



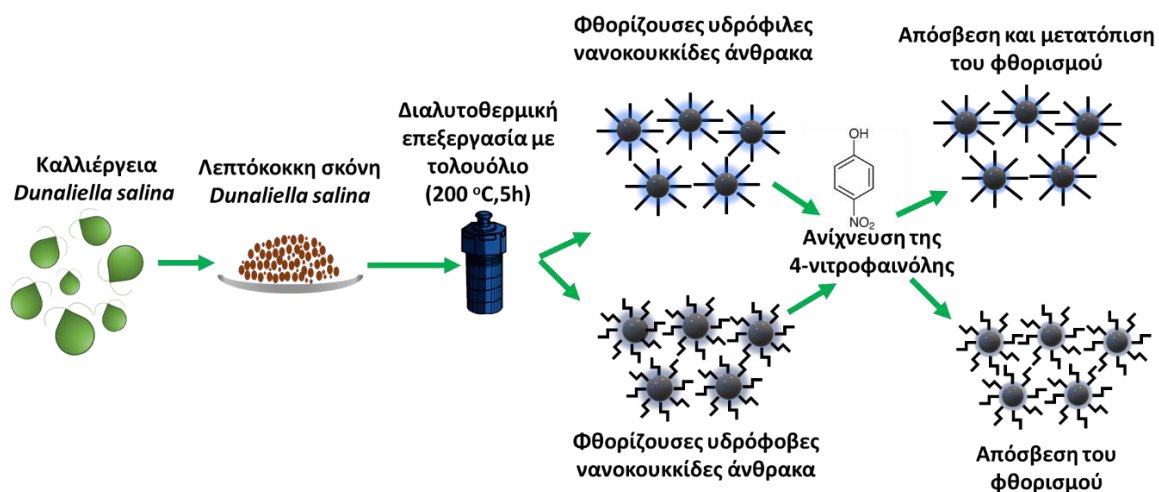
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΥΔΡΟΦΙΛΩΝ ΚΑΙ ΥΔΡΟΦΟΒΩΝ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΩΝ
ΝΑΝΟΚΟΥΚΚΙΔΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΥΣ
DUNALIELLA SALINA ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥΣ ΩΣ
ΝΑΝΟΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΤΗΣ 4-ΝΙΤΡΟΦΑΙΝΟΛΗΣ**



ΣΚΟΛΑΡΙΚΗ ΘΩΜΑΪΣ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ

2022

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Σύνθεση υδρόφιλων και υδρόφοβων φθοριζουσών
νανοκουκκίδων άνθρακα με χρήση του μικροφύκου *Dunaliella
salina* και εφαρμογή τους ως νανοανιχνευτές της 4-
νιτροφαινόλης**

ΣΚΟΛΑΡΙΚΗ ΘΩΜΑΪΣ

ΧΗΜΙΚΟΣ

A.M.:1320

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Σταλίκας Κωνσταντίνος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σταλίκας Κωνσταντίνος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Σακκάς Βασίλειος

Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γκιώκας Δημοσθένης

Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ιωάννινα

2022

«Το παρόν δεν είναι ένα εν δυνάμει παρελθόν.

Είναι η στιγμή της επιλογής και της δράσης.»

Σιμόν ντε Μποβουάρ, 1908-1986

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	16
1.1. Εισαγωγή στην επιστήμη των νανοϋλικών.....	16
1.1.1. Ορισμός νανοϋλικών	16
1.1.2. Ταξινόμηση νανοϋλικών	17
1.1.2.α. Με βάση τη δομή τους	18
1.1.2.β. Με βάση τις διαστάσεις τους.....	19
1.1.2.γ. Με βάση την προέλευσή τους	21
1.1.3.Τρόποι σύνθεσης νανοϋλικών.....	21
1.1.4. Εφαρμογές των νανοϋλικών	23
1.2. Νανοκουκκίδες άνθρακα.....	23
1.2.1. Σύντομη εισαγωγή	23
1.2.2. Ταξινόμηση των νανοκουκκίδων άνθρακα.....	24
1.2.3. Οι ιδιότητες των νανοκουκκίδων άνθρακα	26
1.2.4. Η ιδιότητα του φθορισμού των νανοκουκκίδων	27
1.2.5. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της ιδιότητας του φθορισμού των νανοκουκκίδων άνθρακα.....	29
1.2.6. Σύνθεση των νανοκουκκίδων άνθρακα	30
1.2.6.α. Διαλυτοθερμική μέθοδος σύνθεσης.....	30
1.2.7. Φυσικά υλικά ως πρόδρομες ενώσεις	31
1.2.8. Τα μικροφύκη ως πηγή άνθρακα για τη σύνθεση νανοκουκκίδων	31
1.2.8.α. <i>Dunaliella salina</i>	32
1.3. Η παρουσία οργανικών ρύπων στα υδάτινα συστήματα	34
1.3.1. Η 4-νιτροφαινόλη και οι επιπτώσεις της.....	35
1.3.2. Δομή και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της 4-νιτροφαινόλης	35
1.3.3. Άλλες χρήσεις και ιδιότητες της 4-νιτροφαινόλης	36
1.3.3.α. Δείκτης pH	36
1.3.3.β. Δείκτης ενζυμικής δραστηριότητας.....	37
1.4. Επιπτώσεις των νανοϋλικών στο περιβάλλον	37
1.5. Τα νανοϋλικά στα υδάτινα συστήματα	37
1.6. Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	38

1.6.1. Το Zebrafish ως πειραματικό μοντέλο.....	39
ΣΚΟΠΟΣ	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	42
2.1. Αντιδραστήρια - Διαλύτες - Υλικά :.....	42
2.1.1. Μελέτη εκλεκτικότητας.....	42
2.1.2. Διαλύματα.....	42
2.2. Όργανα και συσκευές.....	43
2.3. Καλλιέργεια <i>Dunaliella salina</i>	45
2.4. Σύνθεση νανοκουκκίδων άνθρακα	45
2.5. Φασματοσκοπία UV – Vis.....	46
2.6. Φασματοσκοπία IR (FTIR)	46
2.7. Φασματοφθορισμομετρία.....	47
2.8. Υδροδυναμικό μέγεθος και ζήτα δυναμικό	47
2.9. Φασματοσκοπία με ακτίνες X (X-ray photoelectron spectroscopy) ...	48
2.10. Μέτρηση κβαντικής απόδοσης.....	48
2.11. Μελέτη σταθερότητας των διαλυμάτων νανοκουκκίδων άνθρακα ..	49
2.12. Μελέτη φωτοσταθερότητας των διαλυμάτων νανοκουκκίδων	49
2.13. Αναλυτική πορεία προσδιορισμού της 4-νιτροφαινόλης.....	49
2.14. Προετοιμασία πραγματικών δειγμάτων	50
2.15. Έλεγχος τοξικότητας.....	51
2.15.1. Ηθική	51
2.15.2. Διατήρηση και εκτροφή ενήλικων ψαριών Zebrafish.....	51
2.15.3. Έκθεση των εμβρύων Zebrafish σε νανοκουκκίδες άνθρακα	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	54
3.1. Χαρακτηρισμός των νανοκουκκίδων άνθρακα	54
3.1.1. Φασματοσκοπία UV-Vis.....	54
3.1.2. Φασματοσκοπία FT-IR.....	56
3.1.3. Φωτοηλεκτρονική φασματοσκοπία ακτίνων X (XPS).....	57
3.1.4. Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) και επιφανειακό φορτίο ...	59
3.1.5. Φθορισμομετρική μελέτη.....	59
3.1.6. Μελέτη σταθερότητας φθορισμού	60
3.2. Φθορισμομετρικός προσδιορισμός της 4-νιτροφαινόλης – Μελέτη εκλεκτικότητας.....	62
3.3. Αναλυτικά δεδομένα φθορισμομετρικού προσδιορισμού της 4-νιτροφαινόλης	66
3.3.1. Υδρόφιλες νανοκουκκίδες άνθρακα	66
3.3.2. Υδρόφοβες νανοκουκκίδες άνθρακα.....	68

3.3.3. Μηχανισμός απόσβεσης φθορισμού των υδρόφιλων νανοκουκκίων άνθρακα	70
3.4. Τοξικότητα στο Zebrafish.....	75
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	78
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	79

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Κλίμακα μεγεθών διάφορων υλικών, ενώσεων και δομών.....	17
Εικόνα 3: Παραδείγματα νανοϋλικών με βάση τις διαστάσεις.....	21
Εικόνα 4: Παρουσίαση των δύο βασικών μεθόδων σύνθεσης νανοϋλικών, Top-down και Bottom-up.....	22
Εικόνα 5: Τομείς εφαρμογών των νανοϋλικών και αντίστοιχα παραδείγματα.	23
Εικόνα 6: Ταξινόμηση φθορίζουσών νανοκουκκίδων : SQDs (Semiconductor Quantum Dots, GQDs (Graphene Quantum dots) και CNDs (Carbon Nanodots).....	26
Εικόνα 7: Εικονική απεικόνιση του φθορισμού μιας νανοκουκκίδας άνθρακα.	29
Εικόνα 8: Στο επάνω μέρος της εικόνας φαίνεται ένα πράσινο κύτταρο <i>D. salina</i> με έναν χλωροπλάστη που περιέχει τη θυλακοειδή μεμβράνη συμπιεσμένη σε συγκεκριμένες περιοχές. Το πυρηνοειδές φαίνεται επίσης στο εσωτερικό των χλωροπλάστων. Στο συγκεκριμένο στέλεχος φαίνονται και μερικά μεμονωμένα σφαιρίδια β-καροτενίου (βCGs). Στο κάτω μέρος της εικόνας φαίνεται ένα πορτοκαλί κύτταρο στο οποίο ο χλωροπλάστης είναι γεμάτος με σφαιρίδια β-καροτενίου. Η περικυτταρική μήτρα και των δύο κυττάρων περιβάλλεται από τις φλαγέλλες.	33
Εικόνα 9: (i) Η λίμνη Hiller στην Αυστραλία, στην οποία επιβιώνει η <i>Dunaliella salina</i> εξαιτίας της υπερβολικής συγκέντρωσης άλατος που τη χαρακτηρίζει και (ii) η <i>Dunaliella salina</i> μέσα από μικροσκόπιο.	34
Εικόνα 10: (i) Συντακτικός τύπος της 4-NP και (ii) Η 4-NP σε στερεή μορφή.	36
Εικόνα 11: (i) Θηλυκό και (ii) αρσενικό <i>D. rerio</i>	39
Εικόνα 12: Αυτόκλειστο σκεύος με εσωτερικό δοχείο Teflon στο οποίο πραγματοποιήθηκε η διαλυτοθερμική σύνθεση.....	44
Εικόνα 13: (i) Τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας 24 πηγαδιών, (ii) Στερεομικροσκόπιο Olympus SZ61 (Πηγή: www.olympus-lifescience.com)..	44
Εικόνα 14: Σύστημα αναπαραγωγής ISPAWN-S (Πηγή: www.tecniplast.it)	45
Εικόνα 15: (i) Perkin Elmer FT-IR spectrometer SPECTRUM TWO, (ii) Shimadzu UV-2100 και (iii) FS5 Edinburgh.....	47
Εικόνα 16: ZebTEC, Aquatics Zebrafish Housing System (Πηγή: www.tecniplast.it)	52
Εικόνα 17: Πειραματική απεικόνιση της έκθεσης των Zebrafish στις νανοκουκκίδες άνθρακα.....	53

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Συγκεντρώσεις και είδος των νανοκουκκίδων άνθρακα στις οποίες εκτέθηκε το Zebrafish.....	53
Πίνακας 2: Ποσοστιαία ανάλυση της περιεκτικότητας των χαρακτηριστικών ομάδων άνθρακα και αζώτου για τα δύο είδη νανοκουκκίδων.	59
Πίνακας 3: Ανακτήσεις από πραγματικά δείγματα για τις υδρόφιλες νανοκουκκίδες άνθρακα για τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις 4-νιτροφαινόλης.	68
Πίνακας 4: Ανακτήσεις από πραγματικά δείγματα με τη χρήση υδρόφοβων νανοκουκκίδων άνθρακα για τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις 4-νιτροφαινόλης.	70

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

QDs: quantum dots/κβαντικές κουκκίδες
CQDs: carbon quantum dots/κβαντικές κουκκίδες άνθρακα
GQDs: graphene quantum dots/κβαντικές κουκκίδες γραφενίου
NDs: nanodots/νανοκουκκίδες
CNDs: carbon nanodots/νανοκουκκίδες άνθρακα
4-NP: 4-nitrophenol/4-νιτροφαινόλη
2-NP: 2-nitrophenol/2-νιτροφαινόλη
λ_{ex}: μήκος κύματος διέγερσης
λ_{em}: μήκος κύματος εκπομπής

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών (ΠΜΣ) του Τμήματος Χημείας, με κατεύθυνση: «*Αναλυτική Χημεία, Χημεία και Τεχνολογία Περιβάλλοντος και Τροφίμων*», υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Κωνσταντίνου Σταλικά κατά την περίοδο 2019-2022.

Ξεκινώντας θα ήθελα να ευχαριστήσω κάποιους ανθρώπους που με την πολύτιμη βοήθεια και συμβολή τους έπαιξαν καταλυτικό ρόλο στη διεκπεραίωση αυτής της προσπάθειας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω αρχικά στον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Κωνσταντίνο Σταλικά, αρχικά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, δεχόμενος να συμμετάσχω στην ερευνητική του ομάδα και στη συνέχεια για τη καθημερινή υποστήριξη και βοήθειά του. Με την επιμονή, τη ψυχραιμία, τις επιστημονικές του παρατηρήσεις και την πάντα αισιόδοξη διάθεση, αποτέλεσε για εμένα κινητήριο δύναμη, ακόμη και τις πιο δύσκολες μέρες. Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδάκτορα Θεόδωρο Χατζημητάκο, για τη συνεχή πρακτική βοήθεια, εκπαίδευση και ενημέρωση που μου παρείχε όποτε, αυτό ζητήθηκε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου Ζωολογίας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και ιδιαίτερα τον καθηγητή Ιωάννη Λεονάρδο και την υποψήφια διδάκτορα Αικατερίνη Θεμελή για την ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφεραν όλο αυτό το διάστημα. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ερευνήτρια Αθανασία για την πολύτιμη βοήθειά της, την κ. Λαμπρινή Συγκέλου για τη μελέτη και ερμηνεία των δειγμάτων μέσω φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων Χ.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Γκιώκα Δημοσθένη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σακκά Βασίλειο, για το γεγονός ότι δέχθηκαν να είναι μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής του μεταπτυχιακού μου, καθώς και για τις καίριες υποδείξεις και τις διορθώσεις τους πάνω στο κείμενο της εργασίας.

Ευχαριστίες, επίσης, οφείλω σε όλα τα μέλη ΔΕΠ και ΕΔΙΠ του τομέα Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και ιδιαίτερα στον καθηγητή κ. Μάμαντο Προδρομίδα και όλα τα μέλη της

ερευνητικής του ομάδας για το ευχάριστο κλίμα και την αρμονική συνύπαρξη στο εργαστηριακό περιβάλλον.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου, Αλκιβιάδη, Γεωργία, Δήμητρα, Φοίβη, Ελευθερία, Ιωάννα, Καλλιρόη, Ιωάννη, Άννη και Άλκη, που γνώρισα και συνεργάστηκα κατά τη διάρκεια των σπουδών για όλες τις όμορφες μέρες και εμπειρίες που μοιραστήκαμε.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω ξεχωριστές ευχαριστίες σε όλα τα μέλη της οικογένειάς μου, τους φίλους μου και τον τετράποδο φίλο μου για την ηθική συμπαράσταση που μου προσέφεραν, προκειμένου να ολοκληρώσω τις σπουδές μου και γενικότερα τους στόχους μου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

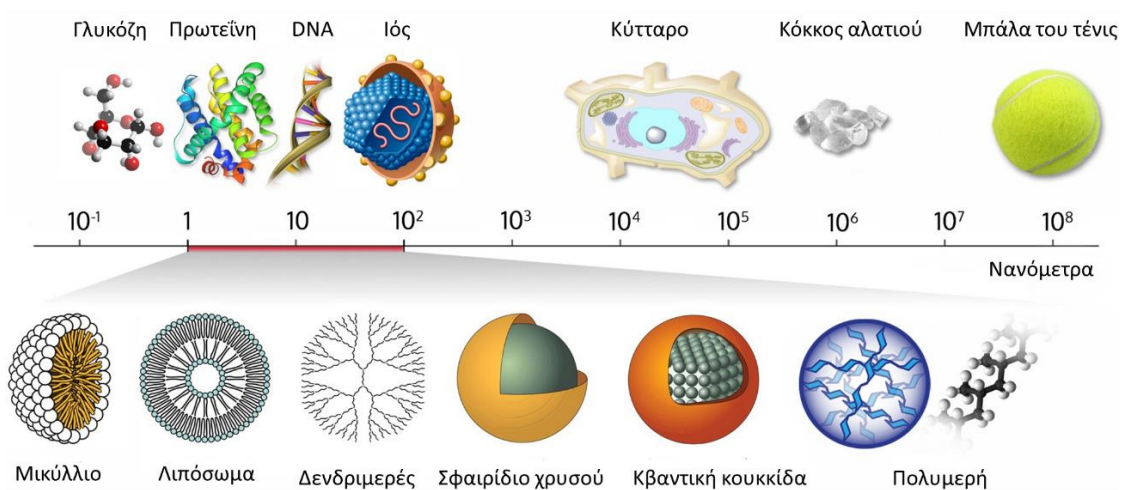
1.1. Εισαγωγή στην επιστήμη των νανοϋλικών

Η πρώτη αναφορά στην νανοεπιστήμη πραγματοποιήθηκε το 1959. Στο ετήσιο συνέδριο της Αμερικανικής Ένωσης Φυσικών (American Physical Society), ο φυσικός Richard Feynman παρουσίασε την ομιλία του με τίτλο «*There's plenty of room at the bottom - An invitation to enter a new field of physics*», κατά την οποία δόθηκε για πρώτη φορά έμφαση στη νανοτεχνολογία, που μέχρι τότε δεν είχε ξανά ειπωθεί.[1] Το 1974, και πλέον επίσημα, ο όρος της νανοτεχνολογίας χρησιμοποιήθηκε για την αναφορά σε σύνθεση ημιαγωγών, διαστάσεων νανοκλίμακας από τον Norio Taniguchi.

Συνολικά πλέον, με τον όρο νανοεπιστήμη και νανοτεχνολογία εννοούμε αυτά τα επιστημονικά πεδία που ασχολούνται με διεργασίες σύνθεσης, χαρακτηρισμού και χρήσης των υλικών αυτών σε διάφορους κλάδους. [2]

1.1.1. Ορισμός νανοϋλικών

Τα νανοϋλικά, σήμερα, αποτελούν μία σχετικά νέα τάση στην επιστήμη των υλικών και πιο συγκεκριμένα στη νανοεπιστήμη. Σύμφωνα με τον επίσημο ορισμό της Ευρωπαϊκής Επιτροπής Περιβάλλοντος (European Commissioner for the Environment), ως νανοϋλικά ορίζονται τα φυσικά, τυχαία ή κατασκευασμένα υλικά, που περιέχουν σωματίδια σε αδέσμευτη κατάσταση, ως συσσωματώματα, ή ως ένα συσσωμάτωμα, όπου το 50% ή περισσότερο των σωματιδίων, έχουν μία ή περισσότερες εξωτερικές διαστάσεις που να ανήκει στην νανοκλίμακα, δηλαδή μεταξύ 1 nm και 100 nm. Μπορούν να απαντηθούν και με άλλες ονομασίες όπως νανοσωματίδια [nanosized particles (NPs)<100 nm σε αεροδυναμική διάμετρο] ή ως εξαιρετικά λεπτά σωματίδια (ultrafine particles). Στην **Εικόνα 1** φαίνεται η σχέση μεγέθους συγκρινόμενη με άλλα υλικά και δομές. [2,3]



Εικόνα 1: Κλίμακα μεγεθών διάφορων υλικών, ενώσεων και δομών.

Το ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον των ερευνητών για τα νανοϋλικά φαίνεται να οφείλεται στις πολλές και αξιοσημείωτες ιδιότητες που τα χαρακτηρίζουν, όπως οι οπτικές, οι φυσικές, οι μηχανικές, οι χημικές, οι βιολογικές και οι θερμικές. Οι ιδιότητες αυτές και οι διαφορετικές συμπεριφορές που μπορούν αυτά να παρουσιάζουν οφείλονται κυρίως σε επιφανειακά και κβαντικά φαινόμενα, εξαιτίας του μεγέθους τους.

Επομένως, συνθέτοντας νανοϋλικά με κάποιες ή και όλες από τις παραπάνω ιδιότητες, οδεύουμε στην ουσία στην ανάπτυξη τεχνητών υλικών που μπορούν να συμμετέχουν σε χημικές διαδικασίες όπως η κατάλυση, η ανίχνευση, η διασπορά, η μελέτη τοξικότητας, κ.α. Αυτά τα εξαιρετικά εργαλεία, πλέον, βρίσκουν άμεση εφαρμογή σε τομείς όπως την Αναλυτική Χημεία, τη Χημεία Τροφίμων, τη Φαρμακολογία, τη Βιοαπεικόνιση και πολλούς άλλους. [4-6]

1.1.2. Ταξινόμηση νανοϋλικών

Τα νανοϋλικά μπορούν να διακριθούν με βάση τη δομή τους, με βάση τη διάσταση στην οποία ανήκουν (μέγεθος) και με βάση την προέλευσή τους.

1.1.2.α. Με βάση τη δομή τους

Η δομή των νανοϋλικών παίζει καθοριστικό ρόλο στις τελικές ιδιότητες αυτών. Έτσι, ως προς τη δομή και τη σύσταση τους τους μπορούν να ταξινομηθούν στις εξής κατηγορίες:

- Νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα. Οι βασικότερες κατηγορίες νανοϋλικών άνθρακα περιλαμβάνουν το γραφένιο, τα φουλερένια, τις νανοκουκκίδες άνθρακα και τους νανοσωλήνες. Το γραφένιο, το οποίο αποτελείται από λεπτά φύλλα ατόμων άνθρακα, μπορεί μέσω της αναδίπλωσης και ευθυγράμμισης των φύλλων του να μας δώσει νανοσωλήνες άνθρακα. Ακόμη, μέσω σφαιρικής αναδίπλωσης μπορούν να προκύψουν τα φουλερένια. Τέλος, η διάτμησης γραφενίου ή και άλλες πορείες που θα συζητηθούν παρακάτω συμβάλλουν στο σχηματισμό νανοκουκκίδων άνθρακα. [7-9]
- Νανοϋλικά με βάση τα μέταλλα. Η χρήση μετάλλων μεμονωμένα ή συνδυαστικά για το σχηματισμό νανοϋλικών παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και έχει μελετηθεί εκτενώς. Χάρη στις πολλές οπτικές και ηλεκτρονικές ιδιότητες των μετάλλων και δη των ευγενών μετάλλων, που αποτελούν αποτέλεσμα του φαινομένου του συντονισμού επιφανειακών πλάσμονιών (surface plasmon resonance, SPR), τα συγκεκριμένα νανοϋλικά βρίσκουν άμεση εφαρμογή σε πολλά ερευνητικά πεδία. Κάποιες από τις εφαρμογές που έχουν ήδη αναφερθεί αφορούν την κατάλυση, τη μεταφορά φαρμάκων και την εξυγίανση υδάτων. Στην κατηγορία αυτή, ανήκουν, επίσης, και τα οξειδία μετάλλων, τα οποία παρουσιάζουν, επίσης, ενδιαφέρουσες ιδιότητες και βρίσκουν εφαρμογές στη φωτοκατάλυση ή σε UV φίλτρα αντηλιακών, όπως το TiO_2 . [10]
- Νανοϋλικά ημιαγωγών. Τα συγκεκριμένα νανοϋλικά έχουν συνήθως μέγεθος μικρότερο των 10-20 nm, και οι οπτικές τους ιδιότητες καθορίζονται από την κβαντομηχανική. Προκύπτουν από το συνδυασμό μετάλλων ή μεταλλοειδών με αμέταλλα, με κύριο χαρακτηριστικό τους την ηλεκτρική αγωγιμότητα και το ευρύ ενεργειακό χάσμα μεταξύ των ζωνών (bandgap). Αναλόγως λοιπόν της ικανότητας ρύθμισης του ενεργειακού χάσματος (bandgap tuning), τα υλικά αυτά εμφανίζουν ποικιλία ιδιοτήτων.

Με τη μείωση του μεγέθους του κρυστάλλου του ημιαγωγού, έχει παρατηρηθεί η εμφάνιση σπουδαίων κβαντικών φαινομένων και τα υλικά χαρακτηρίζονται ως κβαντικές κουκκίδες (QDs). Τα υλικά αυτά παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε εφαρμογές που αφορούν την ανάλυση και τη βιοαπεικόνιση. [11]

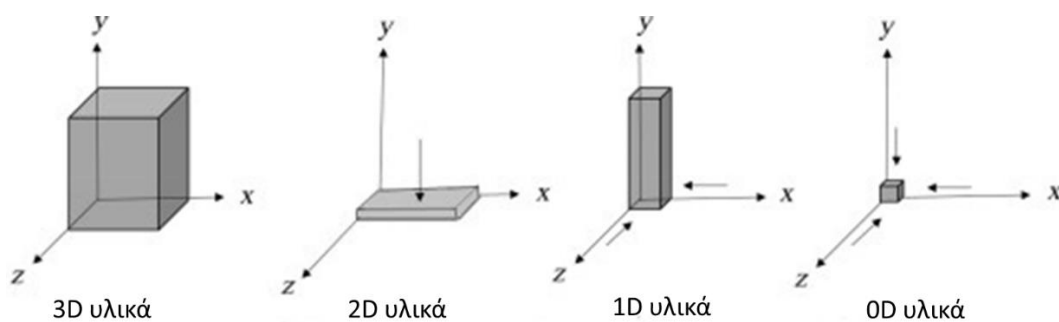
- Δενδριμερή. Πρόκειται για δομές που αποτελούνται από διακλαδισμένες μονάδες πολυμερών, οι οποίες σχηματίζονται από μονομερή με πολύ μικρό μέγεθος. Τα πολυμερή συνήθως σχηματίζουν στο χώρο ακτίνες, που απλώνονται από έναν σφαιρικό πυρήνα προς τα έξω. Η επιφάνειά τους μπορεί να τροποποιηθεί και να παρουσιάσει συγκεκριμένες χημικές ιδιότητες. Κάποια τρισδιάστατα δενδριμερή που έχουν ήδη βρει εφαρμογή σε βιολογικά συστήματα, φαίνεται να διαθέτουν εσωτερικές κοιλότητες εντός του δικτύου πολυμερών τους, με αποτέλεσμα να μπορούν να μεταφέρουν μόρια, όπως τα φάρμακα. Επίσης, σημαντικές ιδιότητες όπως η υδατοδιαλυτότητα, η ομοιόμορφη κατανομή τους στο χώρο και η ικανότητα τροποποίησης τους τα καθιστούν νανοδομές με ικανοποιητική βιοσυμβατότητα. [12]
- Σύνθετα νανοϋλικά. Πρόκειται για τρισδιάστατα νανοϋλικά τα οποία σχηματίζονται από πρωταρχικά υλικά που έχουν ως βάση τους τα νανοϋλικά. Είναι πολυφασικά υλικά που έχουν κύρια μήτρα πολυμερή όπως εποξικά, νάιλον, πολυεποξειδία, κεραμικά και μέταλλα. [13]

1.1.2.β. Με βάση τις διαστάσεις τους

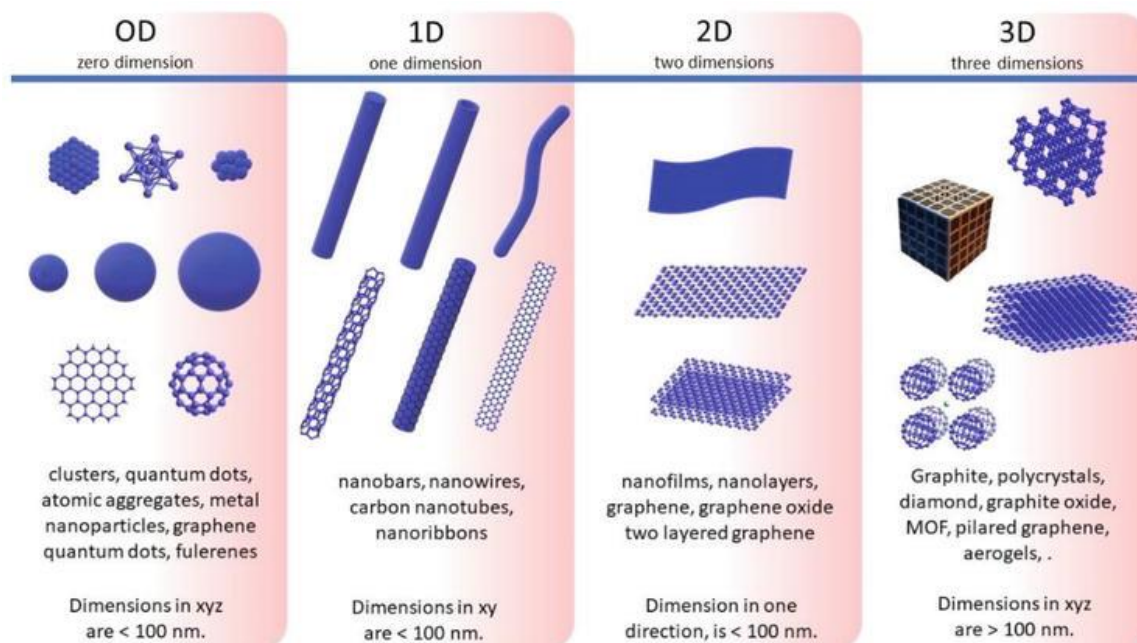
Ως προς το μέγεθος τους, τα νανοϋλικά μπορούν να ταξινομηθούν σε υλικά μηδενικής διάστασης (0-D), μονοδιάστατα υλικά (1-D), δισδιάστατα υλικά (2-D) και τρισδιάστατα υλικά (3-D). Πιο συγκεκριμένα:

- Υλικά μηδενικής διάστασης (0-D). Θεωρούνται αυτά που και οι τρεις διαστάσεις τους ανήκουν στη νανοκλίμακα (1-100 nm). Συνήθως αυτά τα υλικά έχουν σφαιρικό σχήμα (με εξαίρεση κάποιες κυβικές και πολυγωνικές δομές) και η διάμετρος τους κυμαίνεται μεταξύ 1 και 50 nm. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα και οι νανोकουκκίδες.

