

# **Plasma-vloeistofinteractie voor de plasmabehandeling van kanker: een gecombineerde experimentele en computationele studie**

**Wilma Van Boxem**

Promotor: prof. dr. Annemie Bogaerts

m.m.v.: Christof C.W. Verlackt en Steven Vanuytsel

Academiejaar 2016-2017

Masterproef ingediend tot het bekomen van de graad van Master in de Chemie



## Dankwoord

Biochemische onderwerpen die aan bod kwamen tijdens de lessen van mijn opleiding chemie hebben me steeds geboeid. Ik was dan ook zeer verheugd toen prof. dr. Annemie Bogaerts mij een onderwerp in die richting aanbood voor mijn masterproef. Naast het uitvoeren van computersimulaties sprak vooral de combinatie met chemische en biochemische experimenten me enorm aan. Ik heb dan ook niet lang getwijfeld om voor deze masterproef te kiezen. Ik ben mijn promotor prof. dr. Annemie Bogaerts zeer dankbaar voor de kans die ze mij gegeven heeft om een masterthesis te schrijven die volledig aansluit bij mijn interesseveld. Ze was dag en nacht bereikbaar en de snelheid waarmee ze teksten nakeek, problemen aanpakte en suggesties voorstelde, is ongezien. Haar passie en enthousiasme voor het onderzoek werkten aanstekelijk. Door haar betrokkenheid, zowel op onderzoeksgericht als op persoonlijk vlak, haalt ze het beste in iedereen naar boven.

Deze masterproef bevat veel aspecten die ik nog niet volledig beheerste. Een aantal mensen hebben mij hierbij op weg geholpen. Voor het computationele gedeelte heeft Chris me begeleid. Hij was steeds beschikbaar als ik vragen had en gaf me tegelijkertijd de ruimte om zelfstandig te werken. In het bijzonder apprecieer ik zijn rustgevende houding, waardoor ik steeds vertrouwde op het vinden van een oplossing bij problemen. Bij het experimentele gedeelte vormden het aanleren van nieuwe methodes en het werken met toestellen die op de campus verspreid staan, een hele uitdaging. Daarom wil ik Yury Gorbanev bedanken om mij wegwijs te maken in het uitvoeren van de plasma-experimenten en vooral in het hele EPR-gebeuren. Door zijn energiek en daadkrachtig karakter gingen de zaken vooruit en werden logistieke moeilijkheden snel opgelost. Ik wil ook prof. dr. Paul Cos en Magali van Den Kerkhof van de onderzoeksgroep LMPH bedanken voor het gebruik van de EPR-machine, de begeleiding en de plaats die onze plasmajet in hun labo kreeg. Verder wil ik prof. dr. Sylvia Dewilde en Herald Berghmans van de onderzoeksgroep PPES bedanken voor het meermaals uitlenen van hun spectrofotometer en de hulp die we daarbij kregen. Mijn begeleider Steven heeft mij ingeleid in de wereld van de kankercellen, waarvan ik nog maar weinig afwist. Hij gaf mij zeer snel het vertrouwen om de experimenten alleen uit te voeren en was bereid mee te zoeken naar verklaringen. Ik wil prof. dr. Evelien Smits van de CORE-onderzoeksgroep bedanken voor het ter beschikking stellen van het labo voor de celexperimenten. Bij afwezigheid van Steven kon ik met mijn vragen bij de leden van deze onderzoeksgroep terecht. Onder het motto 'met twee is leuker dan alleen', wil ik ook Manou bedanken voor de samenwerking bij de gemeenschappelijke experimenten van onze bachelor- en masterproef. Tot slot bedank ik nog graag Luc Van't dack voor de ICT-ondersteuning en Karen Leyssens voor het bestellen van de nodige materialen.

# Inhoudstafel

<b>Samenvattingen .....</b>	<b>3</b>
Nederlandstalige samenvatting .....	3
English summary .....	3
Wetenschapspopulariserende samenvatting .....	4
<b>1. Inleiding.....</b>	<b>5</b>
1.1 Plasmageneeskunde .....	5
1.2 Plasmabronnen voor medische toepassingen .....	6
1.2.1 DBD .....	8
1.2.2 APPJ .....	8
1.3 Plasma-oncologie .....	10
1.3.1 Kanker.....	10
1.3.2 Bestaande behandelingsmethoden .....	11
1.3.3 Het gebruik van plasma voor de behandeling van kanker .....	12
1.4 Het gebruik van computersimulaties in de plasmageneeskunde .....	14
1.4.1 Plasma-vloeistofinteracties .....	14
1.5 Doel van de thesis .....	15
<b>2. Experimentele methode.....</b>	<b>17</b>
2.1 Chemische samenstelling.....	17
2.1.1 UV-VIS spectrofotometrie .....	17
2.1.2 EPR .....	18
2.2 Celexperimenten .....	21
2.2.1 Celcultuur.....	21
2.2.2 Uitzaaien.....	22
2.2.3 Viabiliteitsanalyse .....	22
2.3 Plasmabehandeling.....	22
2.3.1 Plasmabron.....	22
2.3.2 Gebruikte parameters bij de plasmabehandelingen.....	23
<b>3. Computationale methode .....</b>	<b>26</b>
3.1 Algemene beschrijving van de computationale methode .....	26
3.1.1 Fluid model .....	26
3.1.2 Comsol Multiphysics™ .....	26
3.2 Beschrijving van het model .....	27
3.2.1 Geometrie .....	28
3.2.2 Conditie van de modules.....	29
3.3 Geanalyseerde parameters .....	34
3.3.1 Validatie van het model .....	34
3.3.2 Effect van de temperatuur .....	35
3.3.3 Effect van de waterlaag boven het oppervlak .....	35
3.3.4 Effect van de luchtvochtigheid .....	35
3.3.5 Effect van N <sub>2</sub> en O <sub>2</sub> in de lucht .....	36
3.3.6 Effect van het vloeistofvolume en -oppervlak .....	36
<b>4. Experimentele studie: resultaten en discussie .....</b>	<b>38</b>
4.1 Bepaling van de chemische samenstelling van pPBS.....	38
4.1.1 Effect van het gasdebiet, de gap en de behandelingstijd .....	38
4.1.2 Uitgebreide tijdstudie .....	43
4.1.3 Stabiliteit van pPBS .....	43
4.1.4 Detectie van O <sub>3</sub> in pPBS.....	44

4.2	Kankerexperimenten .....	45
4.2.1	Effect van het gasdebiet, de gap en de behandelingstijd .....	45
4.2.2	Uitgebreide tijdstudie .....	49
4.2.3	Stabiliteit van pPBS .....	50
4.3	Samenvatting van de resultaten uit de experimentele studie .....	51
<b>5.</b>	<b>Computationele studie: resultaten en discussie .....</b>	<b>52</b>
5.1	Validatie van het model .....	52
5.1.1	Vergelijking met de experimenten .....	52
5.1.2	Vergelijking met de literatuur .....	59
5.1.3	Besluit over de validatie van het model .....	62
5.2	Uitgebreide computationele studie .....	63
5.2.1	Effect van de temperatuur .....	63
5.2.2	Effect van de waterlaag boven het vloeistofoppervlak .....	63
5.2.3	Effect van de luchtvochtigheid .....	65
5.2.4	Effect van N <sub>2</sub> en O <sub>2</sub> uit de lucht .....	65
5.2.5	Effect van vloeistofvolume en -oppervlak .....	69
<b>6.</b>	<b>Conclusie .....</b>	<b>74</b>
6.1	Conclusie .....	74
6.1.1	Conclusie over de experimentele studie .....	74
6.1.2	Conclusie over de computationele studie .....	75
6.2	Toekomstperspectief .....	76
<b>7.</b>	<b>Referenties .....</b>	<b>77</b>
<b>Appendix .....</b>	<b>i</b>	
A.1	Kalibratiecurven .....	i
A.1.1	Kalibratie van H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	i
A.1.2	Kalibratie van NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	i
A.1.3	Kalibratie van 4-hydroxy-TEMPO .....	ii
A.2	Evaporatie van de vloeistof .....	iii
A.3	Vergelijking van het model met de literatuur .....	iii
A.3.1	Snelheidsprofiel .....	iii
A.3.2	Dichtheidsprofielen in de gasfase .....	iv
A.4	Effect van de luchtvochtigheid .....	v

## Samenvattingen

### Nederlandstalige samenvatting

Plasmageneeskunde is een opkomend onderzoeksdomein, waarvan de behandeling van kanker een toepassing is. De vele reactieve deeltjes geproduceerd in een plasma kunnen inwerken op kankercellen en daarbij celdood induceren. Aangezien gezonde cellen de verhoging van de oxidatieve stress die hiermee gepaard gaat, kunnen verdragen, werkt deze behandeling selectief voor kankercellen. Voor de klinische toepassing van deze behandelingsmethode is het gebruik van plasmabehandelde vloeistoffen veelbelovend. Hierbij wordt een vloeistof behandeld met plasma, waarna ze aan cellen of weefsel wordt toegevoegd. In deze thesis wordt het gebruik van plasmabehandelde PBS (pPBS) onderzocht op drie niveaus, nl. een analyse van de chemische samenstelling van pPBS, het effect op de viabiliteit van drie kankercellijnen (U251, LN229 en U87) en simulaties.

Voor het experimentele gedeelte worden de concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  bepaald d.m.v. UV-VIS spectrofotometrie en de concentraties van O,  $\text{O}_3$  en  $^1\text{O}_2$  d.m.v. EPR. De pPBS wordt ook toegevoegd aan de kankercellen, waarna de viabiliteit wordt nagegaan via de SRB-methode. Hieruit blijkt  $\text{H}_2\text{O}_2$  het belangrijkste deeltje voor de anti-kankerwerking van pPBS. Verder wordt het effect van het gasdebiet, de gap en de behandelingstijd alsook de stabiliteit van pPBS op zowel de chemische samenstelling als de viabiliteit van kankercellen onderzocht.

In het computationele gedeelte wordt een fluid model ontwikkeld, waarbij de plasma-vloeistofinteracties bij het gebruik van een argon plasmajet worden gesimuleerd. De resultaten worden, in de mate van het mogelijke, vergeleken met de experimenten en data uit de literatuur. Een verdere optimalisatie van het model is nodig, maar het effect van een aantal parameters, zoals de temperatuur, de samenstelling van de lucht en het vloeistofvolume en -oppervlak, wordt reeds bestudeerd.

Het gebruik van pPBS voor de behandeling van kanker heeft veel potentieel, al moet er nog zeer veel onderzoek gebeuren naar de onderliggende mechanismen en naar het optimaliseren van de vele behandelingsparameters.

### English summary

Cancer treatment is one of the most innovative applications within the plasma medicine research field. The reactive plasma species interact with cancer cells, inducing apoptosis. Since healthy cells can deal better with the increase of oxidative stress due to the plasma treatment, this treatment is selective against cancer cells. For the clinical application of plasma oncology, the use of plasma-activated liquids shows great potential. For this purpose, a liquid is treated with plasma, after which it is added to the cells. In this thesis, the use of plasma-activated PBS (pPBS)

is investigated at three levels, namely an analysis of the chemical composition of pPBS, the effect on the viability of three cancer cell lines (U251, LN229, and U87), and simulations.

Experimentally, the concentrations of  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  on the one hand and of  $\text{O}$ ,  $\text{O}_3$ , and  $^1\text{O}_2$  on the other hand, are measured using UV-VIS spectrophotometry and EPR respectively. The cell viability of the pPBS-treated cancer cells is assessed using the SRB method. Our results indicate that the cell death is mainly due to the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , and less to that of  $\text{NO}_2^-$ . Furthermore, the effects of the flow, gap, treatment time, and the stability of pPBS are studied, for both the chemical composition and cell viability.

In the computational part, a fluid model is developed for the simulation of the plasma-liquid interactions by using an argon plasma jet. The results are compared with experiments and available data in literature. The model needs further optimization, but the effect of several parameters, such as the temperature, the composition of the ambient air, and the volume and surface of the liquid, are already studied.

The use of pPBS for cancer treatment looks quite promising, although further research is necessary, especially for the understanding of the underlying mechanisms, and the optimization of the treatment parameters.

## **Wetenschapspopulariserende samenvatting**

Kanker is een van de belangrijkste doodsoorzaken in de wereld. Jaarlijks sterven er meer dan 8 miljoen mensen aan deze ziekte. Omdat de bestaande behandelingsmethoden vaak veel nevenwerkingen hebben en de ziekte nog niet in alle gevallen kan worden behandeld, is de nood aan nieuwe, verbeterde methoden groot. Een mogelijke nieuwe behandelingsmethode is het gebruik van een (fysisch) plasma, wat gezien kan worden als een zeer reactief gas. Nadat een vloeistof met dit plasma is behandeld, bevat ze zeer veel reactieve deeltjes en kan ze in het lichaam worden ingespoten. Zo kunnen ook moeilijk bereikbare en uitgezaaide kankercellen worden behandeld. Deze methode is zeer veelbelovend aangezien er in de eerste onderzoeken wordt aangetoond dat plasma de kankercellen aantast en de gezonde cellen onveranderd laat. In deze thesis wordt het gebruik van plasmabehandelde vloeistoffen onderzocht door de chemische samenstelling ervan te achterhalen via experimenten en simulaties, en ook het effect op kankercellen te onderzoeken. Door op deze drie niveaus te werken, kan er op verschillende manieren informatie verkregen worden over de werking van plasmabehandelde vloeistoffen en de behandelingsparameters die daarbij een belangrijke rol spelen. Deze grondige kennis is nodig om een plasmabehandeling te laten uitgroeien tot een volwaardige behandelingsmethode voor kanker.

# 1. Inleiding

## 1.1 Plasmageneeskunde

Plasmageneeskunde is een innovatief en opkomend onderzoeksdomein dat zijn oorsprong heeft in de plasmachemie.<sup>1</sup> Het is uitgegroeid tot een hoogst interdisciplinair onderzoeksgebied dat principes uit geneeskunde, biologie, microbiologie, biochemie, fysica en chemie omvat.<sup>2</sup> De veelbelovende toepassingen van plasmageneeskunde bevinden zich o.a. in de (bio)medische sector, de voedingssector en de agricultuur.<sup>3</sup>

Een (fysisch) plasma kan beschreven worden als een volledig of deels geïoniseerd gas en wordt beschouwd als de vierde aggregatietoestand (naast vast, vloeibaar en gas). Het is een complex geheel bestaande uit reactieve deeltjes (radicalen, elektronen, ionen), geëxciteerde deeltjes, moleculen, maar ook straling (zichtbaar licht en UV-straling) en elektrische velden. Deze verschillende soorten deeltjes kunnen met elkaar botsen en interageren, wat een plasma tot een zeer reactief medium maakt.<sup>4</sup> Plasma's kunnen in de natuur voorkomen (bv. de zon, bliksem, het noorderlicht), maar ook opgewekt worden door de mens. Klassiek bestaat een plasma bij hoge temperatuur en druk, maar door technologische vooruitgang kan plasma ook opgewekt worden bij kamertemperatuur en atmosferische druk. Dit laatste heeft ervoor gezorgd dat plasma's hun intrede gedaan hebben in de biomedische wereld.<sup>5</sup>

Van de vele verschillende deeltjes in een plasma zijn de reactieve zuurstofdeeltjes (*Eng: reactive oxygen species*, ROS, bv.  $O_3$ ,  $O$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO_2$ , enz.) en de reactieve stikstofdeeltjes (*Eng: reactive nitrogen species*, RNS, bv.  $NO$ ,  $NO_2$ ,  $HNO_2$ ,  $HOONO$ , enz.) waarschijnlijk de belangrijkste voor biomedische toepassingen.<sup>6</sup> Omwille van hun synergistisch effect worden ze vaak samen vermeld als RONS. De interactie tussen deze plasmadeeltjes en het behandelde weefsel resulteert in oxidaties van de biochemische moleculen, waardoor deze laatste structuurveranderingen ondergaan.<sup>6</sup> RONS zijn bovendien ook verantwoordelijk voor het verstoren van de oxidatieve balans in het weefsel en de cellen, wat kan leiden tot het inhiberen of stimuleren van verschillende *pathways*.<sup>7</sup> Plasmadeeltjes kunnen zeer selectief interageren met biomoleculen aangezien RONS in het lichaam als signaalmoleculen dienen en ze kunnen, afhankelijk van hun concentratie, zowel dodende als helende effecten teweegbrengen.<sup>7</sup> Zo induceert bv.  $H_2O_2$  bij lage concentratie celgroei, waar het bij een hoge concentratie celgroei tegenhoudt en zelfs apoptose (d.w.z. gecontroleerde celdood) kan induceren.<sup>2</sup> De precieze interactiemechanismen van plasmagegenereerde deeltjes met weefsels en cellen zijn echter nog niet volledig gekend.

Waar vroeger vooral de thermische eigenschappen van een plasma gebruikt werden in de biomedische wereld (bv. voor het verwijderen van weefsel, sterilisatie en het dichtschroeien van wonden<sup>8</sup>), werd recenter in een aantal experimentele onderzoeken aangetoond dat lage-



temperatuurplasma's, in het bijzonder de plasmagegenereerde RONS, effectief zijn bij de sterilisatie van operatiemateriaal en het te behandelen weefsel<sup>9</sup>, tandheelkunde en het bleken van tanden<sup>10</sup>, voedselbehandeling<sup>11</sup>, wondheling<sup>8,12</sup>, het bevorderen van bloedstolling<sup>13</sup> en het induceren van apoptose bij kankercellen.<sup>14-18</sup> In het kankeronderzoek werd reeds aangetoond dat plasmabehandeling leidt tot selectieve uitroeiing van kankercellen *in vitro*<sup>19-22</sup> en tot het verkleinen van een tumor *in vivo*.<sup>23-27</sup>

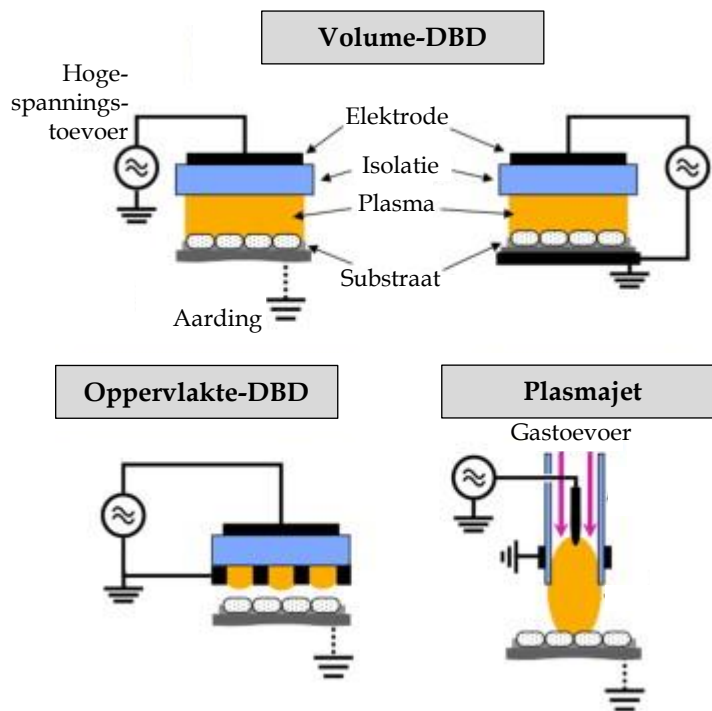
## 1.2 Plasmabronnen voor medische toepassingen

Om plasma te gebruiken voor biomedische toepassingen is het vereist dat het plasma onder atmosferische druk en bij kamertemperatuur opgewekt kan worden en stabiel blijft, zodat het behandelde weefsel geen thermische schade ondergaat.<sup>28</sup> Een plasma met deze eigenschappen wordt ook wel een koud plasma of een plasma in niet lokaal thermisch evenwicht (niet-LTE) genoemd. In een niet-LTE plasma hebben niet alle deeltjes dezelfde temperatuur. De temperatuur van het gas is vergelijkbaar met kamertemperatuur, terwijl de temperatuur van de elektronen kan oplopen tot enkele tienduizenden graden Celsius. De meest eenvoudige methode om een niet-LTE plasma op te wekken is het aanleggen van een elektrisch potentiaalverschil tussen twee evenwijdige platen waartussen zich een gas (doorgaans argon, helium, zuurstof, stikstof, lucht, of mengsels hiervan<sup>28</sup>) bevindt bij een druk lager dan of gelijk aan atmosferedruk. De lichtere deeltjes, d.w.z. de elektronen, worden door het elektrisch veld veel harder versneld dan de zwaardere deeltjes. De versnelde elektronen botsen met de andere deeltjes in het plasma, waardoor reacties zoals ionisatie, excitatie en dissociatie optreden, met de vorming van respectievelijk ionen en nieuwe elektronen, geëxciteerde deeltjes en radicalen. Hierbij is het belangrijk op te merken dat er opnieuw elektronen gevormd worden, hetgeen noodzakelijk is opdat het plasma blijft bestaan.<sup>4</sup>

Het effect van een plasmabron op een te behandelen substraat (bv. weefsel of cellen) wordt bepaald door de reactieve deeltjes die gegenereerd worden en hun respectieve fluxen. Deze worden op hun beurt bepaald door de plasmachemie, alsook door het elektrisch veld en de flux en energie van fotonen, ionen en elektronen. Het is dus van groot belang om controle te hebben over de plasmachemische processen, wat bereikt kan worden door het aanpassen van de operationele plasmacondities, zoals het vermogen, de spanning, de temperatuur, de gebruikte gassen, gasstroom, enz. Om deze controle te verkrijgen is het duidelijk dat een fundamentele kennis van de optredende processen noodzakelijk is. Deze processen betreffen niet enkel deze in het plasma zelf, maar ook deze bij het contact tussen de plasmadeeltjes en het substraat (biomoleculen, micro-organismen, weefsels, cellen<sup>28</sup>). Alleen deze fundamentele kennis zal uiteindelijk toelaten om veilige, betrouwbare en gecontroleerde plasmabronnen te ontwikkelen en om plasmageneeskunde te laten uitgroeien tot een volwaardige en toepasbare medische

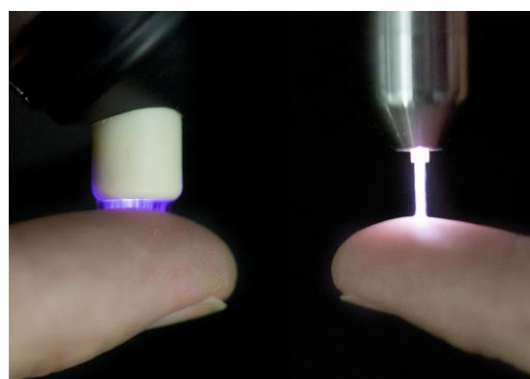
discipline.<sup>3</sup>

De laatste decennia is er wereldwijd veel onderzoek gedaan naar bronnen van koude plasma's bij atmosferedruk (Eng: *cold atmospheric pressure plasma*, CAPP). Er zijn een heel aantal toestellen ontwikkeld voor biomedische doeleinden, bv. de plasmanaald<sup>29</sup>, de atmosferische druk plasmajet (Eng: *atmospheric pressure plasma jet*, APPJ)<sup>30</sup>, de floating-electrode DBD (diëlektrische barrière ontlading, Eng: *dielectric barrier discharge*)<sup>31</sup>, de microschaal APPJ<sup>32</sup> en DBD's meer algemeen<sup>33</sup>. De resultaten van experimenten zijn zeer afhankelijk van de gebruikte plasmabron.<sup>7</sup>



**Figuur 1:** Verschillende soorten plasmabronnen die gebruikt worden in de plasmageneeskunde, namelijk DBD (boven + linksonder) en de plasmajet, of APPJ (rechtsonder). Afbeelding overgenomen uit Ref 1.

Van deze plasmabronnen zijn er twee die de laatste jaren zowel in onderzoek als in de eerste praktische toepassingen vooral gebruikt worden, nl. de DBD en APPJ (zie [Figuur 1](#) en [Figuur 2](#)).<sup>28</sup> De werking van beide bronnen wordt hieronder kort besproken. Er wordt verwacht dat beide bronnen, ondanks hun voor- en nadelen, hun plaats zullen behouden in de plasmageneeskunde, elk met hun specifieke toepassingen.<sup>28</sup>



**Figuur 2:** De interactie met een vingertip bij een volume-DBD (links) en een APPJ (rechts). Afbeelding overgenomen uit Ref 28.