- Μονοδιάστατα υλικά (1-D), θεωρούνται αυτά τα οποία μόνο η μία από τις τρεις διαστάσεις τους ξεπερνάει τη νανοκλίμακα. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι νανοϊνες, οι νανοράβδοι και οι νανოსωλήνες μετάλλων, οξειδίων ή άλλων υλικών. Τα υλικά αυτά μπορεί να έχουν μήκος αρκετών μικρομέτρων και διάμετρο στη κλίμακα των νανομέτρων.
- Δισδιάστατα υλικά (2-D), θεωρούνται αυτά τα οποία οι δύο από τις τρεις διαστάσεις τους ξεπερνάει τη νανοκλίμακα. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν υλικά όπως τα φύλλα, οι πλάκες και τα νανοφιλμ. Αν και το εμβαδόν τους μπορεί να είναι μερικά τετραγωνικά μικρόμετρα, το πάχος τους δε ξεπερνά τις διαστάσεις νανοκλίμακας.
- Τρισδιάστατα υλικά (3-D), θεωρούνται αυτά τα οποία και οι τρεις διαστάσεις τους ξεπερνούν τα 100 nm. Ωστόσο, τα δομικά τους στοιχεία ως μονάδες δε ξεπερνούν τα 100 nm. [14,15]



Εικόνα 2: Η ταξινόμηση των νανοϋλικών με βάση τις διαστάσεις τους.



Εικόνα 2: Παραδείγματα νανοϋλικών με βάση τις διαστάσεις.

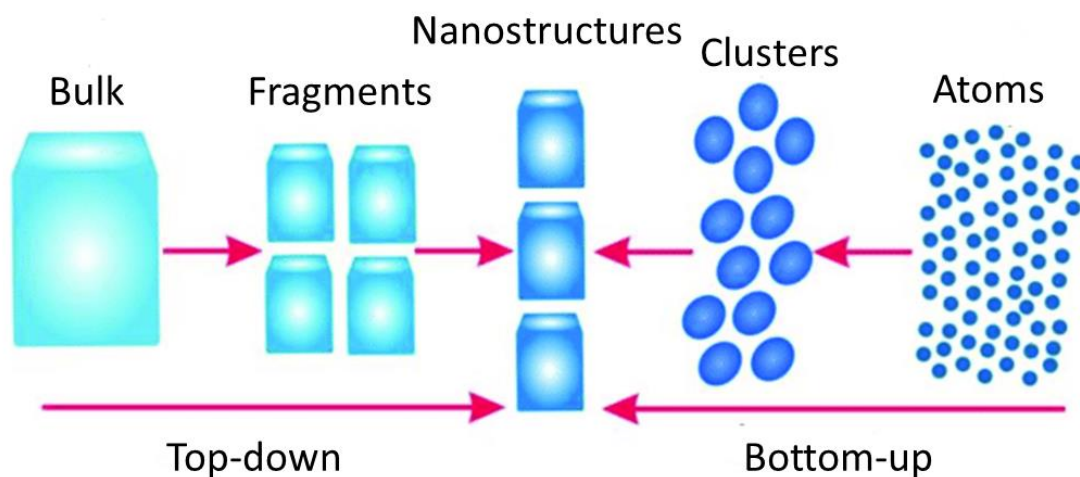
1.1.2.γ. Με βάση την προέλευσή τους

Παρ' όλο που ο όρος νανοτεχνολογία έγινε γνωστός από το 1970 και έπειτα, τα νανοϋλικά είναι πλέον ξεκάθαρο πως προϋπήρχαν. Εκτός από αυτά που αποτελούν προϊόν ανθρώπινης σύνθεσης, τα νανοϋλικά μπορούν να προκύψουν από φυσικά αίτια και φαινόμενα στο περιβάλλον και από φυσικές πηγές. Τέτοιες πηγές μπορούν να είναι για παράδειγμα η ανόργανη τέφρα που σχηματίζεται έπειτα από ηφαιστειακή δραστηριότητα, τμήματα θραυσμάτων πετρωμάτων που προέκυψαν από θαλάσσια κύματα και τέφρα έπειτα από δασικές πυρκαγιές. Ακόμη, νανοϋλικά μπορούν να προκύψουν από βιολογικά μόρια ή δομικά συστατικά οργάνων ζώντων οργανισμών, φυσικά υλικά όπως καρποί, φυτά, μικροφύκη, μύκητες και ακόμη νανοϋλικά από παραπροϊόντα ανθρώπινης δραστηριότητας, όπως κινητήρες καύσης. [14]

1.1.3.Τρόποι σύνθεσης νανοϋλικών

Υπάρχουν δύο βασικές μέθοδοι συνθετικών πορειών, οι οποίες χωρίζονται σε υποκατηγορίες διάφορων τρόπων με τους οποίους μπορεί να πραγματοποιηθεί, εν τέλη, η σύνθεση των νανοϋλικών.

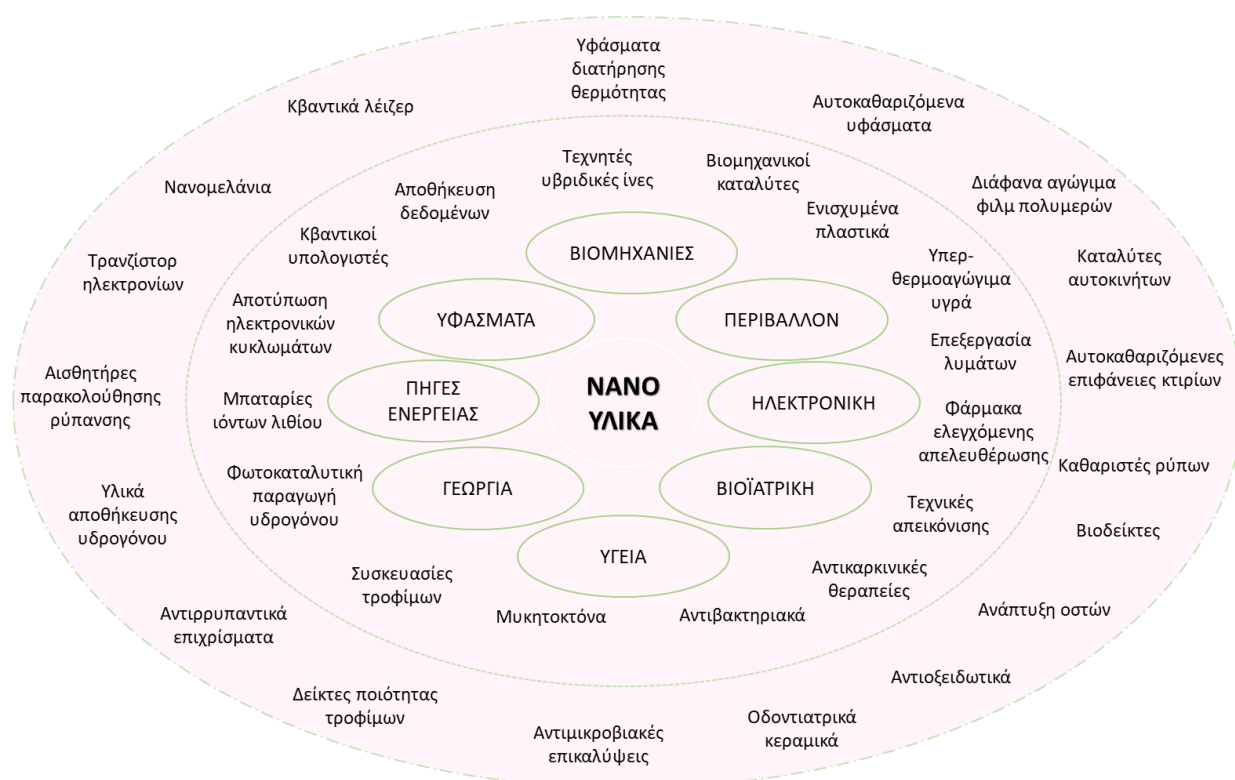
- Οι “top-down” μέθοδοι σύνθεσης στηρίζονται στον κατακερματισμό και την κονιοποίηση μεγαλύτερων υλικών σε μικρότερες μονάδες, που στην συνέχεια μετατρέπονται στην τελική και επιθυμητή τους δομή (νανοκουκκίδες). Για παράδειγμα, ογκώδεις δομές άνθρακα, μπορούν να μετατραπούν σε μικρότερες δομές όπως είναι ο γραφίτης ή οι νανοσωλήνες, προς νανοκουκκίδες άνθρακα. Πρόκειται για φθηνές και εύκολες τεχνικές. Στις μεθόδους αυτές συγκαταλέγονται η χρήση laser, η εκκένωση τόξου άνθρακα ή ηλεκτροχημικές τεχνικές.
- Οι “bottom-up” μέθοδοι οδηγούν στη σύνθεση νανοκουκκίδων άνθρακα χρησιμοποιώντας μικρές πρόδρομες ενώσεις. Πρόκειται για έναν μηχανισμό ο οποίος στηρίζεται στην πυρήνωση και την ανάπτυξη ατόμων, από μια σταθερή διασπορά σε νανοδομές, με ελεγχόμενο μέγεθος και κατανομή. Πλέον αυτές οι συνθέσεις είναι γνωστές σε κλάδους όπως η πράσινη χημεία και η βιοχημική σύνθεση. Τέτοιοι μέθοδοι είναι η υδατοθερμική σύνθεση, η διαλυτοθερμική σύνθεση ή σύνθεση έπειτα από χρήση μικροκυμάτων. Οι πρόδρομες ενώσεις μπορούν να είναι υδατάνθρακες, άλατα, υλικά πολυμερισμού και φυσικές πρόδρομες ενώσεις. [16,17]



Εικόνα 3: Παρουσίαση των δύο βασικών μεθόδων σύνθεσης νανοϋλικών, Top-down και Bottom-up.

1.1.4. Εφαρμογές των νανοϋλικών

Η ταχεία ανάπτυξη και η ευρεία χρήση των νανοϋλικών τα καθιστούν σπουδαίο εργαλείο όχι μόνο στους διάφορους επιστημονικούς κλάδους αλλά και στον παγκόσμιο βιομηχανικό τομέα. Πέρα από τα ερευνητικά εργαστήρια, τα νανοϋλικά βρίσκουν εφαρμογή στην καθημερινότητα μέσω της κοσμητολογίας, της συσκευασίας και των πρόσθετων τροφίμων, σε αθλητικά ρούχα και υφάσματα και σε πεδία που αφορούν την ενέργεια, τη μηχανική, την ιατρική, τη φαρμακολογία, το περιβάλλον κ.α. [18]



Εικόνα 4: Τομείς εφαρμογών των νανοϋλικών και αντίστοιχα παραδείγματα.

1.2. Νανοκουκκίδες άνθρακα

1.2.1. Σύντομη εισαγωγή

Στην προηγούμενη ενότητα (1.1.) έγινε μια γενικότερη αναφορά στα νανοϋλικά ως προς τον ορισμό τους, την ταξινόμησή τους, τους τρόπους σύνθεσης και τις εφαρμογές τους. Από τις γενικότερες έννοιες προχωράμε στις ειδικότερες, εστιάζοντας και ξεχωρίζοντας τα νανοϋλικά άνθρακα και συγκεκριμένα τις νανοκουκκίδες άνθρακα.

Η ιδιαιτερότητα λοιπόν των υλικών με βάση τον άνθρακα που ανήκουν παράλληλα και στη κλίμακα των νανομέτρων στηρίζεται στις σπουδαίες φυσικοχημικές και ηλεκτροχημικές ιδιότητες που τα χαρακτηρίζουν. Ακόμη, άλλα σημαντικά χαρακτηριστικά είναι η χαμηλή τοξικότητα που παρουσιάζουν (σε σχέση με τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα), η χημική τους αδράνεια, η πληθώρα πρότυπων υλών για τη σύνθεση τους, οι οπτικές τους ιδιότητες, η βιοσυμβατότητα κλπ. Έτσι, μέχρι σήμερα έχουν χρησιμοποιηθεί σε αναρίθμητες εφαρμογές σε τομείς όπως η ανάλυση, η περιβαλλοντική χημεία, στην ενέργεια, στην πληροφορική, στη χημεία τροφίμων και στη βιοϊατρική.

Ως νανοκουκκίδες άνθρακα ορίζονται τα νανოსωματίδια μηδενικής διάστασης με βάση τον άνθρακα, των οποίων η διάμετρος δε ξεπερνά τα 10 nm. [19]

1.2.2. Ταξινόμηση των νανοκουκκίδων άνθρακα

Η ευρεία σύνθεση και μετέπειτα χρήση των διάφορων τύπων νανοκουκκίδων επιβάλλει την ανάγκη για μια γενική κατηγοριοποίηση αυτών σε διάφορους υπάρχοντες τύπους. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στις φθορίζουσες νανοκουκκίδες οι οποίες εξετάζονται και στην παρούσα διατριβή. Αν και οι οπτικές ιδιότητες των περισσότερων νανοκουκκίδων είναι παρόμοιες, ο μηχανισμός εκπομπής αυτών μπορεί να είναι αρκετά διαφορετικός.

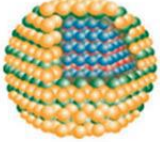
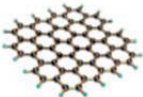
Ο όρος κβαντική κουκκίδα (QD) επινοήθηκε από τον Mark Reed, θέλοντας να αναφερθεί σε νανοςωματίδια ημιαγωγών με μέγεθος λίγων νανομέτρων στην κβαντική περιοχή. Αυτό σημαίνει ότι σε αυτά τα σωματίδια, παρατηρείται το φαινόμενο του κβαντικού περιορισμού, δηλαδή το μέγεθός τους είναι τόσο μικρό ώστε να μπορεί να συγκριθεί με το μήκος κύματος του ηλεκτρονίου. Αποτέλεσμα του φαινομένου είναι τα νανοςωματίδια αυτά να συγκρατούν αρκετά ισχυρά τα ηλεκτρόνια και στις τρεις διαστάσεις. Αργότερα, ο όρος κβαντικές κουκκίδες άνθρακα συνδέθηκε σε διάφορες αναφορές με τα φθορίζοντα νανοςωματίδια άνθρακα. Ο όρος αυτός, όμως, εξακολούθησε να χρειάζεται διευκρινίσεις. Έτσι, κρίνεται απαραίτητο να αποσαφηνιστούν παρακάτω ορισμένοι σημαντικοί όροι.

Στην επιστήμη των νανοϋλικών, ως κουκκίδα ή νανοκουκκίδα αναφέρονται τα σωματίδια μεγέθους νανομέτρου. Κύρια χαρακτηριστικά τους που τις καθιστούν ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες στην έρευνα είναι οι λειτουργικές και οι

δομικές τους ιδιότητες. Ακόμη, ο όρος «κβαντικό» αναφέρεται στην ελεγχόμενη μεταφορά φορτίου λόγω των μικρών διαστάσεων. Επομένως, η γενική χρήση του όρου κβαντικές κουκκίδες αφορά όλους τους τύπους νανοσωματιδίων με κβαντικό περιορισμό, που περιλαμβάνουν τις κβαντικές κουκκίδες ημιαγωγών (SQDs) και τις κβαντικές κουκκίδες με βάση τον άνθρακα (CQDs και GQDs).

Για τον περεταίρω χαρακτηρισμό των κβαντικών κουκκίδων άνθρακα είναι απαραίτητο να εξεταστούν χαρακτηριστικά όπως η διάταξη των ατόμων άνθρακα, η κρυσταλλική δομή του σωματιδίου, οι διαστάσεις κ.ο.κ. Υπάρχουν τρία είδη νανοκουκκίδων με βάση τον άνθρακα. Οι σφαιρικές νανοκουκκίδες ND με άμορφη δομή οι οποίες δεν εμφανίζουν το φαινόμενο του κβαντικού περιορισμού και χαρακτηρίζονται ως νανοκουκκίδες άνθρακα (CNDs). Αν οι νανοκουκκίδες παρουσιάζουν το φαινόμενο του κβαντικού περιορισμού και κρυσταλλική δομή, τότε οδηγούμαστε στις κβαντικές κουκκίδες άνθρακα (CQDs και στις μονοστρωματικές π-συζευγμένες κβαντικές κουκκίδες (GQDs). Πέρα από την παρουσία ή όχι κβαντικών φαινομένων, η ουσιαστικότερη διάκριση των διάφορων ειδών νανοκουκκίδων σχετίζεται με τις πρόδρομες ουσίες που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεσή τους. Έτσι, οι CQDs συντίθενται από οργανικές πρώτες ύλες ή μόρια με πυρόλυση ή από κρυσταλλικά νανοϋλικά άνθρακα οποιουδήποτε είδους (νανοσωλήνες άνθρακα), ενώ οι GQDs συντίθενται αποκλειστικά με τη χρήση ανθρακικών νανοϋλικών ή υλικών με βάση το γραφένιο. [20,21]

Οι νανοκουκκίδες των οποίων το μέγεθος δεν είναι τόσο μικρό, ώστε να παρατηρούνται φαινόμενα κβαντικού περιορισμού, δε χαρακτηρίζονται ως κβαντικές. Οι πολυμερικές ή απλώς νανοκουκκίδες άνθρακα (CNDs) είναι στην πραγματικότητα άμορφα υλικά. Πρόκειται για υλικά που μοιάζουν με σφαιρικά, όπως οι CQDs, τα οποία σχηματίζονται όμως από sp^3 υβριδοποιημένους άνθρακες, σχηματίζοντας ανομοιόμορφο πυρήνα. [22]

ΦΘΟΡΙΖΟΥΖΕΣ ΝΑΝΟΚΟΥΚΚΙΔΕΣ			
ΚΟΥΚΚΙΔΕΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΕΣ ΣΕ ΗΜΙΑΓΩΓΟΥΣ	ΚΟΥΚΚΙΔΕΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΕΣ ΣΕ ΑΝΘΡΑΚΑ		
SQDs	GQDs	CQDs	CNDs
			

Εικόνα 5: Ταξινόμηση φθορίζουσών νανोकουκκίδων : SQDs (Semiconductor Quantum Dots, GQDs (Graphene Quantum dots) και CNDs (Carbon Nanodots).

1.2.3. Οι ιδιότητες των νανोकουκκίδων άνθρακα

Οι ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά των νανोकουκκίδων άνθρακα μπορούν να εξαρτηθούν από ένα πλήθος παραγόντων. Η πηγή σύνθεσης, η μέθοδος σύνθεσης, ο βαθμός κρυσταλλικότητας και η χημική δομή της επιφάνειας μπορούν να επηρεάσουν τη συμπεριφορά και τις ιδιότητες αυτών.

Η μέθοδος σύνθεσης νανोकουκκίδων άνθρακα επηρεάζει σημαντικά τις ιδιότητες που θα έχουν αυτές μετέπειτα. Έτσι, χρησιμοποιώντας την ίδια πρώτη ύλη αλλά αλλάζοντας τη μέθοδο σύνθεσης, προκύπτουν νανोकουκκίδες άνθρακα με διαφορετική δομή και φυσικοχημικές ιδιότητες, εξαιτίας της διαφορετικής επίδρασης που έχει η μέθοδος σύνθεσης στο πρωταρχικό υλικό. Οι διαφορές αυτές μπορούν να αφορούν το μέγεθος, τη διασπορά των νανोकουκκίδων στο νερό και το είδος των ετεροατόμων στην επιφάνεια αυτής. Ακόμη, η τοξικότητα είναι μια ιδιότητα που εξαρτάται αποκλειστικά από τη δομή των ανθράκων στο νανοσωματίδιο.

Τέλος, κάποιες ιδιότητες σχετίζονται αποκλειστικά με τον πυρήνα άνθρακα ενώ άλλες ιδιότητες και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά εξαρτώνται από τη δομή, τα ετεροάτομα και τις λειτουργικές ομάδες στην επιφάνεια των νανोकουκκίδων. Ωστόσο, οι περισσότερες ιδιότητες, όπως και αυτή του φθορισμού, επηρεάζονται τόσο από τον πυρήνα όσο και από τη συνολική δομή του νανοσωματιδίου. [23]

1.2.4. Η ιδιότητα του φθορισμού των νανοκουκκίδων

Οι φθορισμομετρικές ιδιότητες των νανοκουκκίδων άνθρακα αποτελούν, ίσως, το σπουδαιότερο χαρακτηριστικό αυτών, χάρη στο οποίο μπορούν να βρίσκουν εφαρμογή στη βιοαπεικόνιση, στη (βιο)ανίχνευση, στην υποβοηθούμενη χορήγηση (αντικαρκινικών) φαρμάκων, στην παράδοση γονιδίων ή/και πρωτεϊνών και σε πειράματα φωτοκατάλυσης. Ο βασικότερος λόγος για τον οποίο οι νανοκουκκίδες άνθρακα μπορούν να συμμετέχουν στις παραπάνω εφαρμογές είναι ότι ως ημιαγωγοί που είναι, διαθέτουν μετρήσιμο ενεργειακό χάσμα (non-zero bandgap), γεγονός που τις κάνει να φθορίζουν.

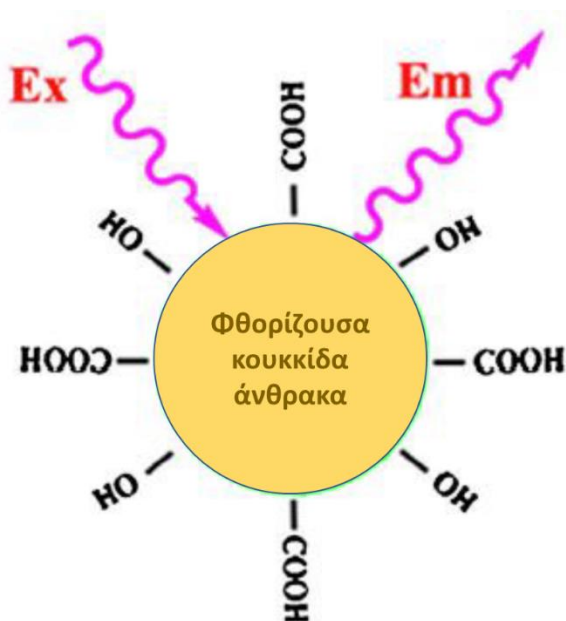
Πιο ειδικά, οι νανοκουκκίδες άνθρακα μπορούν να απορροφούν και να εκπέμπουν ακτινοβολία σε μεγάλο εύρος μήκους κύματος. Το πιο σύνηθες είναι να εμφανίζουν ισχυρή απορρόφηση ακτινοβολίας στην περιοχή του υπεριώδους, κυρίως μεταξύ των 270 nm και 320 nm. Το μήκος κύματος που εκπέμπουν εξαρτάται από το αντίστοιχο μήκος κύματος της διέγερσης (λ_{ex}). Ωστόσο, τις περισσότερες φορές, έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση του μήκους κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης προκαλεί την αύξηση του μήκους κύματος της ακτινοβολίας εκπομπής, ενώ ταυτόχρονα μειώνεται η ένταση της τελευταίας. Έχει διαπιστωθεί επίσης ότι ορισμένοι παράγοντες επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό το είδος του φθορισμού των νανοκουκκίδων άνθρακα. Τέτοιοι παράγοντες είναι οι χημικές ομάδες στην επιφάνεια των κουκκίδων, το υλικό σύνθεσης, ο τρόπος σύνθεσης, ακόμη και το pH του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται αυτές, εξαιτίας της πρωτονίωσης και αποπρωτονίωσης των επιφανειακών ομάδων που προαναφέρθηκαν. Τέλος, η πλειοψηφία των νανοκουκκίδων άνθρακα φαίνεται να εμφανίζει κυανό ή πράσινο φθορισμό και σπανιότερα ερυθρό.

Στις πιο πρόσφατες έρευνες, έχει διαπιστωθεί ότι καθοριστικό ρόλο στο είδος του φθορισμού των νανοκουκκίδων άνθρακα παίζει η μορφή της επιφάνειας αυτών και έπειτα ο πυρήνας τους. Πιο συγκεκριμένα, οι επιφανειακές λειτουργικές ομάδες που μπορεί να φέρουν οι νανοκουκκίδες, επιδρούν στο ενεργειακό χάσμα και επηρεάζεται εν τέλη ο φθορισμός τους. Μερικές από τις πιο γνωστές λειτουργικές ομάδες είναι οι υδροξυλο-, καρβονυλο-, καρβοξυλο-, αμινο- και επόξυ-ομάδες. Αυτές οι ομάδες έχουν διπλό ρόλο, μπορούν δηλαδή

να συμπεριφέρονται είτε ως άτομα δότες είτε ως άτομα δέκτες ηλεκτρονίων και παράλληλο ενισχύουν την διαλυτότητα των νανοκουκκίδων άνθρακα στο νερό. Εξίσου σημαντική επίδραση στο φθορισμό έχει και η ενίσχυση (doping) της επιφάνειας των νανοκουκκίδων με ετεροάτομα, όπως το άζωτο, το οξυγόνο και το θείο. Οι παραπάνω τροποποιήσεις μπορούν να μεταβάλλουν το μήκος κύματος της εκπομπής (λ_{em}) ακτινοβολίας, την ένταση αυτής αλλά και την κβαντική απόδοση του φθορισμού. Ως κβαντική απόδοση, ορίζεται ο λόγος των φωτονίων που απορροφούνται προς εκείνων που εκπέμπονται από μια φθορίζουσα ένωση/υλικό.

Πέρα από τις ομάδες στην επιφάνεια των νανοκουκκίδων, οι οποίες όπως προαναφέρθηκε, θεωρούνται πρωταρχικός παράγοντας που καθορίζει τις ιδιότητες αυτών, το μέγεθος των σωματιδίων και η πολικότητα του διαλύτη αποτελούν επίσης δύο καθοριστικούς παράγοντες οι οποίοι μπορούν να διαφοροποιήσουν τις ιδιότητες φωταύγειας των νανοκουκκίδων. Περιπτώσεις στις οποίες η φωταύγεια των τελευταίων εξαρτάται από το μέγεθός τους έχουν αναφερθεί, και, μάλιστα, τα υλικά μεγαλύτερου μεγέθους εμφάνισαν μετατόπιση του μήκους κύματος εκπομπής ακτινοβολίας προς μεγαλύτερες τιμές συγκριτικά με τα μικρότερα υλικά.

Σχετικά με το φθορισμό των νανοκουκκίδων άνθρακα, υπάρχουν διάφορες πιθανές αναφορές στο μηχανισμό αυτού, όμως δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Ο φθορισμός στα νανοϋλικά είναι πιθανό να προέρχεται από εξιτόνια άνθρακα, δηλαδή ζεύγη ηλεκτρονίων και οπών, από συστήματα κβαντικού περιορισμού και από αρωματικές δομές που περιέχουν ομάδες οξυγόνου. Ακόμη, φαίνεται ότι ανάλογα το είδος των νανοκουκκίδων, διαφέρει και το είδος τους φθορισμού. Για παράδειγμα, οι νανοκουκκίδες άνθρακα, σε αντίθεση με τις κβαντικές κουκκίδες γραφενίου και άνθρακα, θεωρείται ότι εμφανίζουν φθορισμό που δεν εξαρτάται από το φαινόμενο κβαντικού περιορισμού και κατ' επέκταση ο φθορισμός τους δεν εξαρτάται από το μέγεθος των σχηματιζόμενων νανοκουκκίδων, με αποτέλεσμα ο χρόνος ζωής τους να είναι μικρότερος από ότι στις αντίστοιχες κβαντικές κουκκίδες. Τέλος, η εκπομπή ακτινοβολίας τους χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερο εύρος μηκών κύματος. [25,26]



Εικόνα 6: Εικονική απεικόνιση του φθορισμού μιας νανοκουκκίδας άνθρακα.