### 1.2.1 DBD

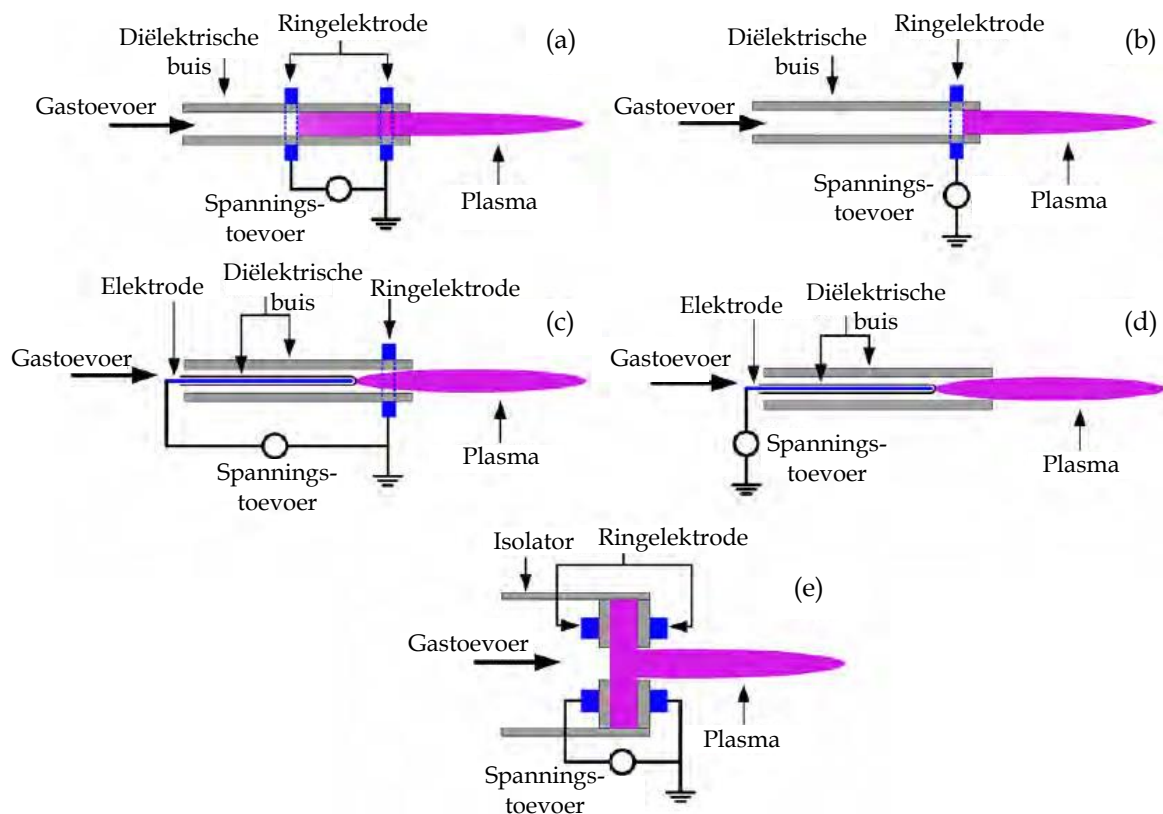
DBD-toestellen bestaan in hun meest eenvoudige vorm uit twee parallelle metalen elektroden, waarvan er minstens één bedekt is met een isolerende (d.i. diëlektrische) laag. Deze diëlektrische barrière zorgt ervoor dat de stroomsterkte en de temperatuur beperkt blijven, zodat de transitie naar een (thermische) boogontlading vermeden wordt.<sup>34</sup> Het voornaamste onderscheid bij DBD's wordt gemaakt tussen de volume-DBD (VDBD) en de oppervlakte-DBD (*Eng: surface DBD, SDBD*) (zie [Figuur 1](#)). Bij een VDBD vormen één of twee elektroden en een diëlektrische laag de holte waarin de plasma-ontlading plaatsvindt. In deze opstelling zal er directe behandeling van het weefsel gebeuren, aangezien dat als tegenelektrode wordt gebruikt of zich erop bevindt. Bij een SDBD daarentegen zijn beide elektroden in contact met de diëlektrische barrière. In deze opstelling wordt het plasma tegen het diëlektrische oppervlak tussen de elektroden gevormd, waardoor het te behandelen oppervlak geen deel uitmaakt van de ontlaadingsopstelling, wat resulteert in een indirecte behandeling.<sup>33</sup>

Een van de grootste voordelen van een DBD is dat de ontlading redelijk eenvoudig kan worden ontstoken en stabiel is bij een grote verscheidenheid aan gebruikte condities. Het te behandelen oppervlak kan ook zeer groot zijn, afhankelijk van de grootte en de vorm van de elektroden. Daarnaast kunnen er heel wat gassen gebruikt worden in een DBD, bv. edelgassen en mengsels van O<sub>2</sub> en N<sub>2</sub> en waterdamp.<sup>34</sup> Meestal wordt er echter geen specifiek gas maar lucht gebruikt. Dit kan gezien worden als een voordeel, omdat er zo geen extra gas gebruikt moet worden, maar het kan ook een nadeel zijn aangezien de variatie in samenstelling van de lucht groot kan zijn en het minder controle over de plasma-eigenschappen toelaat. Om specifieke biologische effecten te induceren is het soms noodzakelijk om de werkgasvariëaties zeer strikt te definiëren en dit is niet altijd mogelijk met lucht.<sup>28</sup> Een nadeel aan deze opstellingen is dat de afstand tot het te behandelen oppervlak overal constant moet zijn om consistente resultaten te verkrijgen over de gehele behandelde oppervlakte. De gastemperatuur in DBD's is typisch laag, d.w.z. rond kamertemperatuur.<sup>34</sup> Indien het behandelde weefsel gebruikt wordt als tegenelektrode (bv. bij de *floating electrode DBD, FE-DBD*<sup>31</sup>), zullen de resultaten ook afhankelijk zijn van de conductiviteit van dat oppervlak.<sup>28</sup>

### 1.2.2 APPJ

APPJ's worden ook frequent gebruikt als plasmabron voor biomedische toepassingen. Ze bestaan uit een buisje met één of twee elektroden waardoor het gas stroomt en werken typisch in radiofrequente (RF) mode (bv. bij 13,56 of 27,12 MHz). Er wordt een RF-spanning aangelegd op één elektrode, wat leidt tot de ontsteking van de gasontlading. Ook APPJ's bestaan in verschillende ontwerpen ([Figuur 3](#)) waarbij de rangschikking en geometrie van de elektroden verschillen. Dankzij de gasstroom kunnen de plasmagenereerde deeltjes tot buiten het uiteinde

van het buisje gevoerd worden (plasma-effluent), wat ervoor zorgt dat de plasmajet tot op een afstand van enkele centimeters van het te behandelende oppervlak gehouden kan worden. De gassen die gebruikt worden zijn meestal edelgassen, bv. helium en argon, met een variërend percentage aan  $O_2$ ,  $N_2$  of  $H_2O$ . Over het algemeen ligt de gastemperatuur rond  $70\text{ }^\circ\text{C}$ , wat iets hoger is dan de temperatuur bij DBD's (kamertemperatuur).<sup>34</sup> Deze temperatuur is te hoog voor biomedische toepassingen waarbij weefsel rechtstreeks behandeld wordt, maar kan verlaagd worden tot  $30\text{ }^\circ\text{C}$  door het gebruik van aangepaste elektrische inputsignalen (bv. burst mode<sup>33</sup>). Hierbij worden perioden van plasma afgewisseld met perioden waarin geen plasma gegenereerd wordt.



**Figuur 3:** Schematische voorstelling van verschillende APPJ configuraties: (a) plasmajet met twee ringelektroden, (b) plasmajet met één ringelektrode zonder geaarde elektrode, (c) plasmajet met een centrale pinelektrode en een ringelektrode, (d) plasmajet met een centrale pinelektrode zonder geaarde elektrode en (e) plasmajet met twee ringelektroden die vastgemaakt zijn aan het oppervlak van twee geperforeerde diëlektrische schijven. De elektroden staan weergegeven in blauwe kleur, diëlektrische onderdelen in grijze kleur en de plasmapluiim (Eng: *afterglow*, d.w.z. het zichtbare gedeelte van de effluent) in paarse kleur. Afbeelding afkomstig van Ref 35.

Bij een APPJ moet er een onderscheid gemaakt worden tussen het gebruik van de plasmajet op korte en lange afstand. Als de plasmajet op voldoende grote afstand van het te behandelen substraat gehouden wordt, bevat de effluent enkel nog plasmadeeltjes zoals radicalen en geëxciteerde deeltjes en geen elektrisch veld. In dit geval vindt er zogenaamde indirecte behandeling van het weefsel plaats. Een plasmajet kan echter ook in actieve mode gebruikt worden. Door de plasmajet dicht bij het te behandelen oppervlak te brengen, bevinden er zich nog elektronen in de effluent (d.i. de *afterglow*). Hierdoor wordt dat oppervlak als een tweede of derde elektrode gebruikt en wordt het direct behandeld.<sup>33</sup>

Het grootste voordeel van APPJ bronnen is dat het gegenereerde plasma als gevolg van de kleine dimensies kan doordringen in kleine structuren en openingen. Dit betekent dat ook complexe structuren met microgestructureerde holtes gemakkelijk behandeld kunnen worden met een APPJ, wat zeer nuttig is voor biomedische toepassingen (bv. tandheelkunde, katheters). Een nadeel van het gebruik van een APPJ is dat het plasma niet gegenereerd wordt op de plaats waar het gebruikt wordt. Door de gasstroom wordt het plasma getransporteerd in de richting van het uiteinde van het buisje. Dit maakt dat het plasma minder controleerbaar is en beïnvloed wordt door de omgevingslucht. Dit laatste ligt echter ook aan de basis van de biomedische toepassingen, vermits door contact met de omgevingslucht extra RONS gevormd worden. Bovendien is de concentratie aan reactieve plasmadeeltjes in de effluent van een APPJ over het algemeen lager dan in DBD-bronnen, waardoor de behandelingstijden langer zijn.<sup>34</sup>

## **1.3 Plasma-oncologie**

### **1.3.1 Kanker**

Kanker is een van de belangrijkste doodsoorzaken ter wereld. Volgens het GLOBOCAN-project zijn er in 2012 naar schatting 14,1 miljoen nieuwe gevallen van kanker vastgesteld en stierven er dat jaar 8,2 miljoen mensen aan de gevolgen van kanker.<sup>36</sup>

Kanker is een groep van ziektes die gekarakteriseerd worden door ongereguleerde celgroei en de mogelijkheid van de kankercellen om zich te verspreiden vanuit hun plaats van ontstaan naar andere plaatsen in het lichaam (uitzaaiingen). Er zijn meer dan honderd types van kanker gekend, ingedeeld volgens het weefsel waarin de kanker zich ontwikkelt. In elk type kanker zijn de moleculaire mechanismen die leiden tot carcinogenese en het patroon van de verspreiding doorheen het lichaam verschillend. Hierdoor kent elk type een eigen ideale behandelingsmethode, al zijn nog lang niet alle types van kanker genees- of behandelbaar.<sup>37</sup>

Kanker ontstaat door veranderingen in het DNA van cellen, waardoor de processen die het netto aantal cellen in een weefsel regelen, verstoord worden. Deze processen zijn (i) celdeling, waarbij een cel splitst in twee dochtercellen, (ii) apoptose (gecontroleerde celdood) en (iii) celdifferentiatie. Een ontregeling van deze processen resulteert in een verandering van het aantal cellen in een weefsel of individu, wat kan leiden tot ongereguleerde celgroei (vorming van een neoplasma). Een neoplasma is in principe niet meteen levensbedreigend, maar kan wel uitgroeien tot de kwaadaardige variant, die kanker wordt genoemd.<sup>37</sup>

Bijna alle mutaties die geïdentificeerd worden in kankercellen zijn mutaties van somatische cellen (geen geslachtscellen). Deze mutaties worden wel doorgegeven aan de dochtercellen als de cel splitst, maar niet aan de nakomelingen van het desbetreffend organisme. Kankercellen blijven, door opeenvolgende mutaties, hun gedrag veranderen terwijl ze groeien en delen, waardoor ze uitroeiing door lichaamseigen processen kunnen ontwijken. Cellen beschikken immers in

principe over verschillende mechanismen om mutaties ongedaan of onschadelijk te maken. Ze kunnen zelfs apoptose ondergaan, waardoor ze de ophoping van deze mutatie in het weefsel vermijden. Enkel als een mutatie door de mazen van het net glipt en doorgegeven kan worden aan dochtercellen, kan er een accumulatie van deze mutatie in een weefsel ontstaan. Het lichaam beschikt wel degelijk over krachtige mechanismen om het ontstaan van kanker tegen te gaan, maar als bepaalde kritische systemen gedereguleerd worden, zullen er toch één of meerdere gemuteerde cellen hieraan ontsnappen en kanker kunnen veroorzaken. Het feit dat er een ophoping van mutaties vereist is om kanker te veroorzaken, verklaart waarom steeds meer mensen kanker krijgen. Onze levensverwachting blijft stijgen en hoe langer we leven, hoe meer we worden blootgesteld aan invloeden die mutaties kunnen veroorzaken. Ook externe factoren kunnen een verhoogd risico op kanker veroorzaken. Omgevingsfactoren, zoals zonnestraling, chronische blootstelling aan roetdeeltjes en chemicaliën, maar ook bepaalde gewoonten, zoals roken, drinken van alcohol en voedingspatronen, spelen hierbij een belangrijke rol.<sup>37</sup>

### 1.3.2 Bestaande behandelingsmethoden

De drie meest gekende behandelingsmethoden voor kanker zijn het verwijderen van de tumor door middel van een operatie, chemotherapie en radiotherapie. Een operatie kan de meest eenvoudige oplossing zijn in bepaalde gevallen, maar in andere gevallen is dit onmogelijk door de aard van de kanker en de plaats waar de cellen zich bevinden. Ook kan er hierbij geen oplossing geboden worden voor het verwijderen van eventuele uitzaaiingen van de kankercellen. Een operatie zorgt steeds voor lichamelijke stress bij de patiënt, waardoor dit bij erg verzwakte patiënten geen mogelijkheid meer is.<sup>38</sup> In deze gevallen worden chemotherapie en radiotherapie gebruikt om (uitgezaaide) kankercellen te inhiberen of uit te roeien. Het doel is uiteraard om dit te bereiken met zo weinig mogelijk neveneffecten.<sup>37</sup> Naast deze drie klassieke behandelingsmethoden bestaan er sinds een aantal jaar ook alternatieve behandelingsmethoden, zoals doelgerichte therapie<sup>39</sup> (*Eng: targeted therapy*), immunotherapie<sup>40</sup> en protonstaling<sup>41</sup>. Toch blijft de nood aan verbetering van kankerbehandelingsmethoden groot.

#### *Chemotherapie*

In conventionele chemotherapie gebruikt men chemicaliën die DNA, RNA en proteïnen aanvallen om zo de celcyclus van de sneldelende kankercellen te verstoren. Het uiteindelijke doel van cytotoxische chemotherapie is om ernstige DNA-schade toe te brengen en zo apoptose te in de sneldelende kankercellen induceren. De neveneffecten van chemotherapie, die we allen kennen als haarverlies, maagzweren en bloedarmoede, zijn te wijten aan het feit dat haarfollikels, cellen in het darmepitheel en hematopoëtische stamcellen ook sneldelende cellen zijn en daarom ook beschadigd worden door de chemotherapie.<sup>37</sup> Bovendien kunnen kankercellen resistent



worden tegen deze chemicaliën, waardoor bij een herhaal dezelfde methode niet opnieuw gebruikt kan worden.

### **Radiotherapie**

Bij radiotherapie wordt ioniserende straling door middel van lineaire elektronenversnellers op de tumor gericht. De straling interageert met de vloeistof in en rondom de cellen, waarbij er ROS gegenereerd worden die het DNA beschadigen. Gezond weefsel rondom de kankercellen wordt echter eveneens beschadigd door de straling. De tumor kan wel preciezer bereikt worden door het gebruik van moderne technieken zoals MRI en CT, waardoor er 3D-beelden van het lichaam gemaakt kunnen worden.<sup>37</sup> Hierdoor kan de schade op de naburige cellen beperkt worden. Radiotherapie is slechts effectief bij sommige types van kanker en er kan enkel lokaal bestraald worden, wat bij uitzaaiingen voor moeilijkheden zorgt.<sup>38</sup>

### **1.3.3 Het gebruik van plasma voor de behandeling van kanker**

De voorbije tien jaar is er veel onderzoek verricht naar het gebruik van koude atmosferische plasma's (CAP) voor de behandeling van kanker.<sup>5,7,38,42,43</sup> De bekomen resultaten zijn zeer veelbelovend. Zo is er aangetoond dat CAP een anti-kankeractiviteit heeft voor veel verschillende cellijnen.<sup>15,44-49</sup> Daarnaast is er aangetoond dat CAP de groei van tumoren in muizen vermindert.<sup>18,50</sup> De exacte mechanismen van de effecten op kankercellen door een plasmabehandeling zijn echter nog niet helemaal begrepen, maar er zijn wel reeds enkele algemene conclusies te trekken. Zo zijn RONS als de hoofdrolspelers in de anti-kankeractiviteit aangeduid.<sup>51</sup> Deze deeltjes zorgen voor een verhoging van de concentratie aan intracellulaire ROS<sup>17,45</sup>, wat een merkbare schade aanricht op het anti-oxidantsysteem<sup>52,53</sup> en zorgt voor fatale breuken in dubbelstrengig DNA<sup>54</sup>. DNA-schade, samen met de andere effecten van CAP, zorgt voor een verstoring van de celcyclus<sup>27</sup>, wat leidt tot apoptose of necrose.<sup>25,55</sup> Gezonde cellen zijn beter opgewassen tegen de effecten van een CAP-behandeling dan kankercellen<sup>18,23</sup>, omdat ze ten eerste minder RONS opnemen doorheen het celmembraan en ten tweede over een beter anti-oxidantsysteem beschikken dan de meeste kankercellijnen.<sup>56,57</sup>

Conventioneel wordt plasma gebruikt om rechtstreeks kankercellen of -weefsel te bestralen, wat vanaf nu aangeduid zal worden als CAP-behandeling. De laatste vijf jaar is er echter een groeiende aandacht voor plasmabestraalde vloeistoffen (*Eng: plasma activated liquids, PAL*) of plasmabestraalde media (*Eng: plasma activated media, PAM*).<sup>44,58</sup> Deze PAL worden na de plasmabehandeling toegediend aan cellen. Er zijn reeds een aantal resultaten beschreven over het succes van het gebruik van PAM, die in [Tabel 1](#) zijn opgelijst. Het gebruik van PAM heeft een aantal voordelen ten opzichte van CAP. Het is aangetoond dat PAM tot 7 dagen bewaard kunnen worden bij -80 °C, waardoor er op plaatsen waar geen plasmabron beschikbaar is toch een plasmabehandeling toegepast kan worden.<sup>59</sup> Een CAP-behandeling is enkel effectief in de

bovenste drie tot vijf cellagen<sup>14</sup> en kan niet toegepast worden bij beperkt bereikbare kankercellen.<sup>60</sup> In deze gevallen kunnen PAM gericht geïnjecteerd worden op bepaalde plaatsen in het lichaam. Bovendien kan het gebruik van PAM ook gezien worden als een meer gecontroleerde behandelingsmethode. Enkel het effect van de langlevende plasmadeeltjes is belangrijk, niet dat van de elektronen of fotonen, en de pH en temperatuur van de vloeistof kan perfect gecontroleerd worden. Voordat ze toegediend worden, kunnen de PAM geanalyseerd worden om zeker te zijn welke deeltjes aanwezig zijn en in welke concentraties. Tot nu toe is de mogelijkheid voor het gebruik van PAM minder onderzocht dan CAP, waardoor er nog minder gekend is over de mechanismen die daarbij een rol spelen.<sup>61</sup>

**Tabel 1: Resultaten voor het gebruik van PAM die verschenen zijn in de literatuur.**

Jaar	Auteurs	Celtype	Resultaat	Ref.
2011	Tanaka <i>et al</i>	GBM (U251SP)	PAM induceert apoptose bij kankercellen, terwijl gewone astrocyten met dezelfde behandeling overleven	44
2011	Sato <i>et al</i>	Baarmoederhalskanker (HeLa)	Effect van H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> op de celdood	62
2012	Vandamme <i>et al</i>	GBM (U87) en darmkanker (HCT116)	PAM induceert celdood <i>in vitro</i> en reduceert de grootte van de tumor bij een muismodel <i>in vivo</i>	17
2013	Utsumi <i>et al</i>	Eierstokkanker (NOS2 en NOS3)	Effect van PAM op chemo-resistente kankercellen <i>in vitro</i> en <i>in vivo</i>	60
2014	Yan <i>et al</i>	GBM (U87)	Effect van concentratie FBS ( <i>Eng: fetal bovine serum</i> ) in PAM en van de bewaar temperatuur van PAM	58
2014	Utsumi <i>et al</i>	Eierstokkanker (NOS2, TOV21G, ES-2, SKOV3)	Minder schade aan gezonde cellen dan aan kankercellen door PAM-behandeling	63
2014	Torii <i>et al</i>	Maagkanker (NUGC4, SC-2-NU, MKN28 en MKN45)	PAM induceert celdood bij kankercellen door de opname van ROS	64
2015	Yan <i>et al</i>	GBM (U87), borstkanker (MDA-MB-231 en MCF-7)	Effect van volume, grootte wellplaat en afstand tussen plasmajet en vloeistofoppervlak op de anti-kankeractiviteit van PAM	61
2015	Adachi <i>et al</i>	Longkanker (A549), leverkanker (HepG2) en borstkanker (MCF-7)	Stabiliteit van PAM bij langdurige bewaring	59
2015	Hara <i>et al</i>	Neuroblastoma (SH-SY5Y)	Celdood wordt veroorzaakt door de intracellulaire vrijstelling van zink, veroorzaakt door PAM	65
2016	Vermeylen <i>et al</i>	Melanoma (Malme-M3 en SK-MEL-28) en GBM (LN229 en U87)	PAM induceert celdood, effect van plasmabehandelingstijd en verschillende gasmengsels op de viabiliteit van de cellen, verschillende cellijnen hebben verschillende gevoeligheid	51
2016	Yan <i>et al</i>	GBM (U87MG)	Medium aangerijkt met lysine is effectiever als PAM, optimalisatie van het medium	66
2016	Boehm <i>et al</i>	Baarmoederhalskanker (HeLa)	Cytotoxisch en mutageen effect van PAM	67
2016	Judée <i>et al</i>	Darmkanker (HCT116)	PAM-behandeling van tumorsferen ( <i>Eng: tumour spheroids</i> )	68
2016	Kurake <i>et al</i>	GBM (U251SP)	PAM induceert celdood bij GBM-cellen, niet bij gezonde epitheelcellen	69



## 1.4 Het gebruik van computersimulaties in de plasmageneeskunde

Om vooruitgang te boeken in het domein van plasmageneeskunde is het noodzakelijk om de interactiemechanismen tussen plasmadeeltjes en biochemische structuren beter te begrijpen. Er is nog weinig bekend over de processen en reactiemechanismen die plaatsvinden. Zowel de plasma's als de biochemische systemen zijn dikwijls te complex om de interacties specifiek te onderzoeken door middel van experimenten.<sup>3</sup> Computersimulaties kunnen zeer nuttig zijn voor het onderzoeken en begrijpen van de reactie- en interactiemechanismen die optreden in het plasma en aan de plasma-substraat interface.<sup>70</sup> Ten eerste bestaat de mogelijkheid om procesvariabelen te scheiden, wat experimenteel vaak niet mogelijk is. Ook is het mogelijk om simulaties uit te voeren met zeer hoge resolutie voor inzichten op atomair en moleculair niveau. Daarnaast is het gebruik van simulaties een relatief goedkope manier voor het screenen van parameters. Tot slot maakt de afwezigheid van mogelijke risico's en voorschriften voor biomedische experimenten van simulaties een waardevolle onderzoeksmethode in de plasmageneeskunde.<sup>3</sup> Naast computersimulaties blijven experimenten uiteraard onmisbaar om de computationeel bekomen resultaten te valideren en nieuwe inzichten aan te brengen.

Bij simulaties in het kader van plasmageneeskunde is het in de eerste plaats belangrijk om te weten welke reacties er optreden, wat de reactiekinetiek is en welke reacties en deeltjes de belangrijkste zijn.<sup>71</sup> Voor de gasfase zijn er reeds uitvoerige studies gepubliceerd met datasets voor heliumplasma's die water bevatten bij atmosferische druk<sup>72-76</sup>, voor systemen gebaseerd op argon<sup>77</sup> en voor plasma's in vochtige lucht<sup>78,79</sup>. Voor het begrijpen van de onderliggende mechanismen is het tevens belangrijk om de interacties tussen de plasmagegenereerde deeltjes en biomoleculen te kennen. Hiervoor worden typisch reactieve MD (moleculaire dynamica) studies gebruikt.<sup>80-86</sup>

### 1.4.1 Plasma-vloeistofinteracties

Door het opkomend gebruik van PAM is de interesse in plasma-vloeistofinteracties zeer groot. Het is belangrijk om de chemische en fysische mechanismen te begrijpen die leiden tot de reactiviteit van de vloeistof na contact met het plasma. Het modelleren van plasma-vloeistofinteracties is zeer uitdagend vanuit een aantal standpunten. Ten eerste bemoeilijkt het grote verschil tussen de botsingsprocessen in gas- en vloeistoffase de numerische integratie. Daarnaast bestaat er een grote onzekerheid over de reactiemechanismen in de vloeistoffase, aangezien er slechts beperkte gegevens in de literatuur beschikbaar zijn. Tenslotte zorgt het transport van de deeltjes van de gasfase naar de vloeistoffase en omgekeerd ook voor moeilijkheden.<sup>71</sup> Recentelijk zijn er artikels verschenen waarbij een gekoppeld systeem tussen plasma en vloeistof werd gesimuleerd.<sup>87-91</sup>

Bij het simuleren van plasma-vloeistofinteracties moeten er drie gebieden beschouwd worden, nl. de gasfase, de vloeistoffase en de interface tussen de beide fasen. Het transport van de deeltjes doorheen de interface gebeurt in principe in beide richtingen. Het is gebruikelijk om het transport van deeltjes van gas- naar vloeistoffase en omgekeerd te beschrijven d.m.v. de wet van Henry, waarbij dat transport afhankelijk is van de dichtheden net boven en onder het vloeistofoppervlak. Een ander belangrijk punt bij de interface is de evaporatie van water, wat resulteert in een laag boven het vloeistofoppervlak die verzadigd is met waterdamp.<sup>71</sup> De nodige gegevens om de gasfase te beschrijven zijn voldoende voorhanden. Voor de vloeistoffase zijn de gegevens echter beperkt, waardoor de onzekerheid voor deze fase zeer groot is. Recent succes van modellen die specifieke experimentele resultaten kunnen nabootsen, zorgen wel voor een verhoging van de kwaliteit van de beschikbare gegevens voor de vloeistoffase.<sup>92-95</sup>

## 1.5 Doel van de thesis

In deze thesis zullen plasma-vloeistofinteracties voor kankerbehandeling onderzocht worden op drie verschillende niveaus, nl. een bepaling van de chemische samenstelling van plasmabehandelde fosfaat-gebufferde zoutoplossing (*Eng: plasma-treated phosphate buffered saline, pPBS*), een viabiliteitsanalyse van kankercellen na behandeling met pPBS en een computationele studie. In het eerste luik zullen de effecten op de kankercellen vergeleken worden met de chemische samenstelling van pPBS. In het tweede luik zal het model gevalideerd worden door vergelijking met de experimenteel bepaalde chemische samenstelling van pPBS en zal de invloed van een aantal parameters op de reactiviteit van pPBS bestudeerd worden.

Voor de celexperimenten wordt gebruikgemaakt van drie glioblastomacellijnen (GBM), nl. U87, U251 en LN229. Glioblastoma is de meest dodelijke vorm van hersenkanker.<sup>96</sup> Dit type kanker kent een grote resistentie tegen chemotherapie, waardoor de gemiddelde overlevingstijd van patiënten slechts 15 maanden bedraagt.<sup>96,97</sup> Het gebruik van CAP-behandeling van glioblastoma is effectief gebleken bij het behandelen van cellijnen *in vitro*<sup>44</sup> en *in vivo*<sup>50</sup>. In deze thesis wordt het effect van pPBS op deze GBM-cellijnen onderzocht.

Voor de chemische analyse van pPBS worden de concentraties van  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{O}$ ,  $\text{O}_3$  en  $^1\text{O}_2$  bepaald d.m.v. UV-VIS spectrofotometrie en EPR (elektron paramagnetische resonantie). Bij het gebruik van pPBS is het belangrijk op te merken dat kortlevende deeltjes zoals radicalen niet kunnen bijdragen aan de reactiviteit van de vloeistof, aangezien deze al weggereageerd zijn op het moment dat de vloeistof bij de cellen terechtkomt. De langlevende deeltjes zoals  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{O}_3$  kunnen wel belangrijk zijn voor de interactie met de cellen. Voor de validatie van het model is het echter wel nuttig om ook enkele kortlevende deeltjes ( $\text{O}$  en  $^1\text{O}_2$ , die simultaan met  $\text{O}_3$  gedetecteerd kunnen worden) te meten.

Voor de computationele studie wordt een fluid model ontwikkeld. De gasfase, de vloeistoffase en de interface worden gesimuleerd. Om de rekentijd te beperken, wordt de eigenlijke plasmaontlading niet beschouwd, maar worden gekende concentraties als inlaat in de plasmajet genomen. Dit zal verder toegelicht worden in de computationele methode.

In dit gecombineerd onderzoek zal inzicht verkregen worden in de verschillende mechanismen, reacties en deeltjes die belangrijk zijn voor de reactiviteit van pPBS. Deze kennis over de anti-kankerwerking van pPBS is nodig om plasmageneeskunde uiteindelijk te laten uitgroeien tot een volwaardige biomedische discipline.