1.2.5. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της ιδιότητας του φθορισμού των νανοκουκκίδων άνθρακα

Τα παραπάνω χαρακτηριστικά του φθορισμού που χαρακτηρίζουν τις νανοκουκκίδες άνθρακα τις καθιστούν κατάλληλες για την εφαρμογή τους σε διάφορους επιστημονικούς τομείς. Κυρίως, ο κυανός φθορισμός που τις χαρακτηρίζει φαίνεται πως δεν είναι κατάλληλος για την εφαρμογή σε βιολογικά συστήματα. Αυτό εξηγείται, αν σκεφτεί κανείς ότι τα βιολογικά κύτταρα και οι ιστοί εκπέμπουν επίσης σε μήκος κύματος που αντιστοιχεί στο κυανό. Έτσι, η χρήση φθορίζουσών ουσιών στο κυανό, σε τέτοιες περιπτώσεις, θα προκαλούσε παρεμποδίσεις στο φάσμα εκπομπής ακτινοβολίας. Το εμπόδιο αυτό ξεπερνιέται συνήθως, καθώς οι περισσότερες νανοκουκκίδες άνθρακα χαρακτηρίζονται από εκπομπή ακτινοβολίας μεγάλου μήκους κύματος. Επιπρόσθετα, αυτό το μεγάλο εύρος εκπομπής των νανοκουκκίδων άνθρακα αυξάνει την πιθανότητα να αξιοποιηθούν για την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών συστατικών που προέρχονται από βιολογικά συστήματα.

Πέρα από τα πλεονεκτήματα του μεγάλου εύρους εκπομπής, οι νανοκουκκίδες άνθρακα φαίνεται να εξαρτώνται από το pH του περιβάλλοντος στο οποίο μπορούν να βρεθούν, αποκτώντας με τον τρόπο αυτό ένα ρόλο νανο-ανιχνευτή pH. Επιπρόσθετα, αν τις συγκρίνει κανείς με οργανικές φθορίζουσες

ουσίες, θα διαπιστώσει εύκολα πως χαρακτηρίζονται από μεγάλη φωτοσταθερότητα, κάνοντας έτσι δυνατή την εφαρμογή τους σε συστήματα που απαιτείται συνεχής έκθεση και μελέτη υπό το φως. Η σύστασή τους και πιο συγκεκριμένα το γεγονός ότι κυρίως αποτελούνται από άτομα άνθρακα, οξυγόνου, υδρογόνου και αζώτου, τις καθιστά μη τοξικές, αρκετά ευδιάλυτες και βιοσυμβατές. [27]

1.2.6. Σύνθεση των νανοκουκκίδων άνθρακα

Ο τρόπος με τον οποίο μπορούν να συντεθούν οι νανοκουκκίδες άνθρακα αποτελεί πολύ σημαντικό βήμα και παράγοντα για τις ιδιότητες αυτών που ήδη αναφέρθηκαν. Στο στάδιο αυτό μπορεί να βελτιστοποιηθεί η δομή τους, να ενισχυθεί ή ακόμη και να τροποποιηθεί η επιφάνειά τους με την ενίσχυση άλλων στοιχείων ή ομάδων εκτός του άνθρακα. Η σύνθεση των νανοκουκκίδων άνθρακα στηρίζεται συνολικά σε χημικές, ηλεκτροχημικές και φυσικές τεχνικές. Οι μέθοδοι σύνθεσης των νανοκουκκίδων άνθρακα μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο βασικές κατηγορίες, τις “top-down” και “bottom-up” μεθόδους. Οι τρόποι σύνθεσης έχουν αναφερθεί παραπάνω και ταυτίζονται με τους τρόπους σύνθεσης των νανοϋλικών.

1.2.6.α. Διαλυτοθερμική μέθοδος σύνθεσης

Η διαλυτοθερμική μέθοδος σύνθεσης αποτελεί το βασικό τρόπο σύνθεσης του υλικού στην παρούσα εργασία για αυτό θα αναλυθεί εκτενέστερα. Πρόκειται για τον τρόπο σύνθεσης που πραγματοποιείται έπειτα από υπερθέρμανση των οργανικών πρόδρομων ενώσεων, που βρίσκονται σε διάλυμα με οργανικό διαλύτη, ο οποίος χαρακτηρίζεται από υψηλό σημείο ζέσεως. Το διάλυμα της αντίδρασης βρίσκεται σφραγισμένο μέσα σε Teflon και σε αυτόκαυστο, οπότε σε αυτήν την περίπτωση η αντίδραση διενεργείται υπό υψηλή πίεση. Ύστερα από τη θέρμανση ακολουθεί εκχύλιση και φυγοκέντρωση. Η διαλυτοθερμική επεξεργασία αποτελεί μία απλή μέθοδο σύνθεσης νανοκουκκίδων άνθρακα, της οποίας, όμως, η εφαρμογή περιορίζεται εξαιτίας της τοξικότητας που επιφέρουν οι οργανικοί διαλύτες και τον μεγάλο χρόνο επεξεργασίας σε υψηλή θερμοκρασία. [28]

1.2.7. Φυσικά υλικά ως πρόδρομες ενώσεις

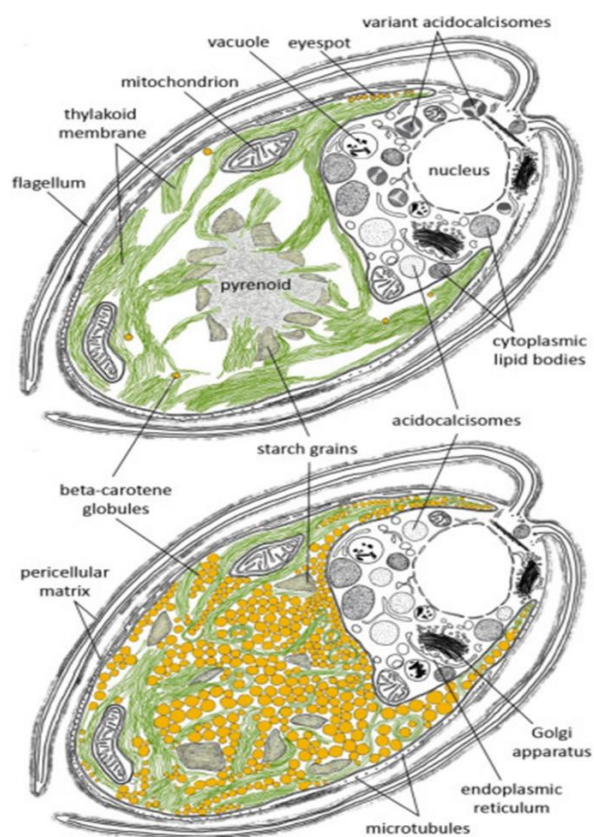
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, κατά τη σύνθεση νανοκουκκίδων άνθρακα με “bottom-up” μεθόδους απαιτείται η χρήση πρόδρομων ή μεγαλύτερων ενώσεων άνθρακα. Η ολοένα αυξανόμενη χρήση των νανοκουκκίδων άνθρακα σε πολλούς τομείς και η παράλληλη ανάγκη για μείωση της τοξικότητας οδήγησε στην αναζήτηση πρόδρομων ενώσεων και υλικών που ρέουν άφθονα από το περιβάλλον, ανοίγοντας με τον τρόπο αυτό ένα σπουδαίο κεφάλαιο στον τομέα της πράσινης χημείας. Οι βασικότεροι λόγοι που κάνουν τα φυσικά ή τα βιολογικά προϊόντα να εμφανίζουν μεγάλο ενδιαφέρον ως πρόδρομες ενώσεις για τη σύνθεση είναι ότι, επί το πλείστο, είναι ανανεώσιμα και οδηγούν σε νανοϋλικά που έχουν καλή βιοσυμβατότητα. Δεύτερον, τα φυσικά και τα βιολογικά προϊόντα περιέχουν ετεροάτομα, διευκολύνοντας τη συνθετική πορεία των νανοκουκκίδων χωρίς να χρειάζεται επιπλέον διαδικασία ενίσχυσης αυτών (doping). Ακόμη, τα φυσικά προϊόντα ως πρόδρομες ενώσεις συνήθως δεν απαιτούν ιδιαίτερη προκατεργασία και μπορούν εύκολα να χρησιμοποιηθούν πράσινοι μέθοδοι σύνθεσης με αυτά. Τέλος, συνήθως από τέτοιου είδους συνθέσεις δεν προκύπτουν επικίνδυνα απόβλητα, μειώνοντας έτσι τις περιβαλλοντικές και ανθρώπινες επιπτώσεις. [29,30]

1.2.8. Τα μικροφύκη ως πηγή άνθρακα για τη σύνθεση νανοκουκκίδων

Τα μικροφύκη είναι μονοκύτταροι οργανισμοί με πολύ μικρή δομή η οποία τους επιτρέπει να μετατρέπουν το φως του ήλιου σε χημική ενέργεια, χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα το CO₂. Χάρη στο συνδυασμό αυτής της μικρής δομής και της φωτοσυνθετικής ικανότητας, τα μικροφύκη έχουν χαρακτηριστικά που μοιάζουν τόσο με αυτά των ανώτερων φυτών, όσο και των μικροοργανισμών. Επιπρόσθετα, διακρίνονται από γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης και απαιτούν απλά διατροφικά στοιχεία, ενώ, ταυτόχρονα, παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες. Γενικά, τα μικροφύκη, όταν εκτεθούν στην ηλιακή ακτινοβολία UVB, μεταβάλλουν τον μεταβολισμό και την ανάπτυξή τους, προκειμένου να προστατευθούν. Τέτοιοι μηχανισμοί προστασίας είναι η πυροδότηση της βιοσύνθεσης δευτερογενών μεταβολιτών, η μεταβολή της μορφολογίας και η ενεργοποίηση διάφορων αντιοξειδωτικών συστημάτων με ενώσεις που απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία.[31,32]

1.2.8.α. *Dunaliella salina*

Η *Dunaliella salina* είναι ένας αλόφιλος μονοκύτταρος οργανισμός, ανήκει στην κατηγορία των πράσινων μικροφυκών και απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1838 από λίμνη, έπειτα από εξάτμιση αλατιού στη μεσογειακή ακτή της Γαλλίας από τον Michel Fliex Dunal, ενώ το 1905 ο Teodoresco ονόμασε το γένος αυτό *Dunaliella* προς τιμή του Dunal. Η *Dunaliella* είναι γένος μικροοργανισμού που ανήκει στην κατηγορία των ευκαρυωτικών, στο βασίλειο των φυτών (plantae), στο φύλο των πρασινόφυτων, στην τάξη των πράσινων μικροφυκών και αποτελείται από 24 είδη. Ως δομή, δε διαθέτει ανθεκτικό εξωτερικό τοίχωμα πολυσακχαριτών, διαθέτει όμως δύο φλαγέλλες που βοηθούν στην κίνηση της και έναν μεγάλο χλωροπλάστη στον οποίο συγκεντρώνεται το β-καροτένιο που παράγεται όταν ο οργανισμός βρεθεί υπό συνθήκες στρες, δηλαδή σε συνθήκες έντονου φωτός ή σε περιβάλλον με χαμηλό άζωτο ή υψηλή αλκαλικότητα. Η *Dunaliella* περιέχει αρκετά μεγάλες ποσότητες ασταξανθίνης και β-καροτένιου, η δομή των οποίων παρουσιάζεται στην **Εικόνα 8**. Ειδικότερα, αυτά τα δύο καροτενοειδή αποτελούν περισσότερο από το 7% και το 13%, αντίστοιχα, του ξηρού της βάρους, ενώ υπερβαίνουν το ποσοστό του 80% των συνολικών καροτενοειδών που περιέχει. [33,34]



Εικόνα 7: Στο επάνω μέρος της εικόνας φαίνεται ένα πράσινο κύτταρο *D. salina* με έναν χλωροπλάστη που περιέχει τη θυλακοειδή μεμβράνη συμπιεσμένη σε συγκεκριμένες περιοχές. Το πυρηνοειδές φαίνεται επίσης στο εσωτερικό των χλωροπλάστων. Στο συγκεκριμένο στέλεχος φαίνονται και μερικά μεμονωμένα σφαιρίδια β-καροτένιου (βCGs). Στο κάτω μέρος της εικόνας φαίνεται ένα πορτοκαλί κύτταρο στο οποίο ο χλωροπλάστης είναι γεμάτος με σφαιρίδια β-καροτένιου. Η περικυτταρική μήτρα και των δύο κυττάρων περιβάλλεται από τις φλαγέλλες.

Επιπλέον, η *Dunaliella* αποτελεί την πιο πλούσια φυσική πηγή του βιοδραστικού ισομερούς του β-καροτένιου, δηλαδή του 9-cis στερεοϊσομερούς. Έτσι, αποτελεί μία από τις κύριες εμπορικές πηγές φυσικού καροτένιου και καλλιεργείται εκτεταμένα σε ανοιχτές λίμνες ή σε κλειστούς βιοαντιδραστήρες, κυρίως στην Αυστραλία, το Ισραήλ, την Κίνα και την Ισπανία. Τέλος, σε κατάσταση αβιοτικού στρες παράγει λιπίδια, βιταμίνες, γλυκερόλη και πολλές χρωστικές ουσίες. Η συσσώρευση γλυκερόλης στην *Dunaliella salina* κάτω από συνθήκες υψηλής αλκαλικότητας είναι πιθανό να υπερβεί το 50% του ξηρού της βάρους. [33,35]



Εικόνα 8: (i) Η λίμνη Hiller στην Αυστραλία, στην οποία επιβιώνει η *Dunaliella salina* εξαιτίας της υπερβολικής συγκέντρωσης άλατος που τη χαρακτηρίζει και (ii) η *Dunaliella salina* μέσα από μικροσκόπιο.

1.3. Η παρουσία οργανικών ρύπων στα υδάτινα συστήματα

Τα τελευταία χρόνια, η αλόγιστη χρήση χημικών και φυτοφαρμάκων από τις βιομηχανίες έχει αυξηθεί και έχει ενισχύσει το φαινόμενο της περιβαλλοντικής ρύπανσης, ιδιαίτερα της ρύπανσης των υδάτων, του πόσιμου νερού, των υπόγειων και επιφανειακών υδάτων, κυρίως με διάφορους οργανικούς ρύπους. Η σημερινή κρίση έλλειψης νερού σε πολλά μέρη ανά τον κόσμο, που συνεχώς εξαπλώνεται, οφείλεται στην ολοένα αυξανόμενη κατανάλωση και σπατάλη του νερού, στον υπερπληθυσμό, στην κλιματική αλλαγή, στην μη-ελεγχόμενη κατανομή του παγκοσμίως και στην ολοένα αυξανόμενη βιομηχανική και τεχνολογική δραστηριότητα των ανθρώπων. [36] Όλα τα παραπάνω, σε συνδυασμό με την ολοένα και μεγαλύτερη παραγωγή, χρήση άρα και απόρριψη χημικών ουσιών στο περιβάλλον γιγαντώνουν το πρόβλημα της ρύπανσης. Οι χημικοί ρύποι μπορεί να είναι δραστικές ουσίες φαρμακευτικών σκευασμάτων, φυτοφάρμακα, ζιζανιοκτόνα, προϊόντα προσωπικής φροντίδας, απορρυπαντικά και άλλα βιομηχανικά απόβλητα, όπως φαινόλες, αλογονομένα οργανικά παράγωγα, αρωματικές ενώσεις κλπ. Η ανεξέλεγκτη απόρριψη τέτοιων ουσιών στο περιβάλλον, ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, οδηγούν στη συσσώρευση αυτών στο υδάτινο περιβάλλον, προκαλώντας σοβαρές επιπτώσεις στα υδρόβια συστήματα και τους ανθρώπους. [37,38]

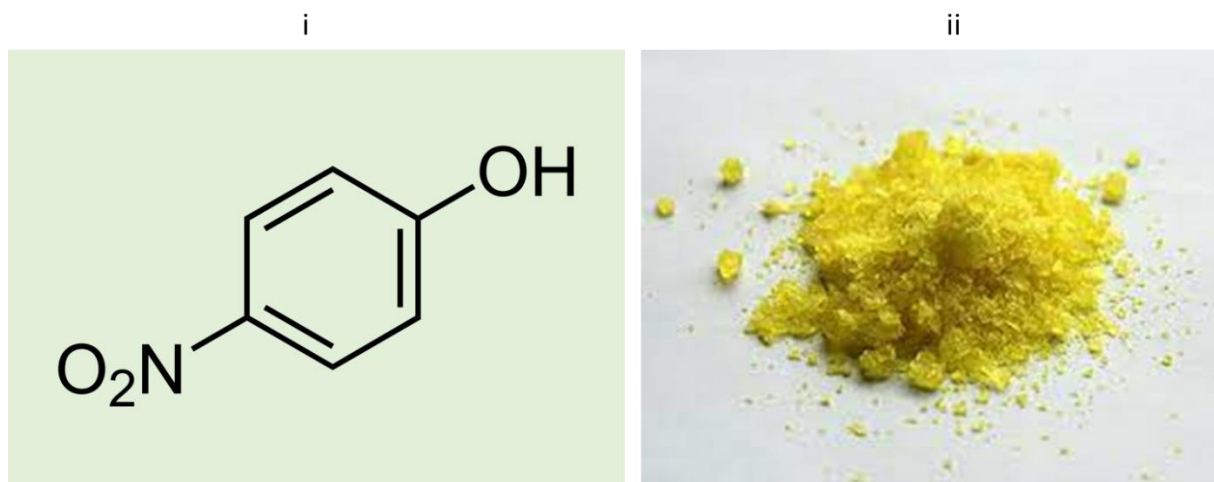
1.3.1. Η 4-νιτροφαινόλη και οι επιπτώσεις της

Ιδιαίτερα οι νιτροφαινόλες είναι γνωστές χημικές ενώσεις με επιβλαβή δράση ως προς το περιβάλλον. Πιο συγκεκριμένα, με τον όρο νιτροφαινόλες εννοούνται τα υδροξυ-παράγωγα των αρωματικών υδρογονανθράκων, τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλή διαλυτότητα σε υδάτινα συστήματα και χαμηλή ικανότητα αποδόμησης στα διάφορα εδάφη και τα υπόγεια υδάτινα συστήματα. Η 4-νιτροφαινόλη (4-NP) σαν ανθρωπογενής δραστική ουσία που είναι, χρησιμοποιείται ευρέως στην παραγωγή φαρμακευτικών σκευασμάτων, παρασιτοκτόνων και φυτοφαρμάκων όπως το methyl-parathion και ethyl-parathion. Ακόμη, βρίσκει εφαρμογή ως συστατικό βαφών, μυκητοκτόνο δερμάτινων υφασμάτων σε βυρσοδεψεία και ως δείκτης pH. Για τους παραπάνω λόγους, η 4-NP έχει χαρακτηριστεί ως πιθανός παράγοντας καρκινογένεσης, τερατογένεσης και μετάλλαξης και οι επιτρεπτές συγκεντρώσεις αυτής σε φυσικά ύδατα δεν επιτρέπεται να ξεπερνούν τα 10 ng L^{-1} , σύμφωνα με την Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (EPA). Πολλές είναι και οι τοξικολογικές μελέτες που έχουν υποστηρίξει ότι η παρουσία της 4-NP σε ζωντανούς οργανισμούς όπως τα ποντίκια και τα κουνέλια φαίνεται να προκαλεί δερματικούς ερεθισμούς και θνησιμότητα, ενώ στον άνθρωπο φαίνεται να ευθύνεται για αναπνευστικά προβλήματα, πονοκεφάλους και φαινόμενα ναυτίας. Επιπλέον, η 4-NP αποτελεί κύριο μεταβολίτη του ανθρώπινου ουροποιητικού συστήματος, ο οποίος μπορεί είτε να παραχθεί από ένζυμα παρουσία συγκεκριμένου υποστρώματος, ή να χρησιμοποιηθεί ως βιολογικός δείκτης, για τη μελέτη πιθανής έκθεσης του ανθρώπου σε υψηλές συγκεντρώσεις φαρμακευτικών σκευασμάτων ή παρασιτοκτόνων. [39,40]

1.3.2. Δομή και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της 4-νιτροφαινόλης

Η 4-NP, που μπορεί επίσης να εμφανίζεται επίσης με την ονομασία παρα-νιτροφαινόλη, είναι μια φαινόλη με μοριακό βάρος ίσο με $139,11 \text{ g/mol}$ που διαθέτει μια νιτρο-ομάδα στην πάρα θέση ως προς την υδροξυλο-ομάδα. Το σημείο τήξης της ισούται με 114°C , το σημείο βρασμού ισούται με 279°C και η διαλυτότητα της στο νερό είναι ίση με 16 g/L στους 25°C . Όταν η 4-NP βρίσκεται στην κρυσταλλική της κατάσταση, εμφανίζει δύο πολυμορφικές δομές. Η α-δομή είναι άχρωμο στερεό, ασταθής σε θερμοκρασία δωματίου και

σταθερή παρουσία ηλιακού φωτός. Η β-δομή είναι κίτρινο στερεό, σταθερή σε θερμοκρασία δωματίου και παρουσία ηλιακού φωτός μπορεί να σταδιακά να εμφανίσει ερυθρό χρώμα. Συνήθως, σε στερεή κατάσταση η 4-NP υπάρχει ως μείγμα των δύο παραπάνω μορφών. Υπό τη μορφή διαλύματος, έχει σταθερά διάστασης $pK_a = 7,15$ στους 25°C . [40]



Εικόνα 9: (i) Συντακτικός τύπος της 4-NP και (ii) Η 4-NP σε στερεή μορφή.

1.3.3. Άλλες χρήσεις και ιδιότητες της 4-νιτροφαινόλης

1.3.3.α. Δείκτης pH

Η 4-NP μπορεί ακόμη να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης pH. Το διάλυμά της είναι άχρωμο σε pH μικρότερο του 5,4 ενώ εμφανίζει κίτρινο χρώμα σε τιμές pH μεγαλύτερες του 7,5. Η συγκεκριμένη ιδιότητα αλλαγής χρώματος των διαλυμάτων της 4-NP ανάλογα της τιμής του pH την καθιστούν χρήσιμη ως δείκτη. Η μορφή στην οποία οφείλεται το κίτρινο χρώμα του 4-νιτροφαινολικού ιόντος το οποίο εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 405 nm και γραμμομοριακή απορροφητικότητα (ϵ) ίση με $18,3 \text{ έως } 18,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ σε ισχυρά αλκαλικό περιβάλλον. Αντίθετα, η μη ιοντική μορφή της 4-NP εμφανίζει ασθενή απορρόφηση στα 405 nm και ϵ ίση με $0,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Το ισοσβεστικό σημείο των 4-NP/4-νιτροφαινολικού ιόντος βρίσκεται στα 348 nm με $\epsilon = 5,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

1.3.3.β. Δείκτης ενζυμικής δραστικότητας

Σε εργαστήρια βιοχημείας και ενζυμολογίας, η 4-NP χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του ενζύμου της αλκαλικής φωσφατάσης και τον προσδιορισμό της ενζυμικής του δραστικότητας, μέσω της πορείας υδρόλυσης του 4-νιτροφαινυλο-φωσφορικού. Η 4-NP αποτελεί προϊόν ενζυμικής διάσπασης για αρκετά υποστρώματα, όπως του 4-νιτροφαινυλο-φωσφορικού, του 4-οξικού-νιτροφαινυλεστέρα (υπόστρωμα της καρβονικής ανυδράσης), του 4-νιτροφαινυλο-β-D-γλυκοκυρανοζίτη και άλλων παραγώγων σακχάρων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό διάφορων γλυκοσιδάσων. [41-45]

1.4. Επιπτώσεις των νανοϋλικών στο περιβάλλον

Τα νανοϋλικά, λόγω των χαρακτηριστικών τους που ήδη αναφέρθηκαν, χρησιμοποιούνται ευρέως σε διάφορους τομείς της επιστήμης, της τεχνολογίας, της υγείας, των βιομηχανιών και της γεωργίας, αποτελώντας σήμερα έναν από τους τομείς έρευνας με την μεγαλύτερη αναφορά παγκοσμίως.[46] Η αυξανόμενη λοιπόν παραγωγή και χρήση αυτών φαίνεται να καθιστά πλέον αναγκαίες μελέτες που αφορούν την επίδραση αυτών στο περιβάλλον και στον άνθρωπο, κυρίως στο κομμάτι που αφορά την τοξικότητα. Δεν είναι λίγες οι φορές που έχουν εκφραστεί λογικές ανησυχίες για την πορεία, τη μεταφορά και την απελευθέρωση των νανοϋλικών στο περιβάλλον. Η διαλεύκανση του προφίλ τοξικότητας αυτών αποτελεί σημαντικό κομμάτι για τη συνεχή ανάπτυξή τους στο μέλλον. Υπάρχουν ήδη αρκετές αναφορές για τις αρνητικές επιπτώσεις αυτών των υλικών σε ζωντανούς οργανισμούς και καλλιέργειες κυττάρων. [48-50]

1.5. Τα νανοϋλικά στα υδάτινα συστήματα

Τα νανοϋλικά μπορούν να καταλήξουν άμεσα στο υδάτινο περιβάλλον μέσω βιομηχανικής δραστηριότητας, απόρριψης αποβλήτων ή/και μέσω επιφανειακών απορροών από εδάφη. Κατά την πορεία τους λοιπόν στα υδάτινα συστήματα είναι πολύ πιθανό να αλληλεπιδράσουν με άλλα αιωρούμενα σωματίδια, οργανική ύλη και κολλοειδή αιωρήματα, δημιουργώντας έτσι συσσωματώματα που στη συνέχεια καθιζάνουν. Αυτή του είδους η συσσωμάτωση των νανοϋλικών, συνδυαστικά με άλλα περιεχόμενα στο νερό,

προκαλεί αρκετά συχνά την αλληλεπίδραση των παραπάνω συσσωματωμάτων με διάφορα στερεά, και ως εκ τούτου δυσχεραίνεται η διασπορά τους. Ο βαθμός συσσωμάτωσης εξαρτάται από τα κύρια χαρακτηριστικά των σωματιδίων (μέγεθος, ομάδες επιφάνειας, ικανότητα διασποράς) και τις συνθήκες του περιβάλλοντος (pH, ιοντική ισχύς και περιεκτικότητα σε διαλυμένο οργανικό άνθρακα). [47]

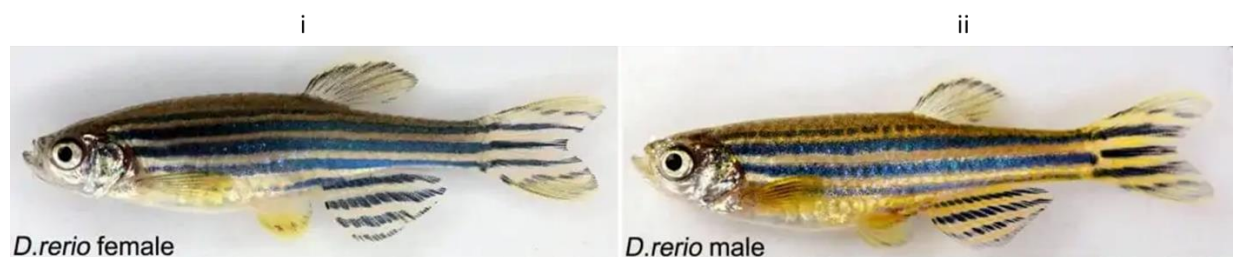
Μερικές μελέτες έχουν ήδη αναφέρει ανεπιθύμητες επιπτώσεις, όπως βλάβες στο DNA, μεταβολομικές ανωμαλίες, θνησιμότητα, οξειδωτικό στρες και μείωση της ανάπτυξης, σε υδρόβιους οργανισμούς, ζώα ή κύτταρα. Οι ανησυχίες των επιστημόνων έχουν αρχίσει να αφορούν και την ανθρώπινη υγεία, καθώς έχει αποδειχτεί ότι ανάλογα το μέγεθος και το είδος των νανοϋλικών, ορισμένα μπορούν να εισέλθουν σε κυτταρικές μεμβράνες θηλαστικών. [48,49]

Είναι, λοιπόν, αδιαμφισβήτητο ότι τα νανοϋλικά πέρα από το επιστημονικό ενδιαφέρον, έχουν πολλά πλεονεκτήματα στη σύγχρονη ανθρώπινη ζωή. Μπορούν όμως, απ' ότι φαίνεται, να έχουν και αρνητικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη ζωή, το περιβάλλον και διάφορους έμβιους οργανισμούς. Επομένως, υπάρχει μεγάλη ανάγκη κατανόησης των επιπτώσεων και του τοξικολογικού προφίλ αυτών, ώστε να γίνει μια ολοκληρωμένη εκτίμηση των κινδύνων. Το Zebrafish (*Danio rerio*) αποτελεί έναν κατατοπιστικό μοντέλο-οργανισμό για την έρευνα σε θέματα που αφορούν τους κινδύνους για την ανθρώπινη ζωή και το περιβάλλον.