## 2. Experimentele methode

### 2.1 Chemische samenstelling

In het experimentele luik zullen de concentraties van  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{NO}_2^-$  in pPBS bepaald worden. De concentratie van  $\text{NO}_3^-$  is in deze thesis niet gemeten wegens contaminatie van de detectiekit. De reden waarom de concentratie van  $\text{O}_3$  (tezamen met die van  $\text{O}$  en  $^1\text{O}_2$ ) enkel voor het computationele gedeelte bepaald wordt, zal besproken worden in *sectie 4.1.4*. Voor andere stabiele RONS in de vloeistof (bv.  $\text{ONOOH}$ ) is de detectiemethode vaak niet selectief ten opzichte van andere RONS.

#### 2.1.1 UV-VIS spectrofotometrie

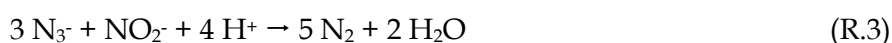
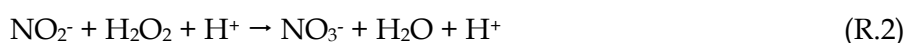
Het verband tussen de absorbantie en concentratie van een gekleurde component kan beschreven worden met behulp van de wet van Lambert-Beer:

$$A = c \cdot d \cdot \varepsilon$$

Deze wet stelt dat de absorbantie ( $A$ ) recht evenredig is met de concentratie ( $c$ , in  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), waarbij de evenredigheidsfactor het product van de padlengte ( $d$ , in  $\text{cm}$ ) en de extinctiecoëfficiënt ( $\varepsilon$ , in  $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) is. Via een ijking met oplossingen met gekende concentraties kunnen de extinctiecoëfficiënt en het lineaire gebied van dit verband bepaald worden.

#### *Detectie van waterstofperoxide*

De concentratie van waterstofperoxide wordt colorimetrisch bepaald met behulp van de titaniumsulfaatmethode.<sup>98</sup> In zuur milieu vormt  $\text{H}_2\text{O}_2$  met titaniumionen het geelgekleurde peroxotitanium(IV)-complex (volgens reactie R.1) dat een absorptiemaximum heeft rond 407 nm. Dit complex blijft stabiel voor minstens zes uur.<sup>99</sup> Uit een kalibratie met standaardoplossingen van  $\text{H}_2\text{O}_2$  tussen 9,5 en 1429,5  $\mu\text{M}$  wordt de extinctiecoëfficiënt berekend ( $\varepsilon = 817 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). De resultaten van deze kalibratie zijn te vinden in *Appendix A.1.1*. Na de plasmabehandeling wordt aan de oplossing meteen natriumazide toegevoegd om de afbraak van waterstofperoxide door nitriet via reactie R.2 te vermijden.<sup>100</sup> Natriumazide reageert met nitriet volgens reactie R.3, waardoor het nitriet verdwijnt uit het reactiemilieu.<sup>101</sup> Deze reacties gebeuren onder zure condities, dus is het belangrijk het azide toe te voegen voor de zure titanium(IV)-oplossing.<sup>99</sup> Omdat reactie R.3 ook zure condities vereist, zal er waarschijnlijk telkens een kleine hoeveelheid  $\text{H}_2\text{O}_2$  wegreageren met  $\text{NO}_2^-$ . Dit laatste is echter onvermijdelijk.

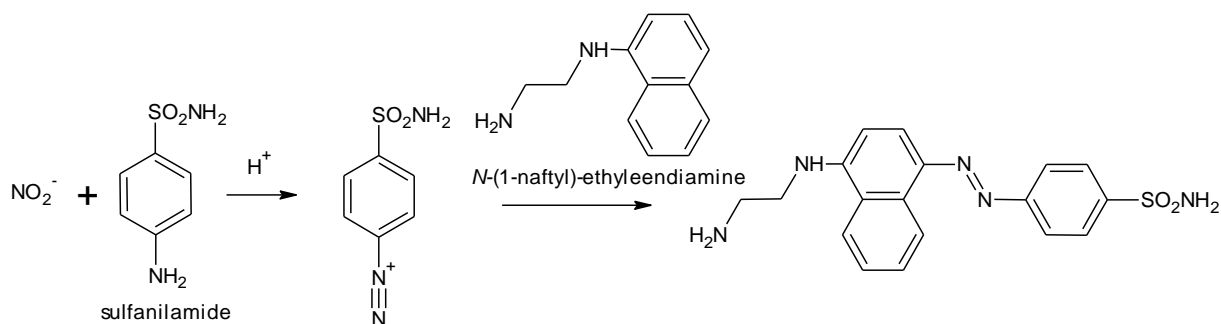


Voor de analyse wordt een ThermoFischer Genesys™ 6 spectrofotometer gebruikt. De cuvetten hebben een padlengte van 1 cm, een volume van 700  $\mu\text{L}$ , een interne breedte van 2 mm en zijn vervaardigd uit kwartsglas. De absorptie van de stalen wordt gemeten ten opzichte van een blanco staal bij 400 nm. Er wordt een oplossing van 80 mM  $\text{NaN}_3$  (Sigma Aldrich®, S2002) in PBS en een oplossing van 0,1 M  $\text{K}_2\text{TiO}(\text{C}_2\text{O}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma Aldrich®, 14007) en 5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in milli-Q water bereid. Voor de metingen wordt aan de cuvette 50  $\mu\text{L}$   $\text{N}_3^-$ -oplossing, 200  $\mu\text{L}$  staal en 50  $\mu\text{L}$  Ti(IV)-oplossing toegevoegd.

### Detectie van nitrietionen

Voor de bepaling van de concentratie nitriet wordt de Griessmethode gebruikt<sup>102</sup> (Griess Reagent Nitrite Measurement kit, Cell Signaling Technology®, 13547). Nitriet reageert met sulfanilamide en *N*-(1-naftyl)-ethyleendiamine diwaterstofchloride via azosulfanilamidezuur tot een magenta azokleurstof (zie [Figuur 4](#)) waarvan de absorptie maximaal is rond 543 nm. Een ijklijn wordt opgesteld met concentraties van standaardoplossingen nitriet tussen 7,8 en 125  $\mu\text{M}$ , waaruit de extinctiecoëfficiënt berekend kan worden ( $\epsilon = 8921 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). De gegevens van de ijking zijn terug te vinden in [Appendix A.1.2](#). Vermits ook de sulfanilamideoplossing zuur is, is het mogelijk dat een fractie van de  $\text{NO}_2^-$  reageert met  $\text{H}_2\text{O}_2$  volgens reactie R.2, voordat ze kunnen reageren met de Griessreagentia.

De analyse gebeurt in een 96-wellplaat met een BIO-RAD iMark™ Microplate lezer. Per well wordt 100  $\mu\text{L}$  Griessreagens (1:1 sulfanilamide en *N*-(1-naftyl)-ethyleendiamine) en 100  $\mu\text{L}$  staal (al dan niet verdund met onbehandelde PBS) toegevoegd. Er wordt telkens een blancostaal aangemaakt in de wellplaat. De absorptie wordt in drievoud gemeten bij 540 nm.



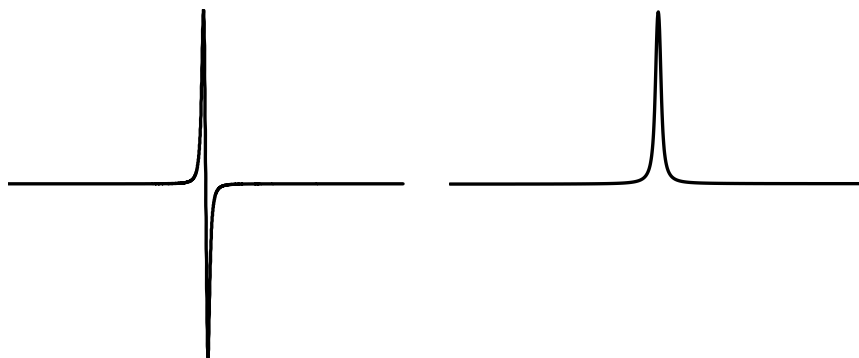
**Figuur 4: Reacties van nitrietionen met de Griessreagentia.**

### 2.1.2 EPR

Elektron paramagnetische resonantie (EPR), ook wel elektron spinresonantie (ESR) of elektron magnetische resonantie (EMR) genoemd, is een techniek die gebruikt kan worden om radicalen te detecteren. Het principe van EPR is gelijkaardig aan dat van NMR (nucleaire magnetische resonantie) met dat verschil dat bij EPR elektronspins geëxciteerd worden en geen atoomkernspins, wat bij NMR het geval is. Doordat elektronen veel lichter zijn dan atoomkernen, zullen een sterker magnetisch veld en een hogere frequentie nodig zijn dan bij NMR. Bij EPR

wordt microgolfstraling gebruikt als exciterende straling. Een ongepaard elektron heeft een magnetisch moment, waardoor de energieniveaus van het elektron zullen opsplitsen in een magneetveld (volgens het Zeemannprincipe). Als de energie van de microgolfstraling gelijk wordt aan de opsplitsingsenergie, zal er een transitie van de elektronspin plaatsvinden van het lager gelegen naar het hoger gelegen energieniveau. Het is deze absorptie van de straling die wordt gemeten bij EPR. Aangezien het patroon van de opsplitsing afhankelijk is van de aard van het radicaal, kan er informatie verkregen worden over welk radicaal precies gedetecteerd wordt.<sup>103</sup>

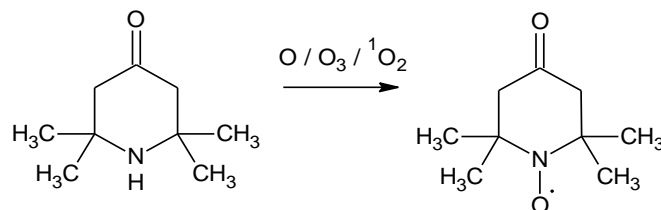
Een mogelijk probleem bij het detecteren van radicalen is dat deze deeltjes slechts een zeer korte levensduur hebben. Op het moment dat de EPR-analyse effectief gestart is, zal een groot deel van de radicalen al weggereageerd zijn. Een manier om dit probleem te omzeilen is door gebruik te maken van de spin-trappingmethode.<sup>104</sup> Radicalen kunnen reageren met spintraps, met vorming van een zogenaamd spinadduct. Dit spinadduct is nog steeds een radicaal, maar stabiel dan het oorspronkelijke, waardoor het lang genoeg blijft bestaan om gedetecteerd te worden in een EPR-analyse.



**Figuur 5: Links: eenvoudig EPR-spectrum. Rechts: hetzelfde spectrum weergegeven als absorptiespectrum.**

Het resultaat van een EPR-meting is een absorptiespectrum in functie van het magneetveld. Een EPR-spectrum wordt weergegeven als de eerste afgeleide van de absorptie (Figuur 5, links). De oppervlakte onder de curve is een maat voor de hoeveelheid geabsorbeerde straling en kan d.m.v. een ijking gerelateerd worden aan de concentratie van het radicaal. De EPR-spectra moeten dubbel geïntegreerd worden om de oppervlakte onder de curve te verkrijgen. Bij experimentele spectra is de signaal-op-ruisverhouding vaak te klein, zeker bij lage concentraties, waardoor het dubbel integreren van deze spectra geen goede resultaten geeft. Daarom worden de spectra gesimuleerd, waarbij de ruis onbestaande is. Het dubbel integreren van deze gesimuleerde spectra geeft uiteraard wel duidelijke resultaten. Bij het simuleren van de spectra zijn een aantal parameters belangrijk, nl. de *hyperfine*-waarde (d.i. de grootte van de opsplitsing), de *g-shift* (d.i. het midden van het signaal van een bepaald radicaal), de vorm van de curve en de piekbreedte. Aangezien de meeste radicalen ongeveer dezelfde *g-shift* hebben, zullen de signalen van

verschillende radicalen samenvallen. Dit maakt het analyseren van de spectra soms zeer ingewikkeld. In dat geval zijn vooral de *hyperfine*-waarde, maar ook de vorm van de curve en de piekbreedte, belangrijk om een onderscheid te kunnen maken tussen de radicalen.<sup>103</sup>

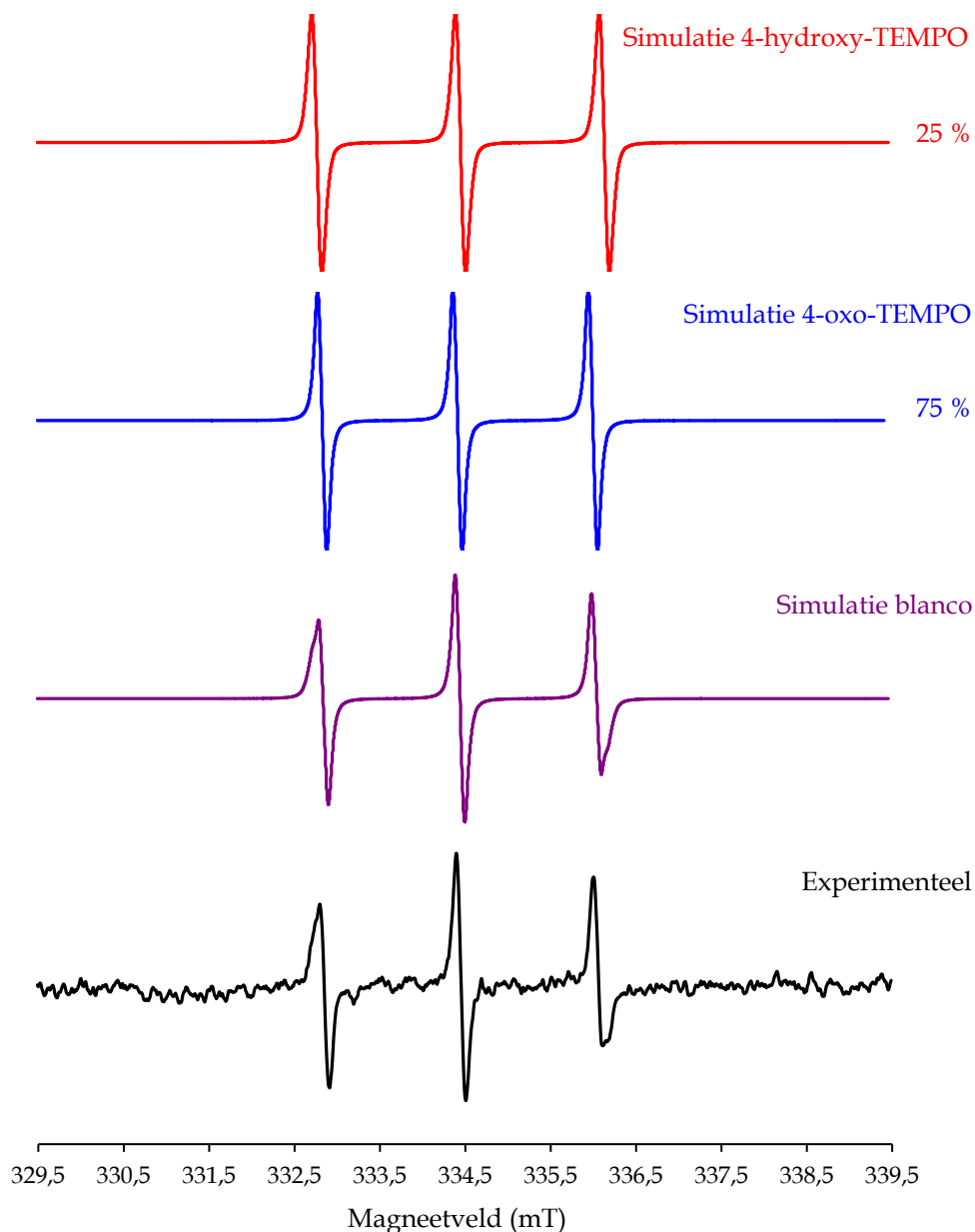


**Figuur 6: Reactie van de spintrap 4-oxo-TEMP (spintrap) met O, O<sub>3</sub> en <sup>1</sup>O<sub>2</sub> tot 4-oxo-TEMPO (spinadduct).**

De EPR-metingen worden uitgevoerd met een MiniScope MS 200 (Magnettech, Duitsland). Deze spectrometer werkt met elektromagnetische straling met een frequentie van 9,8 GHz en een magneetsterkte van 350 mT. Als capillairen worden Ringcaps<sup>®</sup> 50 µL-capillairen (Hirschmann<sup>®</sup>, Duitsland) gebruikt. Een aantal belangrijke parameters voor de EPR-metingen zijn het centrum van het magneetveld en de grootte van het gebied waarbij gemeten wordt ( $B_0$ -veld = 334,5 mT, gebied = 10 mT), het aantal punten binnen het gebied waarop gemeten wordt (4096), de tijd waarin dit gebied gescand wordt (*Eng: sweep time* = 40 s), de amplitude van de oscillerende straling (0,1 mT) en de verzwakking van de microgolven (*Eng: microwave attenuation* = 5 dB).

Als spintrap wordt 4-oxo-TEMP (2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidon, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, 459119) gebruikt. Deze spintrap wordt zowel door het atomair zuurstofradicaal (O), ozon (O<sub>3</sub>) als singlet zuurstof (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) geoxideerd tot 4-oxo-TEMPO (zie [Figuur 6](#)), een radicaal dat gedetecteerd kan worden met EPR.<sup>105</sup> Met deze spintrap wordt dus de som van de concentraties van deze drie deeltjes verkregen. Om een onderscheid te maken, kan er een tweede analyse gebeuren van 4-oxo-TEMP waaraan natriumazide is toegevoegd. N<sub>3</sub><sup>-</sup> is een quencher voor <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, waardoor nu enkel nog O en O<sub>3</sub> met 4-oxo-TEMP zullen reageren.<sup>106,107</sup> Het verschil tussen de concentraties die met deze twee experimenten verkregen worden, is dan een maat voor de hoeveelheid <sup>1</sup>O<sub>2</sub> die aanwezig is. Het onderscheid tussen O en O<sub>3</sub> kan niet gemaakt worden met deze methode.

Voor de ijklijn worden concentraties tussen 1 en 50 µM van het radicaal 4-hydroxy-TEMPO (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, 176141) geanalyseerd. Dit is goedkoper dan 4-oxo-TEMPO en voor het opstellen van de ijklijn kan in principe elk radicaal gebruikt worden, aangezien de intensiteit van het signaal evenredig is met de concentratie van het radicaal, en enkel de vorm van de opsplitsing van de aard ervan. Deze gegevens zijn terug te vinden in [Appendix A.1.3](#). Bij het meten van de onbehandelde 4-oxo-TEMP-oplossing als blancostaat wordt een EPR-signaal gedetecteerd, te wijten aan onzuiverheden en oxidatie van de 4-oxo-TEMP. Dit signaal blijkt afkomstig van twee radicalen, nl. 4-oxo-TEMPO en 4-hydroxy-TEMPO, wat te zien is aan de asymmetrie van het signaal (zie [Figuur 7](#)). Aangezien het blancostaat reeds een EPR-signaal geeft, moet de waarde van de oppervlakte onder deze curve telkens afgetrokken worden van de oppervlakte bij het meten van de behandelde oplossingen.



**Figuur 7:** Afbeelding van de experimentele en gesimuleerde EPR-spectra van de blanco 4-oxo-TEMP-oplossing. De spectra worden gesimuleerd om te achterhalen welke verbindingen verantwoordelijk zijn voor het gemeten EPR-signaal. Het signaal in de blanco-oplossing blijkt afkomstig te zijn van 75 % 4-oxo-TEMPO en 25 % 4-hydroxy-TEMPO. De oppervlakte onder de pieken van het spectrum 'simulatie blanco' wordt als waarde afgetrokken van de oppervlakte onder de pieken bij het meten van de plasmabehandelde oplossingen.

## 2.2 Celexperimenten

### 2.2.1 Celcultuur

Er worden drie humane GBM-cellijnen (U87, U251 en LN229) gebruikt die gekweekt worden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco™ DMEM, Life Technologies, 10938025), waaraan 10 % FBS (*Eng: fetal bovine serum*) (Gibco™ FBS, Life Technologies, 10270098), 2 mM L-glutamine (Gibco™, Life Technologies, 25030081), 100 eenheden/mL penicilline en 100 µg/mL streptomycine (Gibco™, Life Technologies, 15140163) wordt toegevoegd. De cellen worden geïncubeerd bij 37 °C en 5 % CO<sub>2</sub>.



## 2.2.2 Uitzaaien

Voor de plasmabehandeling werden de U87- en LN229-cellen uitgezaaid aan 3000 en de U251-cellen aan 1500 cellen per well in 150  $\mu$ L medium in een 96-wellplaat. Na incubatie van 24 uur bij 37 °C en 5 % CO<sub>2</sub> worden de cellen behandeld met pPBS (zie verder).

## 2.2.3 Viabiliteitsanalyse

Na de plasmabehandeling wordt de viabiliteit van de kankercellen geanalyseerd via de sulforhodamine B-methode (SRB). Deze methode werd in 1990 ontwikkeld<sup>108</sup> en is gebaseerd op de binding van SRB met basische aminozuren. SRB is een roze kleurstof en bindt stoichiometrisch met de aminozuren. De absorbantie wordt in een 96-wellplaat gemeten bij 540 nm en is een maat voor de totale hoeveelheid proteïnen aanwezig in de wells.<sup>109</sup> Aangezien de dode cellen voor de kleuring weggewassen worden, is dit dus ook een maat voor de viabiliteit van de kankercellen. De cellen worden na verwijdering van het medium gefixeerd met 10 % trichloorazijnzuur (TCA). Na weggewassen van de TCA en de nog aanwezige dode cellen, wordt er aan elke well 100  $\mu$ L SRB (Sigma-Aldrich®, S1402) toegevoegd. Na grondig weggewassen van de niet-gebonden kleurstof met 1 % (vol/vol) azijnzuur en terug oplossen van de gebonden kleurstof met 100  $\mu$ L tris-buffer (tris(hydroxymethyl)aminomethaan, Sigma-Aldrich®, 252859) kan de absorbantie gemeten worden met de BIO-RAD iMark Microplate lezer. Er wordt telkens een blanchestaal gemeten en de viabiliteit wordt bepaald ten opzichte van een onbehandeld controlestaal.

## 2.3 Plasmabehandeling

### 2.3.1 Plasmabron

Als plasmabron wordt in deze thesis gebruikgemaakt van een kINPen® IND plasmajet (zie [Figuur 8](#)). Deze plasmajet heeft dezelfde specificaties als de commercieel beschikbare kINPen® MED (INP Greifswald/neoplas tools GmbH, Greifswald, Duitsland), met als enig verschil dat de kINPen® IND niet gecertificeerd is voor medische toepassingen. De kINPen® MED is speciaal ontworpen voor het gebruik in de geneeskunde.

De kINPen® IND bestaat uit een penvormige houder, een voedingsbron en een gastoevoereenheid. Binnenin de metalen behuizing bevindt zich een pinelektrode (1 mm diameter) die door een capillair (diëlektrische buis met interne diameter 1,6 mm) afgeschermd wordt van een gearde ringelektrode (zie de opstelling zoals weergegeven in [Figuur 3c](#)).<sup>110,111</sup> Het plasma wordt opgewekt door een sinusoidale spanning (2-6 kV<sub>pp</sub> (piek-tot-piekspanning)) aan te leggen op de centrale elektrode met een frequentie tussen 1,0 en 1,1 MHz, waarbij het vermogen maximaal 3,5 W bedraagt. Om de temperatuur te beperken, wordt in de burstmode gewerkt. Hierbij wordt het plasma afwisselend aan- en uitgezet met een frequentie van 2,5 kHz, waarbij de verhouding 1:1 is tussen aan en uit. Het plasma wordt opgewekt binnen het capillair, waarna

de reactieve deeltjes door de gasstroom tot buiten de opening worden gevoerd. Deze plasmapluij is 9-12 mm lang en heeft een diameter van 1 mm.<sup>110</sup>



**Figuur 8:** Afbeelding van de kINPen® IND. Links: foto van de gastoevoereenheid en penvormige houder (voedingsbron niet weergegeven). Midden: foto van de penvormige houder, waarbij de plasmapluij zichtbaar is. Rechts: een schematische voorstelling van de plasmajet, waarbij de centrale pinelektrode, het capillair en de behuizing zichtbaar zijn. Afbeelding overgenomen uit Ref 112.

### 2.3.2 Gebruikte parameters bij de plasmabehandelingen

Voor de plasmabehandelingen wordt telkens 2 mL PBS (pH 7,3) in een 12-wellplaat behandeld met de plasmajet. Als gas wordt zuiver argon gebruikt met een debiet van 1-3 slm (standaard liter per minuut). Afhankelijk van de experimenten worden bepaalde waarden voor het gasdebiet, de afstand tussen de plasmajet en de vloeistof (*Eng: gap*, wordt in deze thesis verder als benaming gebruikt) en de behandelingstijd gekozen. Deze worden gespecificeerd bij de bespreking van de deelstudies hieronder. De metingen van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  bij de chemische samenstelling gebeurden telkens met dezelfde plasmabehandelde PBS. Voor de chemische analyse en de celexperimenten worden ten minste drie herhalingen uitgevoerd.

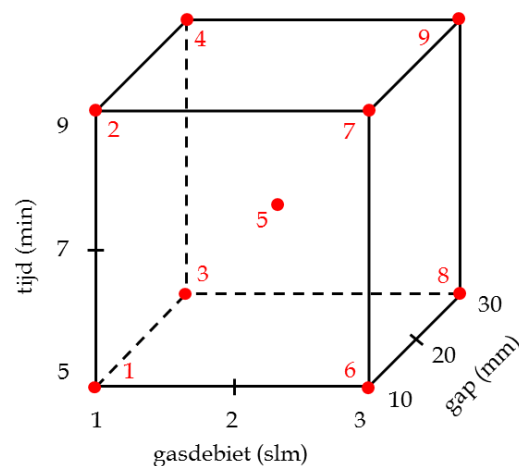
De temperatuur van de omgeving varieerde bij alle metingen tussen 20,2 en 23,1 °C. De temperatuur is belangrijk, omdat de reactiesnelheden, meer bepaald de reactiesnelheidsconstanten, hiervan afhankelijk zijn. Aangezien de temperatuur bij de experimenten slechts beperkt varieerde, zal dit nagenoeg geen effect hebben op de resultaten. De relatieve vochtigheid varieerde tussen 24 en 57 %. Deze grote spreiding in de luchtvochtigheid zou een groot effect kunnen hebben op de resultaten. Dit zal in *sectie 4*, indien nodig, besproken worden.

#### *Experimenten voor de vergelijking tussen de chemische samenstelling en het effect op de kankercellen*

Voor de chemische samenstelling worden de concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  in de behandelde oplossing bepaald (volgens de hierboven beschreven methode), terwijl voor het effect van plasmabehandelde PBS (pPBS) op de kankercellen 30  $\mu\text{L}$  van de pPBS aan de cellen in 150  $\mu\text{L}$  medium wordt toegevoegd.

Als eerste deelstudie in dit luik wordt het effect van drie belangrijke parameters bij een plasmabehandeling bestudeerd, nl. het gasdebiet, de gap en de behandelingstijd. Een methode

die gebruikt kan worden om de effecten van verschillende parameters tegelijk te bestuderen, is het uitvoeren van een *Design of Experiments* (DOE). Bij het bestuderen van drie parameters, die elk tussen drie waarden variëren (gasdebiet: 1, 2, 3 slm; gap: 10, 20, 30 mm; tijd: 5, 7, 9 min), zijn er in principe 27 mogelijke combinaties. Het uitgangspunt bij een DOE is dat van deze 27 combinaties enkel de uiterste 8 combinaties en het centrumpunt gemeten moeten worden om het effect van de parameters volledig te kunnen beschrijven (zie [Figuur 9](#)). Deze negen condities zijn opgelijst in [Tabel 2](#) en worden zowel voor de chemische analyse als voor de celexperimenten gebruikt. Het centrumpunt (conditie 5) wordt drie keer gemeten voor de robuustheid van de experimenten en de experimenten worden in willekeurige volgorde uitgevoerd om te compenseren voor het effect van de variatie door machinale parameters. Het uitvoeren van de analyse met de DOE bleek niet mogelijk, wat in de discussie besproken zal worden. De reden waarom er twee extra condities werden gekozen (1b en 2b) zal eveneens in de discussie besproken worden.



**Figuur 9:** Voorstelling van de keuze voor de gebruikte condities volgens *Design of Experiments*. Tijd staat voor behandelingstijd. De nummers bij de punten komen overeen met de nummers van de condities in [Tabel 2](#).

**Tabel 2:** Gebruikte condities bij de experimenten voor de vergelijking tussen de chemische analyse en het effect op de kankercellen. Deze condities worden zowel voor de plasmabehandeling van de cellen als voor de chemische analyse gebruikt. Tijd staat voor de plasmabehandelingstijd.

Conditie	Gasdebiet (slm)	Gap (mm)	Tijd (min)
1a	1	10	5
2a	1	10	9
1b	1	15	5
2b	1	15	9
3	1	30	5
4	1	30	9
5	2	20	7
6	3	10	5
7	3	10	9
8	3	30	5
9	3	30	9

Een tweede deelstudie in dit luik is het testen van de stabiliteit van pPBS. In een eerste reeks experimenten wordt de plasmabehandelde PBS chemisch geanalyseerd of toegevoegd aan de cellen op verschillende tijdstippen na de behandeling (nl. na 0', 5', 10', 30', 60' en 120'). De reactieve deeltjes in de vloeistof hebben zo langer de tijd om te reageren, zodat er een verandering in de concentraties van de deeltjes zou kunnen optreden. In een tweede reeks experimenten wordt de stabiliteit nagegaan van celmedium waaraan pPBS (in een 1 op 6 verdunning) werd toegevoegd. Hiertoe wordt op dezelfde tijdstippen na de behandeling als in de eerste reeks de concentratie van  $\text{NO}_2^-$  in dat celmedium geanalyseerd en wordt er 180  $\mu\text{L}$  van dit medium toegevoegd aan de kankercellen, na het verwijderen van het celmedium waarin de cellen zich bevonden. Voor  $\text{H}_2\text{O}_2$  is deze meting in celmedium praktisch niet uitvoerbaar, omdat het medium bij het schudden van de cuvette te hard schuimt om de oplossing te meten in de spectrometer. Voor deze deelstudie wordt conditie 1b uit Tabel 2 gekozen.

De laatste deelstudie handelt over het effect van de plasmabehandelingstijd op de concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  in pPBS en op de kankercellen. Hiervoor wordt conditie 1a uit Tabel 2 gekozen. De gebruikte behandelingstijden zijn 5', 2'30'', 1'15'', 37,5'', 18,75''.

### *Experimenten voor de validatie van het model*

Om het ontwikkelde model (zie *sectie 3*) te valideren, worden opnieuw een aantal condities gekozen voor het bepalen van de chemische samenstelling. Het effect van het gasdebiet, de gap en de plasmabehandelingstijd zal onderzocht worden bij zowel de computationeel als de experimenteel verkregen resultaten. Hiervoor worden deze keer negen condities gekozen, die opgelijst zijn in Tabel 3. De chemische samenstelling wordt bestudeerd door de concentraties van  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , O,  $\text{O}_3$  en  $^1\text{O}_2$  te bepalen. De concentraties van  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{NO}_2^-$  worden gemeten in 2 mL plasmabehandelde PBS en voor de EPR-analyse wordt 2 mL van een spintrapoplossing in PBS gebruikt. Hiervoor wordt er 2 mL van een oplossing van 40 mM 4-oxo-TEMP (2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidon, Sigma-Aldrich®, 459119), waaraan al dan niet 50 mM  $\text{NaN}_3$  (Sigma-Aldrich®) aan toegevoegd is, behandeld.

**Tabel 3: Gebruikte condities bij het uitvoeren van de experimenten ter validatie van het model, zowel voor de UV-VIS- als voor de EPR-analyse. Tijd staat voor de plasmabehandelingstijd.**

Conditie	Gasdebiet (slm)	Gap (mm)	Tijd (min)
A	1	15	1
B	1	15	2
C	1	15	3
D	1	15	4
E	1	15	5
F	1	20	2
G	1	30	2
H	2	15	2
I	3	15	2

## 3. Computationele methode

### 3.1 Algemene beschrijving van de computationele methode

#### 3.1.1 Fluid model

Voor de computationele studie worden fluid simulaties uitgevoerd met behulp van het softwarepakket Comsol Multiphysics™, versie 5.0. In een fluid model wordt het plasma als een continuüm beschouwd. Hierdoor kunnen enkel macroscopische eigenschappen van het plasma worden onderzocht en kan er geen informatie over individuele deeltjes verkregen worden. In een fluid model worden de vergelijkingen voor behoud van massa, energie en impuls opgelost. In tegenstelling tot bv. een 0D-model kunnen wel transportfenomenen beschouwd worden. Met een fluid model kan een plasma berekend worden in complexe reactorgeometrieën en binnen een aanvaardbare rekentijd.

#### 3.1.2 Comsol Multiphysics™

In het ontwikkelde model worden de gasfase, de vloeistoffase en de interface tussen beide fasen gesimuleerd. Hierbij worden drie verschillende fysicamodules gebruikt die ingebouwd zijn in Comsol, nl. de module voor de gas- en vloeistofstroming, warmtetransport en transport van de deeltjes. Deze modules worden apart in de gas- en vloeistoffase berekend, maar de beide fasen worden wel gekoppeld door een aantal grensvoorwaarden die later besproken zullen worden. Twee belangrijke vergelijkingen die geïmplementeerd zijn in het model, zijn de vergelijkingen voor behoud van massa en behoud van momentum (Navier-Stokesvergelijking):

$$\rho \nabla \cdot \vec{u} = 0$$

$$\rho(\vec{u} \cdot \nabla \vec{u}) = \nabla[-pI + \mu(\nabla \vec{u} + (\nabla \vec{u})^T)]$$

Hierin is  $\rho$  de totale massadichtheid,  $\vec{u}$  het snelheidsprofiel van het fluid,  $p$  de statische druk,  $I$  de eenheidsmatrix,  $\mu$  de dynamische viscositeit en  $T$  voor de matrixtransformatie voor getransponeerde matrix. Deze vergelijkingen worden gebruikt om de stroming in de gas- en vloeistoffase te berekenen. Dit gebeurt in een 'steady-state'-berekening, totdat een evenwichtstoestand bereikt wordt. Dit snelheidsprofiel in evenwicht wordt dan gebruikt als input voor de tijdsafhankelijke berekeningen van het warmte- en deeltjestransport.

Voor het warmtetransport, zowel in de gas- als vloeistoffase, wordt de eerste wet van de thermodynamica (behoud van energie) berekend:

$$\rho C_p \left( \frac{\delta T}{\delta t} + \vec{u} \cdot \nabla T \right) = \nabla \cdot (k \nabla T) + Q$$

$C_p$  staat voor de warmtecapaciteit bij constante druk,  $k$  is de thermische conductiviteit, die bepaald wordt door de materiaaleigenschappen van het fluid en  $Q$  is de som van alle andere productie- en verliestermen van warmte. Het linkerlid staat hier voor de som van de verandering

van de temperatuur in de tijd en door convectie (bepaald door het snelheidsprofiel). De eerste term in het rechterlid staat voor de warmteflux door conductie, die gelijk is aan de gradiënt van de temperatuur (volgens de wet over conductiviteit van Fourier<sup>113</sup>).

De vergelijking voor massatransport die in de deeltjestransportmodule gebruikt wordt, is:

$$\frac{\delta c_i}{\delta t} + \nabla \cdot (-D_i \nabla c_i) + \vec{u} \cdot \nabla c_i = R_i$$

Hierin staat  $c_i$  voor de concentratie,  $D_i$  voor de diffusiecoëfficiënt en  $R_i$  voor de som van alle productie- en verliesreactietermen van een zeker deeltje  $i$ , bepaald door de chemische reacties (zie verder). De eerste term in het linkerlid staat voor de verandering van de concentratie van een zeker deeltje  $i$  in de tijd. De tweede en derde term staan voor het transport van dit deeltje door respectievelijk diffusie (bepaald door  $D_i$ ) en convectie (bepaald door het snelheidsprofiel  $\vec{u}$ ).

In het volgende deel zullen de modules en de gebruikte condities meer in detail besproken worden.

## 3.2 Beschrijving van het model

Het doel is om de plasma-vloeistofinteracties bij het gebruik van een argon plasmajet te simuleren. Hiervoor worden alle beschouwde deeltjes en reacties, en hun overeenkomstige snelheidsconstanten, uit de (voor de vloeistoffase beperkt beschikbare) literatuur gehaald. Er kunnen reacties of deeltjes ontbreken in het model, omdat daar de nodige gegevens voor ontbreken, maar alles wat wel geïmplementeerd is, zal reeds gevalideerd zijn.

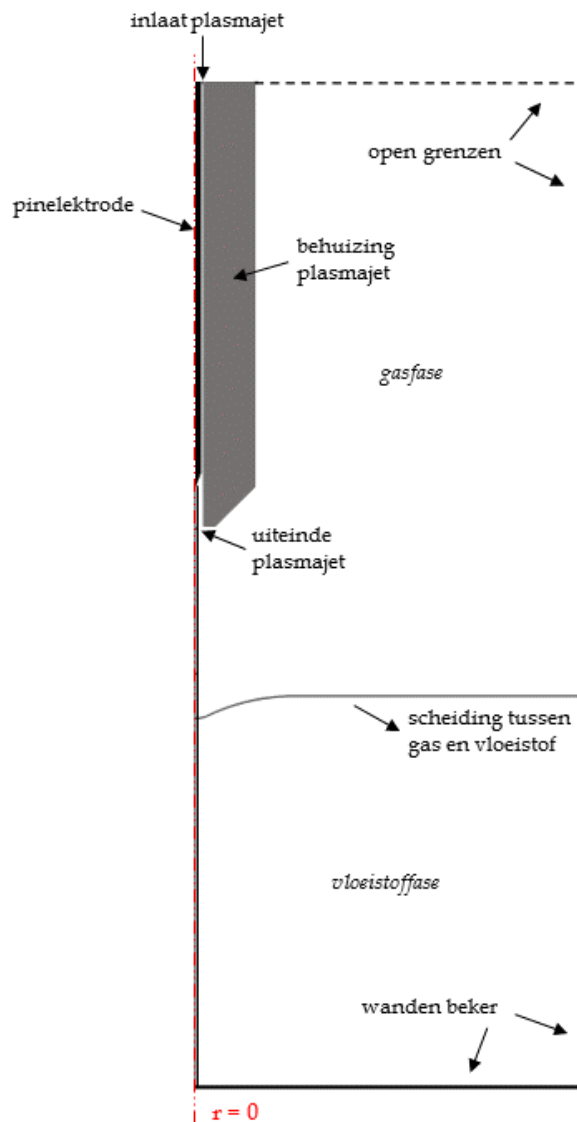
Zoals reeds in de inleiding vermeld, zal in het model de eigenlijke plasma-ontlading niet gesimuleerd worden om de rekentijd te beperken. Ook worden er om dezelfde reden geen elektron-impactreacties beschouwd in het model, waardoor enkel de chemie in de verre effluent (d.i. het niet-zichtbare gedeelte van de effluent) berekend wordt. Om dit op te lossen, worden de concentraties van de deeltjes op het einde van de *afterglow* (d.i. het zichtbare gedeelte van de effluent, waar er zich nog elektronen en fotonen bevinden) uit de artikels van Van Gaens *et al*<sup>95</sup> en Schmidt-Bleker *et al*<sup>114</sup> gebruikt als inlaatconcentraties voor de plasma effluent in dit model. De deeltjes die in het model geïmplementeerd worden, zijn weergegeven in Tabel 4. Een voorbeeld van een (mogelijk belangrijk) deeltje dat ontbreekt in de vloeistoffase, is  $^1\text{O}_2$ , omdat hiervoor de relevante reacties ontbreken in de literatuur, zoals hierboven vermeld.

**Tabel 4: Lijst van beschouwde deeltjes in het model in de gasfase en in de vloeistoffase.**

<b>Deeltjes in de gasfase</b>	Ar, O <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O, OH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , HO <sub>2</sub> , O, O <sub>3</sub> , <sup>1</sup> O <sub>2</sub> , H, N, NO, NO <sub>2</sub> , NO <sub>3</sub> , HNO <sub>2</sub> , HNO <sub>3</sub> , N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , ONOOH
<b>Deeltjes in de vloeistoffase</b>	O <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O, OH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , HO <sub>2</sub> , O, O <sub>3</sub> , H, NO, NO <sub>2</sub> , NO <sub>3</sub> , HNO <sub>2</sub> , HNO <sub>3</sub> , N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , ONOOH, H <sup>+</sup> , OH <sup>-</sup> , O <sub>2</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , ONOO <sup>-</sup>

### 3.2.1 Geometrie

De gesimuleerde geometrie wordt weergegeven in [Figuur 10](#) en de afmetingen van enkele componenten zijn opgelijst in [Tabel 5](#). Er wordt een 2D-axisymmetrisch model gebruikt, waarbij de reële geometrie verkregen wordt door deze geometrie te roteren over de as  $r = 0$ .



**Figuur 10:** Geometrie van het model. De gasruimte wordt gesimuleerd vanaf binnenin de plasmajet, maar voor de chemie (deeltjes en reacties) wordt enkel de verre effluent beschouwd in het model. De aanwezigheid van een actieve *afterglow* wordt verwaarloosd (geen elektron-impactreacties), waardoor de verre effluent zich in het model reeds bevindt vanaf het uiteinde van de plasmajet.

**Tabel 5:** Afmetingen van verschillende componenten van de geometrie die weergegeven is in [Figuur 10](#).

Component	Afmetingen
Plasmajet	Buitendiameter: 10 mm, binnendiameter: 1,6 mm, lengte: 4 cm
Pinelektrode	Diameter: 1 mm, lengte 3,5 cm
Gap	Variërend, in <a href="#">Figuur 10</a> weergegeven als 15 mm
Beker	Hoogte: 3,5 cm, diameter: 7 cm
Kuiltje in het water	Hoogte: 2 mm
Vloeistof	Volume: 135 mL

De reactieve deeltjes komen bovenaan binnen langs de inlaat met een diameter van 1,6 mm (waarin zich de pinelektrode met een diameter van 1 mm bevindt). Door de open grenzen kunnen de gasstroom, de warmte en de deeltjes het model verlaten. De condities aan de buitenzijde van



het model worden gedefinieerd als lucht (met als benadering 79% N<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> en 1% H<sub>2</sub>O), waardoor constant nieuwe lucht aangevoerd kan worden bij een druk van 1 atmosfeer en kamertemperatuur. Reactieve deeltjes die het model verlaten, kunnen echter niet terug binnenstromen. Deze benadering is aanvaardbaar, omdat het onwaarschijnlijk is dat de weinige reactieve deeltjes die op die plaats zouden terugvloeien nog een belangrijke rol kunnen spelen in de plasmachemie. De vloeistof wordt gedefinieerd als water met een concentratie aan H<sub>2</sub>O van 55,6 mol.L<sup>-1</sup> met een gebufferde pH van 7,3 (om de experimenten zo goed mogelijk na te bootsen, waarbij PBS met een pH van 7,3 gebruikt wordt). In het model wordt de vloeistoffase gedefinieerd als gebufferd water, terwijl in de experimenten PBS gebruikt wordt. Door Liu *et al*<sup>115</sup> werd aangetoond dat een gebufferde zoutoplossing lagere concentraties aan RONS dan water bevatte na plasmabehandeling, maar dat het anti-bacteriële effect ervan wel hoger ligt. Dit komt doordat er ook reactieve chloordeeltjes, afkomstig van de zouten, (zoals HClO) in de oplossing zitten. Het doel in deze thesis is om trends, te vergelijken tussen de experimenten (met PBS) en de simulaties (met water), en geen absolute concentraties, waardoor deze benadering aanvaardbaar is.

Om gebufferd water te simuleren worden in het model de concentraties H<sup>+</sup> en OH<sup>-</sup> constant gehouden om een pH van 7,3 te behouden, waardoor er een overschot aan negatieve ionen ontstaat. In werkelijkheid zijn in een gebufferd systeem (bv. PBS) andere positieve zoutionen aanwezig om de vorming van deze negatieve ionen te compenseren, maar deze worden in het model niet expliciet beschreven. Daardoor lijkt de oplossing in het model elektrisch niet neutraal, maar in de werkelijkheid zal dit altijd wel het geval zijn. Bovendien heeft de lading van de deeltjes in het ontwikkelde model geen invloed op de simulaties.

Om de experimentele condities zo goed mogelijk te benaderen, wordt een kuiltje in de vloeistof gesimuleerd op de plaats waar de gasstroom het vloeistofoppervlak raakt. De diepte van dit kuiltje varieert in experimenten in principe met de gasstroom en de gap, maar wordt in dit model constant gehouden op 2 mm.

### 3.2.2 Conditie van de modules

#### *Gas- en vloeistofstroom*

In een tijdsafhankelijke studie wordt eerst de gas- en vloeistofstroom gesimuleerd totdat een evenwichtstoestand bereikt is. Aangezien de plasmajet een turbulente stroming kent<sup>114</sup>, worden de *Reynolds-averaged* Navier-Stokesvergelijkingen (RANS) voor een onsamendrukbaar gas gebruikt in de gasfase. Dit is een gevalideerd en veelvuldig gebruikt model voor de beschrijving van een turbulente stroom. De theorie over deze RANS-vergelijkingen leidt te ver voor deze thesis, maar kan gevonden worden in Ref 116. De snelheid van de gasstroom bij de inlaat wordt in de thesis gevarieerd tussen 1 en 3 slm (standaard liter per minuut) en wordt in het model gedefinieerd als een massastroom met een gemiddelde molaire massa van 40,002 g.mol<sup>-1</sup> (de



molaire massa van argon) en een snelheid tussen 1000 en 3000 SCCM (*Eng: standard cubic centimeters per minute*), welke overeenkomt met een gemiddelde snelheid van 12 tot 35 m.s<sup>-1</sup> aan het uiteinde van de plasmajet.

Om de afschuifspanning (*Eng: shear stress*) van de gasstroom op de vloeistoffase te benaderen, wordt langs de vloeistofkant de scheiding tussen gas en vloeistof als een schuivende wand gedefinieerd, die enkel een laterale snelheid heeft, namelijk die van het gas. Langs de gaskant wordt de scheiding ook als een schuivende wand gedefinieerd, met de snelheid van de vloeistoffase, zodat de convectie van de vloeistof ook in rekening wordt gebracht in de gasfase en omgekeerd.

### *Warmtetransport*

De temperatuur van de vloeistof- en gasfase is initieel 21 °C. Ook de zogenaamde buitenlucht (buiten de open grenzen) heeft dezelfde temperatuur. De inkomende gasstroom heeft een temperatuur van 54 °C (overgenomen uit Schmidt-Bleker *et al*<sup>114</sup>). Er wordt aangenomen dat het plasma de binnenzijde van de plasmajet opwarmt, waardoor de temperatuur van deze binnenwanden ook op 54 °C wordt gehouden. De andere wanden zijn thermisch isolerend. De temperatuur van de gasfase en de vloeistof worden berekend met de formule zoals gegeven in *sectie 3.1.2*, bepaald door eigenschappen zoals warmtecapaciteit en thermische geleidbaarheid.

### *Deeltjestransport*

Aangezien de plasma-ontlading zelf niet gesimuleerd wordt, worden reacties van de reactieve deeltjes pas geactiveerd vanaf het moment dat ze de plasmajet verlaten hebben. Ook is binnenin de plasmajet geen lucht aanwezig in het model, aangezien deze uit de jet geblazen wordt zodra de gasstroom wordt opgezet. Daardoor zullen de concentraties van de deeltjes aan het uiteinde van de plasmajet in ons model nog dezelfde zijn als die aan de inlaat. Deze inlaatconcentraties zijn weergegeven in *Tabel 6* en zijn afkomstig van Schmidt-Bleker *et al*<sup>114</sup>, als startwaarden voor simulaties in de effluent. Belangrijk om hierbij op te merken is dat er geen H<sub>2</sub>O in de inlaat aanwezig is, aangezien in het werk van Schmidt-Bleker *et al* droge lucht beschouwd wordt. Het transport van de deeltjes (in zowel de effluent, als de vloeistoffase) wordt bepaald door hun diffusiecoëfficiënten in de gas- en vloeistoffase, die opgelijst zijn in *Tabel 7*, en door convectie (zie vergelijking voor massatransport in *sectie 3.1.2*).

**Tabel 6: Inlaatconcentraties van de deeltjes, uitgedrukt als een dichtheid in  $\text{cm}^{-3}$ . Deze concentraties worden gebruikt als startwaarde voor onze simulaties in de gasfase (effluent) en werden overgenomen uit het artikel van Schmidt-Bleker *et al*<sup>14</sup>. De concentraties van de deeltjes die niet in de tabel zijn opgenomen, worden gelijk aan nul verondersteld.**

Deeltje	Inlaatdichtheid ( $\text{cm}^{-3}$ )	Deeltje	Inlaatdichtheid ( $\text{cm}^{-3}$ )
O <sub>2</sub>	$5 \times 10^{17}$	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	$1 \times 10^{14}$
N <sub>2</sub>	$1 \times 10^{17}$	H	$2 \times 10^{13}$
H <sub>2</sub>	$4 \times 10^{11}$	N	$5 \times 10^{14}$
OH	$5 \times 10^{13}$	NO	$9 \times 10^{13}$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$5 \times 10^{11}$	NO <sub>2</sub>	$2 \times 10^{13}$
HO <sub>2</sub>	$2 \times 10^{13}$	NO <sub>3</sub>	$3 \times 10^{12}$
O	$2 \times 10^{15}$	HNO <sub>2</sub>	$2 \times 10^{12}$
O <sub>3</sub>	$1 \times 10^{14}$	HNO <sub>3</sub>	$3 \times 10^{12}$

Tezamen met het transport van de deeltjes, worden ook de concentraties van de deeltjes berekend in deze module. Deze concentraties zijn uiteraard afhankelijk van de reacties die plaatsvinden in de gas- of vloeistoffase. De gebruikte reactieset wordt weergegeven in Tabel 8. De meeste reacties en reactiesnelheidsconstanten voor de gasfase zijn overgenomen uit Van Gaens *et al*<sup>17</sup>, tenzij anders vermeld in Tabel 8. Voor de vloeistoffase zijn de reacties allemaal uit de beperkt beschikbare literatuur gehaald, waarbij er meerdere bronnen geraadpleegd werden (zie Tabel 8). Naast deze reacties zijn ook de evenwichtsreacties van de zuren (d.w.z. HNO<sub>2</sub>, HNO<sub>3</sub>, HOONO en HO<sub>2</sub>) in water meegerekend, gebruikmakend van hun pKa-waarden.

**Tabel 7: Diffusieconstanten voor de gas- en vloeistoffase en Henryconstanten van de verschillende deeltjes.**

Deeltje	$D_{i,\text{gas}}$		$D_{i,\text{vloeistof}}$		$H_i$	
	( $10^{-5} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	Ref.	( $10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	Ref.	( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$ )	Ref.
Ar	12,2	118				
O <sub>2</sub>	2,1	118	2,3	87	$1,3 \times 10^{-3}$	119
N <sub>2</sub>	2,1	118	2,6	120	$6,5 \times 10^{-4}$	119
H <sub>2</sub>	12,2	118				
H <sub>2</sub> O	2,3	118	2,299	121		
OH	4	118	2,8	87	$3,03 \times 10^1$	119
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2	118	1,7	87	$7,9 \times 10^4$	119
HO <sub>2</sub>	2	118	1,7	zelfde als H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$5,56 \times 10^3$	119
O	3,2	118	2,8	zelfde als OH	$1,3 \times 10^{-3}$	zelfde als O <sub>2</sub>
O <sub>3</sub>	1,5	118	1,76	122	$1,22 \times 10^{-2}$	119
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	2,1	118				
H	12,2	118	1	87	$7,8 \times 10^{-4}$	zelfde als H <sub>2</sub>
N	2,9	118				
NO	2	118	2,2	87	$1,9 \times 10^{-3}$	119
NO <sub>2</sub>	1,7	118	1,85	87	$1,93 \times 10^{-2}$	119
NO <sub>3</sub>	0,9	118	2,5	zelfde als HNO <sub>3</sub>	3,28	119
HNO <sub>2</sub>	2,1	118	2,5	87	$4,9 \times 10^{-1}$	119
HNO <sub>3</sub>	2,1	118	2,5	87	$1,7 \times 10^6$	119
N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	1	118	1	123	2,1	119
ONOOH	1,78	118	2,5	87	$4,8 \times 10^6$	87
H <sup>+</sup>			7	87		
OH <sup>-</sup>			5,29	87		
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>			2,3	schatting		
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>			1,7	87		
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>			1,7	87		
ONOO <sup>-</sup>			1,7	zelfde als NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		

Om het transport van deeltjes over de interface te bepalen, wordt gebruikgemaakt van de wet van Henry. Sommige deeltjes zullen beter dan andere worden opgenomen in de vloeistoffase en deze eigenschap wordt gekenmerkt door de Henryconstante,  $H_i$ . De wet van Henry stelt een

evenwichtstoestand tussen de gas- en vloeistoffase voor als volgt:

$$c_{i,vl} = H_i c_{i,g}$$

In deze formule staat  $c_i$  voor de concentratie van een deeltje  $i$  in de vloeistof- of gasfase. In het model wordt er op de scheiding tussen de lucht en het water een grensconditie gezet die stelt dat de concentraties tussen de gas- en vloeistoffase in evenwicht zijn volgens bovenstaande formule. Hierbij is het belangrijk om op te merken dat deze conditie enkel geldig is in de grenslaag en niet voor de hele gas- en vloeistoffase. De Henryconstanten van de deeltjes staan weergegeven in [Tabel 7](#). Deeltjes waarvoor de  $H_i$  groter is dan 1 zullen liever in de vloeistoffase verblijven, terwijl deeltjes met een  $H_i$  kleiner dan 1 zich voornamelijk in de gasfase zullen bevinden. Er wordt aangenomen dat ionen in de vloeistoffase blijven en dus niet in de gasfase kunnen terechtkomen. Tenslotte, om de evaporatie van het water te implementeren in het model, wordt de dampdruk van water gedefinieerd op de interface langs de gasfasekant volgens de vergelijking van Antoine<sup>124</sup>:

$$\log_{10} p_{damp} = 8.07131 - \frac{1730.63}{233.426 + T}$$

Hierin is  $p_{damp}$  de dampdruk van water en  $T$  de temperatuur.