1.6. Zebrafish (*Danio rerio*)

Το Zebrafish (*Danio rerio*) είναι ψάρι του γλυκού νερού που ανήκει στην οικογένεια των *Cyprinidae*, της τάξης *Cypriniformes*. Έχει εντοπιστεί στις περιοχές του Μπαγκλαντές, της Ινδίας, του Νεπάλ, του Πακιστάν, του Μπουτάν και της Σρι Λάνκα. [51] Συνήθως, προτιμά στάσιμα ή μέτριας ροής ενδιαιτήματα πολύ μικρού βάθους, όπως ρέματα, κανάλια, μικρές λίμνες και στάσιμα νερά καλλιεργειών, σε σχεδόν ουδέτερο μέχρι ελαφρώς βασικό pH και σε θερμοκρασία από 16,5 έως 34,0 °C.

Η ονομασία του προέρχεται από τις πέντε ομοιόμορφες, οριζόντιες, μπλε λωρίδες στο πλάι του σώματός του, οι οποίες μοιάζουν με τις ρίγες της ζέβρας και εκτείνονται μέχρι την άκρη του ουραίου πτερυγίου. Το σχήμα του είναι συμπαγές και πλευρικά συμπιεσμένο, με το στόμα του στραμμένο προς τα επάνω. [52] Το αρσενικό έχει τορπιλοειδές σχήμα, με χρυσές λωρίδες να εναλλάσσονται διαδοχικά με τις μπλε λωρίδες. Το θηλυκό έχει μεγαλύτερη κοιλιά, με υπόλευκη χροιά και ασημί ρίγες αντί χρυσών. Το μήκος του Zebrafish μπορεί να φτάσει έως και 4-5 cm, αν και συνήθως είναι 1,8-3,7 cm στο φυσικό του περιβάλλον, με κάποιες παραλλαγές, ανάλογα το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται. Η διάρκεια ζωής του σε αναπαραγωγική μονάδα είναι περίπου δύο με τρία χρόνια, αν και σε ιδανικές συνθήκες μπορεί να φτάσει και τα πέντε χρόνια. Στην άγρια φύση είναι τυπικά ένα ετήσιο είδος.



Εικόνα 10: (i) Θηλυκό και (ii) αρσενικό *D. rerio*.

1.6.1. Το Zebrafish ως πειραματικό μοντέλο

Το Zebrafish, λόγω των χαρακτηριστικών του, θεωρείται ένα καλό πρότυπο μοντέλο σε διάφορους ερευνητικούς τομείς, και εμφανίζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλα μοντέλα όπως π.χ. τα τρωκτικά. Τα άτομα είναι εύκολα διαθέσιμα, διατηρήσιμα και έχουν χαμηλό κόστος συντήρησης. Επιπλέον, είναι διατηρούνται σε μεγάλους πληθυσμούς χωρίς να απαιτούν μεγάλες εγκαταστάσεις.

Τα θηλυκά άτομα γεννούν αυγά σε συγκεκριμένες περιόδους, κάθε 2-3 ημέρες και από κάθε γέννα μπορούν να προκύψουν εκατοντάδες αυγά. Τα έμβρυα του Zebrafish διατηρούνται στους 28,5 °C και εκκολάπτονται μεταξύ 48-72 h μετά τη γονιμοποίηση (hpf), όπου και γίνονται προνύμφες. Πριν από την εκκόλαψη, το έμβρυο περιορίζεται στο χόριο, την ημι-διάφανη και σχετικά

αδιαπέραστη μεμβράνη που φράσει την είσοδο σε ορισμένες ενώσεις. Τα έμβρυα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλούς ερευνητικούς τομείς επειδή αναπτύσσονται πολύ γρήγορα και μπορούν να ληφθούν μεγάλοι πληθυσμοί. Η επιλογή εξωτερικής γονιμοποίησης, η οποία μειώνει την πιθανότητα επιρροής της μητέρας, σε συνδυασμό με τη διαφάνεια του εμβρύου Zebrafish (η οποία επιτρέπει στους ερευνητές να εξετάζουν εύκολα την ανάπτυξη των εσωτερικών συστημάτων), αποτελούν σημαντικά πλεονεκτήματα, στις περιπτώσεις που μελετώνται πολλαπλές αναπτυξιακές διεργασίες και το καθιστούν πρωταρχική επιλογή σε βιολογικές μελέτες, όταν απαιτείται η παρατήρηση της ανάπτυξης του μοντέλου. Στα πρώιμα στάδια της ζωής τους, τα έμβρυα Zebrafish είναι οπτικά διάφανα και μπορεί κανείς να τα παρακολουθήσει πολύ εύκολα, με τη βοήθεια ενός μικροσκοπίου. [51]

Η ανάπτυξη των εμβρύων Zebrafish είναι γρήγορη και ο σχηματισμός των οργάνων του ολοκληρώνεται εντός 3 ημερών μετά τη γονιμοποίηση (dpf). Το σωματικό πρότυπο λαρβών Zebrafish είναι ανάλογο με αυτό άλλων σπονδυλωτών· για παράδειγμα το συκώτι είναι υπεύθυνο για την μεταβολική ενεργοποίηση, διαθέτει λειτουργικό θυροειδή αδένα και έχει πλήρως σχηματισμένο αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Αυτό που αξιοποιείται στην πραγματικότητα από τον τομέα της βιοϊατρικής είναι η μεγάλη γονιδιωματική ομοιότητα μεταξύ του Zebrafish και των θηλαστικών, το μικρό του μέγεθος και το γεγονός ότι ο φαινότυπός του μπορεί να εκτιμηθεί και εξηγηθεί σχετικά γρήγορα και με ακρίβεια. [52-54]

Το Zebrafish χρησιμοποιείται σε πολλούς ερευνητικούς τομείς της βιολογίας, ως αναπτυξιακό και γενετικό μοντέλο για τη μελέτη της τοξικολογίας, της συμπεριφοράς, της φυσιολογίας, της οργανογένεσης, της επίδρασης φαρμάκων και της μοντελοποίησης διάφορων νόσων. Με βάση τα προηγούμενα, λοιπόν, τα πλεονεκτήματα του Zebrafish, το καθιστούν ικανό για την μελέτη των επιδράσεων τόσο της βραχυπρόθεσμης όσο και της μακροπρόθεσμης έκθεσης σε ποικιλία ενώσεων και υλικών. [55,56]

ΣΚΟΠΟΣ

Κύριος σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η σύνθεση φθοριζουσών νανοκουκκίδων άνθρακα (CNDs) από μια φυσική πηγή, όπως είναι η βιομάζα του μικροφύκου *Dunalliella salina*. Στη συνέχεια, τα συντιθέμενα υλικά χρησιμοποιούνται ως ευαίσθητοι και επιλεκτικοί νανο-αισθητήρες για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση της 4-νιτροφαινόλης σε δείγματα νερού και ούρων, αφού βελτιστοποιηθούν οι αναλυτικές συνθήκες. Αναλυτικότερα η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή έχει ως στόχους:

- ο Τη σύνθεση νανοκουκκίδων άνθρακα μέσω της διαλυτοθερμικής επεξεργασίας, χρησιμοποιώντας ως βασική ύλη μια πράσινη πηγή, και συγκεκριμένα, βιομάζα από το μικροφύκος *Dunaliella salina*.
- ο Το χαρακτηρισμό των νανοκουκκίδων άνθρακα που συντέθηκαν.
- ο Τη διερεύνηση και μελέτη ανάπτυξης και βελτιστοποίησης φθορισμομετρικής μεθόδου/μεθόδων προσδιορισμού της 4-νιτροφαινόλης με βάση τις νανοκουκκίδες άνθρακα που συντέθηκαν.
- ο Τον έλεγχο τοξικότητας των νανοκουκκίδων άνθρακα με τη χρήση πειραματικών μοντέλων Zebrafish.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2° – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Αντιδραστήρια - Διαλύτες - Υλικά :

Όλα τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τουλάχιστον αναλυτικής καθαρότητας. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν δις απεσταγμένο. Ακολουθεί ο κατάλογος των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν :

- Τολουόλιο (Honeywell, North Carolina)
- Αιθανόλη
- Δις απεσταγμένο νερό
- Απεσταγμένο νερό
- Αέριο άζωτο
- Διαλύματα νιτροφαινόλων (Sigma-Aldrich-Steinheim, Germany)
- Διάλυμα Ιβουπροφαίνης (Sigma-Aldrich-Steinheim, Germany)
- Διαλύματα αλλεργιογόνων (Sigma-Aldrich-Steinheim, Germany)
- Διαλύματα μετάλλων (Mn^{2+} , Fe^{3+} , Ag^{+} , As^{5+} , Se^{4+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Li^{+} , Cd^{2+} , K^{+} , Na^{+} , Hg^{2+} , Ca^{2+}) (Merck, Darmstadt, Germany)
- Χουμικά οξέα (Sigma-Aldrich-Steinheim, Germany)
- Χλωριούχο αμμώνιο (Sigma-Aldrich-Steinheim, Germany)
- Αμμωνία (Sigma-Aldrich-Steinheim, Germany)
- Μονοϋδρικό ημιθειικό άλας κινίνης (Karlsruhe, Germany)

2.1.1. Μελέτη εκλεκτικότητας

Για τη μελέτη της εκλεκτικότητας των δύο ειδών νανοκουκκίδων άνθρακα ως προς την 4-νιτροφαινόλη, πραγματοποιήθηκε μια εκτενής έρευνα, που περιλάμβανε τη δοκιμή πρότυπων ενώσεων αναλυτικού ενδιαφέροντος όπως μέταλλα, αλλεργιογόνα, στεροειδή, συστατικά φαρμακευτικώνσκευασμάτων, νιτροφαινόλες, φαινόλες, βενζοφαινόλες και χρωστικές.

2.1.2. Διαλύματα

Τα πρότυπα διαλύματα της 4-νιτροφαινόλης παρασκευάστηκαν με ζύγιση 5 mg στέρεης ουσίας, μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια και στη συνέχεια διαλυτοποιήθηκαν με τη βοήθεια υπερήχων σε 5 mL DDW και 5 mL

ακετονιτρίλιο, για τα υδρόφιλα και τα υδρόφοβα αντίστοιχα. Τα πρότυπα διαλύματα 4-νιτροφαινόλης σφραγίστηκαν με πώμα και αποθηκεύτηκαν σε σκοτεινό μέρος στους 4 °C.

2.2. Όργανα και συσκευές

- Πεχάμετρο PHM83 Autocal (Radiometer, Copenhagen, Denmark)
- Συσκευή περιδίνησης, Vortex TK3S (Technokartell, Italy)
- Αναλυτικός ζυγός (Shimadzu, Tokyo, Japan)
- Συσκευή διπλής απόσταξης ύδατος (Aquatron, A4D, BIBBY Scientific Ltd., UK)
- Φυγόκεντρος PrO-Research (Centurion, Sci., West Sussex, UK)
- Λουτρό υπερήχων Emmi-D30 (Emag, Germany)
- Θερμαντικό μάτι
- Γεννήτρια αζώτου (N₂) Micro nitrogen generator (Claind S.r.l., Lenno, Italy)
- Αυτόκλειστο (Autoclave) Parr με Teflon
- Φούρνος
- Συσκευή λυοφιλίωσης με αντλία κενού Alpha 1-4 LD (Christ, Germany)
- Μεμβράνη διαπίδυσης (MWCO: 1000 Da)
- Φασματοφωτόμετρο UV-VIS Shimadzu UV-2100 με κυψελίδα από quartz οπτικής διαδρομής 10 mm
- Φασματοφωτόμετρο ATR-FTIR Perkin Elmer (MA, USA)
- Φθορισμόμετρο FS5 Edinburgh (Livingston, UK)
- Nano Zetasizer (Nano ZS, Malvern, Herrenberg) με τεχνολογία δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS) για τον προσδιορισμό της υδροδυναμικής διαμέτρους και τη μέτρηση του ζ-δυναμικού.
- Φασματομέτρο φωτοηλεκτρονίων ακτίνων-X (XPS)
- Cell culture multiwell plates.
- Στερεομικροσκόπιο (διοφθάλμιο) Olympus SZ61, με ψυχρό φωτισμό LED KL 300 L.
- Αυτοματοποιημένο σύστημα εκτροφής Zebrafish ZebTEC Tecniplast, Aquatics Zebrafish Housing System.
- Σύστημα αναπαραγωγής ISPAWN-S χωρητικότητας 20L.



Εικόνα 11: Αυτόκλειστο σκεύος με εσωτερικό δοχείο Teflon στο οποίο πραγματοποιήθηκε η διαλυτοθερμική σύνθεση.

i



ii



Εικόνα 12: (i) Τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας 24 πηγαδιών, (ii) Στερεομικροσκόπιο Olympus SZ61 (Πηγή: www.olympus-lifescience.com)



Εικόνα 13: Σύστημα αναπαραγωγής ISPAWN-S (Πηγή: www.tecniplast.it)

2.3. Καλλιέργεια *Dunaliella salina*

Το στέλεχος *Dunaliella salina* που χρησιμοποιήθηκε ως πρόδρομη ένωση για την σύνθεση των νανοκουκκίδων, είναι το *Duna* 30 και έχει απομονωθεί από αλυκές στο Μεγάλο Έμβολο (Βόρεια Ελλάδα/Αιγαίο Πέλαγος). Για την καλλιέργειά του χρειάστηκαν τετραπλές παρτίδες όγκου (5L) τεχνητού θαλασσινού νερού (Tropical Marine™ άλας διαλυμένο σε δις απεσταγμένο νερό, (Wartenberg, Germany), υπό ήπιο αερισμό (0,5 ννμ), με τελική αλατότητα 120 ppt σε θερμοκρασία 26 ± 1 °C. Το θαλασσινό νερό εμπλουτίστηκε με 1 mL θρεπτικό υλικό Conway, χωρίς άζωτο και 0,1 mL από απόθεμα βιταμίνης. Το στέλεχος καλλιεργήθηκε για 7 ημέρες, έως τη φάση θανάτου. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε στον Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής από την Ομάδα Εφαρμοσμένης Φυκολογίας, του Τμήματος Βιολογίας του ΕΚΠΑ.

2.4. Σύνθεση νανοκουκκίδων άνθρακα

Για τη διαλυτοθερμική σύνθεση των νανοκουκκίδων άνθρακα, ζυγίστηκαν 80 mg κονιορτοποιημένου μικροφύκους σε μικρό ποτήρι ζέσεως. Σε αυτά προστέθηκαν 40 mL τολουόλιο και το μείγμα υπέστη κατεργασία με υπερήχους για 15 min. Στη συνέχεια, το μείγμα μεταφέρθηκε σε αυτόκλειστο Teflon

(οβίδα) και τοποθετήθηκε σε προθερμασμένο φούρνο στους 200 °C για 5 h (διαλυτοθερμική επεξεργασία). Η οβίδα έπειτα αφέθηκε στον απαγωγό έως ότου να φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου και να ανοιχτεί. Το μαύρο μίγμα που προέκυψε συλλέχθηκε με μικρή ποσότητα τολουολίου σε ένα νέο ποτήρι ζέσης. Αφού φυγοκεντρήθηκε στις 8000 rpm για 5 min, το υπερκείμενο διάλυμα (οργανική φάση) διαχωρίστηκε από το ίζημα. Στη συνέχεια, η οργανική φάση εξατμίστηκε σε θερμαντικό μάτι, υπό την παροχή αερίου αζώτου. Από αυτή την εξατμισμό προέκυψε το ξηρό στερεό υπόλειμμα των υδρόφοβων νανοκουκκίδων οι οποίες εμφάνισαν καλή διασπορά στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Το ίζημα που προήλθε από τη σύνθεση εκπλύθηκε πρωτίστως με τολουόλιο και ακολούθως με αιθανόλη και υπέστη εξατμισμό σε θερμαντικό μάτι. Η καφέ σκόνη που προέκυψε διαλυτοποιήθηκε σε νερό με τη βοήθεια υπερήχων και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη διαπίδυσης. Για 24 h γίνονταν αλλαγές του εξωτερικού νερού της μεμβράνης. Τέλος, το εσωτερικό διάλυμα που υπήρχε στη μεμβράνη (MWCO: 1000 Da) μεταφέρθηκε στην κατάλληλη συσκευή και υπέστη λυοφιλίωση, απ' όπου και προέκυψε το υποκίτρινο στερεό (υδρόφιλες νανοκουκκίδες) το οποίο χρησιμοποιήσαμε εκτενώς στη συνέχεια.

2.5. Φασματοσκοπία UV – Vis

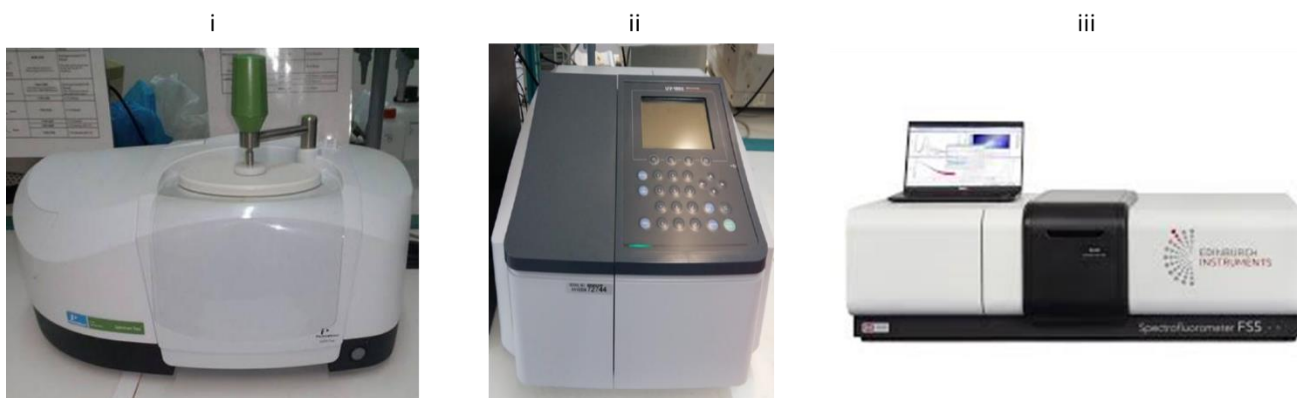
Έπειτα από κατάλληλη αραιώση των διαλυμάτων νανοκουκκίδων έγινε λήψη των φασμάτων σε κυψελίδα quartz οπτικής διαδρομής 1 cm χωρητικότητας 1 mL. Τα φάσματα ελήφθησαν στην περιοχή UV - Vis, σε θερμοκρασία δωματίου με φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV – 2100.

2.6. Φασματοσκοπία IR (FTIR)

Ελήφθησαν φάσματα από το στερεό δείγμα των υδρόφιλων νανοκουκκίδων άνθρακα και από το αιώρημα των υδρόφοβων νανοκουκκίδων άνθρακα. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο ATR-FTIR SPECTRUM TWO, Perkin Elmer, σε θερμοκρασία δωματίου, στην περιοχή από 4000 cm⁻¹ έως 450 cm⁻¹.

2.7. Φασματοφθορισμομετρία

Για τη λήψη φασμάτων εκπομπής και διέγερσης σε διάφορα μήκη κύματος χρησιμοποιήθηκαν υδατικά και οργανικά διαλύματα νανοκουκκίδων, σε θερμοκρασία δωματίου (εκτός από τη μελέτη επίδρασης της θερμοκρασίας, όπου η θερμοκρασία ήταν μεταβλητή), υπό ανάδευση στο φασματοφθορισμόμετρο FS5 Edinburgh. Χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα quartz, οπτικής διαδρομής 1 cm.



Εικόνα 14: (i)Perkin Elmer FT-IR spectrometer SPECTRUM TWO, (ii)Shimadzu UV-2100 και (iii) FS5 Edinburgh.

2.8. Υδροδυναμικό μέγεθος και ζήτα δυναμικό

Η μέτρηση του υδροδυναμικού έγινε με χρήση κατάλληλων κυψελίδων της Malvern, στους 25 °C με την τεχνική της Δυναμικής Σκέδασης του Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS), με την οποία μετρείται το μέγεθος των σωματιδίων, σε διασπορά, γρήγορα και απαιτώντας ελάχιστη προετοιμασία δείγματος. Η αρχή λειτουργίας της συγκεκριμένης μεθόδου βασίζεται στο ότι, τα σωματίδια (μακρομόρια ή νανοσωματίδια) βρίσκονται σε διαρκή και τυχαία κίνηση μέσα στο διαλύτη διασποράς (κίνηση Brown). Μέσω της τεχνικής αυτής, είναι δυνατός ο υπολογισμός του υδροδυναμικού μεγέθους των νανοκουκκίδων σε αραιά διαλύματα. Βέβαια, όταν ένα σωματίδιο βρίσκεται σε εναιώρημα, ως επί το πλείστον, δημιουργείται μία ηλεκτρική διπλοστιβάδα στη διεπιφάνεια των νανοκουκκίδων, σύμφωνα με το μοντέλο Gouy-Chapman-Stern. Το πάχος του στρώματος εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως την ηλεκτρική αγωγιμότητα του διαλύτη, το επιφανειακό φορτίο του υλικού

κ.α. Δεδομένου ότι αυτό το στρώμα επηρεάζει την κίνηση του σωματιδίου, η μετρούμενη (με τεχνική DLS) υδροδυναμική διάμετρος προκύπτει να είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη διάμετρο του υλικού μετρούμενη με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (TEM). Στο ίδιο όργανο ήταν εφικτή η μέτρηση του ζ-δυναμικού των νανοκουκκίδων άνθρακα.

2.9. Φασματοσκοπία με ακτίνες X (X-ray photoelectron spectroscopy)

Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε ημισφαιρικός αναλυτής ηλεκτρονίων SPECS Phoibos 100-1DDLD, με μη-μονοχρωματική πηγή ακτίνων-X διπλής ανόδου (Mg, Al). Η μέτρηση του δείγματος πραγματοποιήθηκε μέσα σε κατάλληλο σύστημα υπερυψηλού κενού ($\sim 5 \times 10^{-10}$ mbar) και σε θερμοκρασία δωματίου. Ως ακτινοβολία διέγερσης χρησιμοποιήθηκε η AlK α με ενέργεια φωτονίου 1486,6 eV. Ο αναλυτής ηλεκτρονίων λειτουργούσε σε σταθερή ενέργεια διέλευσης ίση με 10 eV, που δίνει για την κορυφή του Ag3d5/2 πλάτος στο μισό του μεγίστου ύψους ίσο με $fwhm = 0,85$ eV. Το πειραματικό σφάλμα στην θέση της κορυφής XPS που προέρχεται από εσωτερικά ατομικά ενεργειακά επίπεδα, όταν έχουμε καλό λόγο σήματος/θόρυβο, είναι $\pm 0,05$ eV. Η περιοχή ανάλυσης του δείγματος πραγματοποιήθηκε σε σημείο διαμέτρου 3 mm. Τα δείγματα ήταν σε μορφή σκόνης και συμπίεστηκαν σχηματίζοντας ένα λεπτό φύλλο υλικού. Η συλλογή και ανάλυση φασμάτων έγινε με τη χρήση λογισμικό SpecsLab Prodigy (Specs GmbH, Berlin) και οι ατομικές αναλογίες υπολογίστηκαν με τη βοήθεια βιβλιοθήκης SPECS Prodigy.

2.10. Μέτρηση κβαντικής απόδοσης

Ο υπολογισμός της κβαντικής απόδοσης των νανοκουκκίδων έγινε με βάση μία συγκριτική μέθοδο, κατά την οποία χρησιμοποιείται διάλυμα άλατος ημιθειικής κινίνης σε 0.1M H₂SO₄ (με κβαντική απόδοση 0,54 και $\eta_1=1,2$ στα 340 nm). [57] Η κβαντική απόδοση των νανοκουκκίδων υπολογίστηκε σύμφωνα με την παρακάτω σχέση :

$$\Phi_1 = \frac{\Phi_2 A_2 \eta_1^2}{I_2 A_1 \eta_2^2}$$

όπου I_1 και I_2 οι τιμές φθορισμού του πρότυπου και των νανοκουκκίδων, A_1 και A_2 οι οπτικές πυκνότητες, η_1 και η_2 οι δείκτες διάθλασης του πρότυπου και του υδατικού διαλύματος των νανοκουκκίδων αντίστοιχα. Η τιμή του δείκτη διάθλασης η_2 στο νερό ισούται με 1,2.

2.11. Μελέτη σταθερότητας των διαλυμάτων νανοκουκκίδων άνθρακα

Η σταθερότητα του φθορισμού του διαλύματος νανοκουκκίδων μετρήθηκε καθημερινώς και για μία εβδομάδα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση σε φθορισμόμετρο FS5 Edinburgh. Χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα quartz, οπτικής διαδρομής 1 cm.

2.12. Μελέτη φωτοσταθερότητας των διαλυμάτων νανοκουκκίδων

Υδατικό διάλυμα νανοκουκκίδων ακτινοβολήθηκε επί 30 min όπου και καταμετρούνταν συνεχώς η ένταση της εκπομπής του. Η μέτρηση έγινε σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση σε φθορισμόμετρο FS5 Edinburgh. Χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα quartz, οπτικής διαδρομής 1 cm.

2.13. Αναλυτική πορεία προσδιορισμού της 4-νιτροφαινόλης

Κατά την ανίχνευση της 4-νιτροφαινόλης χρησιμοποιώντας τις υδρόφιλες νανοκουκκίδες, χρησιμοποιήθηκαν 0,25 mL ρυθμιστικού διαλύματος Britton-Robinson (0,1M, pH=9,5) και 0,25 mL υδατικού διαλύματος νανοκουκκίδων συγκέντρωσης 1 mg/mL. Τα παραπάνω διαλύματα μεταφέρθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια συγκεκριμένου όγκου (3 mL) και στη συνέχεια προστέθηκαν σε αυτά 2,5 mL δείγματος. Ακολούθησε ανάμειξη σε συσκευή vortex και μέτρηση της έντασης του φθορισμού του διαλύματος των νανοκουκκίδων στα 330 nm (μήκος κύματος διέγερσης, λ_{ex}) και στα 420 nm (μήκος κύματος εκπομπής, λ_{em}). Η ένταση του φθορισμού καταγράφηκε και σε μήκη κύματος διέγερσης μεγαλύτερο των 330 nm, όπου και παρατηρήθηκε μετατόπιση της κορυφής

του φάσματος εκπομπής προς την περιοχή του κόκκινου του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος.

Για την ίδια διαδικασία χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά τις υδρόφοβες νανοκουκκίδες, χρησιμοποιήθηκαν 5 mL δείγματος που περιείχαν 0,25 mL ρυθμιστικού διαλύματος Britton-Robinson (0,1M, pH=5,5). Τα υδατικά διαλύματα δείγματος εκχυλίστηκαν επιτυχώς 3 φορές με οξικό αιθυλεστέρα (1,5 mL ανά κύκλο εκχύλισης). Έπειτα από την ανάμειξη με συσκευή vortex του διφασικού συστήματος, ακολούθησε αναμονή 30 sec ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις. Η υπερκείμενη φάση που προέκυψε έπειτα από κάθε κύκλο εκχύλισης συλλέχθηκε και ενώθηκε σε άλλο γυάλινο φιαλίδιο, όπου και προστέθηκαν σε αυτή 20 μ L διαλύματος υδρόφοβων νανοκουκκίδων συγκέντρωσης 5 mg/mL σε οξικό αιθυλεστέρα. Ακολούθησε ανάδευση του οργανικού διαλύματος για 15 sec και στη συνέχεια καταγράφηκε η ένταση φθορισμού στα 380 nm (μήκος κύματος διέγερσης, λ_{ex}) και στα 465 nm (μήκος κύματος εκπομπής, λ_{em}).

Η πορεία υπολογισμού ανακτήσεων σε πραγματικά δείγματα περιλάμβανε την προσθήκη της 4-NP σε 2,5 mL πραγματικού δείγματος έως τελικής συγκέντρωσης 0, 7,5, 15,5, 22,5 μ M. Στη συνέχεια, τα πραγματικά δείγματα εκχυλίστηκαν με οξικό αιθυλεστέρα 3 φορές, έως ο τελικός όγκος του οργανικού διαλύτη να είναι 2,5 mL. Η ολική διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές και η μέση τιμή των ενδείξεων έντασης φθορισμού (F) χρησιμοποιήθηκε σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη, ώστε να υπολογιστεί η % ανάκτηση.