**Tabel 8: Gebruikte reactieset in het model. De snelheidsconstante  $k$  voor de gasfase-reacties wordt weergegeven in de Arrheniusvorm:  $k = A \cdot \left(\frac{T}{300}\right)^B \cdot \exp\left(\frac{-C}{T}\right)$ , en de parameters  $A$ ,  $B$  en  $C$  staan weergegeven in de tabel. De eenheid van  $A$  is  $\text{cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  of  $\text{cm}^6 \cdot \text{s}^{-1}$  voor respectievelijk tweede- of derde-orde reacties, de eenheid van  $T$  en  $C$  is K. Voor de vloeistoffase-reacties wordt de  $k$ -waarde gedefinieerd als een constante. De eenheid van  $k$  is  $\text{s}^{-1}$ ,  $\text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  of  $\text{m}^6 \cdot \text{mol}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  voor respectievelijk eerste-, tweede- of derde-orde reacties.  $M$  staat voor de som van  $\text{Ar}$ ,  $\text{N}_2$  en  $\text{O}_2$ .**

Nr	Reactie	Snelheidsconstante			Ref.
		A	B	C	
	<i>Reacties in de gasfase</i>				
1	$\text{O} + \text{OH} \rightarrow \text{H} + \text{O}_2$	$1,81 \times 10^{-11}$	-0,31	-177	77
2	$\text{O} + \text{O}_2 + \text{M} \rightarrow \text{O}_3 + \text{M}$	$6,40 \times 10^{-35}$	0	-663	77
3	$\text{O} + \text{NO}_2 \rightarrow \text{NO} + \text{O}_2$	$6,50 \times 10^{-12}$	0	-120	77
4	$\text{O} + \text{O}_3 \rightarrow \text{O}_2 + \text{O}_2$	$8,00 \times 10^{-12}$	0	2060	77
5	$\text{O} + \text{O}_3 \rightarrow {}^1\text{O}_2 + \text{O}_2$	$1,00 \times 10^{-11}$	0	2300	77
6	$\text{O} + \text{O} + \text{M} \rightarrow {}^1\text{O}_2 + \text{M}$	$6,93 \times 10^{-35}$	-0,63	0	114
7	$\text{O} + \text{HO}_2 \rightarrow \text{OH} + \text{O}_2$	$2,71 \times 10^{-11}$	0	-224	77
8	$\text{O} + \text{NO} + \text{M} \rightarrow \text{NO}_2 + \text{M}$	$1,00 \times 10^{-31}$	-1,6	0	77
9	$\text{O} + \text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2 + \text{O}_2$	$1,70 \times 10^{-11}$	0	0	77
10	$\text{O} + \text{O} + \text{M} \rightarrow \text{O}_2 + \text{M}$	$5,21 \times 10^{-35}$	0	-900	77
11	$\text{O} + \text{N} + \text{M} \rightarrow \text{NO} + \text{M}$	$1,02 \times 10^{-32}$	-0,5	0	77
12	$\text{O} + \text{HNO}_3 \rightarrow \text{OH} + \text{NO}_3$	$3,00 \times 10^{-17}$	0	0	77
13	$\text{O} + \text{NO}_2 + \text{M} \rightarrow \text{NO}_3 + \text{M}$	$9,00 \times 10^{-32}$	-2	0	77
14	$\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{HO}_2 + \text{OH}$	$1,79 \times 10^{-13}$	2,92	1394	77
15	$\text{O} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	$1,45 \times 10^{-15}$	0	0	77
16	$\text{O} + \text{HNO}_2 \rightarrow \text{OH} + \text{NO}_2$	$2,00 \times 10^{-11}$	0	3000	77
17	$\text{O}_2 + \text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2 + \text{O}_3$	$1,00 \times 10^{-17}$	0	0	77
18	$\text{O}_2 + {}^1\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_3 + \text{O}$	$3,00 \times 10^{-21}$	0	0	114
19	${}^1\text{O}_2 + \text{M} \rightarrow \text{O}_2 + \text{M}$	$3,00 \times 10^{-18}$	0	200	77
20	${}^1\text{O}_2 + \text{HO}_2 \rightarrow \text{OH} + \text{O}_2 + \text{O}$	$1,66 \times 10^{-11}$	0	0	77
21	${}^1\text{O}_2 + \text{O}_3 \rightarrow \text{O}_2 + \text{O}_2 + \text{O}$	$1,00 \times 10^{-14}$	0	0	77
22	$\text{O}_3 + \text{NO} \rightarrow \text{NO}_2 + \text{O}_2$	$4,30 \times 10^{-12}$	0	1560	77
23	$\text{O}_3 + \text{NO}_2 \rightarrow \text{NO}_3 + \text{O}_2$	$1,40 \times 10^{-13}$	0	2470	77
24	$\text{O}_3 + \text{OH} \rightarrow \text{HO}_2 + \text{O}_2$	$1,69 \times 10^{-12}$	0	941	77

25	$O_3 + HNO_2 \rightarrow HNO_3 + O_2$	$5,00 \times 10^{-19}$	0	0	114
26	$O_3 + O_3 \rightarrow {}^1O_2 + O_2 + O_2$	$1,00 \times 10^{-11}$	0	2300	77
27	$O_3 + H \rightarrow OH + O_2$	$2,71 \times 10^{-11}$	0,75	0	77
28	$OH + NO_2 + M \rightarrow HNO_3 + M$	$4,60 \times 10^{-29}$	-5,49	1180	77
29	$OH + NO + M \rightarrow HNO_2 + M$	$7,40 \times 10^{-31}$	-2,4	0	77
30	$OH + H_2O_2 \rightarrow H_2O + HO_2$	$4,53 \times 10^{-12}$	0	288,9	77
31	$OH + OH \rightarrow H_2O + O$	$5,49 \times 10^{-14}$	2,42	-970	77
32	$OH + HO_2 \rightarrow H_2O + O_2$	$4,80 \times 10^{-11}$	0	-250	77
33	$OH + HNO_2 \rightarrow H_2O + NO_2$	$2,70 \times 10^{-12}$	0	-260	77
34	$OH + OH + M \rightarrow H_2O_2 + M$	$8,00 \times 10^{-31}$	-0,8	0	77
35	$OH + HNO_3 \rightarrow H_2O + NO_3$	$1,50 \times 10^{-13}$	0	0	77
36	$HO_2 + NO + M \rightarrow HNO_3 + M$	$5,60 \times 10^{-33}$	0	0	77
37	$HO_2 + NO \rightarrow NO_2 + OH$	$3,60 \times 10^{-12}$	0	-270	114
38	$HO_2 + HO_2 + M \rightarrow H_2O_2 + O_2 + M$	$1,70 \times 10^{-33}$	0	-999,5	114
39	$HO_2 + N \rightarrow NO + OH$	$2,20 \times 10^{-11}$	0	0	77
40	$H + O_2 + M \rightarrow HO_2 + M$	$6,09 \times 10^{-32}$	-0,8	0	77
41	$H + OH + M \rightarrow H_2O + M$	$8,00 \times 10^{-31}$	-2,6	0	77
42	$H + HO_2 \rightarrow H_2 + O_2$	$2,06 \times 10^{-11}$	0,84	277	77
43	$H + H_2O_2 \rightarrow H_2O + OH$	$4,00 \times 10^{-11}$	0	2000	77
44	$H + HNO_2 \rightarrow H_2 + NO_2$	$2,00 \times 10^{-11}$	0	3700	77
45	$H + NO_3 \rightarrow NO_2 + OH$	$5,80 \times 10^{-10}$	0	750	77
46	$H + HO_2 \rightarrow OH + OH$	$1,66 \times 10^{-10}$	0	413	77
47	$H + NO_2 \rightarrow OH + NO$	$4,00 \times 10^{-10}$	0	340	77
48	$H_2 + OH \rightarrow H_2O + H$	$9,54 \times 10^{-13}$	2	1490	77
49	$N + O_2 \rightarrow NO + O$	$3,30 \times 10^{-12}$	-1	3150	77
50	$N + NO \rightarrow N_2 + O$	$8,20 \times 10^{-11}$	0	-410	77
51	$N + NO_3 \rightarrow NO_2 + NO$	$3,00 \times 10^{-12}$	0	0	77
52	$N + OH \rightarrow H + NO$	$4,70 \times 10^{-11}$	0	0	77
53	$N + N + M \rightarrow N_2 + M$	$1,38 \times 10^{-34}$	0	0	77
54	$N + NO_2 \rightarrow NO + NO$	$1,33 \times 10^{-12}$	0	-220	77
55	$NO_3 + NO \rightarrow NO_2 + NO_2$	$1,80 \times 10^{-11}$	0	-110	77
56	$NO_3 + NO_2 + M \rightarrow N_2O_5 + M$	$2,80 \times 10^{-30}$	-3,5	0	77
57	$N_2O_5 + M \rightarrow NO_2 + NO_3 + M$	$1,33 \times 10^{-3}$	-3,5	11000	77
<i>Reacties in de vloeistoffase</i>		<i>k</i>			
58	$H + H_2O \rightarrow H_2 + OH$	$1,00 \times 10^{-2}$			125
59	$H + H \rightarrow H_2$	$7,50 \times 10^6$			125
60	$H + OH \rightarrow H_2O$	$7,00 \times 10^6$			125
61	$H + H_2O_2 \rightarrow OH + H_2O$	$9,00 \times 10^4$			125
62	$H + O_2 \rightarrow HO_2$	$2,10 \times 10^7$			125
63	$H + HO_2 \rightarrow H_2O_2$	$1,00 \times 10^7$			125
64	$H + NO_2 \rightarrow OH + NO$	$1,20 \times 10^6$			125
65	$H_2 + H_2O_2 \rightarrow H + OH + H_2O$	$6,00 \times 10^3$			125
66	$O + H_2O \rightarrow OH + OH$	$1,30 \times 10^1$			125
67	$O + O_2 \rightarrow O_3$	$3,00 \times 10^6$			125
68	$O_2 + NO \rightarrow 0,7.(NO_3) + 0,3.(ONOO)$	$1,20 \times 10^7$			125
69	$O_3 + O_3 + OH \rightarrow O_2 + O_2 + HO + O_2$	$2,10 \times 10^{-1}$			126
70	$O_3 + NO_2 \rightarrow O_2 + NO_3$	$3,30 \times 10^2$			126
71	$OH + OH \rightarrow H_2O_2$	$1,00 \times 10^7$			125
72	$OH + H_2 \rightarrow H + H_2O$	$4,20 \times 10^4$			125
73	$OH + HO_2 \rightarrow H_2O + O_2$	$6,00 \times 10^6$			125
74	$OH + O_2 \rightarrow OH + O_2$	$8,00 \times 10^6$			125
75	$OH + H_2O_2 \rightarrow H_2O + HO_2$	$2,70 \times 10^4$			125
76	$OH + NO_2 \rightarrow OH + NO_2$	$1,00 \times 10^7$			125
77	$HO_2 + H_2O + O_2 \rightarrow O_2 + H_2O_2 + OH$	$9,68 \times 10^1$			126
78	$H_2O_2 + NO_2 \rightarrow OONO + H_2O$	$4,50 \times 10^5$			125
79	$NO + NO + O_2 \rightarrow NO_2 + NO_2$	2,30			125
80	$NO + NO_2 + H_2O \rightarrow NO_2 + NO_2 + H^+ + H^+$	$2,00 \times 10^2$			125

81	$\text{NO} + \text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}^+$	$2,00 \times 10^7$	125
82	$\text{NO} + \text{HO}_2 \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{H}^+$	$8,00 \times 10^6$	125
83	$\text{NO} + \text{HO}_2 \rightarrow \text{HOONO}$	$3,20 \times 10^6$	125
84	$\text{NO}_2 + \text{OH} \rightarrow 0,7 \cdot (\text{NO}_3^- + \text{H}^+) + 0,3 \cdot (\text{HOONO})$	$5,30 \times 10^6$	125
85	$\text{NO}_2 + \text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^+ + \text{NO}_2^- + \text{H}^+ + \text{NO}_3^-$	$1,50 \times 10^2$	125
86	$\text{NO}_3 + \text{OH} \rightarrow \text{OH} + \text{NO}_3^-$	$8,00 \times 10^4$	126
87	$\text{N}_2\text{O}_5 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{NO}_3^- + \text{H}^+ + \text{H}^+$	$1,20 \times 10^{-3}$	125
88	$\text{HNO}_2 + \text{HNO}_2 \rightarrow \text{NO} + \text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	$1,34 \times 10^1$	87
89	$\text{HOONO} \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{H}^+$	1,20	127
90	$\text{HOONO} \rightarrow \text{OH} + \text{NO}_2$	$3,00 \times 10^{-1}$	128
91	$\text{ONOO}^- \rightarrow \text{NO} + \text{O}_2^-$	$2,00 \times 10^{-2}$	128

### 3.3 Geanalyseerde parameters

Voor de bespreking van de computationele resultaten worden steeds de concentraties van  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , O en  $\text{O}_3$  beschouwd. Deze concentraties worden ook experimenteel bepaald in deze thesis, waardoor dit voor de validatie van het model een logische keuze is. Ook voor de uitgebreide computationele studie worden enkel deze vier deeltjes beschouwd, enerzijds omdat deze in de nabije toekomst experimenteel bepaald kunnen worden voor een verdere validatie van het model. Anderzijds kunnen deze vier deeltjes als representatief beschouwd worden, aangezien we binnen deze thesis niet alle deeltjes uitvoerig kunnen bespreken (concentraties, productie- en verliesreacties).

#### 3.3.1 Validatie van het model

Om het model te valideren worden er een aantal experimenten uitgevoerd (zie *sectie 2.3.2*). Deze condities voor verschillende waarden voor het gasdebiet, de gap en de behandelingstijd worden eveneens gesimuleerd. Er wordt getracht om de gelijkheid tussen de experimenten en de simulaties zo groot mogelijk te maken voor een goede validatie. Om de simulatietijd te beperken worden echter kortere behandelingstijden gesimuleerd dan bij de experimenten en is het volume van de vloeistof veel groter bij de simulaties (135 mL i.p.v. 2 mL). Voor een behandelingstijd van 30 sec en een volume van 135 mL bedraagt de rekentijd van de simulaties tussen de 10 en 36 uur. Indien een volume van 2 mL gesimuleerd zou worden, zouden deze oplopen tot meerdere dagen of zelfs weken. Dit komt doordat bij relatief snelle processen in kleine dimensies convergentie zeer moeilijk bereikt wordt en de tijdstappen bijgevolg zeer klein zijn. De gesimuleerde condities staan weergegeven in *Tabel 9*. Bij deze condities worden de berekende concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$ , O, en  $\text{O}_3$  in de vloeistoffase vergeleken met de gemeten waarden. Aangezien de simulaties niet bij exact dezelfde condities uitgevoerd konden worden (andere behandelingstijd en vloeistofvolume), zal geen absolute vergelijking van de concentraties tussen het model en de experimenten gebeuren, maar zullen de trends in het effect van gasdebiet, gap en tijd vergeleken worden.

**Tabel 9: Gebruikte condities bij het simuleren ter validatie van het model. Met tijd wordt de plasmabehandelingstijd of simulatietijd bedoeld.**

Conditie	Gasdebiet (slm)	Gap (mm)	Tijd (sec)
A	1	15	30
B	1	15	60
C	1	20	30
D	1	30	30
E	2	15	30
F	3	15	30

### 3.3.2 Effect van de temperatuur

Er wordt verondersteld dat de kleine temperatuurschommelingen bij het uitvoeren van de experimenten (zie [sectie 2.3.2](#)) geen invloed hebben op de bekomen experimentele resultaten. Om dit na te gaan, worden er simulaties uitgevoerd waarbij de initiële temperatuur van de gas- en vloeistoffase 16 °C of 26 °C is in plaats van de 21 °C gebruikt in de standaardsimulaties. Hiervoor wordt conditie E uit [Tabel 9](#) gebruikt, aangezien dit model de kortste berekeningstijd blijkt te hebben.

### 3.3.3 Effect van de waterlaag boven het oppervlak

Er wordt verondersteld dat de waterlaag boven het vloeistofoppervlak, ten gevolge van het verdampen van het water, een belangrijke rol speelt bij plasma-vloeistofinteracties. In deze waterdamp zouden immers al reacties van de plasmadeeltjes met water kunnen gebeuren nog voor ze in de eigenlijke vloeistof zijn terechtgekomen.<sup>71</sup> De reacties voor de gasfase die in [Tabel 8](#) staan opgelijst komen uit artikels waarin enkel de gasfase beschouwd wordt en dus geen rekening gehouden is met de reacties in de gasfase die in deze waterlaag kunnen plaatsvinden. Om te onderzoeken of dit een belangrijk effect heeft, worden extra reacties, waarin specifiek water verbruikt of geproduceerd wordt, voor de gasfase beschouwd (zie [Tabel 10](#)). Ook voor deze deelstudie wordt conditie E uit [Tabel 9](#) genomen.

### 3.3.4 Effect van de luchtvochtigheid

De inlaatconcentraties in het model zijn genomen uit een artikel waarin droge lucht beschouwd wordt en de luchtvochtigheid dus buiten beschouwing gelaten is. Om het effect van de luchtvochtigheid in het model te bestuderen, wordt daarom een simulatie uitgevoerd waarbij er een inlaatconcentratie van  $2 \times 10^{12} \text{ cm}^{-3}$  voor H<sub>2</sub>O toegevoegd wordt. Deze waarde wordt gehaald uit een artikel van Van Gaens en Bogaerts<sup>77</sup> waar een relatieve vochtigheid van 50 % wordt verondersteld. Alle andere inlaatconcentraties worden op dezelfde waarde gehouden en de extra reactieset voor H<sub>2</sub>O uit [Tabel 10](#) is in deze simulatie geïmplementeerd in de hele gasfase. Ook hier wordt conditie E uit [Tabel 9](#) genomen.

**Tabel 10: Extra reactieset voor het bestuderen van het effect van de waterlaag boven het vloeistofoppervlak. De snelheidsconstante  $k$  wordt weergegeven in de Arrheniusvorm:  $k = A \cdot \left(\frac{T}{300}\right)^B \cdot \exp\left(\frac{-C}{T}\right)$ . De eenheid van  $A$  is  $\text{cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  of  $\text{cm}^6 \cdot \text{s}^{-1}$  voor respectievelijk tweede- of derde-orde reacties, de eenheid van  $T$  en  $C$  is  $\text{K}$ .**

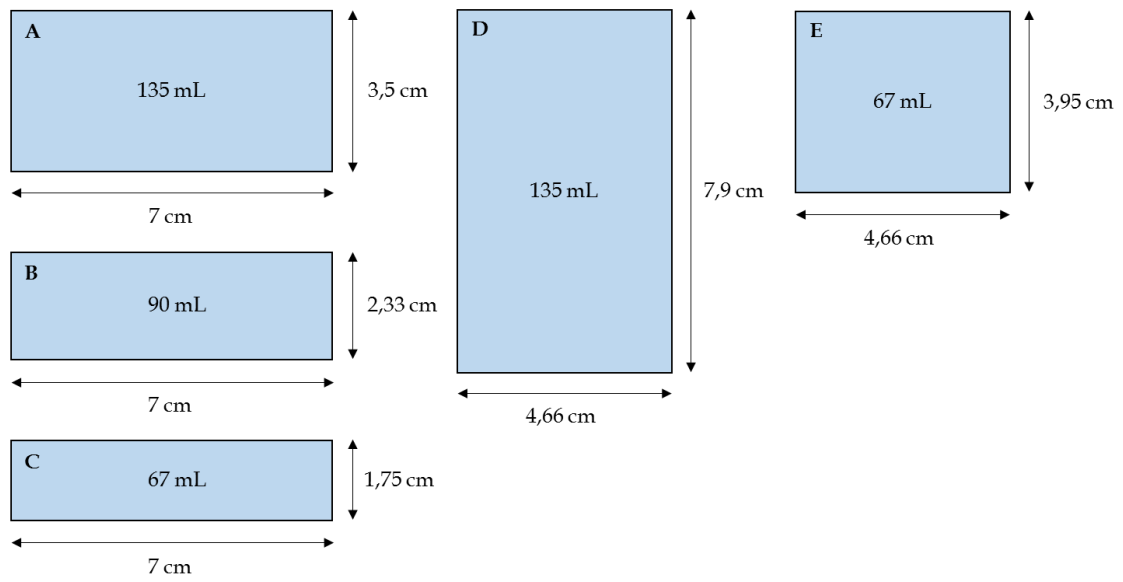
Nr	Reactie	Snelheidsconstante			Ref.
		A	B	C	
	<i>Reacties in de gasfase</i>				
92	$\text{H} + \text{HO}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}$	$5,00 \times 10^{-11}$	0	866	117
93	$\text{H} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{OH} + \text{H}_2$	$6,89 \times 10^{-12}$	1,60	9720	117
94	$\text{H} + \text{HNO}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{NO}$	$6,50 \times 10^{-13}$	1,89	1932	117
95	$\text{H} + \text{HNO}_3 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{NO}_2$	$1,51 \times 10^{-14}$	3,30	3164,8	117
96	$\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HO}_2 + \text{OH}$	$7,72 \times 10^{-12}$	0	37284	74
97	$^1\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HO}_2 + \text{OH}$	$1,65 \times 10^{-11}$	0	25860	129
98	$\text{H}_2\text{O} + \text{O} \rightarrow \text{HO}_2 + \text{H}$	$4,48 \times 10^{-12}$	0,97	34520	129
99	$\text{H}_2\text{O} + \text{O} \rightarrow \text{H}_2 + \text{O}_2$	$4,48 \times 10^{-12}$	0,97	34520	129
100	$\text{H}_2\text{O} + \text{N}_2\text{O}_5 \rightarrow \text{HOONO} + \text{HOONO}$	$2,00 \times 10^{-21}$	0	0	129
101	$\text{H}_2\text{O} + \text{HO}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{OH}$	$4,65 \times 10^{-11}$	0	16500	117
102	$\text{H}_2\text{O} + \text{O} \rightarrow \text{OH} + \text{OH}$	$1,67 \times 10^{-11}$	1,14	8680	117
103	$\text{H}_2\text{O} + \text{NO} + \text{NO}_2 \rightarrow \text{HNO}_2 + \text{HNO}_2$	$4,41 \times 10^{-40}$	0	0	117
104	$\text{H}_2\text{O} + \text{N}_2\text{O}_5 \rightarrow \text{HNO}_3 + \text{HNO}_3$	$4,18 \times 10^{-10}$	0	5830	117

### 3.3.5 Effect van $\text{N}_2$ en $\text{O}_2$ in de lucht

Om een inzicht te krijgen in de verschillende chemische processen die een rol spelen bij het bestuderen van de plasma-vloeistofinteracties worden de hypothetische situaties gesimuleerd waarbij er zich ofwel geen  $\text{N}_2$ , ofwel geen  $\text{N}_2$  en  $\text{O}_2$  in de lucht bevinden. Experimenteel komt dit overeen met een opstelling die volledig van de lucht afgeschermd kan worden, waarbij de samenstelling van het gas binnenin nauwkeurig gecontroleerd kan worden. Hiervoor worden in het model de concentraties van  $\text{N}_2$  en  $\text{O}_2$  in de omringende lucht op nul gezet, terwijl alle andere eigenschappen hetzelfde worden gehouden. Hierbij is het belangrijk om op te merken dat de inlaatconcentraties van  $\text{N}_2$  en  $\text{O}_2$  constant gehouden worden. Zo wordt enkel het effect van de aanwezigheid van  $\text{N}_2$  en/of  $\text{O}_2$  in de omringende lucht bestudeerd, terwijl er wel  $\text{N}_2$  en/of  $\text{O}_2$  in het voedingsgas aanwezig zijn (dit kan bv. het geval zijn als er  $\text{N}_2$  en  $\text{O}_2$  aan het voedingsgas wordt toegevoegd). Ook voor deze simulaties wordt conditie E uit Tabel 9 genomen.

### 3.3.6 Effect van het vloeistofvolume en -oppervlak

Om het effect te bekijken van verschillende geometrieën van bekertjes op de concentraties in de vloeistof, wordt het volume van de vloeistof en de grootte van het vloeistofoppervlak gevarieerd (zie Figuur 11). In een eerste deelstudie wordt het effect van het volume bestudeerd, waarbij het vloeistofoppervlak onveranderd blijft (bekertjes A-B-C). Ook wordt het effect van het verkleinen van het vloeistofoppervlak bekeken, wanneer het totale volume hetzelfde blijft (bekertjes A-D) en tenslotte worden zowel het volume als het oppervlak tegelijk verkleind (bekertjes A-E). Ook hier wordt conditie E uit Tabel 9 gekozen.



**Figuur 11: Voorstelling van de verschillende geometrieën van bekers die gesimuleerd worden, om het effect te bestuderen van het vloeistofvolume en -oppervlak op de concentraties van de deeltjes in de vloeistof.**



## 4. Experimentele studie: resultaten en discussie

### 4.1 Bepaling van de chemische samenstelling van pPBS

#### 4.1.1 Effect van het gasdebiet, de gap en de behandelingstijd

Om het effect van het gasdebiet, de gap en de plasmabehandelingstijd te bestuderen, wordt een DOE uitgevoerd. Echter, bij condities 1a en 2a (zie [Tabel 2](#)) blijkt de gap niet groot genoeg om ontladingen op het vloeistofoppervlak te vermijden. Dit leidt tot een ander plasmaregime dan wanneer de plasmajet op voldoende lange afstand gebruikt wordt (condities 3,4,5,8,9). Ook wanneer de gap slechts 10 mm bedraagt, maar het gasdebiet hoger is (condities 6 en 7), vinden deze ontladingen niet plaats, omdat de vloeistof wordt weggedrukt naar de zijkanten van de well. Bij het optreden van ontladingen gedraagt de vloeistof zich als derde elektrode en spelen de elektronen en bijbehorende elektron-impactreacties een belangrijke rol in de vloeistof. Vermits beide plasmaregimes niet vergelijkbaar zijn, geeft de analyse van de DOE aan dat de effecten van de onderzochte parameters niet lineair zijn (resultaten worden niet getoond). Om conclusies uit de DOE te kunnen trekken, is het noodzakelijk om bijkomende experimenten uit te voeren, wat niet mogelijk was binnen het tijdsbestek van deze thesis. In plaats daarvan wordt ervoor gekozen om experimenten uit te voeren bij twee extra condities (1b en 2b), waarbij de gap vergroot wordt tot de kleinst mogelijke afstand waarbij geen ontladingen optreden op het vloeistofoppervlak. Zo kan naast het effect van het gasdebiet, de gap en de plasmabehandelingstijd, ook het effect van het optreden van de ontladingen bestudeerd worden. Deze beschrijving van de effecten van deze parameters zal echter minder volledig kunnen gebeuren dan in een DOE, waarin ook de afhankelijkheid van de parameters onderling geanalyseerd wordt.

#### *Verhouding van de concentraties $\text{NO}_2^-$ en $\text{H}_2\text{O}_2$*

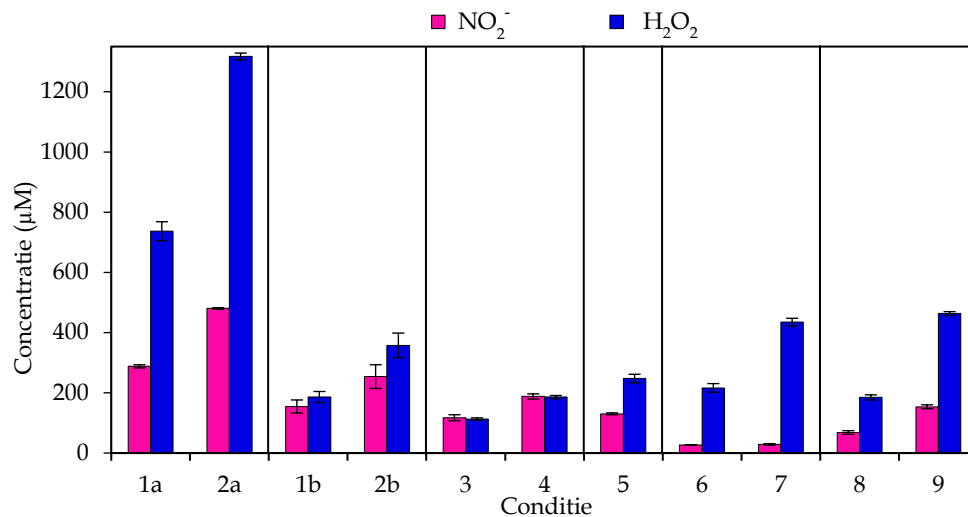
De resultaten van de bepaling van de concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  bij de 11 condities uit [Tabel 2](#) worden weergegeven in [Tabel 11](#) en in [Figuur 12](#). Vooraleer de effecten van de verschillende parameters worden besproken, kan er gekeken worden naar de verhouding van de concentraties  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  bij elk van de condities (zie laatste kolom in [Tabel 11](#)). Hieruit blijkt dat er in de vloeistof steeds een hogere concentratie van  $\text{H}_2\text{O}_2$  dan van  $\text{NO}_2^-$  geproduceerd wordt. Bij condities waarbij het gasdebiet en de gap constant worden gehouden en enkel de behandelingstijd verschilt, is de verhouding van de concentraties dezelfde, met uitzondering van condities 6 en 7. Dit laatste is te wijten aan het feit dat er bij deze twee condities een zeer lage concentratie  $\text{NO}_2^-$  gemeten wordt in de pPBS. Een hoog gasdebiet en een kleine gap (condities 6 en 7) bevoordelen dus zeer duidelijk de vorming van  $\text{H}_2\text{O}_2$  ten opzichte van die van  $\text{NO}_2^-$ . Bij een laag gasdebiet en een grote gap (condities 3 en 4) zijn de concentraties  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  even groot, waardoor de vorming van  $\text{NO}_2^-$  bij deze condities relatief gezien bevordert wordt.

**Tabel 11: Experimenteel gemeten concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  in pPBS bij de 11 gekozen condities uit Tabel 2. Tijd staat voor de plasmabehandelingstijd. De waarden worden weergegeven als het gemiddelde van minstens drie herhalingen  $\pm$  de standaardafwijking op het gemiddelde.**

Conditie	Gasdebiet (slm)	Gap (mm)	Tijd (min)	Concentratie $\text{NO}_2^-$ ( $\mu\text{M}$ )	Concentratie $\text{H}_2\text{O}_2$ ( $\mu\text{M}$ )	Conc. $\text{H}_2\text{O}_2$ / conc. $\text{NO}_2^-$
1a	1	10	5	287,9 $\pm$ 5,3	737 $\pm$ 31	2,6 $\pm$ 0,1
2a	1	10	9	480,2 $\pm$ 2,3	1317 $\pm$ 12	2,74 $\pm$ 0,03
1b	1	15	5	155 $\pm$ 22	186 $\pm$ 18	1,2 $\pm$ 0,2
2b	1	15	9	254 $\pm$ 39	358 $\pm$ 41	1,4 $\pm$ 0,3
3	1	30	5	117,4 $\pm$ 9,8	113 $\pm$ 3,9	0,96 $\pm$ 0,09
4	1	30	9	188,0 $\pm$ 8,5	186 $\pm$ 5,4	0,99 $\pm$ 0,05
5	2	20	7	130,3 $\pm$ 3,0	248 $\pm$ 14	1,9 $\pm$ 0,1
6	3	10	5	26,41 $\pm$ 0,93	216 $\pm$ 14	8,2 $\pm$ 0,6
7	3	10	9	28,6 $\pm$ 2,6	435 $\pm$ 13	15 $\pm$ 2
8	3	30	5	68,1 $\pm$ 6,0	184,7 $\pm$ 8,5	2,7 $\pm$ 0,3
9	3	30	9	153,7 $\pm$ 6,4	463,3 $\pm$ 6,3	3,0 $\pm$ 0,1

Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de vorming van  $\text{NO}_2^-$  in de vloeistof afhankelijk is van  $\text{N}_2$  die zich in de omringende lucht bevindt. Bij een hoog gasdebiet en een kleine gap bevinden de deeltjes zich slechts een korte tijd en over een kleine afstand in de gasfase, waardoor de kans dat de lucht wordt opgenomen in de plasmapluij klein is. Daarom wordt bij deze condities een zeer lage concentratie van  $\text{NO}_2^-$  gemeten. Bij condities met een laag gasdebiet en een grote gap daarentegen heeft de lucht de meeste mogelijkheid om in de plasmapluij terecht te komen en deel te nemen aan de reacties, met de vorming van meer  $\text{NO}_2^-$  als gevolg. De vorming van  $\text{H}_2\text{O}_2$  werd bestudeerd door Gorbanev *et al*<sup>105</sup>. Zij vonden dat de concentratie  $\text{H}_2\text{O}_2$  in de plasmabehandelde vloeistof voornamelijk afhankelijk is van  $\text{H}_2\text{O}_2$  die in de gasfase gevormd wordt en vervolgens in de vloeistof terechtkomt. In het geval dat er geen  $\text{H}_2\text{O}$  aan het gebruikte gas toegevoegd wordt, is de vorming van  $\text{H}_2\text{O}_2$  afhankelijk van de waterdamp aanwezig in de lucht. Bij een hoog gasdebiet en een kleine gap verdampt er meer water, dat bovendien ook meer in contact komt met de kortlevende deeltjes die belangrijk zijn voor de vorming van  $\text{H}_2\text{O}_2$  (bv. H- en OH-radicalen). In het geval van  $\text{H}_2\text{O}_2$  is het dus nadelig dat er veel lucht in de effluent terechtkomt, aangezien deze radicalen in dat geval gemakkelijker verloren zullen gaan door reacties met de lucht moleculen. Dit verklaart de hogere  $\text{H}_2\text{O}_2$ -concentratie bij hoog gasdebiet en kleinere gap.

De bevinding dat er door het variëren van de behandelingsparameters andere verhoudingen van concentraties van verschillende deeltjes gevormd worden, is interessant met het oog op de nodige selectiviteit tussen kankercellen en gezonde cellen bij een plasmabehandeling (die in deze thesis verder niet beschouwd wordt). Indien een bepaald deeltje de selectiviteit al dan niet bevordert, kan de concentratie hiervan gestuurd worden door het gasdebiet en de gap te variëren.



**Figuur 12:** Experimenteel gemeten concentraties van NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pPBS bij de 11 verschillende condities uit Tabel 2. Conditie waarbij enkel de plasmabehandelingstijd verschilt, zijn weergegeven binnen één kader. De concentraties worden weergegeven als het gemiddelde van minstens drie herhalingen en als foutenbalken worden de standaardafwijkingen op het gemiddelde weergegeven.

### Effect van de plasmabehandelingstijd

Het eerste effect dat besproken wordt, is dat van de plasmabehandelingstijd (kortweg aangeduid als “tijd”) op de concentraties van NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in de vloeistof. In [Figuur 12](#) zijn de resultaten verkregen bij condities die onderling enkel verschillen in behandelingstijd, weergegeven binnen één kader. In [Tabel 12](#) worden de verhoudingen van de concentraties NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bij een tijd van 9 min en 5 min getoond. De verhouding 9/5 is gelijk aan 1,80. De verhouding van de concentraties is ook gelijk aan dit getal bij alle condities met uitzondering van conditie 8 en 9 voor zowel NO<sub>2</sub><sup>-</sup> als H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en van conditie 6 en 7 voor NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Bij deze laatste condities werd reeds opgemerkt dat de concentratie aan NO<sub>2</sub><sup>-</sup> zeer laag is, waardoor de resultaten mogelijk minder betrouwbaar zijn. De reden waarom de verhouding bij condities 8 en 9 (hoog gasdebiet en grote gap) anders is, kan niet verklaard worden.

**Tabel 12:** Verhoudingen van de concentraties van NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pPBS voor de plasmabehandelingstijden van 5 en 9 minuten. De waarden worden weergegeven als de verhoudingen van gemiddelden van minstens drie herhalingen ± de standaardafwijking. Een verhouding van 1,80 (= 9/5) wijst op een lineaire toename van de concentratie met de behandelingstijd. Resultaten die afwijken van een lineair verloop zijn aangeduid in rode kleur. Waarden tussen 1,6 en 2,0 worden niet als afwijkend beschouwd.

Conditie	Gasdebiet (slm)	Gap (mm)	conc. NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (9 min) / conc. NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (5 min)	conc. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (9 min) / conc. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (5 min)
1a - 2a	1	10	1,67 ± 0,03	1,79 ± 0,08
1b - 2b	1	15	1,6 ± 0,3	1,9 ± 0,3
3 - 4	1	30	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,1
6 - 7	3	10	1,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1
8 - 9	3	30	2,3 ± 0,2	2,5 ± 0,1

Vermits de concentraties van NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in de onbehandelde PBS nul zijn, wijst dit resultaat op een lineaire toename van de concentraties met de behandelingstijd. Aangezien er slechts twee behandelingstijden rechtstreeks vergeleken worden, kan er maar een beperkte conclusie

getrokken worden over de lineariteit van het effect van de tijd. Een meer gestaafe conclusie over het effect van de behandelingstijd wordt besproken in *sectie 4.1.2*.

### *Effect van de gap*

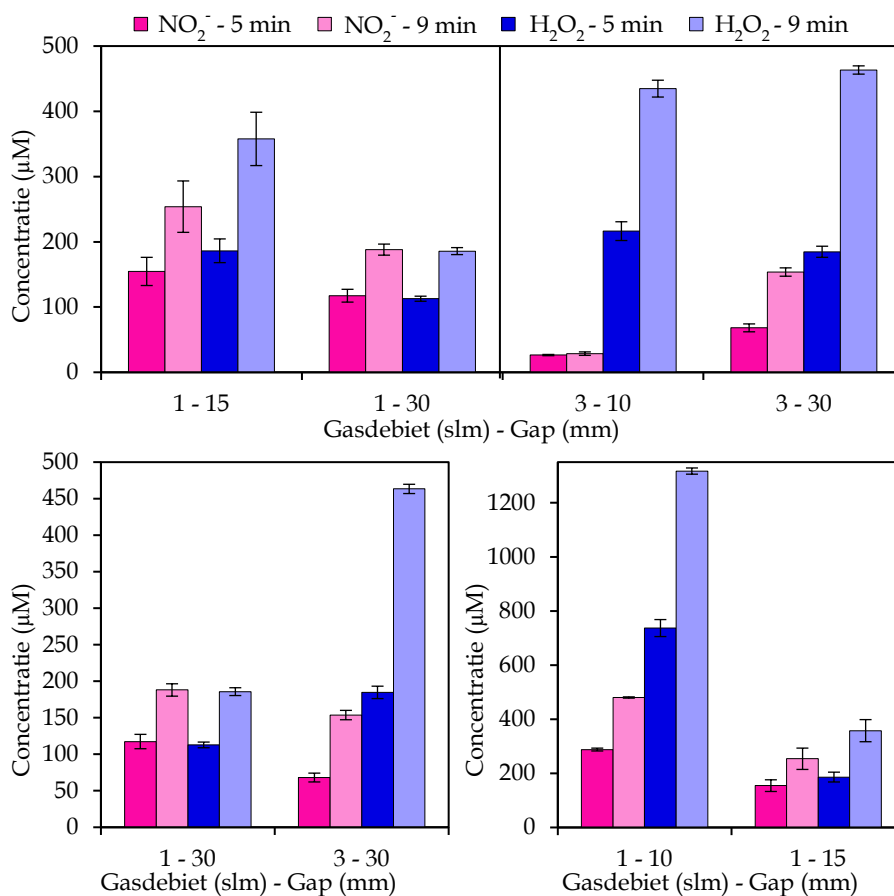
Een tweede parameter waarvan het effect op de concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  bestudeerd wordt, is de gap (zie *Figuur 13*, boven). Bij een gasdebiet van 1 slm (links in de grafiek) wordt voor zowel  $\text{NO}_2^-$  als  $\text{H}_2\text{O}_2$  een daling in de concentratie opgemerkt bij het vergroten van de gap van 15 to 30 mm, al is de daling meer uitgesproken voor  $\text{H}_2\text{O}_2$  dan voor  $\text{NO}_2^-$ . Dit kan verklaard worden doordat de reactieve plasmadeeltjes zich wellicht langer in de gasfase bevinden, waardoor ze meer kans hebben om verloren te gaan in de gasfase door reacties met andere deeltjes. Hierdoor zullen er minder reactieve deeltjes in de vloeistof terechtkomen, waardoor ook de uiteindelijke concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  lager zullen zijn. Het resultaat dat er bij het vergroten van de gap lagere concentraties aan reactieve deeltjes gevonden worden in de vloeistoffase, werd eerder ook door Yan *et al*<sup>61</sup> aangetoond.

Bij een gasdebiet van 3 slm vindt echter een stijging in de concentratie van  $\text{NO}_2^-$  plaats bij het vergroten van de gap. De reden is wellicht opnieuw dat de concentratie aan  $\text{NO}_2^-$  bij condities 6 en 7 zeer laag is, waardoor er over het effect van de gap kan in dit geval niets kan worden geconcludeerd. Voor  $\text{H}_2\text{O}_2$  lijkt het effect van de gap bij een gasdebiet van 3 slm verwaarloosbaar, aangezien de concentraties nagenoeg constant blijven. Zoals eerder vermeld is de concentratie van  $\text{H}_2\text{O}_2$  evenredig afhankelijk van de hoeveelheid waterdamp boven het vloeistofoppervlak. Bij een gasdebiet van 3 slm zal deze hoeveelheid relatief groot zijn. Het vergroten van de gap heeft in dit geval geen invloed op de concentratie, aangezien het gasdebiet hoog genoeg is opdat de reactieve deeltjes met het water kunnen reageren, onafhankelijk van de gap.

### *Effect van het gasdebiet*

Als derde effect wordt dat van het gasdebiet op de concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  onderzocht (zie *Figuur 13*, linksonder). Een hoger gasdebiet resulteert in een daling van de concentratie aan  $\text{NO}_2^-$ , terwijl het voor een verhoging van de concentratie aan  $\text{H}_2\text{O}_2$  zorgt. Als de concentratie van  $\text{NO}_2^-$  effectief afhankelijk is van (de  $\text{N}_2$  uit) de lucht (zie hierboven), dan kan ook hier gesteld worden dat bij een hoger gasdebiet de lucht minder kans heeft om in de plasmapluij terech te komen en dat bijgevolg de uiteindelijke concentratie van  $\text{NO}_2^-$  in de vloeistof lager zal zijn. Voor  $\text{H}_2\text{O}_2$  heeft het gasdebiet het omgekeerde effect. Zoals eerder vermeld is de vorming van  $\text{H}_2\text{O}_2$  afhankelijk van de reacties tussen kortlevende deeltjes (H- en OH-radicalen) met de watermoleculen in de lucht. Bij een hoger gasdebiet verdampt er meer water en kunnen de reactieve deeltjes, door hun kortere verblijftijd in de effluent, minder reacties ondergaan voordat ze met het water kunnen reageren. Dit verklaart de hogere concentratie van  $\text{H}_2\text{O}_2$  bij een hoger

gasdebiet. Het gasdebiet heeft voor  $\text{H}_2\text{O}_2$  duidelijk een groter effect dan de gap, terwijl voor  $\text{NO}_2^-$  de effecten van deze twee parameters van gelijke grootte zijn.



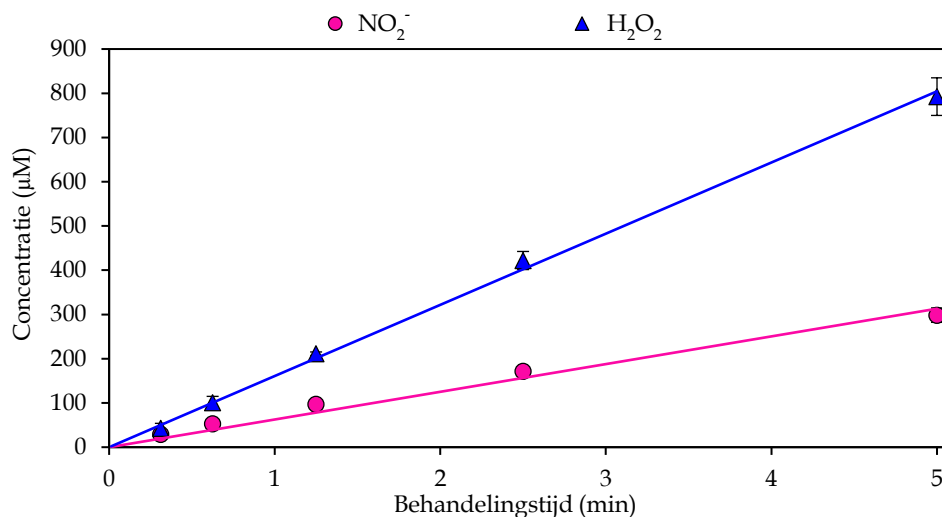
**Figuur 13:** Experimenteel bekomen resultaten voor het effect van de gap (boven), het gasdebiet (linksonder) en de ontladingen op het oppervlak (rechtsonder) op de concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  in pPBS. De concentraties worden weergegeven als het gemiddelde van minstens drie herhalingen en als foutenbalken worden de standaardafwijkingen op het gemiddelde weergegeven.

### Effect van de ontladingen op het oppervlak

In **Figuur 13** (rechtsonder) wordt het effect van de ontladingen op het vloeistofoppervlak op de concentratie van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  getoond. Het is meteen duidelijk dat het vergroten van de gap tot een afstand waarbij geen ontladingen meer plaatsvinden op het vloeistofoppervlak, een zeer groot effect heeft op de concentraties in de vloeistoffase. Het is belangrijk om op te merken dat het optredende effect in principe te wijten is aan een combinatie van twee parameters (het wegnemen van de ontladingen en het vergroten van de gap). Echter, aangezien het effect van de ontladingen veel groter is dan dat van de gap, kan er hier benaderend enkel over het effect van de ontladingen gesproken worden. Bij  $\text{NO}_2^-$  vermindert de concentratie met een factor 2 en bij  $\text{H}_2\text{O}_2$  met een factor 4. Dit impliceert dat de vorming van  $\text{H}_2\text{O}_2$  meer dan die van  $\text{NO}_2^-$  afhankelijk is van elektron-impactreacties in de vloeistof. Bij het plaatsvinden van deze extra reacties, worden er H- en OH-radicalen gevormd op de plaats waar er ook veel  $\text{H}_2\text{O}$  aanwezig is, waardoor de concentratie  $\text{H}_2\text{O}_2$  enorm zal toenemen.

### 4.1.2 Uitgebreide tijdstudie

Voor de uitgebreide tijdstudie worden experimenten met meer behandelingstijden uitgevoerd. De resultaten voor de concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  worden weergegeven in [Figuur 14](#). Hieruit blijkt dat de concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  nagenoeg lineair stijgen met de behandelingstijd, tot en met een behandelingstijd van 5 minuten. Een langere behandelingstijd werd hier niet onderzocht. Echter, in [sectie 4.1.1](#) werd er reeds een aanwijzing gegeven voor de lineariteit tussen 5 en 9 min. Uit deze resultaten kan dus geconcludeerd worden dat de concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  in pPBS nagenoeg lineair stijgen met de tijd in het hier onderzochte tijdsvenster. Yan *et al*<sup>61</sup> toonden eerder al aan dat de concentraties van RNS en  $\text{H}_2\text{O}_2$  in PAM lineair toenemen met de behandelingstijd voor een behandelingstijd tot en met 2 minuten bij het gebruik van een helium plasmajet.



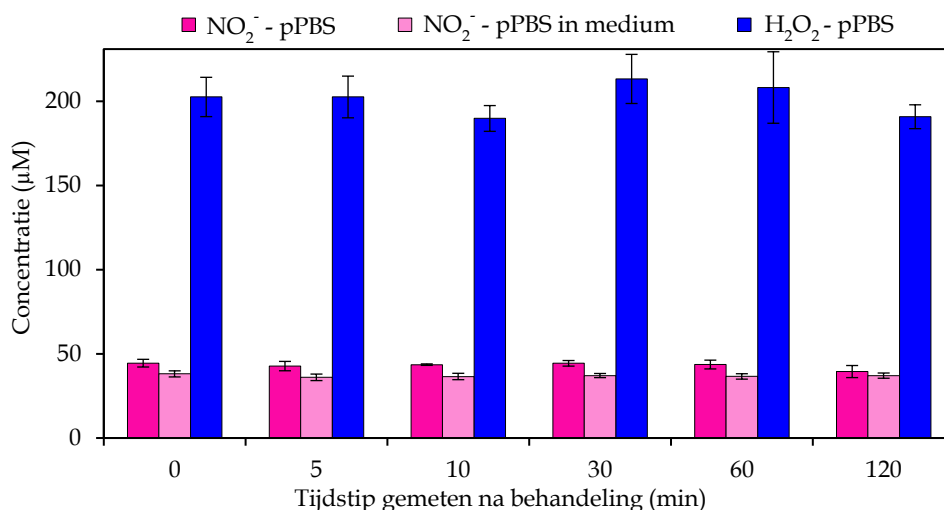
**Figuur 14:** Experimenteel bekomen resultaten voor de concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  uit de tijdstudie. Deze resultaten zijn verkregen met conditie 1a, waarbij de behandelingstijd gevarieerd werd. De concentraties worden weergegeven als het gemiddelde van minstens drie herhalingen en als foutenbalken worden de standaardafwijkingen op het gemiddelde weergegeven.

### 4.1.3 Stabiliteit van pPBS

Er werd reeds aangetoond dat PAM bij een temperatuur van  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gedurende 7 dagen bewaard kan worden.<sup>59</sup> In deze thesis is het de bedoeling om de stabiliteit van pPBS bij kamertemperatuur en binnen een tijdspanne van 2 uur te bepalen. Hiertoe worden de concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  in pPBS bepaald op een aantal tijdstippen na de plasmabehandeling (zie [Figuur 15](#)). Er kan geconcludeerd worden dat de concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  in de pPBS constant blijven gedurende minstens 2 uur.

De concentratie van  $\text{NO}_2^-$  wordt ook bepaald in het geval dat de pPBS meteen na de behandeling aan het celmedium wordt toegevoegd. Zoals beschreven in [sectie 2.3.2](#), is het niet mogelijk om de concentratie  $\text{H}_2\text{O}_2$  in dit geval te bepalen. Deze studie is belangrijk met het oog op het mogelijke effect van pPBS op kankercellen. Een eerste mogelijkheid is dat de plasmadeeltjes door hun interacties met de cellen rechtstreeks celdood induceren. Het zou echter ook kunnen dat de

plasmadeeltjes wegreageren met de organische moleculen in het celmedium, waardoor de componenten die noodzakelijk zijn voor de celgroei, worden afgebroken. In dit geval zullen de kankercellen ook sterven, maar door een indirect effect van de plasmadeeltjes. In een organisme, waar steeds voldoende van deze groeicomponenten aanwezig zijn, zou de plasmabehandeling in dat geval geen effect hebben. Aangezien de concentratie  $\text{NO}_2^-$  in pPBS in medium constant blijft voor minstens 2 uur en niet wegreageert (zie [Figuur 15](#)), kunnen we concluderen dat  $\text{NO}_2^-$  niet bijdraagt tot deze eventuele indirecte celdood.



**Figuur 15:** Experimenteel bekomen resultaten voor de stabiliteit van pPBS. De concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  zijn op verschillende tijdstippen na de plasmabehandeling bepaald in pPBS. De concentratie van  $\text{NO}_2^-$  is ook bepaald in een oplossing van medium en pPBS op verschillende tijdstippen, waarbij de pPBS meteen na de behandeling werd toegevoegd aan het celmedium. Deze resultaten werden verkregen met conditie 1b. De concentraties worden weergegeven als het gemiddelde van minstens drie herhalingen en als foutenbalken worden de standaardafwijkingen op het gemiddelde weergegeven.

#### 4.1.4 Detectie van $\text{O}_3$ in pPBS

Zoals vermeld in [sectie 2.1](#) worden in dit eerste luik enkel de concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  in pPBS bepaald.  $\text{O}_3$ , dat gedetecteerd kan worden met EPR, is nochtans een redelijk stabiele molecule dat om die reden mogelijk ook een effect kan hebben op de anti-kankeractiviteit van pPBS. Bij het uitvoeren van EPR-experimenten wordt de spintrap voor de plasmabehandeling toegevoegd aan de PBS. Wanneer het effect van  $\text{O}_3$  op de kankercellen onderzocht wordt, is enkel de uiteindelijke concentratie in de pPBS belangrijk, aangezien die bij de kankercellen terechtkomt. Daarom dient de 4-oxo-TEMP-spintrap in dit geval pas na de plasmabehandeling toegevoegd te worden aan de pPBS. Bij het uitvoeren van dit experiment wordt er echter geen EPR-sigitaal gedetecteerd. Dit betekent dat 4-oxo-TEMP na de plasmabehandeling niet tot 4-oxo-TEMPO geoxideerd wordt door  $\text{O}$ ,  $\text{O}_3$  of  $^1\text{O}_2$ . Aangezien  $\text{O}$  en  $^1\text{O}_2$  zeer kortlevende deeltjes zijn, wordt er niet verwacht om deze deeltjes te detecteren in de pPBS na de behandeling. Dat er geen  $\text{O}_3$  aanwezig is in de pPBS is eerder onverwacht en kan verschillende redenen hebben:



1) *Er wordt geen ozon gevormd in het plasma.*

Dit is onwaarschijnlijk, aangezien ozon in de literatuur beschouwd wordt als een belangrijk deeltje in een plasma.<sup>105,130</sup>

2) *Ozon wordt wel gevormd, maar komt niet in de vloeistof terecht.*

Ozon heeft een Henryconstante van  $1,22 \times 10^{-2}$ , waardoor het evenwicht van dit deeltje meer in de richting van de gasfase dan de vloeistoffase ligt. Deze waarde is echter niet zo klein dat er helemaal geen ozon in de vloeistof zou terechtkomen.

3) *Ozon oxideert 4-oxo-TEMP niet, of enkel indien het in hoge concentratie aanwezig is.*

Gorbanev *et al*<sup>105</sup> toonden aan dat 4-oxo-TEMP door ozon geoxideerd wordt tot 4-oxo-TEMPO. De minimale concentratie van ozon die hiervoor nodig is, werd echter niet bepaald. Het zou dus kunnen dat de concentratie van ozon in de pPBS te laag is om te reageren met de spintrap. Een andere mogelijkheid is dat de ozongenerator gebruikt door Gorbanev *et al* kleine hoeveelheden O en/of  $^1\text{O}_2$  produceerde, waardoor 4-oxo-TEMP niet door  $\text{O}_3$ , maar wel door O en/of  $^1\text{O}_2$  geoxideerd werd.

4) *Ozon komt wel in de pPBS terecht, maar verdwijnt ook weer snel.*

De Henryconstante van  $\text{O}_3$  is redelijk laag, waardoor  $\text{O}_3$  zich eerder in de gasfase dan in de vloeistoffase bevindt. Het is mogelijk dat op het moment van het toevoegen van de spintrap aan de pPBS alle  $\text{O}_3$  reeds verdwenen is uit de vloeistoffase.