Οι καμπύλες που παρουσιάζονται στα αποτελέσματα προέκυψαν χρησιμοποιώντας το λόγο F_0/F των κουκκίδων, όπου F_0 ορίζεται η τιμή φθορισμού του δείγματος απουσία της 4-νιτροφαινόλης και F η τιμή φθορισμού του δείγματος παρουσία της 4-νιτροφαινόλης.

2.14. Προετοιμασία πραγματικών δειγμάτων

Το νερό βρύσης που μελετήθηκε συλλέχθηκε από την αστική περιοχή των Ιωαννίνων, τα επεξεργασμένα λύματα βιολογικού καθαρισμού συλλέχθηκαν από την έξοδο της μονάδας βιολογικού καθαρισμού Ιωαννίνων και το δείγμα ούρων συλλέχθηκε από υγιές μέλος του εργαστηρίου, αρσενικού γένους, το

οποίο ανήκει στην ηλικιακή ομάδα των 25 ετών. Το νερό βρύσης και τα επεξεργασμένα λύματα από το βιολογικό καθαρισμό αναλύθηκαν απευθείας, χωρίς κάποια προεργασία, πέρα από τη διαδικασία του φιλτραρίσματος, μέσω χάρτινου πορώδους φίλτρου (Whatman ME 25/21 ST), ώστε να απομακρυνθούν τυχόν στερεά σωματίδια. Το δείγμα ούρων φυγοκεντρήθηκε στις 8000 rpm για 10 min με φίλτρο VIVASPIN, χωρητικότητας 2 mL (Membrane: 300.000 MWCO, VIVASCIENCE, Hannover, Germany) και αραιώθηκε 10 φορές πριν τη χρήση. Όλα τα δείγματα νερού βρύσης και λυμάτων αποθηκεύτηκαν σε φιάλη με πώμα σε σκοτεινό μέρος στους 4 °C.

2.15. Έλεγχος τοξικότητας

2.15.1. Ηθική

Ο έλεγχος οξείας τοξικότητας των νανοκουκκίδων πραγματοποιήθηκε με χρήση του Zebrafish (*Danio rerio*) και σύμφωνα με το πρωτόκολλο ZFET του οργανισμού OECD. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες στα ψάρια διεξήχθησαν σύμφωνα με τους εθνικούς κανονισμούς και εγκρίθηκαν από την Επιτροπή Ερευνών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Τα πειράματα και η έρευνα έγιναν σύμφωνα με την οδηγία 86/609/ΕΟΚ και Ευρωπαϊκή Οδηγία 2010/63/ΕΕ. Σύμφωνα με τις οδηγίες, αυτές τα έμβρυα επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται σε πειράματα μέχρι τη στιγμή της ελεύθερης διαβίωσης (περίπου 5-7 dpf). [58]

2.15.2. Διατήρηση και εκτροφή ενήλικων ψαριών Zebrafish

Ενήλικα ψάρια Zebrafish αναπύχθηκαν και διατηρήθηκαν σε αυτοματοποιημένο σύστημα εκτροφής με κλειστό σύστημα ανανέωσης νερού (ZebTEC, Tecniplast).



Εικόνα 15: ZebTEC, Aquatics Zebrafish Housing System (Πηγή: www.tecniplast.it)

2.15.3. Έκθεση των εμβρύων Zebrafish σε νανοκουκκίδες άνθρακα

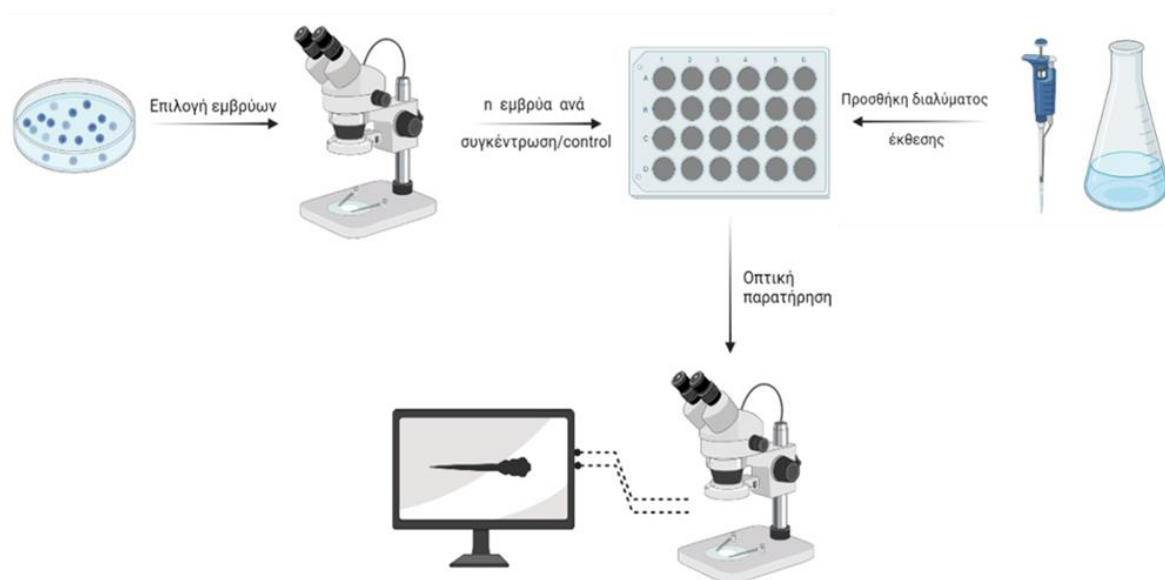
Για τα πειράματα έκθεσης των Zebrafish στις νανοκουκκίδες χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα που στηρίχτηκαν στις φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοκουκκίδων, δηλαδή στον υδρόφιλο (διάλυμα σε δις απεσταγμένο νερό) και υδρόφοβο (διάλυμα σε DMSO) χαρακτήρα αυτών. Τα έμβρυα Zebrafish εκτέθηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 50-1000 $\mu\text{g/mL}$ των επιλεγμένων νανοκουκκίδων με στόχο τον προσδιορισμό του τοξικολογικού τους δυναμικού. Κάθε διάλυμα έκθεσης προστέθηκε σε 12 well-plates από 1,5 mL ανά πηγάδι (well). Μετά την αποχορίωση των εμβρύων, ακολούθησε η τοποθέτηση μίας λάρβας (τυχαία) σε κάθε well-plate.

Στη συνέχεια, τα well-plates τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία στους $28 \pm 1^\circ\text{C}$ και η έκθεση των λαρβών στα διαλύματα έκθεσης διήρκεσε 96 h. Κατά τη διάρκεια των 96 h ήταν εφικτή η παρατήρηση της ανάπτυξης, των μορφολογικών ανωμαλιών (περικαρδικό οίδημα, λεκιθικό οίδημα, λόρδωση σπονδυλικής στήλης και παραμόρφωση της ουράς) με τη χρήση στερεοσκοπίου καθώς και της θνησιμότητας των λαρβών (απουσία καρδιακού

παλμού). [59] Με τη χρήση ψηφιακής κάμερας που διέθετε το στερεοσκόπιο, λήφθηκαν εικόνες υψηλής ανάλυσης στις 24, 48 και στις 96 h έκθεσης, οι οποίες συλλέχθηκαν και επεξεργάστηκαν με κατάλληλο λογισμικό (Image Pro Plus 7, Media Cybernetics). Στον **Πίνακα 1** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των υπό δοκιμή νανοκουκκίδων.

Πίνακας 1: Συγκεντρώσεις και είδος των νανοκουκκίδων άνθρακα στις οποίες εκτέθηκε το Zebrafish.

Τύπος CNDs	Ιδιότητα	Στέλεχος <i>Dunaliella salina</i>	Συγκεντρώσεις έκθεσης
1	Υδροφιλικότητα	<i>Duna30</i> (Μεγάλο Έμβολο, Β. Ελλάδα)	100, 500, 1000 $\mu\text{g/mL}$
2	Υδροφοβικότητα	<i>Duna30</i> (Μεγάλο Έμβολο, Β. Ελλάδα)	50, 125, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$



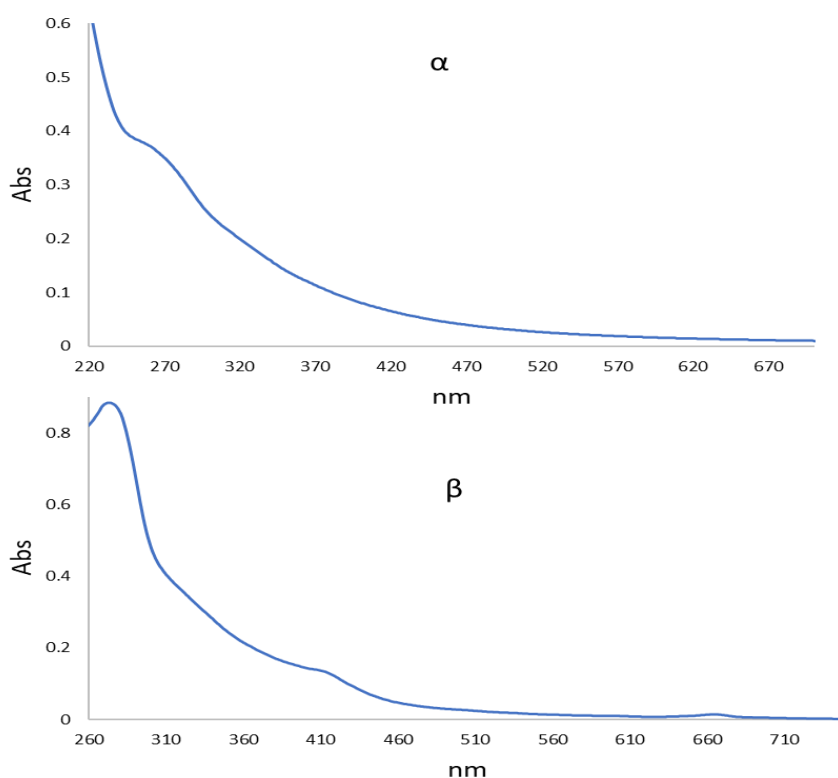
Εικόνα 16: Πειραματική απεικόνιση της έκθεσης των Zebrafish στις νανοκουκκίδες άνθρακα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

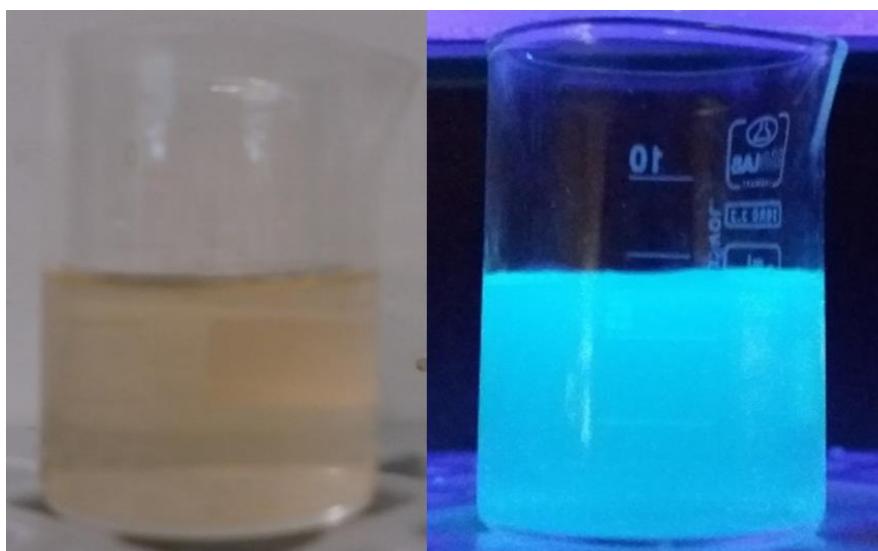
3.1. Χαρακτηρισμός των νανοκουκκίδων άνθρακα

3.1.1. Φασματοσκοπία UV-Vis

Τα φάσματα μοριακής απορρόφησης UV-Vis που ελήφθησαν για τις υδρόφιλες και τα υδρόφοβες νανοκουκκίδες παρουσιάζονται στην **Εικόνα 18**. Τα φάσματα αυτά για τις υδρόφιλες νανοκουκκίδες εμφανίζουν μια ευρεία απορρόφηση με μέγιστο στα 270 nm περίπου, ενώ τα αντίστοιχα φάσματα των υδρόφοβων νανοκουκκίδων εμφανίζουν μια πιο οξεία κορυφή απορρόφησης στα 280 nm περίπου. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, οι κορυφές αυτές οφείλονται σε $n-p^*$ and $p-p^*$ μεταπτώσεις των δεσμών $-C=O$ των καρβοξυλομάδων και των sp^2 δεσμών των αρωματικών δακτυλίων ($-C=C-$). Ακόμη, στο φάσμα UV-Vis των υδρόφοβων νανοκουκκίδων, εμφανίζεται μια κορυφή απορρόφησης από τα 390 nm έως τα 430 nm, η οποία, βιβλιογραφικά, αποδίδεται σε μεταπτώσεις $n-p^*$ αρωματικών $-C=C-$ δεσμών και σε μη δεσμικά ηλεκτρόνια ατόμων οξυγόνου που συμμετέχουν σε δεσμούς $-C=O$ ή $-C-O$. [60] Τα διαλύματα τόσο των υδρόφιλων (σε δις απεσταγμένο νερό) όσο και των υδρόφοβων (σε τολουόλιο) νανοκουκκίδων χαρακτηρίζονται από κίτρινη χροιά, υπό το φυσικό φως της ημέρας και μπλε χροιά, υπό ακτινοβολία UV, στα 365 nm. Στην **Εικόνα 19** απεικονίζεται το διάλυμα υδρόφιλων νανοκουκκίδων στις συνθήκες αυτές.



Εικόνα 18: Φάσματα απορρόφησης UV-Vis των (α) υδρόφιλων και (β) υδρόφοβων νανοκουκκίδων.

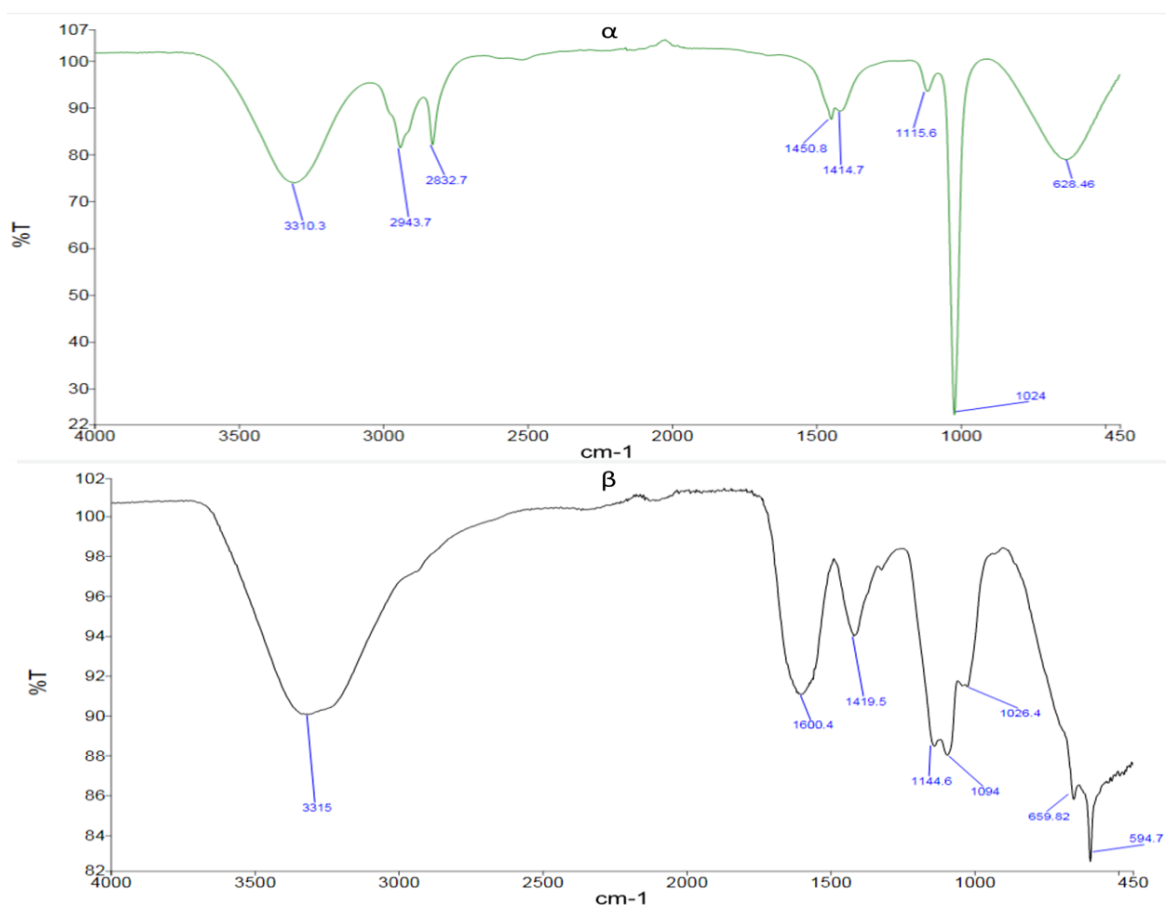


Εικόνα 19: Διάλυμα των υδρόφιλων νανοκουκκίδων, υπό φυσικό φως και υπό το φως της λάμπας UV, στα 365 nm.

3.1.2. Φασματοσκοπία FT-IR

Προκειμένου να εξαχθούν περαιτέρω συμπεράσματα για τις λειτουργικές ομάδες καθώς και για την ποιοτική σύσταση των δύο συντιθέμενων νανοκουκκίδων, ελήφθησαν τα φάσματα FTIR για κάθε είδος υλικού. Στην **Εικόνα 20** παρουσιάζονται τα δεδομένα που συλλέχθηκαν.

Στο φάσμα FTIR των υδρόφιλων συντιθέμενων νανοκουκκίδων παρουσιάζεται μια ευρεία κορυφή στα 3315 cm^{-1} , που αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης δεσμού ομάδων O–H και N–H. Η κορυφή στα 1600 cm^{-1} επιβεβαιώνει την ύπαρξη των ασύμμετρων και συμμετρικών δονήσεων τάσης του δεσμού --COO-- . Ακόμη, η κορυφή στα 1026 cm^{-1} περίπου αντιστοιχεί σε δόνηση κάμψης δεσμών των ομάδων C–O–C και C–O, ενώ η κορυφή στα 1140 cm^{-1} και η κορυφή στα 1419 cm^{-1} μπορούν να αποδοθούν σε C–O και C–N δεσμούς. Οι υπόλοιπες κορυφές που εμφανίζονται στην περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν πλήρως, ωστόσο, είναι γνωστό πως οι περισσότερες από αυτές οφείλονται σε διάφορες δονήσεις του δεσμού --C--H .



Εικόνα 20: Φάσμα FT-IR των (α) υδρόφοβων νανοκουκκίδων και των (β) υδρόφιλων νανοκουκκίδων.

Στο φάσμα FTIR των υδρόφοβων συντιθέμενων νανοκουκκίδων παρουσιάζεται μια κορυφή στα 3310 cm^{-1} , που αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης των δεσμού των ομάδων O-H και N-H, καθώς επίσης και μια μικρή κορυφή στα 2943 cm^{-1} που αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης των δεσμών -C-H και -CH₂ αλειφατικών δομών. Ακόμη, η κορυφή στα 1414 cm^{-1} αντιστοιχεί σε δόνηση κάμψης των δεσμών των ομάδων C-O-C και C-O, ενώ η κορυφή στα 1116 cm^{-1} αντιστοιχεί σε δόνηση κάμψης των δεσμών C-O και C-N ομάδων. Τέλος, η κορυφή στα 1414 cm^{-1} , επιβεβαιώνει την ύπαρξη των ασύμμετρων και συμμετρικών δονήσεων τάσης του δεσμού C-O και C-N. Πολλές από τις υπόλοιπες κορυφές οφείλονται σε διάφορες δονήσεις του δεσμού -C-H. [61,64]

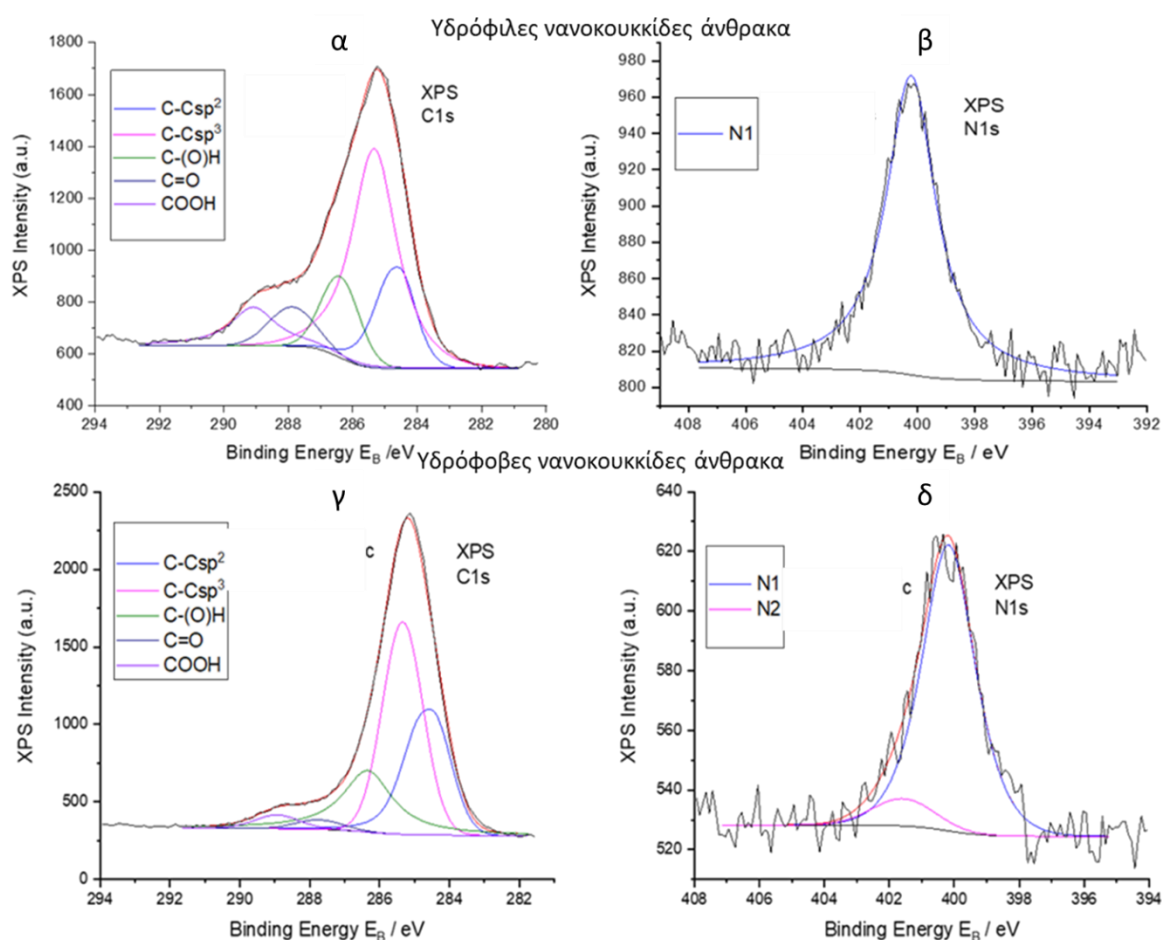
3.1.3. Φωτοηλεκτρονική φασματοσκοπία ακτίνων X (XPS)

Η φασματοσκοπία XPS αποτελεί μία επιβεβαιωτική τεχνική για την ταυτοποίηση της χημικής σύστασης και της χημικής κατάστασης των δύο νεοσυντιθέμενων υλικών. Πιο συγκεκριμένα, τα φάσματα XPS εφαρμόστηκαν για την ανίχνευση λειτουργικών ομάδων αζώτου στην επιφάνεια των υλικών, καθώς επίσης και για τη μελέτη του τρόπου διαμόρφωσης των δεσμών. Τόσο στις υδρόφιλες όσο και στις υδρόφοβες νανοκουκκίδες άνθρακα ανιχνεύονται άνθρακας (C), οξυγόνο (O) και άζωτο (N).

Στις **Εικόνες 21α** και **β** φαίνονται οι δύο αποσυμπλεγμένες κορυφές φάσματος XPS για τον άνθρακα (C1s) και το άζωτο (N1s) για τις υδρόφιλες νανοκουκκίδες, αντίστοιχα. Η πρώτη κορυφή αποτελείται από έξι διαφορετικές καταστάσεις του άνθρακα: δεσμοί C-C με διαμόρφωση sp^2 και sp^3 , δεσμοί υδροξυλίων ή εποξειδίων (C-O(H)), δεσμοί καρβονυλίων (C=O) ή δεσμοί καρβοξυλικών ομάδων (O=C-OH). Το φάσμα XPS αζώτου, εμφανίζει μία κορυφή σε ενέργεια σύνδεσης $400\pm 0,1\text{eV}$ (N1) που σχετίζεται με την κατάσταση του αζώτου στην ομάδα C-NH-C=O. Το νάτριο που παρατηρείται στο φάσμα XPS των υδρόφιλων νανοκουκκίδων μπορεί να αποδοθεί στο περιβάλλον υψηλής αλατότητας που επικρατεί κατά την καλλιέργεια της *Dunaliella salina*.

Στις **Εικόνες 21γ** και **δ** φαίνονται οι δύο αποσυμπλεγμένες κορυφές του φάσματος XPS για τον άνθρακα (C1s) και το άζωτο (N1s) για τις υδρόφοβες

νανοκουκκίδες, αντίστοιχα. Όπως και στα προηγούμενα, η πρώτη κορυφή αποτελείται από έξι διαφορετικές καταστάσεις του άνθρακα: δεσμοί C-C με διαμόρφωση sp^2 και sp^3 , δεσμοί υδροξυλίων ή εποξειδίων (C-O(H)), δεσμοί καρβονυλίων (C=O) ή δεσμοί καρβοξυλικών ομάδων (O=C-OH). Στο φάσμα XPS αζώτου, εμφανίζονται δύο διαφορετικές καταστάσεις αζώτου, μία σε ενέργεια σύνδεσης $400,0 \pm 0,1 \text{ eV}$ (N1) και μία σε ενέργεια σύνδεσης $401,6 \pm 0,1 \text{ eV}$ (N2) που σχετίζονται με την κατάσταση του αζώτου στην ομάδα C-NH-C=O και τα θετικά φορτισμένα άτομα αζώτου ($-NH^{3+}$), επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη ομάδων αζώτου σε διάφορες καταστάσεις. [65]



Εικόνα 21: Ανάλυση του φάσματος XPS για τις κορυφές C1s (α), N1s (β) των υδρόφιλων νανοκουκκίδων, (γ) C1s και (δ) N1s των υδρόφοβων νανοκουκκίδων άνθρακα, μετά από διαδικασία αποσύμπλεξης (deconvolution).

Πίνακας 2: Ποσοστιαία ανάλυση της περιεκτικότητας των χαρακτηριστικών ομάδων άνθρακα και αζώτου για τα δύο είδη νανοκουκκίδων.

Δείγμα	% Χαρακτηριστικών ομάδων άνθρακα				
	<i>C-C sp²</i>	<i>C-C sp³</i>	<i>C-O(H)</i>	<i>C=O</i>	<i>COOH</i>
Υδρόφιλες CNDs	18,5	49,1	13,2	7,8	11,4
Υδρόφοβες CNDs	29,6	42,8	22,4	2,1	3,1
	% Χαρακτηριστικών ομάδων αζώτου				
	<i>C-NH-C=O</i>		<i>-NH₃⁺</i>		
Υδρόφιλες CNDs	100		-		
Υδρόφοβες CNDs	90,6		9,4		
	% Ατομικών συγκεντρώσεων C, O, N				
	% C ατ.	% O ατ.	% N ατ.		
Υδρόφιλες CNDs	67,7 ± 0,2	29,1 ± 0,1	3,50 ± 0,06		
Υδρόφοβες CNDs	84,5 ± 0,1	13,3 ± 0,1	2,22 ± 0,06		

3.1.4. Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) και επιφανειακό φορτίο

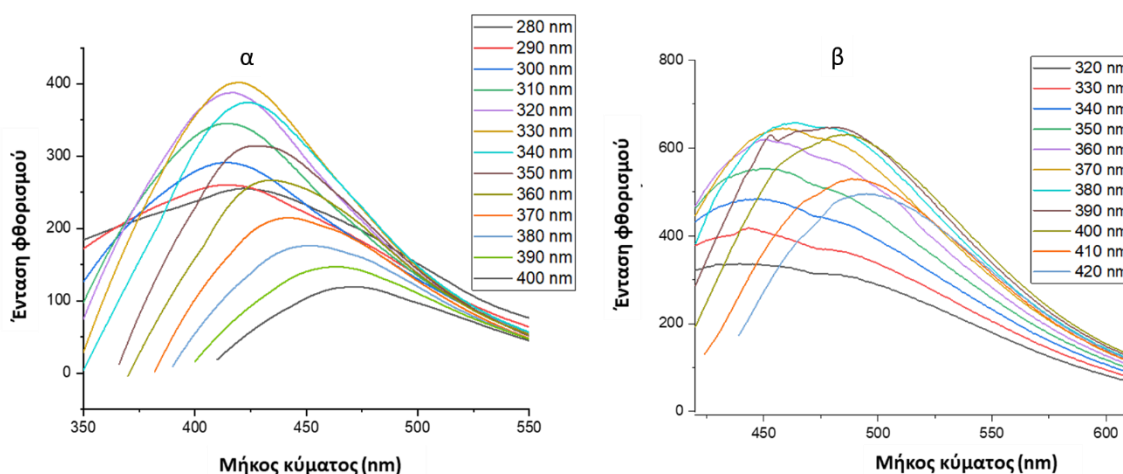
Το ζ δυναμικό σε δις απεσταγμένο νερό (για τις υδρόφιλες νανοκουκκίδες άνθρακα) και σε αιθανόλη (για τις υδρόφοβες νανοκουκκίδες άνθρακα), βρέθηκε να είναι $-17,0$ mV και $-0,54$ mV για τις υδρόφιλες και τις υδρόφοβες νανοκουκκίδες, αντίστοιχα. Η αρνητική τιμή του επιφανειακού φορτίου των υδρόφιλων νανοκουκκίδων, αποδίδεται, πιθανότατα, στην αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια των νανοκουκκίδων λόγω των υδροξυλομάδων και καρβοξυλομάδων.