De vierde reden lijkt de meest waarschijnlijke om te verklaren waarom er na de plasmabehandeling geen  $\text{O}_3$  in de pPBS gedetecteerd wordt. In [sectie 5.1.1](#) komen we hier nog even op terug. Dit resultaat toont aan dat  $\text{O}_3$  wellicht geen rol speelt in de anti-kankerwerking van pPBS.

## 4.2 Kankerexperimenten

### 4.2.1 Effect van het gasdebiet, de gap en de behandelingstijd

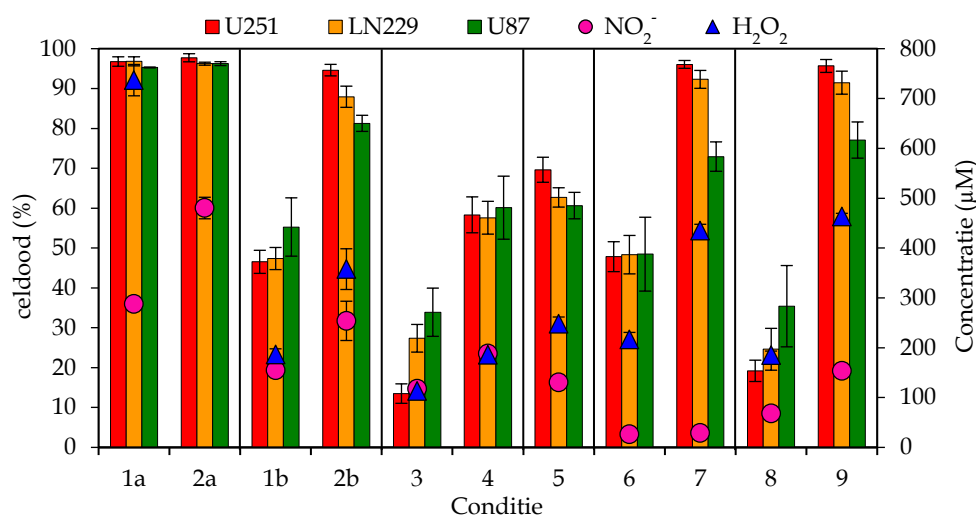
Om het effect van pPBS op kankercellen (cellijnen U251, LN229 en U87) te onderzoeken worden dezelfde plasmabehandelingen uitgevoerd als voor de bepaling van de chemische samenstelling van pPBS, waarna de pPBS aan de cellen wordt toegevoegd. Zo kan een directe vergelijking worden gemaakt tussen de gemeten concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  en het effect op de celdood bij de kankercellen. [Figuur 16](#) toont de resultaten voor de celdood, alsook die voor de chemische samenstelling, bij de 11 condities uit [Tabel 2](#).

Om te kunnen zeggen of pPBS bij de drie cellijnen hetzelfde effect heeft op de celdood, wordt een niet-parametrische t-test uitgevoerd (resultaten worden niet getoond). Hieruit kan geconcludeerd worden dat er voor het 99%-betrouwbaarheidsinterval enkel voor conditie 9 een significant verschil is tussen de verkregen percentages celdood bij de cellijnen U251 en LN229 enerzijds en bij U87 anderzijds. Bij alle andere condities kunnen de percentages celdood bij de

drie cellijnen als dezelfde beschouwd worden. Bij het uitvoeren van deze plasmabehandelingen varieerde de relatieve luchtvochtigheid bij de verschillende herhalingen tussen 29 en 47 %. Dit kan een grote invloed hebben op de bekomen resultaten. Door deze grote variatie en aangezien er slechts bij 1 conditie een significant verschil voorkomt, zullen we het effect van pPBS op de drie cellijnen bij de verdere bespreking van de resultaten steeds als hetzelfde beschouwen. Een eventuele verklaring voor de variatie bij de drie cellijnen kan gezocht worden in het verschil van de celgroei bij de cellijnen. Indien de cellijnen verschillende groeisnelheden vertonen na een behandeling, kan dit leiden tot een vertekend beeld over de gevoeligheid van de cellijn voor de behandeling, vermits de viabiliteitsanalyse gebeurt via de SRB-methode. Hierin wordt de totale hoeveelheid proteïnen in een well als maat genomen voor de viabiliteit ten opzichte van een onbehandelde controle. In [Figuur 16](#) kan gezien worden dat het percentage celdood voor de U87-celijn bij de langere behandelingstijden steeds iets lager ligt dan bij de andere cellijnen. De U87-cellen hebben een astrocyte vorm, terwijl de U251- en LN229-cellen epitheelcellen zijn. We hebben experimenteel ondervonden dat de U87-cellen ook bij een lagere dichtheid goed kunnen groeien, terwijl dit bij U251 en LN229 niet het geval is. Deze cellijnen lijken meer cel-celcontact nodig te hebben voor een goede groei. Aangezien de analyse van de celviabiliteit na 72 uur gebeurt, is het mogelijk dat bij het afsterven van een groot deel van de kankercellen, de overlevende cellen bij de U251- en LN229-celijn minder voortgroeien dan in het geval van de U87-cellen. Daardoor lijkt de viabiliteit van de U87-cellen hoger, terwijl dat in dit geval niet te wijten is aan de rechtstreekse gevolgen van de plasmabehandeling. Hierover zou uitsluitel geboden kunnen worden door gebruik te maken van een analysetechniek die effectief de celdood onderzoekt (bv. flowcytometrie). De bevinding dat het effect van de plasmabehandeling hetzelfde is voor de drie cellijnen, is in tegenstelling tot de resultaten die Vermeulen *et al*<sup>51</sup> rapporteerden. In dat artikel wordt aangetoond dat de LN229-celijn minder gevoelig is aan de plasmabehandeling dan de U87-celijn na een viabiliteitsanalyse via flowcytometrie. Vermeulen *et al* gebruikten een PAM-behandeling, waarvan de effecten op de cellen anders kunnen zijn dan bij de pPBS-behandeling die in deze thesis toegepast wordt. Celmedium bevat immers veel organische componenten die een invloed zouden kunnen hebben op de reactiviteit van de plasmabehandelde vloeistof. Bovendien worden in bovengenoemde studie de U87- en LN229-cellen aan een verschillende dichtheid uitgezaaid, terwijl deze cellijnen in deze thesis steeds aan dezelfde dichtheid worden uitgezaaid voor de behandeling. In Yan *et al*<sup>61</sup> wordt aangetoond dat het effect van een PAM-behandeling afhankelijk is van de hoeveelheid cellen die behandeld worden, wat het verschil in gevoeligheid kan verklaren.

Alvorens de effecten van het gasdebiet, de gap en de behandelingstijd te bespreken, kunnen we eerst een algemene vergelijking maken tussen de concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  en de celdood. Belangrijk om hierbij op te merken is dat de resultaten bij de analyse van de celdood steeds

begrensd zijn door een maximum van 100 % celdood. De concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  kennen dit maximum uiteraard niet en kunnen hoger zijn dan de concentratie die nodig is om 100 % celdood te verkrijgen. In **Figuur 16** kan opgemerkt worden dat de percentages celdood dezelfde trends vertonen als de concentratie  $\text{H}_2\text{O}_2$ , maar niet dezelfde als die van  $\text{NO}_2^-$ . Bij condities 6 en 7 is er bv. bijna geen  $\text{NO}_2^-$  aanwezig in pPBS, terwijl er toch een hoog percentage aan celdood verkregen wordt. Bij condities 1b en 9 is er een gelijke concentratie aan  $\text{NO}_2^-$  aanwezig in de pPBS en toch wordt er bij conditie 9 dubbel zoveel celdood verkregen als bij conditie 1b. Uit deze resultaten kan dus geconcludeerd worden dat  $\text{H}_2\text{O}_2$  waarschijnlijk een belangrijkere rol speelt bij het doden van de kankercellen dan  $\text{NO}_2^-$ . Hiervoor lijkt een concentratie van ongeveer  $400 \mu\text{M}$  aan  $\text{H}_2\text{O}_2$  in de pPBS voldoende om zo goed als alle kankercellen te doden (conditie 2b). Doordat de pPBS aan de cellen in medium wordt toegevoegd, komt dit overeen met een concentratie van ongeveer  $67 \mu\text{M}$  die bij de cellen terechtkomt. Het is uiteraard mogelijk dat er nog andere plasmadeeltjes een belangrijke rol spelen voor het effect van pPBS op de celdood, zoals  $\text{NO}$  of  $\text{NO}_3^-$ . Sato *et al*<sup>62</sup> toonden reeds aan dat van alle ROS  $\text{H}_2\text{O}_2$  waarschijnlijk het meest belangrijke deeltje is dat celdood bij de kankercellen induceert. Yan *et al*<sup>61</sup> rapporteerden echter dat het toevoegen van enkel  $\text{H}_2\text{O}_2$  niet hetzelfde effect heeft als een PAM-behandeling met dezelfde concentratie aan  $\text{H}_2\text{O}_2$ , wat doet vermoeden dat er effectief nog andere deeltjes een rol spelen.



**Figuur 16:** Experimenteel bekomen resultaten van de 11 condities uit Tabel 2 voor het effect van pPBS op de celdood bij de cellijnen U251, LN229 en U87 (linker y-as). De concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  in pPBS zijn ook weergegeven (rechter y-as) voor de vergelijking tussen de chemische samenstelling en het effect op de celdood. De concentratie van  $\text{H}_2\text{O}_2$  bij conditie 2a is  $1317 \mu\text{M}$ , maar dit punt valt buiten het bereik van de grafiek. De waarden zijn het gemiddelde van minstens drie herhalingen en de foutenbalken worden weergegeven als de standaardafwijking op het gemiddelde.

### Effect van de plasmabehandelingstijd

Zoals hierboven vermeld is er bij de celexperimenten een maximumwaarde die niet overschreden kan worden, nl. 100 % celdood. Bij condities 1a en 2a wordt er duidelijk 100 % celdood verkregen, waardoor er over het effect van de behandelingstijd bij deze condities niets geconcludeerd kan worden. Aangezien bij de andere condities maximaal 80-90 % celdood verkregen wordt, kan

hierbij het effect van de behandelingstijd wel bestudeerd worden. De verhoudingen van de percentages celdood bij de verschillende condities zijn weergegeven in Tabel 13. De verhouding 9/5 is gelijk aan 1,80 en in bijna alle gevallen is de verhouding van deze percentages bij benadering ook gelijk aan dit getal. De afwijkende waarden worden geacht het gevolg te zijn van experimentele variaties. Deze resultaten kunnen een aanwijzing zijn voor een lineaire stijging van de celdood met de behandelingstijd, maar hierover zal in *sectie 4.2.2* een betere conclusie getrokken kunnen worden.

**Tabel 13: Verhoudingen van de percentages celdood bij een behandeling van pPBS van 9 min t.o.v. 5 min bij de verschillende condities voor de drie cellijnen. De verhouding 9/5 is gelijk aan 1,80. Afwijkende waarden worden in rode kleur weergegeven.**

Conditie	Gasdebit (slm)	Gap (mm)	U251	LN229	U87
1b - 2b	1	15	2,0 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,5 ± 0,2
3 - 4	1	30	4,3 ± 0,8	2,1 ± 0,3	1,8 ± 0,4
6 - 7	3	10	2,0 ± 0,2	1,9 ± 0,2	1,5 ± 0,3
8 - 9	3	30	5,0 ± 0,7	3,7 ± 0,8	2,2 ± 0,6

### *Effect van de gap*

In *Figuur 17* (boven) worden de resultaten weergegeven van het effect van de gap op de celdood. Een vergroting van de gap zorgt voor een vermindering van het percentage celdood, zowel bij een gasdebit van 1 slm als bij een gasdebit van 3 slm. Enkel bij de behandeling van 9 min met een gasdebit van 3 slm worden dezelfde resultaten verkregen, ongeacht de afstand. Een eerste mogelijke verklaring hiervoor kan zijn dat het effect van de pPBS op de kankercellen kleiner is als deze pPBS geproduceerd is bij een grotere afstand, maar dat dit effect nog steeds groot genoeg is om nagenoeg 100 % celdood te veroorzaken. Een andere mogelijke verklaring ligt bij het feit dat de concentratie van H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bij deze condities ook dezelfde is. Als we stellen dat de celdood voornamelijk veroorzaakt wordt door de concentratie van H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, zal de celdood bij deze condities ook dezelfde zijn. De resultaten voor het effect van de gap zijn in overeenstemming met de bevindingen bij de experimenten voor de chemische samenstelling, voor zowel NO<sub>2</sub><sup>-</sup> als H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

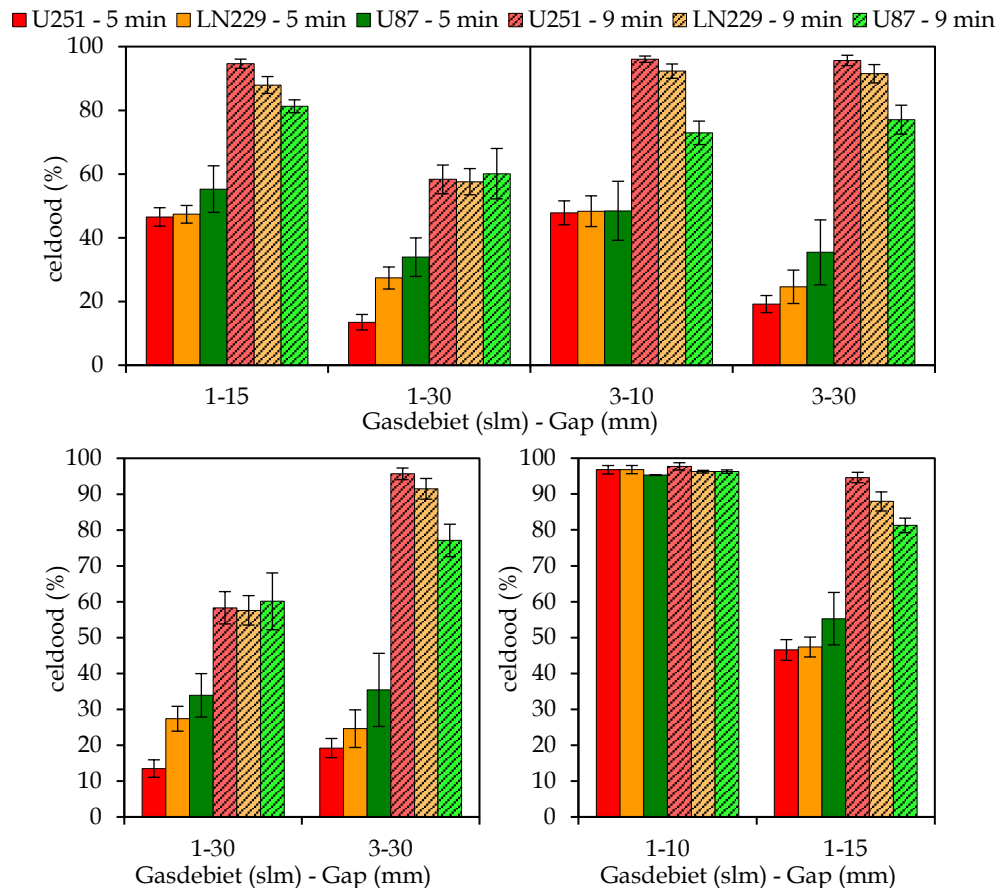
### *Effect van het gasdebit*

De resultaten voor het effect van het gasdebit worden weergegeven in *Figuur 17* (linksonder). Een hoger gasdebit resulteert bij de drie cellijnen in een stijging van het percentage celdood. Dit is in overeenstemming met de trend van de concentratie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De concentratie van NO<sub>2</sub><sup>-</sup> daalt bij een verhoging van het gasdebit, waardoor ook dit resultaat erop wijst dat de celdood voornamelijk door H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en niet (of minder) door NO<sub>2</sub><sup>-</sup> wordt veroorzaakt.

### *Effect van de ontladingen op het vloeistofoppervlak*

Ook bij de celexperimenten kan het effect van de ontladingen op het vloeistofoppervlak op het percentage celdood bestudeerd worden (zie *Figuur 17*, rechtsonder). Bij de condities 1a en 2a

wordt telkens 100 % celdood verkregen. Bij conditie 1b wordt een celdood van ongeveer 50 % verkregen, bij conditie 2b is dit ongeveer 90 %. Dit betekent dat het wegnemen van de ontladingen op het vloeistofoppervlak voor een vermindering van de celdood met minimaal een factor 2 zorgt. Bij de experimenten voor de chemische samenstelling van pPBS wordt een gelijkaardig resultaat verkregen; voor de concentratie  $\text{NO}_2^-$  een daling met een factor 2 en voor die van  $\text{H}_2\text{O}_2$  een daling met een factor 4.

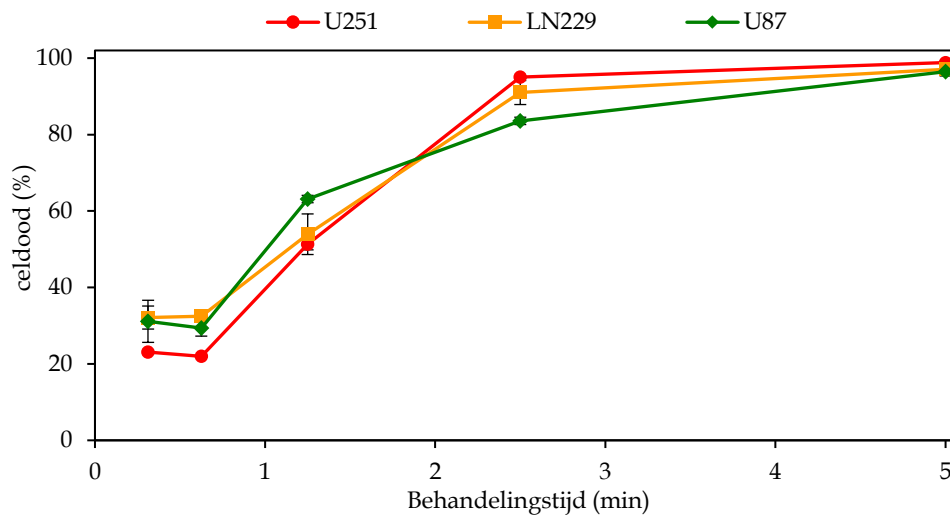


**Figuur 17:** Experimenteel bekomen resultaten voor het effect van de gap (boven), het gasdebiet (linksonder) en de ontladingen op het oppervlak (rechtsonder) op de celdood. De waarden zijn het gemiddelde van minstens drie herhalingen en de foutenbalken worden weergegeven als de standaardafwijking op het gemiddelde.

#### 4.2.2 Uitgebreide tijdstudie

Een uitgebreide tijdstudie kan meer informatie verschaffen over het effect van de behandelingstijd op de celdood. Uiteraard is het ook hier weer van belang om op te merken dat 100 % celdood een bovengrens is voor het effect op de kankercellen. De resultaten zijn weergegeven in [Figuur 18](#). De kortst beschouwde behandelingstijd is 18,75 sec. De celdood bij deze behandelingstijd en die van 37,5 sec is ongeveer gelijk. Dit kan mogelijk verklaard worden door het feit dat reeds een zeer kleine hoeveelheid aan plasmadeeltjes resulteert in een bepaald percentage aan celdood. Een behandelingstijd van 5 min zorgt bij alle cellijnen voor 100 % celdood, wat betekent dat alle cellen afsterven bij een behandelingstijd tussen 2,5 en 5 min. De celdood bij de U87-cellijn lijkt op basis van deze resultaten niet lineair te stijgen met de behandelingstijd. Bij U251 en LN229 kan er wel van een lineaire stijging van de celdood met de

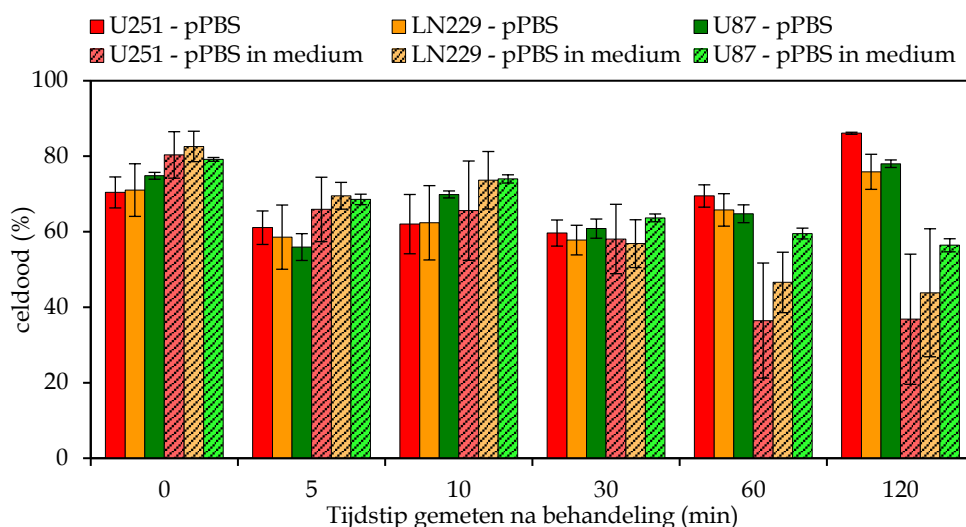
behandelingstijd gesproken worden, al is deze bevinding slechts op drie punten gebaseerd. Om hierover uitsluitsel te geven, zullen er meer experimenten moeten worden uitgevoerd. In de literatuur werd er door Vermeylen *et al*<sup>51</sup> eerder reeds een min of meer lineair verloop (hoewel ook met afwijkingen) van het effect van de behandelingstijd op de celdood aangetoond.



**Figuur 18:** Experimenteel bekomen resultaten voor de uitgebreide tijdstudie op de celdood bij de drie cellijnen. De waarden zijn het gemiddelde van minstens drie herhalingen en de foutenbalken worden weergegeven als de standaardafwijking op het gemiddelde.

#### 4.2.3 Stabiliteit van pPBS

Net als bij het bepalen van de chemische samenstelling wordt ook bij de celexperimenten de stabiliteit van pPBS nagegaan (zie [Figuur 19](#)). Bij het toevoegen van pPBS aan de cellen op verschillende tijdstippen na de plasmabehandeling, lijkt het effect op de celdood nagenoeg constant gedurende twee uur. Echter, bij het toevoegen van pPBS aan celmedium na de behandeling, vermindert het effect op de celdood na 30-60 min. Dit betekent dat de reactieve deeltjes die verantwoordelijk zijn voor de celdood, reageren met organische moleculen in het medium, waardoor de pPBS zijn anti-kankerwerking deels verliest. Uit de experimenten voor de chemische samenstelling van pPBS blijkt dat de concentratie  $\text{NO}_2^-$  in het celmedium met pPBS constant blijft over een tijdsperiode van twee uur. Het verminderd effect op de celdood zal dus te wijten zijn aan het verdwijnen van andere reactieve deeltjes in het medium. Omdat de concentratie van  $\text{H}_2\text{O}_2$  in het celmedium met pPBS niet kon worden bepaald, is het mogelijk dat  $\text{H}_2\text{O}_2$  afgebroken wordt in het celmedium, maar uiteraard kunnen ook nog andere deeltjes daarbij een rol spelen. In Adachi *et al*<sup>59</sup> wordt inderdaad gerapporteerd dat de concentratie  $\text{H}_2\text{O}_2$  in PAM daalt met de tijd, indien het niet wordt bewaard bij  $-80^\circ\text{C}$ . Aangezien de concentratie  $\text{H}_2\text{O}_2$  in pPBS op zich wel stabiel blijft (zie [sectie 4.1.3](#)), kan hier de conclusie getrokken worden dat PBS een beter opslagmiddel is voor plasmadeeltjes dan het celmedium zelf.



**Figuur 19:** Experimenteel bekomen resultaten voor het effect van de stabiliteit van pPBS en pPBS in medium op de celdood bij de cellijnen U251, LN229 en U87. De waarden zijn het gemiddelde van minstens drie herhalingen en de foutenbalken worden weergegeven als de standaardafwijking op het gemiddelde.

### 4.3 Samenvatting van de resultaten uit de experimentele studie

In Tabel 14 worden de resultaten van de effecten van de verschillende parameters op de chemische samenstelling van pPBS en op de celdood bij de kankercellen samengevat. In het algemeen zien we dat de effecten van de verschillende parameters op de concentratie  $H_2O_2$  en de viabiliteit van de kankercellen dezelfde zijn, waaruit we kunnen besluiten dat  $H_2O_2$  wellicht een belangrijkere rol speelt in de anti-kankerwerking van pPBS dan  $NO_2^-$ .

**Tabel 14:** Samenvatting van de experimentele studie over het effect van de gap, het gasdebiet, de plasmabehandelingstijd, de ontladingen op het vloeistofoppervlak en de stabiliteit in pPBS en pPBS in medium, op de concentraties van  $NO_2^-$  en  $H_2O_2$  in pPBS en op de celdood bij de drie kankercellijnen.