3.1.5. Φθορισμομετρική μελέτη

Στην **Εικόνα 22** φαίνονται τα φάσματα εκπομπής του φθορισμού των υδρόφιλων και των υδρόφοβων νανοκουκκίδων, για διάφορα μήκη κύματος

διέγερσης στην περιοχή 280-400 nm και 320-420 nm αντίστοιχα. Παρατηρείται, ότι και στις δύο περιπτώσεις ο εκπεμπόμενος φθορισμός είναι εξαρτώμενος από το μήκος κύματος διέγερσης. Η μέγιστη εκπομπή φθορισμού των υδρόφιλων νανοκουκκίδων παρατηρείται στα 420 nm και επιτυγχάνεται με διέγερση στα 330 nm. Επιπλέον, στο φάσμα, φαίνεται ότι καθώς το μήκος κύματος διέγερσης αυξάνεται από τα 280 nm έως τα 330 nm, η ένταση εκπομπής αυξάνεται, όπου και παρατηρείται η μέγιστη εκπομπή. Τέλος, η κβαντική απόδοση των υδρόφιλων νανοκουκκίδων υπολογίστηκε ίση με 9%.

Όσον αφορά τις υδρόφοβες νανοκουκκίδες, η μέγιστη εκπομπή φθορισμού εντοπίζεται στα 465 nm, έπειτα από διέγερση στα 380 nm. Όμοια με προηγουμένως, φαίνεται ότι καθώς το μήκος κύματος διέγερσης αυξάνεται από τα 320 nm έως τα 380 nm, η ένταση εκπομπής αυξάνεται, όπου και παρατηρείται η μέγιστη εκπομπή. Από τα 380 nm έως τα 420 nm, η εκπομπής μειώνεται. Η κβαντική απόδοση για τις υδρόφοβες νανοκουκκίδες, υπολογίστηκε ίση με 13%.



Εικόνα 22: Φάσματα εκπομπής φθορισμού των (α) υδρόφιλων και (β) υδρόφοβων νανοκουκκίδων για διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης.

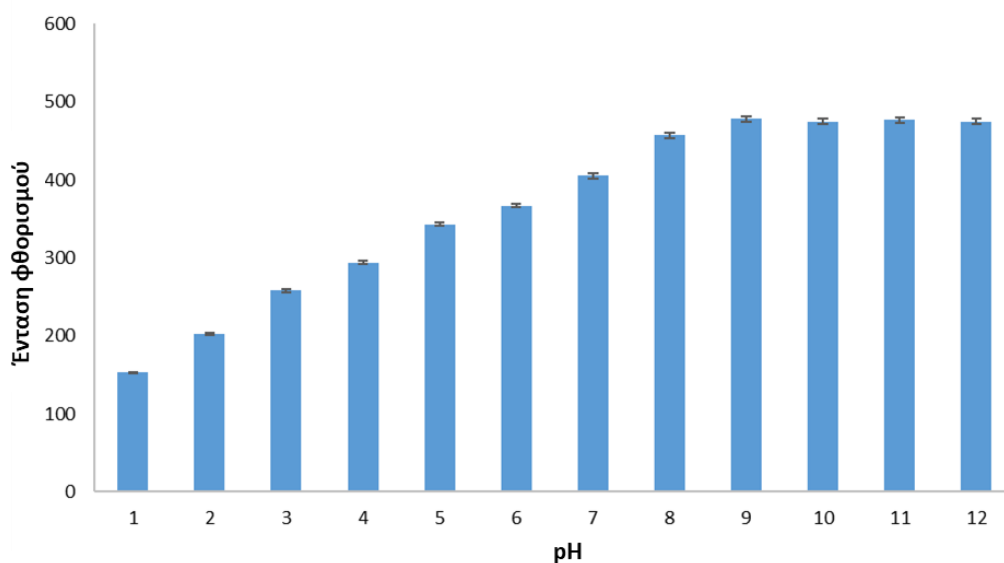
3.1.6. Μελέτη σταθερότητας φθορισμού

Η ένταση του φθορισμού των υδρόφιλων νανοκουκκίδων μελετήθηκε σε διαλύματα διαφόρων τιμών pH, έως την τιμή 12,0. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 23**, παρατηρείται αύξηση της έντασης του φθορισμού για pH=1,0-9,0, και ακολούθως, η ένταση αποκτά μία σταθερή τιμή στην περιοχή pH=9,0-

12,0. Η ποικιλομορφία αυτή στην ένταση του φθορισμού συναρτηθεί της τιμής pH των διαλυμάτων πιθανότατα σχετίζεται με διαδικασίες πρωτονίωσης και αποπρωτονίωσης που συμβαίνουν στις λειτουργικές ομάδες της επιφάνειας των υδρόφιλων νανοκουκκίδων, όπως τις καρβοξυλο- οι αμινο- ομάδες και τις υδροξυλο-ομάδες. [66]

Ακολουθως, εξετάστηκε η επίδραση της ιοντικής ισχύος στην ένταση του φθορισμού. Δεν παρατηρήθηκε κάποια ουσιαστική επίδραση στην ένταση με τη χρήση των αλάτων χλωριούχου νατρίου και θειικού νατρίου, ακόμη και στις μέγιστες συγκεντρώσεις που έφταναν το 1,0 mol/L.

Η φωτοσταθερότητα των νανοκουκκίδων, μελετήθηκε έπειτα από έκθεσή τους για 1 h, σε λάμπα Xe ισχύος 150 Watt. Η ένταση του φθορισμού βρέθηκε πως δεν επηρεάζεται υπό αυτές τις συνθήκες. Τέλος, έπειτα από 1 μήνα αποθήκευσης των υδατικών διαλυμάτων σε θερμοκρασία 4°C, δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική μεταβολή στην ένταση του φθορισμού των νανοκουκκίδων (μείωση έντασης <0,1%). Ομοίως, εξετάστηκε η φωτοσταθερότητα και των υδρόφοβων νανοκουκκίδων (έκθεση 1 h σε λάμπα Xe ισχύος 150 Watt) και η αποθήκευση στις ίδιες συνθήκες (4°C για 1 μήνα). Όπως και παραπάνω, έτσι και στην περίπτωση των υδρόφοβων νανοκουκκίδων δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στην ένταση του φθορισμού.



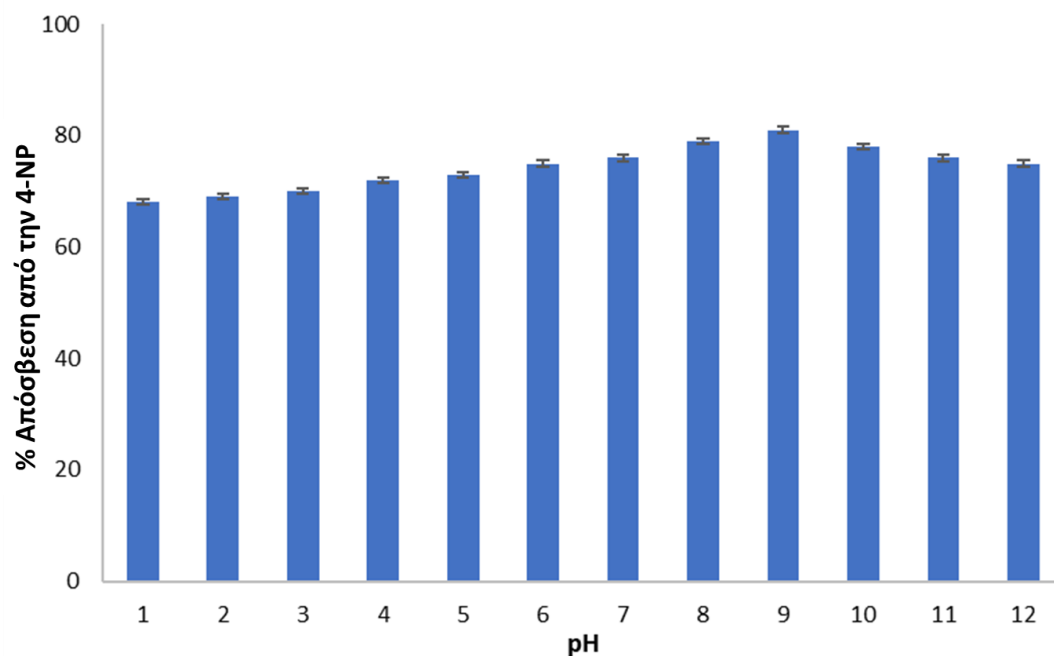
Εικόνα 23: Ένταση του φθορισμού των υδρόφιλων νανοκουκκίδων άνθρακα συναρτηθεί των τιμών pH του διαλύματός τους για $\lambda_{ex}=330$ nm και $\lambda_{em}=420$ nm.

3.2. Φθορισμομετρικός προσδιορισμός της 4-νιτροφαινόλης – Μελέτη εκλεκτικότητας

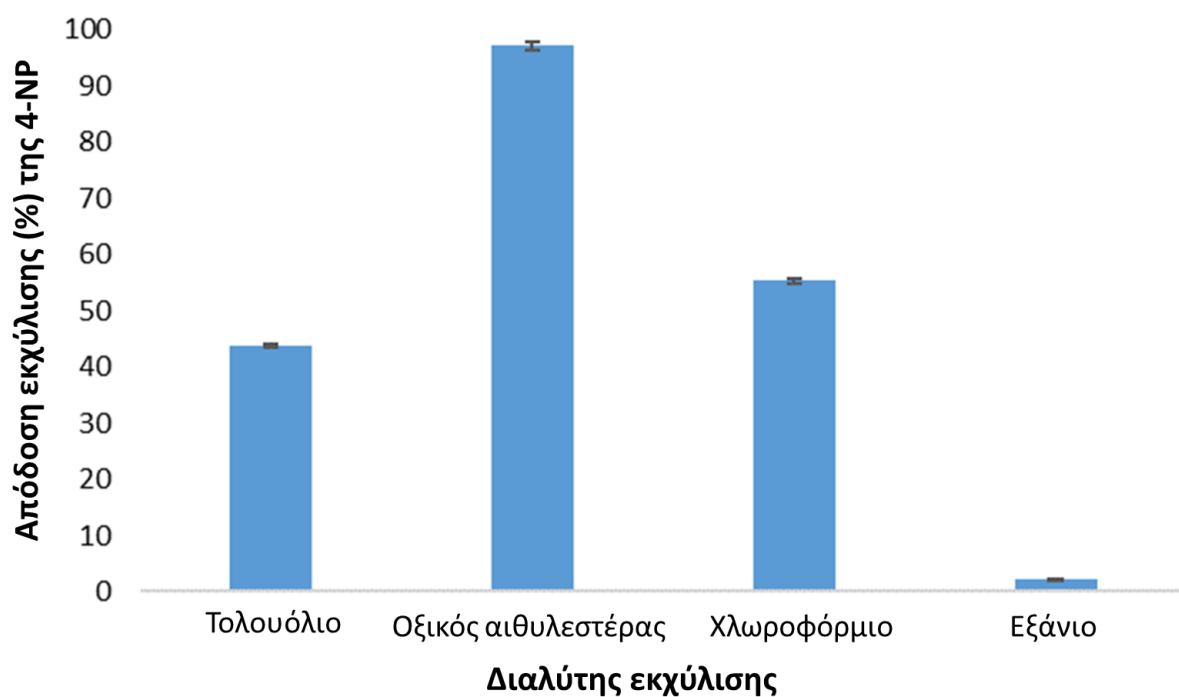
Προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα των συντιθέμενων υδρόφιλων και υδρόφοβων νανοκουκκίδων ως ανιχνευτές ρύπων ή γενικότερα ενώσεων-μεταλλικών ιόντων, πραγματοποιήθηκε μια εκτενής μελέτη από την οποία προέκυψε ότι η 4-NP προκαλεί σημαντική απόσβεση στην ένταση του φθορισμού και γι' αυτό μελετήθηκε περαιτέρω η συμπεριφορά της σε αναλυτικά συστήματα. Για τη διαδικασία βελτιστοποίησης του προσδιορισμού της 4-NP χρησιμοποιώντας τις υδρόφιλες νανοκουκκίδες, μελετήθηκε αρχικά η επίδραση της τιμής του pH υδατικών διαλυμάτων, μιας και η 4-NP είναι μια ένωση που μπορεί να ιοντίζεται ανάλογα με το pH. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 24**, η απόσβεση της έντασης του φθορισμού των υδρόφιλων νανοκουκκίδες, αυξάνεται για το εύρος τιμών $\text{pH}=1,0-9,0$ και έπειτα μειώνεται. Παρ' όλο που η διαφορά στις τιμές της έντασης δεν είναι σημαντικές, ως βέλτιστη τιμή pH για τη διεξαγωγή των πειραμάτων προσδιορισμού επιλέχθηκε η τιμή 9,0, ώστε να επιτευχθεί η βέλτιστη απόκριση. Ακόμη, μελετήθηκε η επίδραση της ιοντικής ισχύος και η παρουσία των χουμικών οξέων στη διαδικασία προσδιορισμού της 4-NP. Τόσο η ύπαρξη των αλάτων χλωριούχου νατρίου και θειικού νατρίου σε συγκεντρώσεις έως 1 mol/L όσο και η παρουσία των χουμικών οξέων σε συγκεντρώσεις έως 10 mg/L, δε βρέθηκαν να επηρεάζουν με κάποιο τρόπο τη διαδικασία απόσβεσης του φθορισμού.

Η ίδια μελέτη πραγματοποιήθηκε και για τις υδρόφοβες νανοκουκκίδες, χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά οργανικούς διαλύτες, εξαιτίας της χαμηλής διασποράς των νανοκουκκίδων στο νερό. Ακόμη, ήταν αναγκαίο η 4-NP να εκχυλιστεί από το μητρικό δείγμα με τον κατάλληλο οργανικό διαλύτη. Για το σκοπό αυτό, δοκιμάστηκαν οι οργανικοί διαλύτες τολουόλιο, χλωροφόρμιο, εξάνιο και οξικός αιθυλεστέρας, ώστε να αξιολογηθεί η ικανότητα εκχύλισης της 4-νιτροφαινόλης από τα υδατικά διαλύματα. Από τους παραπάνω, λοιπόν, διαλύτες τα καλύτερα αποτελέσματα ελήφθησαν κατά την εκχύλιση με τον οξικό αιθυλεστέρα (**Εικόνα 25**). Τέλος, για να επιτευχθεί η μέγιστη επίδοση ποσοτικοποίησης της 4-NP κατά τη διαδικασία, εξετάστηκε και η τιμή του pH των υδατικών διαλυμάτων. Όπως φαίνεται στη **Εικόνα 26**, τα βέλτιστα

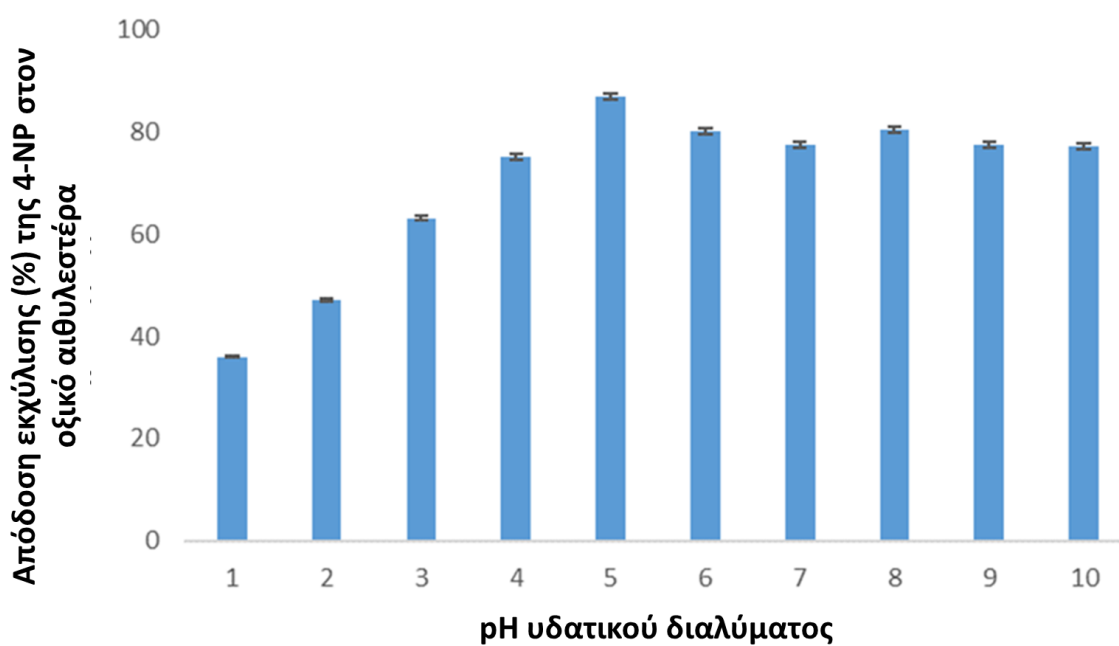
αποτελέσματα επιτεύχθηκαν όταν η τιμή pH ρυθμίστηκε σε περίπου 5,5. Με δεδομένο ότι η τιμή pK_a για την 4-νιτροφαινόλη είναι ίση με 7,15, σε συνθήκες pH ίσο με 5,5, η 4-νιτροφαινόλη θα υπάρχει στη μη ιοντισμένη μορφή της.



Εικόνα 24: Απόσβεση του φθορισμού των υδρόφιλων νανοκουκκίδων άνθρακα παρουσία της 4-νιτροφαινόλης, σε διάφορες τιμές pH για $\lambda_{ex}=330$ nm και $\lambda_{em}=420$ nm.

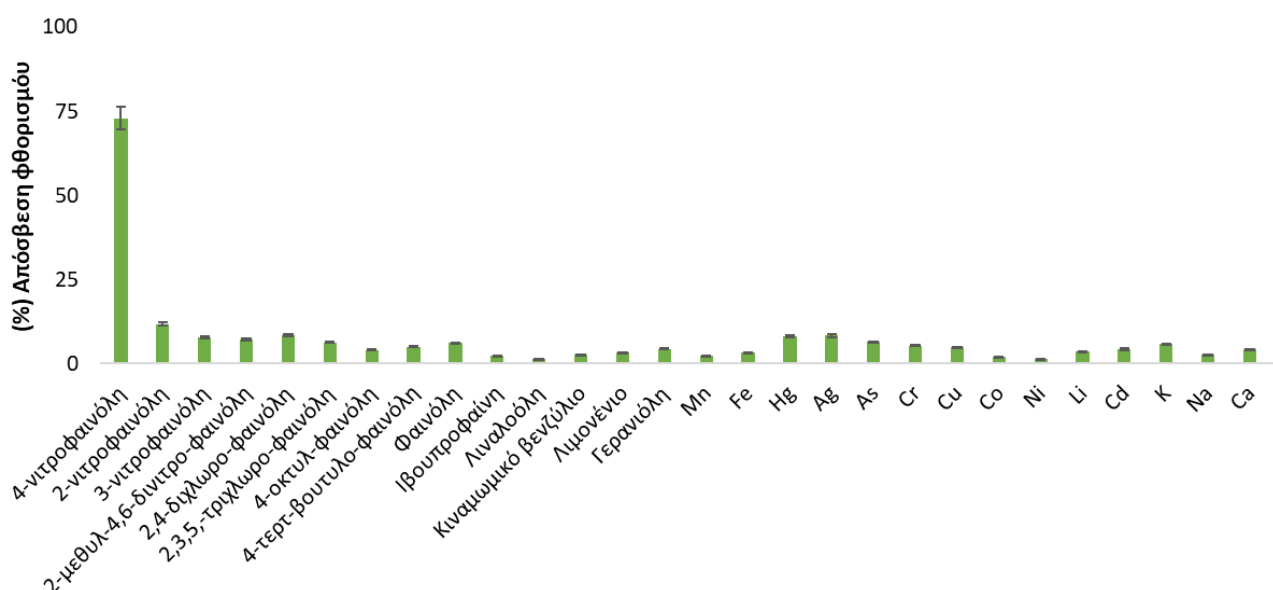


Εικόνα 25: Απόδοση εκχύλισης (%) της 4-νιτροφαινόλης από διάφορους οργανικούς διαλύτες, σε pH=5,5.



Εικόνα 26: Απόδοση εκχύλισης (%) της 4-νιτροφαινόλης στον οξικό αιθυλεστέρα σε διάφορες τιμές pH.

Κατά τη διαδικασία μελέτης της εκλεκτικότητας των δύο διαφορετικών ειδών νανοκουκκίδων, δοκιμάστηκαν διάφορες χημικές ενώσεις και μεταλλικά ιόντα, στις βέλτιστες συνθήκες και σε ένα εύρος συγκεντρώσεων έως 50 μM , για το κάθε είδος νανοκουκκίδων, ως πιθανοί παρεμποδιστικοί παράγοντες και κατ' επέκταση παράγοντες απόσβεσης του φθορισμού. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν φαινόλες [4-NP, 2-νιτροφαινόλη (2-NP), 3-νιτροφαινόλη, 2-μεθυλ-4,6-δινιτρο-φαινόλη, 2,4-διχλωροφαινόλη, 2,3,5-τριχλωρο-φαινόλη, 4-οκτυλ-φαινόλη, 4-τερτ-βουτυλο-φαινόλη, φαινόλη], φαρμακευτική ουσία (Ιβουπροφαίνη), αλλεργιογόνα (Λιναλοόλη, Κιναμωμικό βενζόλιο, Λιμονένιο, Γερανιόλη) και ιόντα μετάλλων (Mn, Fe, Hg, Ag, As, Cr, Cu, Co, Ni, Li, Cd, K, Na, Ca]. Στην **Εικόνα 27**, φαίνεται πως η 4-NP προκαλεί αξιοσημείωτη απόσβεση στην ένταση του φθορισμού, συγκριτικά με τις υπόλοιπες ενώσεις-ιόντα που δε φαίνεται να αποκρίνονται, εκτός της 2-NP, η οποία επίσης προκαλεί απόσβεση του φθορισμού, εμφανώς χαμηλότερη από αυτή της 4-NP. Η απόκριση των συντιθέμενων νανοκουκκίδων στην 4-NP, τις καθιστά ικανές για τη χρήση τους ως πιθανούς φθορισμομετρικούς νανοανιχνευτές.

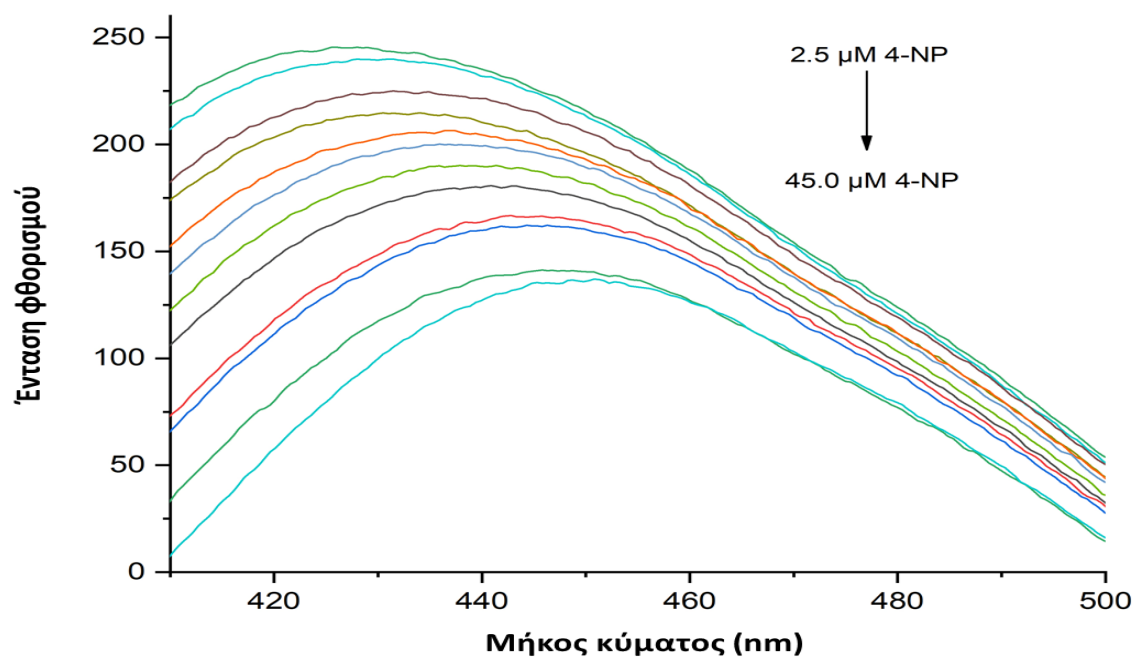


Εικόνα 27: Απόσβεση του φθορισμού των υδρόφιλων νανοκουκκίδων άνθρακα που προκαλούν διάφορες φαινολικές ενώσεις και ιόντα μετάλλων σε συγκέντρωση 50 μM για $\lambda_{\text{ex}}=330 \text{ nm}$ και $\lambda_{\text{em}}=420 \text{ nm}$.

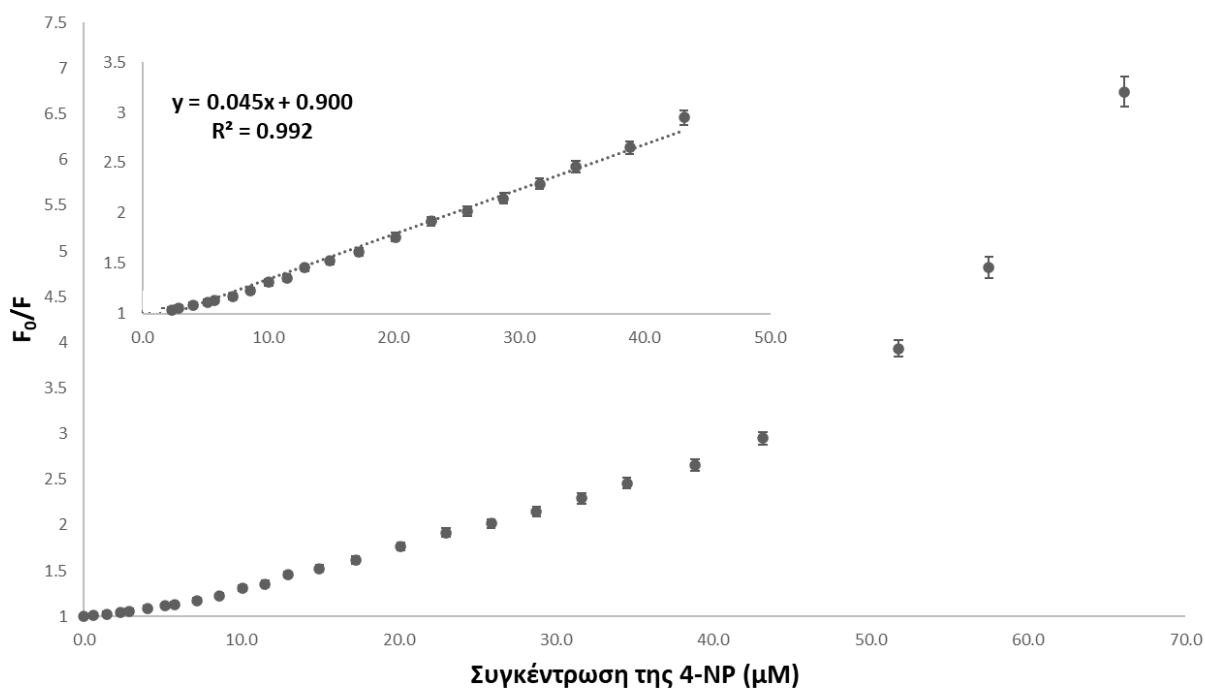
3.3. Αναλυτικά δεδομένα φθορισμομετρικού προσδιορισμού της 4-νιτροφαινόλης

3.3.1. Υδρόφιλες νανοκουκκίδες άνθρακα

Στην **Εικόνα 28** φαίνεται το φάσμα εκπομπής φθορισμού των υδρόφιλων νανοκουκκίδων παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων της 4-NP. Παρατηρείται μείωση της έντασης στο μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής καθώς και μια αισθητή μετατόπιση προς την περιοχή του ερυθρού του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Στην **Εικόνα 29** φαίνεται ο λόγος F_0/F (όπου F_0 : αρχική τιμή φθορισμού και F : τιμή φθορισμού παρουσία της 4-NP) συναρτήσει της συγκέντρωσης 4-NP, σε ένα εύρος συγκεντρώσεων έως και 66,0 μM . Ο λόγος της απόσβεσης του φθορισμού συναρτήσει της συγκέντρωσης 4-NP παρουσιάζει γραμμικότητα, υπό τις βέλτιστες συνθήκες, για τιμές συγκεντρώσεων εντός του εύρους τιμών από 0,8 έως 45,0 μM , με συντελεστή προσδιορισμού $R^2 = 0,992$. Το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε σύμφωνα με το κριτήριο $3 \times \text{σήμα/θόρυβο}$ και βρέθηκε ίσο με 0,3 μM . Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) τριών μετρήσεων για συγκέντρωση 4-NP ίση με 20 μM υπολογίστηκε ίση με 2,1% για μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν εντός της ίδιας ημέρας και 2,9% για μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε διαδοχικές ημέρες. Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 3**, η ανίχνευση της 4-NP με χρήση των συγκεκριμένων νανοκουκκίδων επιβεβαιώθηκε έπειτα από τα πειράματα ανάκτησης σε πραγματικά δείγματα (λύματα αστικού βιολογικού καθαρισμού, νερό βρύσης και ανθρώπινα ούρα). Η πορεία περιλάμβανε την προσθήκη της 4-NP σε πραγματικό δείγμα, ώστε η συγκέντρωση της 4-NP να είναι 5,1, 15,3, 40,2 μM . Οι ανακτήσεις για τη χαμηλότερη συγκέντρωση 4-NP (5,1 μM) κυμαίνονται από 102,2 έως 113,7%, για τη μεσαία συγκέντρωση (15,3 μM) από 103,3 έως 105,2% και για την υψηλότερη συγκέντρωση (40,2 μM) κυμαίνονται από 102,2 έως 103,0%. Επίσης, πέρα από την απόσβεση του φθορισμού των διαλυμάτων υδρόφιλων νανοκουκκίδων παρουσία της 4-NP παρατηρήθηκε μετατόπιση του μεγίστου εκπομπής προς την περιοχή του ερυθρού στο φάσμα εκπομπής, έως και 35nm.



Εικόνα 28: Απόσβεση του φθορισμού και μετατόπιση του μεγίστου εκπομπής των υδρόφιλων νανοκουκκίδων άνθρακα παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων της 4-νιτροφαινόλης, υπό τις βέλτιστες πειραματικές συνθήκες, για $\lambda_{ex}=330$ nm και $\lambda_{em}=420$ nm.



Εικόνα 29: Διάγραμμα του λόγου απόσβεσης φθορισμού (F_0/F) των υδρόφιλων νανοκουκκίδων άνθρακα συναρτήσει της συγκέντρωσης της 4-νιτροφαινόλης, για $\lambda_{ex}=330$ nm και $\lambda_{em}=420$ nm.. Εσωτερικά: καμπύλη βαθμονόμησης.

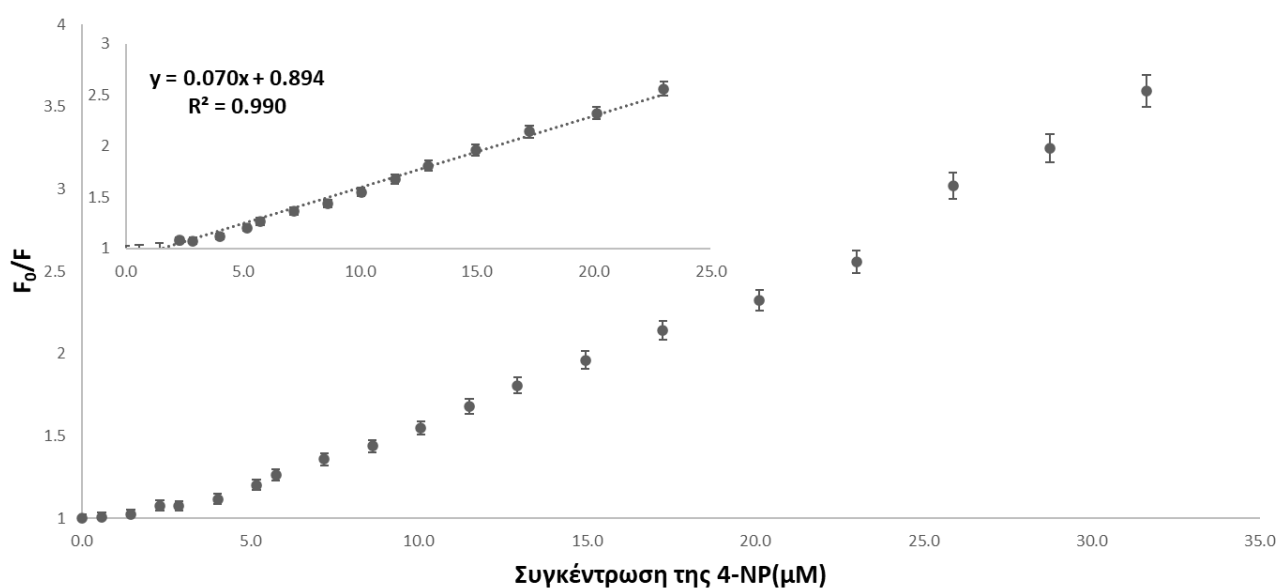
Πίνακας 3: Ανακτήσεις από πραγματικά δείγματα για τις υδρόφιλες νανοκουκκίδες άνθρακα για τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις 4-νιτροφαινόλης. Κάθε αποτέλεσμα αποτελεί μέσο όρο τριών μετρήσεων.

Δείγμα	Συγκέντρωση 4-NP (μM)		Ανάκτηση (%)
	Προστέθηκε	Προσδιορίστηκε	
Νερό βρύσης	0	δεν ανιχνεύθηκε	-
	5,1	5,3	103,9
	15,3	15,8	103,3
	40,2	41,1	102,2
Λύματα αστικού βιολογικού καθαρισμού	0	δεν ανιχνεύθηκε	-
	5,1	5,5	107,8
	15,3	16	104,6
	40,2	41,4	103,0
Ανθρώπινα ούρα	0	δεν ανιχνεύθηκε	-
	5,1	5,8	113,7
	15,3	16,1	105,2
	40,2	41,1	102,2

3.3.2. Υδρόφοβες νανοκουκκίδες άνθρακα

Όπως και παραπάνω, έτσι και τα οργανικά διαλύματα των συντιθέμενων υδρόφοβων νανοκουκκίδων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση της 4-NP. Η **Εικόνα 30** δείχνει το γράφημα στο οποίο απεικονίζεται ο λόγος F_0/F συναρτήσει της συγκέντρωσης της 4-NP, σε ένα εύρος συγκεντρώσεων έως 32,0 μM. Ο λόγος της απόσβεσης του φθορισμού συναρτήσει της συγκέντρωσης της 4-NP παρουσιάζει γραμμικότητα στην περιοχή 1,4-23,0 μM με συντελεστή προσδιορισμού $R^2 = 0,990$. Το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε σύμφωνα με το κριτήριο 3 x σήμα/θόρυβο και βρέθηκε ίσο με 0,5 μM. Η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) τριών μετρήσεων για συγκέντρωση 10 μM υπολογίστηκε ίση με 3,3% για μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν εντός της ίδιας ημέρας και 4,0% για μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε διαδοχικές ημέρες. Επίσης, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 4**, η ανίχνευση της 4-NP με χρήση των συγκεκριμένων νανοκουκκίδων, επιβεβαιώθηκε έπειτα από τα

πειράματα ανάκτησης σε πραγματικά δείγματα (λύματα αστικού βιολογικού καθαρισμού και ανθρώπινα ούρα). Οι ανακτήσεις για τη χαμηλότερη συγκέντρωση 4-NP (7,5 μM) κυμαίνονται από 101,3 έως 104,5%, για τη μεσαία συγκέντρωση (15,5 μM) από 99,3 έως 104,5% και για την υψηλότερη συγκέντρωση (22,5 μM) κυμαίνονται από 98,2 έως 102,7% αντίστοιχα. Κατά την απόσβεση του φθορισμού διαλυμάτων των υδρόφοβων νανοκουκκίδων παρουσία της 4-NP δεν παρατηρήθηκε μετατόπιση στο φάσμα εκπομπής προς την περιοχή του ερυθρού.



Εικόνα 30: Διάγραμμα του λόγου απόσβεσης φθορισμού (F_0/F) των υδρόφοβων νανοκουκκίδων άνθρακα συναρτήσει της συγκέντρωσης της 4-νιτροφαινόλης, για $\lambda_{\text{ex}}=380 \text{ nm}$ και $\lambda_{\text{em}}=465 \text{ nm}$. Εσωτερικά: καμπύλη βαθμονόμησης.

Πίνακας 4: Ανακτήσεις από πραγματικά δείγματα με τη χρήση υδρόφοβων νανοκουκκίδων άνθρακα για τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις 4-νιτροφαινόλης. Κάθε αποτέλεσμα αποτελεί μέσο όρο τριών μετρήσεων.

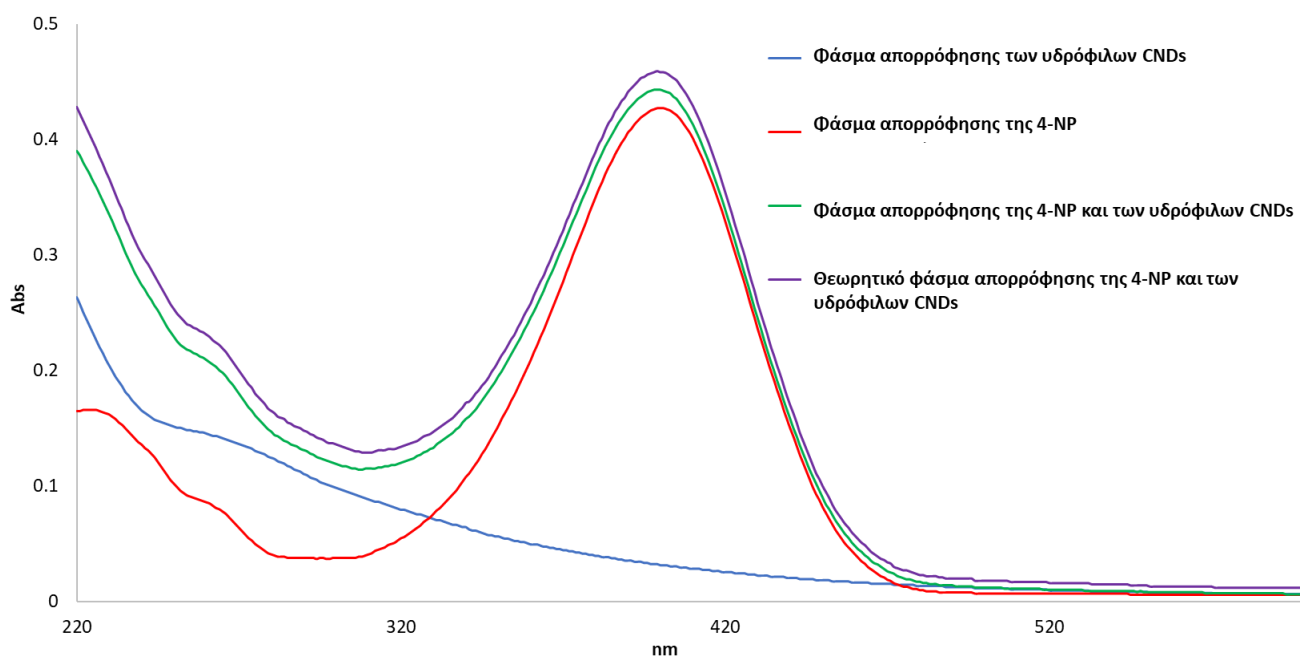
Δείγμα	Συγκέντρωση 4-NP (μM)		Ανάκτηση (%)
	Προστέθηκε	Προσδιορίστηκε	
Λύματα αστικού βιολογικού καθαρισμού	0	δεν ανιχνεύθηκε	-
	7,5	7,6	101,3
	15,4	16,1	104,5
	22,6	22,2	98,2
Ανθρώπινα ούρα	0	δεν ανιχνεύθηκε	-
	7,5	7,8	104,0
	15,4	15,3	99,3
	22,6	23,2	102,7

3.3.3. Μηχανισμός απόσβεσης φθορισμού των υδρόφιλων νανοκουκκίδων άνθρακα

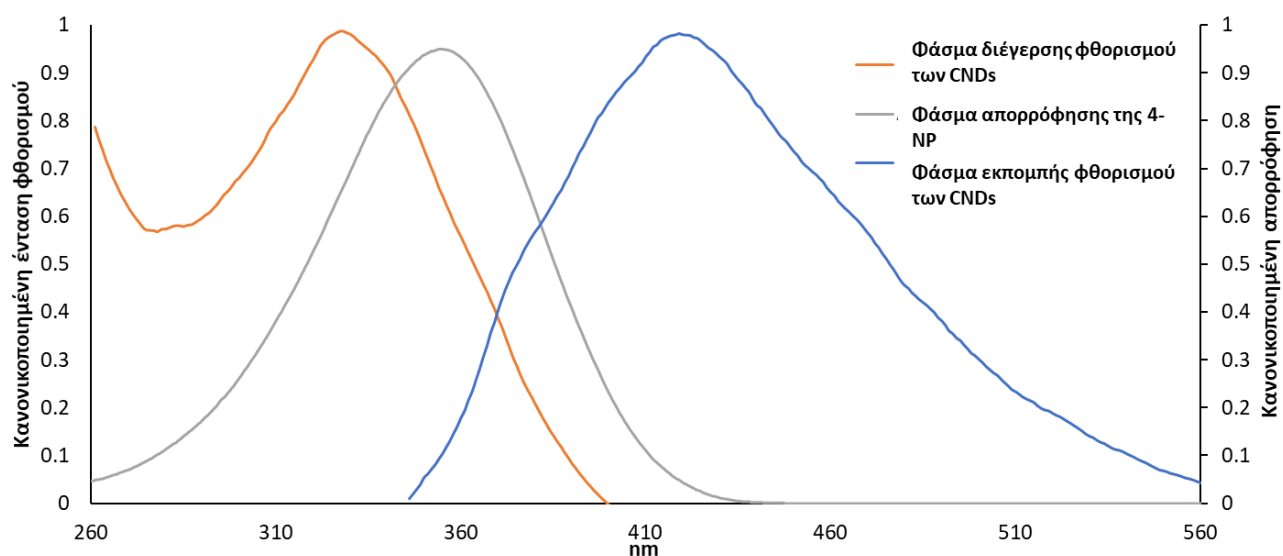
Για τη διαπίστωση του πιθανού μηχανισμού απόσβεσης του φθορισμού των υδρόφιλων νανοκουκκίδων παρουσία της 4-NP, χρειάστηκε να διεξαχθούν κάποια επιπλέον πειράματα. Αρχικά, μελετήθηκε η απόσβεση που προκάλεσαν διαφορετικές συγκεντρώσεις της 4-NP, σε διαφορετικές θερμοκρασίες, δηλαδή 20, 30 and 40°C. Παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση στην απόσβεση καθώς η θερμοκρασία αυξανόταν, ένδειξη στατικού μηχανισμού. Ωστόσο, εφόσον οι μεταβολές στην απόσβεση ήταν οριακές, θεωρήθηκε ότι ο στατικός μηχανισμός δεν αποτελεί το βασικό μηχανισμό απόσβεσης. Για την περεταίρω επιβεβαίωση ή όχι του παραπάνω μηχανισμού, ελήφθησαν τα φάσματα απορρόφησης των υδρόφιλων νανοκουκκίδων, της 4-NP και του μείγματος αυτών. Το τελευταίο φάσμα απορρόφησης συγκρίθηκε με το θεωρητικό άθροισμα των δύο προηγούμενων, οπότε και παρατηρήθηκε μείωση στο φάσμα απορρόφησης του μείγματος, υποδεικνύοντας το σχηματισμό κάποιου συμπλόκου. [64,67,68]

Στη συνέχεια, ελήφθησαν τα φάσματα απορρόφησης της 4-NP, και τα φάσματα διέγερσης και εκπομπής των υδρόφιλων νανοκουκκίδων, που απεικονίζονται στην **Εικόνα 31**, σε γράφημα που προέκυψε έπειτα από

κανονικοποίηση των τιμών. Όπως φαίνεται, υπάρχει μία σημαντική αλληλοεπικάλυψη μεταξύ του φάσματος απορρόφησης της 4-NP και του φάσματος διέγερσης των υδρόφιλων νανοκουκκίδων, γεγονός που υποδεικνύει τον μηχανισμό εσωτερικού φίλτρου (inner filter effect, IFE), ως τον επικρατέστερο μηχανισμό.



Εικόνα 31: Φάσματα απορρόφησης των υδρόφιλων νανοκουκκίδων άνθρακα, της 4-νιτροφαινόλης, του μείγματος των δύο παραπάνω (πραγματικό και θεωρητικό).



Εικόνα 32: Φάσματα διέγερσης και εκπομπής των υδρόφιλων νανοκουκκίδων άνθρακα και φάσμα απορρόφησης της 4-νιτροφαινόλης, έπειτα από κανονικοποίηση των τιμών.

Ο μηχανισμός εσωτερικού φίλτρου προκύπτει όταν το φως διέγερσης ή εκπομπής, ενός φθορίζοντος στοιχείου π.χ. νανοκουκκίδες, απορροφάται από μόρια-απορροφητές της ακτινοβολίας, όπως στην περίπτωση αυτή η 4-NP. Επιπλέον, στον μηχανισμό εσωτερικού φίλτρου δεν απαιτείται η ομοιοπολική σύνδεση μεταξύ του φθορίζοντα αισθητήρα και του πιθανού απορροφητή, παρέχοντας έτσι απλότητα και ευκολία στην κατασκευή νανοανιχνευτών. [69]

3.3.4. Μετατόπιση του φάσματος εκπομπής των υδρόφιλων νανοκουκκίδων άνθρακα προς το ερυθρό, σε σχέση με τη συγκέντρωση της 4-NP

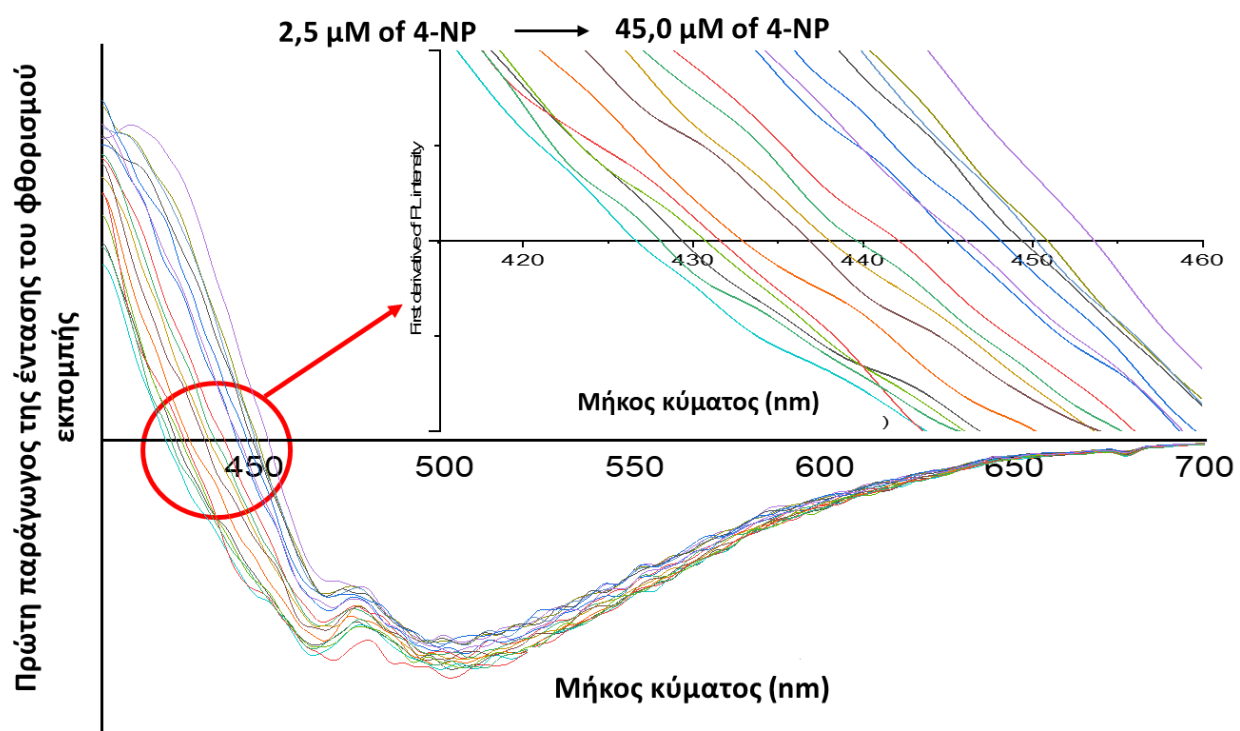
Όπως προαναφέρθηκε, η προσθήκη της 4-NP, εκτός από την απόσβεση στο μέγιστο του φθορισμού εκπομπής, προκαλεί και μια αισθητή μετατόπιση του ίδιου του φάσματος προς την ερυθρή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Η μετατόπιση αυτή παρατηρείται καθώς η συγκέντρωση της 4-NP αυξάνεται έως τα 55,0 μM που αντιστοιχεί σε μετατόπιση προς το ερυθρό του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος έως και 35 nm. Το φαινόμενο της μετατόπισης προς το ερυθρό συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναλύτη είναι κάτι που έχει παρατηρηθεί ξανά σε σύστημα που συνδέονται με τον μηχανισμό IFE. [70]

Με δεδομένη αυτή τη συμπεριφορά, εξετάστηκε κατά πόσο η ιδιότητα αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πιθανό μοντέλο ποσοτικοποίησης της 4-NP. Αξιοσημείωτο είναι ότι η 4-NP αποτελεί τον μοναδικό αναλύτη που προκαλεί τη μετατόπιση αυτή στο φάσμα εκπομπής, ακόμη και σε συνθήκες παρουσίας άλλων ενώσεων που μπορεί να προκαλούν απόσβεση του φθορισμού, όπως η 2-NP. Έτσι, αποτελεί μια επιπλέον εναλλακτική μέθοδο ποσοτικοποίησης της 4-NP παρουσία της 2-NP.

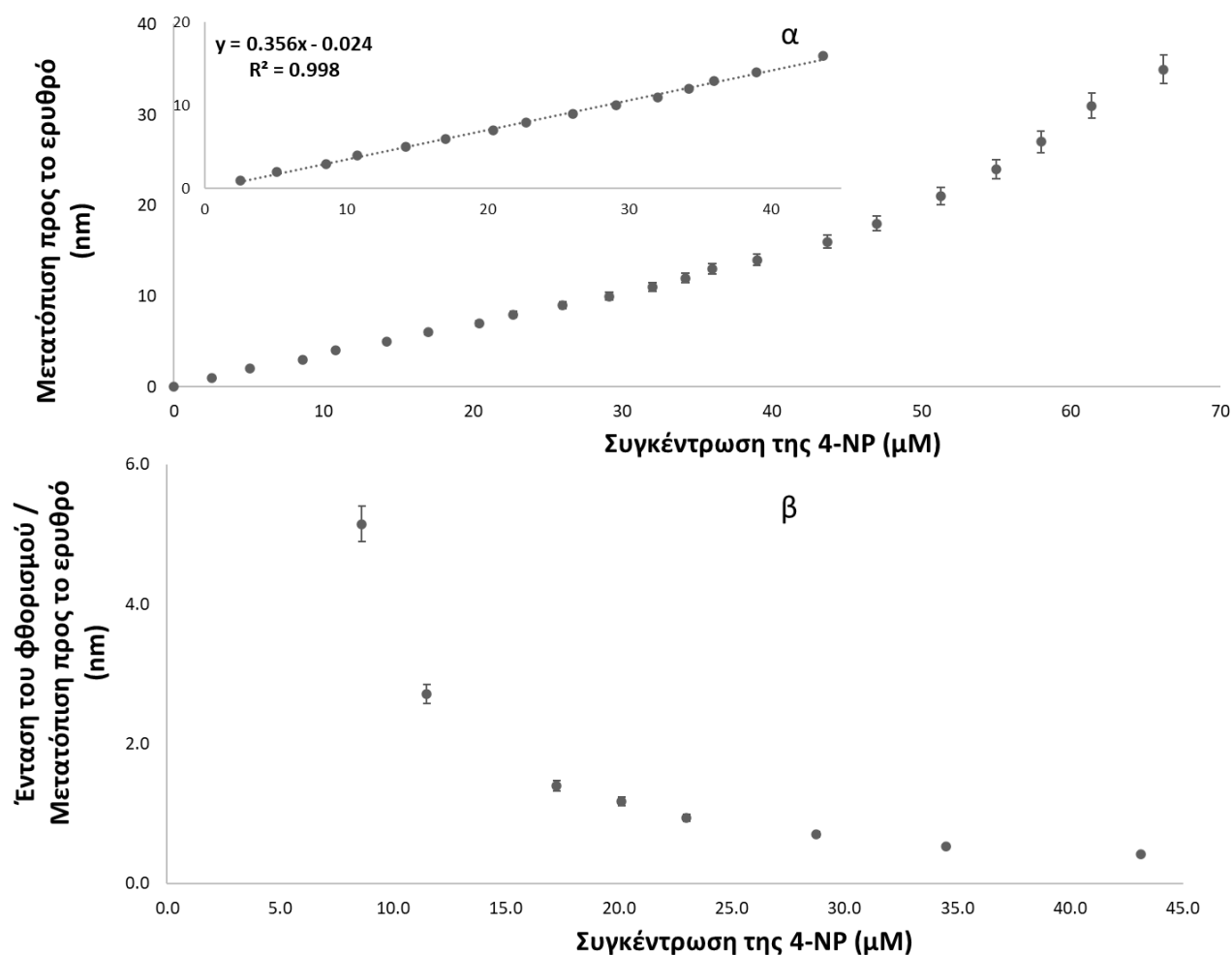
Αφού καταγράφηκαν τα φάσματα εκπομπής των υδρόφιλων νανοκουκκίδων παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων της 4-NP, στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι πρώτες παράγωγοι των φασμάτων αυτών. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 33**,

η μετατόπιση προς το ερυθρό, και κατ' επέκταση το σημείο στο οποίο η πρώτη παράγωγος μηδενίζεται, είναι ανάλογο της αυξανόμενης συγκέντρωσης της 4-NP. Ακόμη, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 34**, παρουσιάζει γραμμικότητα στην περιοχή των τιμών συγκέντρωσης της 4-NP, από 2,5 έως 45,0 μM , με συντελεστή προσδιορισμού $R^2 = 0,998$. Επίσης, υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) για τρεις μετρήσεις συγκέντρωσης 20 μM 4-NP και βρέθηκε ίση με 2,8% για μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν εντός της ίδιας ημέρας και 3,5% για μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε διαδοχικές ημέρες. Τέλος, σε διαλύματα-μίγματα της 4-NP και 2-NP σε γραμμομοριακή αναλογία έως και 1:20 (4-NP : 2-NP), η μετατόπιση του μέγιστου προς την περιοχή του ερυθρού δεν επηρεάστηκε. Χρησιμοποιώντας τη συγκεκριμένη μέθοδο σε πειράματα ανάκτησης για συγκεντρώσεις 10, 20 και 30 μM , οι τιμές κυμαίνονται σε ικανοποιητικό εύρος και συγκεκριμένα στην περιοχή 104,6%-111,6% (κάθε αποτέλεσμα αποτελεί μέσο όρο τριών μετρήσεων).

Τέλος, υπολογίστηκε ο λόγος της έντασης του φθορισμού προς την μετατόπιση προς το ερυθρό σε nm συναρτήσει της συγκέντρωσης της 4-NP (**Εικόνα 34**). Από τη μορφή και τη κλίση της καμπύλης, φαίνεται πως στις χαμηλότερες περιοχές συγκέντρωσης της 4-NP ο λόγος αυτός μεταβάλλεται πολύ πιο απότομα απ' ό,τι στο υπόλοιπο μέρος της καμπύλης. Συνεπώς, παρατηρείται μεγαλύτερη απόσβεση του φθορισμού συγκριτικά με την αντίστοιχη μετατόπιση. Καθώς η συγκέντρωση της 4-NP αυξάνεται ($>16 \mu\text{M}$), η κλίση της καμπύλης αλλάζει και η μετατόπιση που παρατηρείται είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με την απόσβεση για την ίδια συγκέντρωση.



Εικόνα 33: Πρώτη παράγωγος των φασμάτων φθορισμού, για πρότυπα διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης 4-νιτροφαινόλης, υπό τις βέλτιστες συνθήκες, για $\lambda_{\text{ex}}=330$ nm και $\lambda_{\text{em}}=420$ nm. Μεγέθυνση: Σημείο μηδενισμού της πρώτης παραγώγου των φασμάτων.



Εικόνα 34: (α) Μετατόπιση προς το ερυθρό του φάσματος εκπομπής, σε διάφορες συγκεντρώσεις 4-νιτροφαινόλης (μM), για $\lambda_{ex}=330$ nm και $\lambda_{em}=420$ nm. Εσωτερικά: καμπύλη βαθμονόμησης. (β) Ένταση φθορισμού / Μετατόπιση του φάσματος εκπομπής προς το ερυθρό (nm) σε διάφορες συγκεντρώσεις της 4-νιτροφαινόλης, για $\lambda_{ex}=330$ nm και $\lambda_{em}=420$ nm.

3.4. Τοξικότητα στο Zebrafish

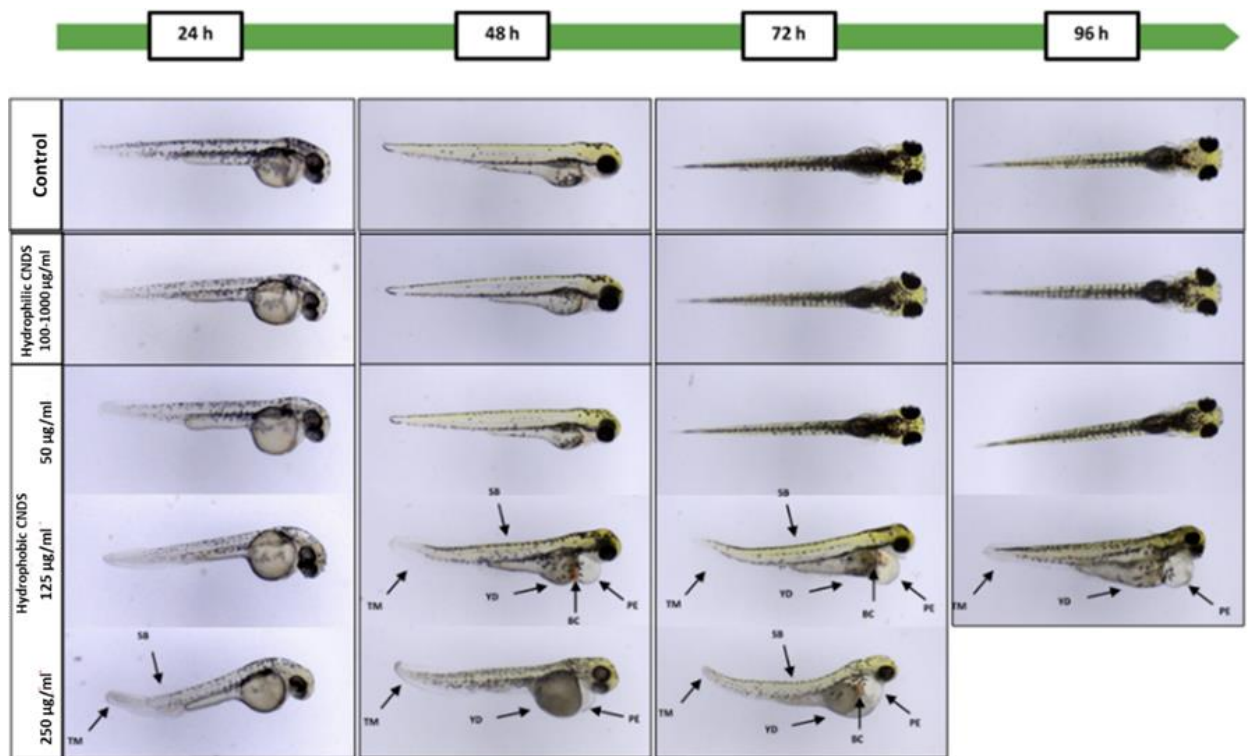
Πέρα από τις φυσικοχημικές ιδιότητες και τα αναλυτικά χαρακτηριστικά, ήταν αναγκαία και η μελέτη του προφίλ τοξικότητας των νανοκουκκίδων άνθρακα προκειμένου να ολοκληρωθεί ο χαρακτηρισμός τους. Έτσι, τα δύο είδη των νανοκουκκίδων που συντέθηκαν από τη *Dunaliella salina*, αξιολογήθηκαν έπειτα από την έκθεση των ψαριών Zebrafish σε αυτές. Στις δοκιμές τοξικότητας που πραγματοποιήθηκαν έμβρυα (λάρβες) Zebrafish εκτέθηκαν σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 50-1000 μg/mL των επιλεγμένων

νανοκουκκίδων με στόχο τον προσδιορισμό του τοξικολογικού τους δυναμικού.

Η έκθεση των λαρβών στα διαλύματα των δύο διαφορετικών νανοκουκκίδων έδωσε τα εξής αποτελέσματα: Από τα δεδομένα θνησιμότητας (**Εικόνα 35**) και τη συχνότητα εμφάνισης αναπτυξιακών διαταραχών προκύπτει ότι οι υδρόφιλες νανοκουκκίδες (διάλυμα έκθεσης σε δις απεσταγμένο νερό) δεν εμφανίζουν τοξικότητα ακόμη και σε συγκεντρώσεις της τάξης των 1000 $\mu\text{g/mL}$, πλην κάποιων ελάχιστων περιπτώσεων ελαφριάς δυσμορφίας της σπονδυλικής στήλης στην υψηλότερη συγκέντρωση έκθεσης, που πρακτικά είναι αδύνατον να υπάρχει έκθεση σε τέτοια τιμή.

Από την άλλη, όσον αφορά τις υδρόφοβες νανοκουκκίδες (διάλυμα έκθεσης σε διμεθυλοσουλφοξείδιο), υπάρχει τοξική επίδραση υπό τη μορφή υψηλών ποσοστών θνησιμότητας (**Εικόνα 35**) και αναπτυξιακών διαταραχών στις συγκεντρώσεις 125-500 $\mu\text{g/mL}$, με τις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις των 250 και 500 $\mu\text{g/mL}$ να οδηγούν σε 100% θνησιμότητα με το πέρας των 96 ωρών και στο πρώτο 24ώρο, αντίστοιχα. Στην **Εικόνα 35** παρουσιάζονται ενδεικτικά φωτογραφίες από εκτεθειμένα και μη εκτεθειμένα άτομα κατά τη διάρκεια των δοκιμών, ενώ επισημαίνονται και οι παρατηρούμενες δυσμορφίες.

Συμπερασματικά, οι νανοκουκκίδες άνθρακα που συντέθηκαν φαίνεται, συνολικά, να μην είναι τοξικές για το Zebrafish, γεγονός που είναι επιθυμητό όταν μιλάμε για συνθέσεις υλικών στην «Πράσινη Χημεία». Ωστόσο, η τοξική επίδραση που εμφάνισαν οι υδρόφοβες νανοκουκκίδες άνθρακα σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν δεν είναι ανησυχητικές καθώς θεωρείται ότι δεν είναι δυνατόν να υπάρξουν σε υδάτινο περιβάλλον σε τέτοιες συγκεντρώσεις. Επομένως, θεωρείται ότι τα υλικά είναι κατάλληλα για χρήση και αναλυτικές εφαρμογές σε συγκεντρώσεις που συνήθως απαντώνται.



Εικόνα 35: Αντιπροσωπευτικές εικόνες των λαμβών Zebrafish μετά από 24, 48, 72 και 96 ώρες έκθεσης σε διάλυμα μάρτυρα, διάλυμα υδρόφιλων νανοκουκκίδων και διάλυμα υδρόφοβων νανοκουκκίδων. Οι κύριες δυσμορφίες υποδεικνύονται με βέλη. PE: περικαρδιακό οίδημα, YD: παραμόρφωση/αποχρωματισμός της λεκίθου, TM: δυσμορφία ουράς, SP: κάμψη σπονδυλικής στήλης, BC: αιματική συμφόρηση

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή συντέθηκαν δύο είδη νανοκουκκίδων άνθρακα χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη βιομάζα από στέλεχος μικροφύκους *Dunaliella salina*. Η σύνθεση βασίστηκε στην εύκολη, φθηνή και γρήγορη μέθοδο της διαλυτοθερμικής επεξεργασίας σε τολουόλιο, από την οποία προέκυψαν τόσο υδρόφιλες όσο και υδρόφοβες νανοκουκκίδες άνθρακα.

Στη συνέχεια, από τη διαδικασία διαλογής (screening) ενώσεων αναλυτικού ενδιαφέροντος, βρέθηκε πως η 4-NP προκάλεσε απόσβεση στο φθορισμό προτύπων διαλυμάτων και των δύο ειδών νανοκουκκίδων. Ταυτόχρονα με την απόσβεση του φθορισμού παρατηρήθηκε έντονη μετατόπιση προς την ερυθρή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος κατά τη χρήση των υδρόφιλων νανοκουκκίδων. Έχοντας ως στόχο τον προσδιορισμό της 4-NP, αναπτύχθηκαν αναλυτικές μέθοδοι οι οποίες βελτιστοποιήθηκαν και τα αναλυτικά χαρακτηριστικά που προέκυψαν είναι ικανοποιητικά. Τέλος, ελέγχθηκε η πιθανή τοξικότητα των δύο νανοκουκκίδων κατά την ανάπτυξη λαρβών Zebrafish. Οι υδρόφιλες νανοκουκκίδες φαίνεται να μην εμφανίζουν τοξικότητα ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις. Από την άλλη, οι υδρόφοβες νανοκουκκίδες άνθρακα εμφάνισαν κάποια τοξική επίδραση σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις.

Με βάση τα παραπάνω, η εκλεκτική ανίχνευση της 4-NP σε υδατικά δείγματα και μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας οποιοδήποτε από τα δύο είδη των συντιθέμενων νανοκουκκίδων άνθρακα ως νανοανιχνευτές. Η ιδιότητα του φθορισμού και κατ' επέκταση η απόσβεση μέσω του μηχανισμού εσωτερικού φίλτρου και η μετατόπιση αυτού προς την ερυθρή περιοχή, παρουσία της 4-NP μπορούν να αξιοποιηθούν με τη χρήση των πρότυπων καμπύλων και την εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα. Η σχετικά χαμηλή τοξικότητα των υδρόφιλων νανοκουκκίδων, σε συνδυασμό με την εύκολη και σύντομη διαδικασία σύνθεσης των υλικών, τα καθιστούν ένα αρκετά υποσχόμενο είδος νανοανιχνευτών στην ανάλυση με αρκετές προοπτικές για επιπλέον πραγματικές εφαρμογές.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Feynman, R. P. There_is_Plenty_of_Room_at_the_Bottom-Feynman.pdf. Journal of Microelectrochemical System vol. 1 7 (1992).
2. Zarzycki, A. Editorial: At source of nanotechnology. TecnoLógicas 17, 9 (2014).
3. J.R. Sohn, A.C.K. Yip, V. Kumar, E. Kabir, K.-H. Kim, Environmental impacts of nanomaterials, J. Environ. Manage. 225 (2018) 261–271. doi:10.1016/j.jenvman.2018.07.087.
4. W. Brullot, "Development, synthesis and characterization of multifunctional nanomaterials," 2014.
5. Roduner, E. Size matters: Why nanomaterials are different. Chem. Soc. Rev. 35, 583–592 (2006)
6. Khaleel, A., Li, W. & Klabunde, K. J. Nanocrystals as stoichiometric reagents with unique surface chemistry. New adsorbents for air purification. Nanostructured Mater. 12, 463–466 (1999).
7. Y. Zhu, D. K. James, and J. M. Tour, "New routes to graphene, graphene oxide and their related applications," Advanced Materials, vol. 24, no. 36. Adv Mater, pp. 4924–4955, Sep. 18, 2012, doi: 10.1002/adma.201202321.
8. R. H. Baughman, A. A. Zakhidov, and W. A. De Heer, "Carbon nanotubes - The route toward applications," Science, vol. 297, no. 5582. Science, pp. 787–792, Aug. 02, 2002, doi: 10.1126/science.1060928.
9. B. C. Yadav and R. Kumar, "Structure, properties and applications of fullerenes," 2008. Accessed: Dec. 10, 2020. [Online]. Available: <http://www.ripublication.com/ijna.htm>.
10. B. I. Kharisov, H. V. Rasika Dias, O. V. Kharissova, V. Manuel Jiménez-Pérez, B. Olvera Pérez, and B. Muñoz Flores, "Iron-containing nanomaterials: Synthesis, properties, and environmental applications," RSC Adv., vol. 2, no. 25, pp. 9325–9358, Oct. 2012, doi: 10.1039/c2ra20812a.
11. V. S. Gurin, "Nanoparticles of ternary semiconductors in colloids: Low-temperature formation and quantum size effects," Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp., vol. 142, no. 1, pp. 35–40, Nov. 1998, doi: 10.1016/S0927-7757(98)00407-5.
12. E. Abbasi et al., "Dendrimers: Synthesis, applications, and properties," Nanoscale Research Letters, vol. 9, no. 1. Springer New York LLC, pp. 1–10, May 21, 2014, doi: 10.1186/1556-276X-9-247.
13. H. Hu, L. Onyebueke, and A. Abatan, "Characterizing and Modeling Mechanical Properties of Nanocomposites-Review and Evaluation," Scientific Research Publishing, Apr. 2010. Accessed: Dec. 10, 2020. [Online]. Available: <http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=20729&#abstract>.

- 14.P. I. Dolez, "Nanomaterials Definitions, Classifications, and Applications," in *Nanoengineering: Global Approaches to Health and Safety Issues*, Elsevier, 2015, pp. 3–40
- 15.J. Njuguna, F. Ansari, S. Sachse, H. Zhu, and V. M. Rodriguez, "Nanomaterials, nanofillers, and nanocomposites: Types and properties," in *Health and Environmental Safety of Nanomaterials: Polymer Nanocomposites and Other Materials Containing Nanoparticles*, Elsevier Ltd., 2014, pp. 3–27.
- 16.L. Lu, Y. Zhu, C. Shi, Y.T. Pei, Large-scale synthesis of defect-selective graphene quantum dots by ultrasonic-assisted liquid-phase exfoliation, *Carbon* N. Y. 109 (2016) 373–383. doi:10.1016/j.carbon.2016.08.023.
- 17.T.T. Meiling, Development of a reliable and environmentally friendly synthesis for fluorescence carbon nanodots, (2017). <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-410160>.
- 18.I. Khan, K. Saeed, and I. Khan, "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 12, no. 7. Elsevier B.V., pp. 908–931, Nov. 01, 2019, doi: 10.1016/j.arabjc.2017.05.011.
- 19.S. Ahmadian-Fard-Fini, D. Ghanbari, M. Salavati-Niasari, Photoluminescence carbon dot as a sensor for detecting of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria: Hydrothermal synthesis of magnetic hollow NiFe₂O₄-carbon dots nanocomposite material, *Compos. Part B Eng.* 161 (2019) 564–577. doi:10.1016/j.compositesb.2018.12.131.
- 20.Z. Sun, X. Li, Y. Wu, C. Wei, H. Zeng, Origin of green luminescence in carbon quantum dots: Specific emission bands originate from oxidized carbon groups, *New J. Chem.* 42 (2018) 4603–4611. doi:10.1039/c7nj04562j.
- 21.D. Sumanth Kumar, B. Jai Kumar, H.M. Mahesh, *Quantum Nanostructures (QDs): An Overview*, Elsevier Ltd., 2018. doi:10.1016/b978-0-08-101975-7.00003-8.
- 22.A. Cayuela, M.L. Soriano, C. Carrillo-Carrión, M. Valcárcel, Semiconductor and carbon-based fluorescent nanodots: The need for consistency, *Chem. Commun.* 52 (2016) 1311–1326. doi:10.1039/c5cc07754k.
- 23.S.L. Ye, J.J. Huang, L. Luo, H.J. Fu, Y.M. Sun, Y.D. Shen, H.T. Lei, Z.L. Xu, Preparation of Carbon Dots and Their Application in Food Analysis as Signal Probe, *Chinese J. Anal. Chem.* 45 (2017) 1571–1581. doi:10.1016/S1872-2040(17)61045-4.
- 24.M.J. Molaei, A review on nanostructured carbon quantum dots and their applications in biotechnology, sensors, and chemiluminescence., *Talanta*. 196 (2019) 456–478. doi:10.1016/j.talanta.2018.12.042.
- 25.M. Iranifam, Analytical applications of chemiluminescence systems assisted by carbon nanostructures, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 387–415. doi:10.1016/j.trac.2015.08.018.
- 26.Zu, F., Yan, F., Bai, Z., Xu, J., Wang, Y., Huang, Y., & Zhou, X. (2017). *The quenching of the fluorescence of carbon dots: A review on*

- mechanisms and applications. Microchimica Acta*, 184(7), 1899–1914. doi:10.1007/s00604-017-2318-9
27. Sciortino, A., Cannizzo, A., & Messina, F. (2018). *Carbon Nanodots: A Review—From the Current Understanding of the Fundamental Photophysics to the Full Control of the Optical Response. C*, 4(4), 67. doi:10.3390/c4040067
 28. Sud, D., & Kaur, G. (2020). *A Comprehensive Review on Synthetic approaches for Metal-Organic Frameworks: From Traditional Solvothermal to Greener Protocols. Polyhedron*, 114897, pp. 11–14. doi:10.1016/j.poly.2020.114897
 29. Chatzimitakos, T. G., & Stalikas, C. D. (2020). Carbon nanodots from natural (re)sources: a new perspective on analytical chemistry. *Handbook of Nanomaterials in Analytical Chemistry*, 3–28. doi:10.1016/b978-0-12-816699-4.00001-3
 30. Sharma, V., Tiwari, P., & Mobin, S. M. (2017). Sustainable carbon-dots: recent advances in green carbon dots for sensing and bioimaging. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(45), 8904–8924. doi:10.1039/c7tb02484c
 31. Zhang, J., Liu, X., Zhou, J., Huang, X., Xie, D.-T., Ni, J.-P., & Ni, C. (2019). *Carbon dots derived from algae as H₂O₂ sensors: the importance of nutrients in the biomass. Nanoscale Advances*. doi:10.1039/c9na00049f
 32. Plácido, J., Bustamante-López, S., Meissner, K. E., Kelly, D. E., & Kelly, S. L. (2019). Microalgae biochar-derived carbon dots and their application in heavy metal sensing in aqueous systems. *Science of The Total Environment*, 656, 531–539. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.11.393
 33. Hosseini Tafreshi, A., & Shariati, M. (2009). *Dunaliellabiotechnology: methods and applications. Journal of Applied Microbiology*, 107(1), 14–35. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x
 34. Kleinegris, D. M. M., van Es, M. A., Janssen, M., Brandenburg, W. A., & Wijffels, R. H. (2010). *Carotenoid fluorescence in Dunaliella salina. Journal of Applied Phycology*, 22(5), 645–649. doi:10.1007/s10811-010-9505-y
 35. Singh, A. K., Singh, V. K., Singh, M., Singh, P., Khadim, S. R., Singh, U., ... Asthana, R. K. (2019). *One pot hydrothermal synthesis of fluorescent NP-carbon dots derived from Dunaliella salina biomass and its application in On-Off sensing of Hg (II), Cr (VI) and live cell imaging. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. doi:10.1016/j.jphotochem.2019.02
 36. S. Das, N. M. Ray, J. Wan, A. Khan, T. Chakraborty, and M. B. Ray, "Micropollutants in Wastewater: Fate and Removal Processes," in *Physico-Chemical Wastewater Treatment and Resource Recovery*, InTech, 2017.

37. J. Wilkinson, P. S. Hooda, J. Barker, S. Barton, and J. Swinden, "Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field," *Environmental Pollution*, vol. 231. Elsevier Ltd, pp. 954–970, Dec. 01, 2017, doi: 10.1016/j.envpol.2017.08.032.
38. J. C. G. Sousa, A. R. Ribeiro, M. O. Barbosa, M. F. R. Pereira, and A. M. T. Silva, "A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 344. Elsevier B.V., pp. 146–162, Feb. 15, 2018, doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.09.058.
39. 4-Nitrophenol, in: Environmental Protection Agency (Ed.), *National Pesticide Survey*, 1990.[8] L.V. Verchot, T. Borelli, Application of para-nitrophenol (pNP) enzyme assays in degraded tropical soils, *Soil Biol. Biochem.* 37 (2005) 625–633.
40. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), *Toxicological Profile for Nitrophenols (draft)*, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, 1990.
41. Paranitrophenol, in: United States Environmental Protection Agency (Ed.), *Reregistration Eligibility Decision (RED)*, 1996, pp. 1–18.
42. G.H.G. Ahmed, R.B. Laíño, J.A.G. Calzón, M.E.D. García, Highly fluorescent carbon dots as nanoprobe for sensitive and selective determination of 4-nitrophenol in surface waters, *Microchim. Acta* 182 (2015) 51–59.
43. M. Koizumi, Y. Yamamoto, Y. Ito, M. Takano, T. Enami, E. Kamata, R. Hasegawa, Comparative study of toxicity of 4-nitrophenol and 2,4-dinitrophenol in newborn and young rats, *J. Toxicol. Sci.* 26 (2001) 299–311.
44. R. Chen, Q. Zhang, Y. Gu, L. Tang, C. Li, Z. Zhang, One-pot green synthesis of Prussian blue nanocubes decorated reduced graphene oxide using mushroom extract for efficient 4-nitrophenol reduction, *Anal. Chim. Acta* 853 (2015) 579–587.
45. Y. Zhang, M. Mei, X. Huang, D. Yuan, Extraction of trace nitrophenols in environmental water samples using boronate affinity sorbent, *Anal. Chim. Acta* 899 (2015) 75–84.
46. E. Kabir, V. Kumar, K.H. Kim, A.C.K. Yip, J.R. Sohn, Environmental impacts of nanomaterials, *J. Environ. Manage.* 225 (2018) 261–271. doi:10.1016/j.jenvman.2018.07.087.
47. Y. Zhu, X. Liu, Y. Hu, R. Wang, M. Chen, J. Wu, Y. Wang, S. Kang, Y. Sun, M. Zhu, Behavior, remediation effect and toxicity of nanomaterials in water environments, *Environ. Res.* 174 (2019) 54–60. doi:10.1016/j.envres.2019.04.014.
48. G. Pattan, G. Kaul, Health hazards associated with nanomaterials, *Toxicol. Ind. Health.* (2014). doi:10.1177/0748233712459900.
49. F. Joris, B.B. Manshian, K. Peynshaert, S.C. De Smedt, K. Braeckmans, S.J. Soenen, Assessing nanoparticle toxicity in cell-based assays:

- Influence of cell culture parameters and optimized models for bridging the in vitro-in vivo gap, *Chem. Soc. Rev.* (2013). doi:10.1039/c3cs60145e.
- 50.R. Madannejad, N. Shoaie, F. Jahanpeyma, M.H. Darvishi, M. Azimzadeh, H. Javadi, Toxicity of carbon-based nanomaterials: Reviewing recent reports in medical and biological systems, *Chem. Biol. Interact.* 307 (2019) 206–222. doi:10.1016/j.cbi.2019.04.036.
 - 51.R. Spence, G. Gerlach, C. Lawrence, C. Smith, The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*, *Biol. Rev.* (2008). doi:10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x.
 - 52.R.E. Engeszer, L.B. Patterson, A.A. Rao, D.M. Parichy, Zebrafish in the wild: A review of natural history and new notes from the field, *Zebrafish.* (2007). doi:10.1089/zeb.2006.9997.
 - 53.M. Arunachalam, M. Raja, C. Vijayakumar, P. Malaiammal, R.L. Mayden, Natural history of zebrafish (*Danio rerio*) in India, *Zebrafish.* (2013). doi:10.1089/zeb.2012.0803.
 - 54.G.S. Gerhard, E.J. Kauffman, X. Wang, R. Stewart, J.L. Moore, C.J. Kasales, E. Demidenko, K.C. Cheng, Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*), *Exp. Gerontol.* (2002). doi:10.1016/S0531-5565(02)00088-8.
 - 55.D.M. Parichy, M.R. Elizondo, M.G. Mills, T.N. Gordon, R.E. Engeszer, Normal table of postembryonic zebrafish development: Staging by externally visible anatomy of the living fish, *Dev. Dyn.* (2009). doi:10.1002/dvdy.22113.
 - 56.M.M. Santoro, Zebrafish as a model to explore cell metabolism, *Trends Endocrinol. Metab.* 25 (2014) 546–554. doi:10.1016/j.tem.2014.06.003.
 - 57.Jiang, C.; Wu, H.; Song, X.; Ma, X.; Wang, J.; Tan, M., Presence of photoluminescent carbon dots in Nescafe® original instant coffee: Applications to bioimaging. *Talanta* 2014, 127, 68–74.
 - 58.T.O.F. Testing, L.O.F. Assessment, P.O.F. Testing, DB-ALM Protocol n ° 140 : Fish Embryo Acute Toxicity Test with Zebrafish (ZFET) Objective & Application Résumé Data Analysis / Prediction Model, (2012) 1–14.
 - 59.C. Lawrence, The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review, *Aquaculture.* 269 (2007) 1–20. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.077.
 - 60.X. Jia, J. Li, E. Wang, One-pot green synthesis of optically pH-sensitive carbon dots with upconversion luminescence, *Nanoscale.* 4 (2012) 5572–5575. <https://doi.org/10.1039/c2nr31319g>
 - 61.Y. Wang, S.H. Kim, L. Feng, Highly luminescent N, S- Co-doped carbon dots and their direct use as mercury(II) sensor, *Anal. Chim. Acta.* 890 (2015) 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.07.051>.
 - 62.Y. Lin, B. Yao, T. Huang, S. Zhang, X. Cao, W. Weng, Selective determination of free dissolved chlorine using nitrogen-doped carbon

- dots as a fluorescent probe, *Microchim. Acta.* 183 (2016) 2221–2227.
<https://doi.org/10.1007/s00604-016-1855-y>.
63. T. Chatzimitakos, A. Kasouni, L. Sygellou, I. Leonardos, A. Troganis, C. Stalikas, Human fingernails as an intriguing precursor for the synthesis of nitrogen and sulfur-doped carbon dots with strong fluorescent properties: Analytical and bioimaging applications, *Sensors Actuators, B Chem.* 267 (2018) 494–501.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.04.059>.
 64. T. Chatzimitakos, A. Kasouni, L. Sygellou, A. Avgeropoulos, A. Troganis, C. Stalikas, Two of a kind but different: Luminescent carbon quantum dots from Citrus peels for iron and tartrazine sensing and cell imaging, *Talanta.* 175 (2017) 305–312.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.053>.
 65. L. Sygellou, G. Paterakis, C. Galiotis, D. Tasis, Work Function Tuning of Reduced Graphene Oxide Thin Films, *J. Phys. Chem. C.* 120 (2016).
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b09234>.
 66. D. Kurniawan, W.H. Chiang, Microplasma-enabled colloidal nitrogen-doped graphene quantum dots for broad-range fluorescent pH sensors, *Carbon N. Y.* 167 (2020) 675–684.
<https://doi.org/10.1016/j.carbon.2020.05.085>.
 67. Chen, S., Yu, Y.-L., & Wang, J.-H. (2018). Inner filter effect-based fluorescent sensing systems: A review. *Analytica Chimica Acta*, 999, 13–26. doi:10.1016/j.aca.2017.10.026
 68. Zu, F., Yan, F., Bai, Z., Xu, J., Wang, Y., Huang, Y., & Zhou, X. (2017). *The quenching of the fluorescence of carbon dots: A review on mechanisms and applications. Microchimica Acta*, 184(7), 1899–1914. doi:10.1007/s00604-017-2318-9
 69. H.J. Lee, J. Jana, J.S. Chung, S.H. Hur, Uncovering the actual inner-filter effect between highly efficient carbon dots and nitroaromatics, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 236 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118342>.
 70. R. El-Shaheny, S. Yoshida, T. Fuchigami, Graphene quantum dots as a nanoprobe for analysis of o- and p-nitrophenols in environmental water adopting conventional fluorometry and smartphone image processing-assisted paper-based analytical device. In-depth study of sensing mechanisms, *Microchem. J.* 158 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105241>.