	$NO_2^-$	$H_2O_2$	U251	LN229	U87
Gap ↗	↘	↘	↘	↘	↘
Gasdebiet ↗	↘	↗	↗	↗	↗
Effect van de behandelingstijd: +/- lineair?	✓	✓	✓	✓	✗
Stabiliteit van pPBS?	✓	✓	✓	✓	✓
Stabiliteit van pPBS + medium?	✓	?	✗	✗	✗
Ontlading op het vloeistofoppervlak	↗ x2	↗ x4	↗ ≥ x2	↗ ≥ x2	↗ ≥ x2

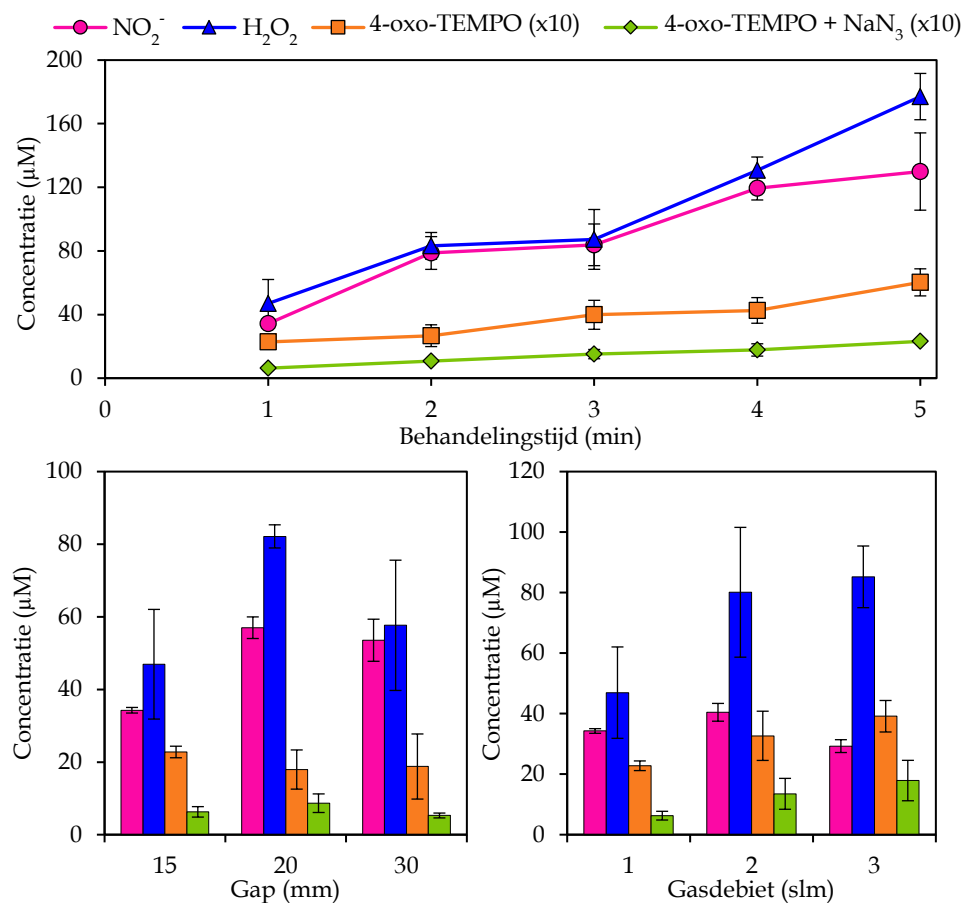


## 5. Computationale studie: resultaten en discussie

### 5.1 Validatie van het model

#### 5.1.1 Vergelijking met de experimenten

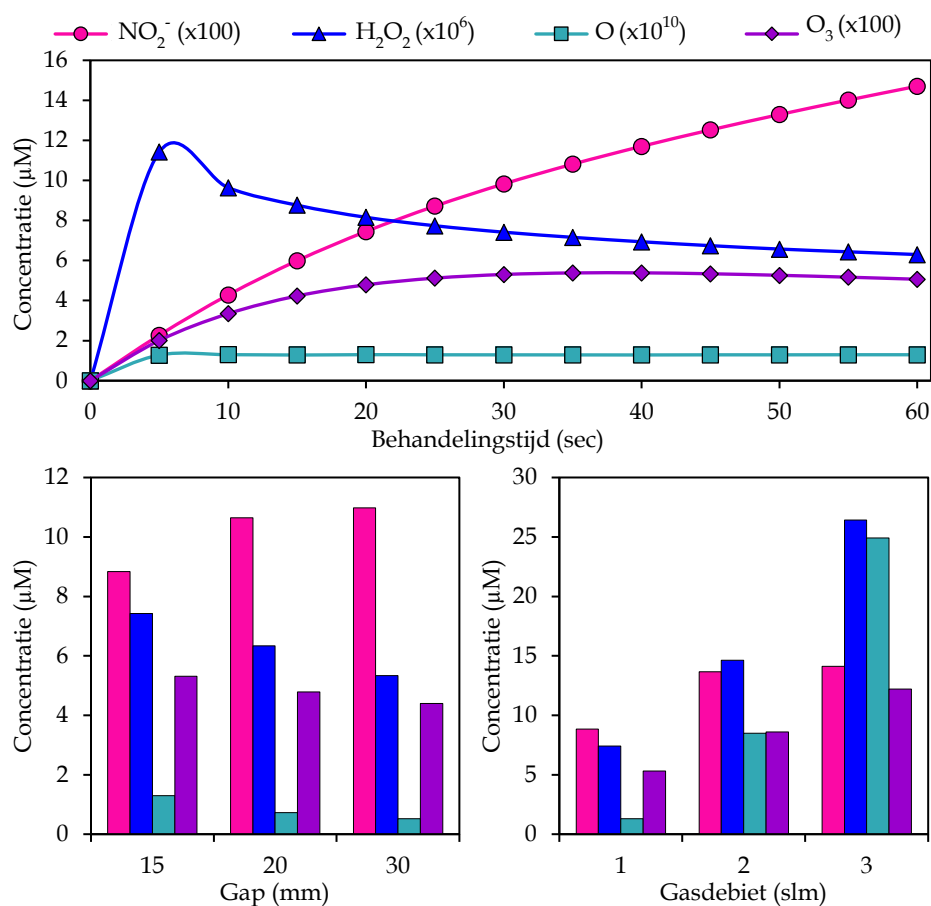
Om het ontwikkelde model te valideren maken we een vergelijking tussen de experimenteel bekomen concentraties van  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  en 4-oxo-TEMPO in pPBS bij de condities uit Tabel 3 (zie Figuur 20) en de concentraties van  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , O en  $\text{O}_3$  in de vloeistoffase, zoals berekend met het model, bij de condities uit Tabel 9 (zie Figuur 21). Zoals vermeld in sectie 2.1.2 is 4-oxo-TEMP een spintrap die door O,  $\text{O}_3$  en  $^1\text{O}_2$  geoxideerd wordt tot 4-oxo-TEMPO. De concentratie van 4-oxo-TEMPO in de pPBS is dus een maat voor de som van de concentraties van deze drie deeltjes. Indien  $\text{NaN}_3$  voor de plasmabehandeling toegevoegd wordt aan de 4-oxo-TEMP-oplossing zal de spintrap enkel nog door O en  $\text{O}_3$  geoxideerd worden, aangezien  $^1\text{O}_2$  wegreageert met  $\text{NaN}_3$ , en dan is deze concentratie een maat voor de som van de concentraties O en  $\text{O}_3$ . Vooraleer de effecten van het gasdebiet, de gap en de behandelingstijd bij de experimenten en het model vergeleken worden, bespreken we eerst nog enkele andere puntjes.



**Figuur 20:** Experimenteel bekomen resultaten voor het effect van de behandelingstijd (boven, condities A-B-C-D-E), de gap (linksonder, condities A-F-G) en het gasdebiet (rechtsonder, condities A-H-I) op de concentraties  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  en 4-oxo-TEMPO (met of zonder toevoeging van  $\text{NaN}_3$ ) ter validatie van het model, bij de condities uit Tabel 3. De waarden zijn het gemiddelde van minstens drie herhalingen en de foutenbalken zijn weergegeven als de standaardafwijking op het gemiddelde. De concentraties van 4-oxo-TEMPO (+  $\text{NaN}_3$ ) worden vermenigvuldigd met een factor 10 voor een duidelijke weergave.

### Gekozen condities

Allereerst dient er een opmerking gemaakt te worden over de gekozen condities bij de experimenten en de simulaties. Om een geldige validatie van het model uit te voeren, moeten de condities bij de experimenten en de simulaties zo goed mogelijk vergelijkbaar zijn. Aangezien de simulaties veel rekencapaciteit vergen, wordt er in het model standaard met een behandelingstijd van 30 sec gewerkt. Dit is een te korte behandelingstijd om experimenteel voldoende hoge concentraties van RONS te bekomen in de pPBS. Daarom werd er geöpteerd om voor de experimenten een behandelingstijd van 2 min te kiezen, wat nog steeds vrij laag is, om zo dicht mogelijk bij de simulaties aan te leunen. De bekomen concentraties van  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  en 4-oxo-TEMPO zijn daardoor toch nog relatief laag en daarom zijn de bijbehorende fouten relatief groot. Daardoor zijn ook de trends voor de effecten van de verschillende parameters niet altijd even zichtbaar in de experimenten.



**Figuur 21:** Computacioneel bekomen resultaten voor het effect van de behandelingstijd (boven, condities A-B), de gap (linksonder, condities A-C-D) en het gasdebiet (rechtsonder, condities A-E-F) op de concentraties van  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}$  en  $\text{O}_3$  bij de condities uit Tabel 9. De concentraties van  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}$  en  $\text{O}_3$  worden vermenigvuldigd met respectievelijk een factor 100,  $10^6$ ,  $10^{10}$  en 100 om de weergave van de resultaten te verduidelijken.

### Aanwezigheid van $^1\text{O}_2$

Zoals in [sectie 3.2](#) vermeld is, wordt  $^1\text{O}_2$  in het model niet beschouwd in de vloeistoffase door gebrek aan beschikbare gegevens. Het verschil tussen de concentraties van 4-oxo-TEMPO met en zonder de toevoeging van  $\text{NaN}_3$  is een maat voor de gevormde hoeveelheid  $^1\text{O}_2$ . Uit [Figuur 20](#)

kan besloten worden dat  $^1\text{O}_2$  in relatief grote hoeveelheid aanwezig is in de vloeistof, aangezien de concentratie ervan bij de meeste condities groter is dan de som van de concentraties van O en  $\text{O}_3$  (die weergegeven wordt als de concentratie 4-oxo-TEMPO +  $\text{NaN}_3$ ). Dit resultaat toont dat  $^1\text{O}_2$  wel degelijk een belangrijk deeltje in de vloeistoffase is, waardoor het in de toekomst zeker aan het model toegevoegd moet worden. Ondanks het feit dat  $^1\text{O}_2$  vermoedelijke zeer kortlevend is in de vloeistof, kan het wel een belangrijke rol spelen in de chemie in de bovenste vloeistofflagen.

### *Evaporatie van de vloeistof*

Evaporatie van de vloeistof, als gevolg van de warmte en energie die door het plasma geproduceerd wordt en door de gasstroom in de vloeistof terechtkomen, wordt experimenteel duidelijk vastgesteld tijdens de plasmabehandelingen. Bovendien wordt de reeds gevormde waterdamp boven het oppervlak steeds weggeblazen door de gasstroom, waardoor steeds meer water kan verdampen. Hierdoor worden alle concentraties die gemeten worden in de vloeistoffase lichtjes overschat (zie hieronder), aangezien de deeltjes zich bij de detectie in een kleiner volume bevinden dan hetgene waarin ze gevormd werden. Dit fenomeen zal zich altijd voordoen, maar het is belangrijk om een onderscheid te maken tussen situaties waarin dit wel en niet belangrijk is. In *sectie 4* werd bewust nergens voor deze evaporatie gecompenseerd, aangezien enkel de uiteindelijke concentraties in de vloeistof die aan de cellen toegevoegd wordt belangrijk zijn bij het vergelijken van de chemische samenstelling met de celexperimenten. Als er, zoals in dit tweede luik, puur naar de chemische mechanismen in pPBS gekeken wordt, is het effect van de evaporatie mogelijk wel belangrijk. In het model komen de verdampte watermoleculen wel in de gasfase terecht, maar kan daar in de vloeistoffase niet voor gecompenseerd worden, m.a.w. het volume van de vloeistoffase blijft constant in het model, omdat de interface statisch is. In de experimenten verdampt er afhankelijk van de gebruikte parameters wel een deel van het water. Voor de vergelijking tussen de experimenten en het model, moet er uiteraard bekeken worden of dit geen invloed heeft op de bekomen resultaten.

In een experimentele studie voorafgaand aan de definitieve experimenten voor deze thesis werd de evaporatie van de vloeistof bepaald. Hiervoor werd de massa van de vloeistof voor en na de plasmabehandeling gemeten. De resultaten zijn weergegeven in *Appendix A.2*. Hieruit kan besloten worden dat de evaporatie bij een behandelingstijd van 5 minuten maximaal 15 % bedraagt en dat de evaporatie lineair stijgt met de behandelingstijd. Bij een behandelingstijd van 7 minuten (de maximale tijd bij deze experimenten) bedraagt de evaporatie maximaal 37 % en bij een behandelingstijd van een halve minuut is dit 2 %. Belangrijk om op te merken is dat deze experimenten met 1 mL PBS uitgevoerd werden, terwijl de experimenten voor de thesis met 2 mL PBS uitgevoerd zijn. Er wordt verondersteld dat de evaporatie in het geval van het behandelen van 2 mL PBS zeker niet groter zal zijn dan bij het behandelen van 1 mL. Het oppervlak van de

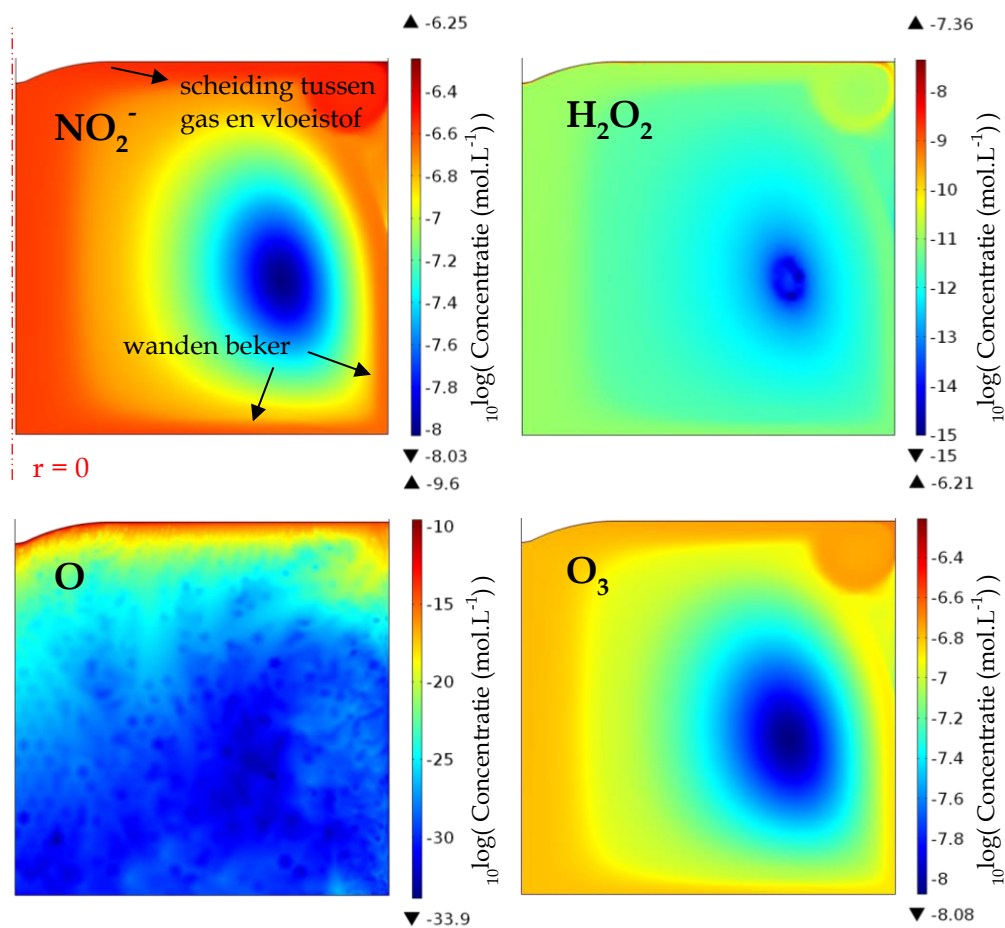
vloeistof is in beide gevallen even groot, waardoor dezelfde absolute hoeveelheid aan watermoleculen kan verdampen, wat overeenkomt met een lagere relatieve verdamping in het geval van het behandelen van het grotere volume. Doordat de vloeistof in de experimenten heel snel circuleert tijdens de plasmabehandeling, zal het bij een groter volume bovendien ook langer duren om de vloeistof op te warmen, wat mogelijk ook resulteert in een lagere verdamping van het water. Doordat er ten eerste geen vergelijking van de absolute waarden uit de experimenten en het model gebeurt en ten tweede de fouten die gemaakt worden door het verwaarlozen van de evaporatie kleiner zijn dan de variatie tussen de herhalingen van de experimenten, wordt ervoor gekozen om de evaporatie ook in dit tweede luik te verwaarlozen.

### *Verhoudingen van de concentraties in het model en de experimenten*

In [Figuur 22](#) staan de 2D-concentratieprofielen van  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , O en  $\text{O}_3$  in de vloeistoffase in het model weergegeven bij conditie E uit [Tabel 9](#). Er is duidelijk te zien dat de concentraties nog niet gehomogeniseerd zijn over de gehele vloeistof. Om de berekende concentratie van een deeltje in de vloeistof te vergelijken met de experimenten, wordt daarom de concentratie uitgemiddeld over het gehele volume van de vloeistof. De reden waarom het concentratieprofiel van O een andere vorm heeft dan dat van de drie andere deeltjes is dat de concentratie van O zeer laag is. Enkel net onder het vloeistofoppervlak zijn er O-atomen aanwezig, maar die reageren meteen weg door reacties met andere deeltjes.

Het valt op dat de berekende grootteordes van de concentraties van deze deeltjes zeer ver uit elkaar liggen (zie [Figuur 21](#) en [Figuur 22](#)). In de experimenten zijn de concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  van dezelfde grootteorde en ligt de concentratie van de som van O en  $\text{O}_3$  ongeveer twee grootteordes lager dan die van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  (zie [Figuur 20](#)).

In het model is de concentratie van  $\text{H}_2\text{O}_2$  4 grootteordes lager dan die van  $\text{NO}_2^-$ . De concentratie van  $\text{O}_3$  is van dezelfde grootteorde als die van  $\text{NO}_2^-$  en die van O ligt 8 grootteordes lager. De som van de concentraties O en  $\text{O}_3$  is in het model dus gelijk aan enkel die van  $\text{O}_3$  en is van dezelfde grootteorde als die van  $\text{NO}_2^-$  (zie [Figuur 21](#)), terwijl in de experimenten de concentratie 4-oxo-TEMP +  $\text{NaN}_3$  twee grootteordes lager is dan die van  $\text{NO}_2^-$  (zie [Figuur 20](#)). Een mogelijke reden voor het feit dat de concentratie van  $\text{O}_3$  in het model relatief hoger is dan in de experimenten is dat in het model voor de inlaatconcentraties droge lucht beschouwd wordt. Aangezien er geen  $\text{H}_2\text{O}$  aanwezig is als inlaatconcentratie, zou het kunnen dat deeltjes die normaal met  $\text{H}_2\text{O}$  wegreageren overschat worden in het model ten opzichte van de experimenten. Dit kan mogelijk ook voor  $\text{O}_3$  het geval zijn en daardoor zou het kunnen dat in het model de netto productie van  $\text{O}_3$  in de gasfase overschat wordt, waardoor ook de concentratie in de vloeistof relatief hoger zal zijn dan in de experimenten. Uiteraard is het ook mogelijk dat andere reacties nog niet in rekening zijn gebracht. Dit zal in de toekomst in meer detail onderzocht worden.



**Figuur 22:** Concentratieprofielen van  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}$  en  $\text{O}_3$  in de vloeistof bij conditie E uit Tabel 9, uitgezet op een logaritmische schaal.

In het concentratieprofiel van  $\text{H}_2\text{O}_2$  (zie Figuur 22) kunnen we zien dat de concentratie van  $\text{H}_2\text{O}_2$  meteen ongeveer 3 grootteordes daalt aan de interface wanneer dit deeltje in de vloeistof terechtkomt. Dit betekent dat  $\text{H}_2\text{O}_2$  in de vloeistof veel sneller wegreacteert dan dat het gevormd wordt. Aangezien  $\text{H}_2\text{O}_2$  in de experimenten telkens de hoogste concentratie heeft, kunnen we concluderen dat de concentratie van  $\text{H}_2\text{O}_2$  in de vloeistof onderschat wordt in het model. Er is dus nog een verbetering aan de chemieset in de vloeistoffase nodig in het model. De absolute waarden van de concentraties kunnen zoals eerder vermeld niet vergeleken worden, aangezien er in het model een groter volume en een kortere behandelingstijd beschouwd worden dan in de experimenten.

In *sectie 4.1.4* werd vermeld dat er geen ozon gedetecteerd wordt in de pPBS na de plasmabehandeling. Als we veronderstellen dat er geen  $\text{O}_3$  terechtkomt in de vloeistof, of dat 4-oxo-TEMP niet geoxideerd wordt door  $\text{O}_3$  (reden 1-3 in *sectie 4.1.4*), moet de concentratie van 4-oxo-TEMPO enkel te wijten zijn aan de oxidatie van 4-oxo-TEMP door  $\text{O}$ . Als dat het geval zou zijn, ligt de concentratie van  $\text{O}$  in het model minstens 7 grootteordes te laag. Bovendien kloppen ook de trends in de vergelijking tussen de experimenten en het model beter met die van  $\text{O}_3$  dan met die van  $\text{O}$  (zie later, bij *Effect van het gasdebiet*). Op basis van de vergelijking tussen de experimenten en het model is het dus waarschijnlijk dat 4-oxo-TEMP in de experimenten wel

geoxideerd wordt door  $O_3$ . Dit maakt dat reden 4 uit *sectie 4.1.4*, d.w.z. dat  $O_3$  na de behandeling meteen terug naar de gasfase ontsnapt, wellicht de meest waarschijnlijke verklaring is.

Na bovenstaande beschouwingen kunnen we nu het effect bestuderen van de behandelingscondities (d.w.z. behandelingstijd, gap en gasdebiet) bij zowel de experimenten als de simulaties.

### *Effect van de behandelingstijd*

Bij de experimenten (*Figuur 20*, boven) wordt voor alle deeltjes een lineaire stijging van de concentratie met de behandelingstijd opgemerkt. Voor de concentraties van  $NO_2^-$  en  $H_2O_2$  is deze stijging minder uitgesproken lineair dan in *sectie 4.1.3*, maar dit wordt geacht een gevolg te zijn van de lage concentraties en bijhorende grote fouten hierop.

Voor de computationele resultaten worden de concentraties van de deeltjes elke 5 sec (tot 60 sec, conditie B uit *Tabel 9*) weergegeven in *Figuur 21* (boven). In het model wordt er geen lineaire stijging van de concentratie met de behandelingstijd opgemerkt. Voor alle deeltjes wordt na redelijk korte tijd een afvlakking van de concentratie opgemerkt. De variatie in functie van de tijd lijkt voor  $NO_2^-$  nog in redelijke overeenstemming met de experimenten, hoewel exacte vergelijking niet mogelijk is, gezien de verschillende behandelingstijden. De afvlakking is vooral uitgesproken voor O en  $O_3$ , terwijl voor  $H_2O_2$  de concentratie na een initiële stijging zelfs daalt met de tijd. Ook mede door het feit dat de concentratie  $H_2O_2$  in het algemeen zeer laag is, doet dit vermoeden dat het verlies van  $H_2O_2$  overschat wordt ten opzichte van de vorming ervan in de vloeistof.

De snelle stabilisatie van de concentraties van de deeltjes in het model kan te wijten zijn aan het feit dat de interface niet beweegt in het model. Het is zo dat de concentratie in de bovenste laag van de vloeistof afhankelijk is van de concentratie net boven de interface, wat via de Henryconstante ( $H_i$ ) als een evenwicht bepaald wordt. De concentraties van de deeltjes worden dan via diffusie en convectie verspreid over de volledige vloeistof. In de experimenten wordt gezien dat het vloeistofoppervlak golft en zeker bij een hoog gasdebiet is het duidelijk dat de vloeistof gedurende de plasmabehandeling continu beweegt, waarbij op elk moment een nieuwe weinig verzadigde vloeistoflaag aan het oppervlak komt te liggen, waarin nieuwe deeltjes opgenomen worden. In het model is convectie in de vloeistof wel aanwezig, berekend door de stromingsmodule, maar is de interface statisch. Bovendien zorgt het circulatiepatroon in de vloeistof ervoor dat reeds verzadigde delen van de vloeistof terug in de richting van het oppervlak vloeien (zie later, bij *Snelheidsprofiel*). Hierdoor gebeurt de volledige menging van de vloeistof in de simulaties veel trager dan in de experimenten. Dit kan de niet-lineaire toename van de concentraties in het model verklaren. Bijgevolg kan met dit model het effect van de plasmabehandelingstijd op de concentraties in de vloeistof nog niet goed voorspeld worden.



### *Effect van de gap*

Het effect van de gap op de concentraties in de vloeistof bij de experimenten en in het model wordt getoond in [Figuur 20](#) en [Figuur 21](#) (linksonder). Het gasdebiet is 1 slm en de behandelingstijd is 2 min bij de experimenten en 30 sec bij de simulaties. Daar waar in [sectie 4.1.1](#) bij een gasdebiet van 1 slm een daling van de concentratie met grotere gap verkregen werd, wordt hier in de experimentele resultaten eerst een stijging en vervolgens een daling met grotere gap opgemerkt voor de concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$ , met een netto stijging in de concentraties als gevolg (zie [Figuur 20](#), linksonder). Een verklaring waarom in deze experimenten bij  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  de concentratie stijgt met toenemende gap kan niet gegeven worden. Zoals hierboven vermeld is dit mogelijk te wijten aan het feit dat er zeer lage concentraties gemeten worden en de fouten relatief groot zijn. Voor 4-oxo-TEMPO, met of zonder  $\text{NaN}_3$  is het effect door de grote fouten zeer moeilijk te zien, al kan een lichte netto daling van de concentratie met grotere gap worden opgemerkt, wat in overeenstemming is met de resultaten voor  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  in [sectie 4.1.1](#).

Bij de resultaten uit het model (zie [Figuur 21](#), linksonder) wordt voor  $\text{NO}_2^-$  een stijging van de concentratie met grotere gap opgemerkt. Voor de drie andere deeltjes daalt de concentratie met stijgende gap. Bij een grotere gap kunnen er meer reactieve deeltjes in de gasfase verloren gaan, die niet in de vloeistoffase terecht kunnen komen, wat resulteert in een lagere concentratie.

Voor 4-oxo-TEMPO is er een goede overeenkomst tussen de experimenten en het model voor het effect van de gap. Aangezien de resultaten voor het effect van de gap op  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{NO}_2^-$  in deze experimenten als afwijkend beschouwd worden, wordt er vergeleken met de resultaten uit [sectie 4.1.1](#), waarbij een grotere gap resulteert in een lagere concentratie en het effect voor  $\text{H}_2\text{O}_2$  groter is dan voor  $\text{NO}_2^-$ . In dat geval wordt er voor  $\text{H}_2\text{O}_2$  een goede overeenkomst tussen de experimenten en het model verkregen. Voor  $\text{NO}_2^-$  echter, kan er geen overeenkomst gevonden worden voor het effect van de gap op de concentratie. In het model wordt immers een lichte stijging en in de experimenten een lichte daling van de concentratie  $\text{NO}_2^-$  bij grotere gap opgemerkt.

### *Effect van het gasdebiet*

[Figuur 20](#) en [Figuur 21](#) (rechtsonder) tonen het effect van het gasdebiet op de concentraties bij respectievelijk de experimenten en de simulaties. Experimenteel wordt er voor  $\text{H}_2\text{O}_2$  een stijging en voor  $\text{NO}_2^-$  een lichte daling van de concentratie met hoger gasdebiet opgemerkt. Dit is in overeenstemming met de bekomen resultaten uit [sectie 4.1.1](#). Voor 4-oxo-TEMPO (met of zonder  $\text{NaN}_3$ ) wordt net als bij  $\text{H}_2\text{O}_2$  een stijging van de concentratie met hoger gasdebiet waargenomen. Dit kan betekenen dat de concentraties van O,  $\text{O}_3$  en  $^1\text{O}_2$ , net zoals die van  $\text{H}_2\text{O}_2$ , in de vloeistof afhankelijk zijn van de meest reactieve deeltjes in de gasfase. Deze reactieve deeltjes zullen bij



een hoger gasdebiet minder tijd hebben om weg te reageren met andere deeltjes en dus in een hogere concentratie terechtkomen in de vloeistof.

Bij de computationele resultaten resulteert een hoger gasdebiet voor alle deeltjes in een hogere concentratie, wat voor  $\text{H}_2\text{O}_2$ , O en  $\text{O}_3$  in overeenstemming is met de experimenten. Het effect van het gasdebiet op de concentratie van O lijkt wel enigszins overschat in het model. Voor  $\text{NO}_2^-$  wordt er een tegengesteld effect bij de experimenten en de simulaties bekomen, als is het effect van het gasdebiet op de concentratie van  $\text{NO}_2^-$  in het model wel minder uitgesproken dan voor de andere deeltjes.

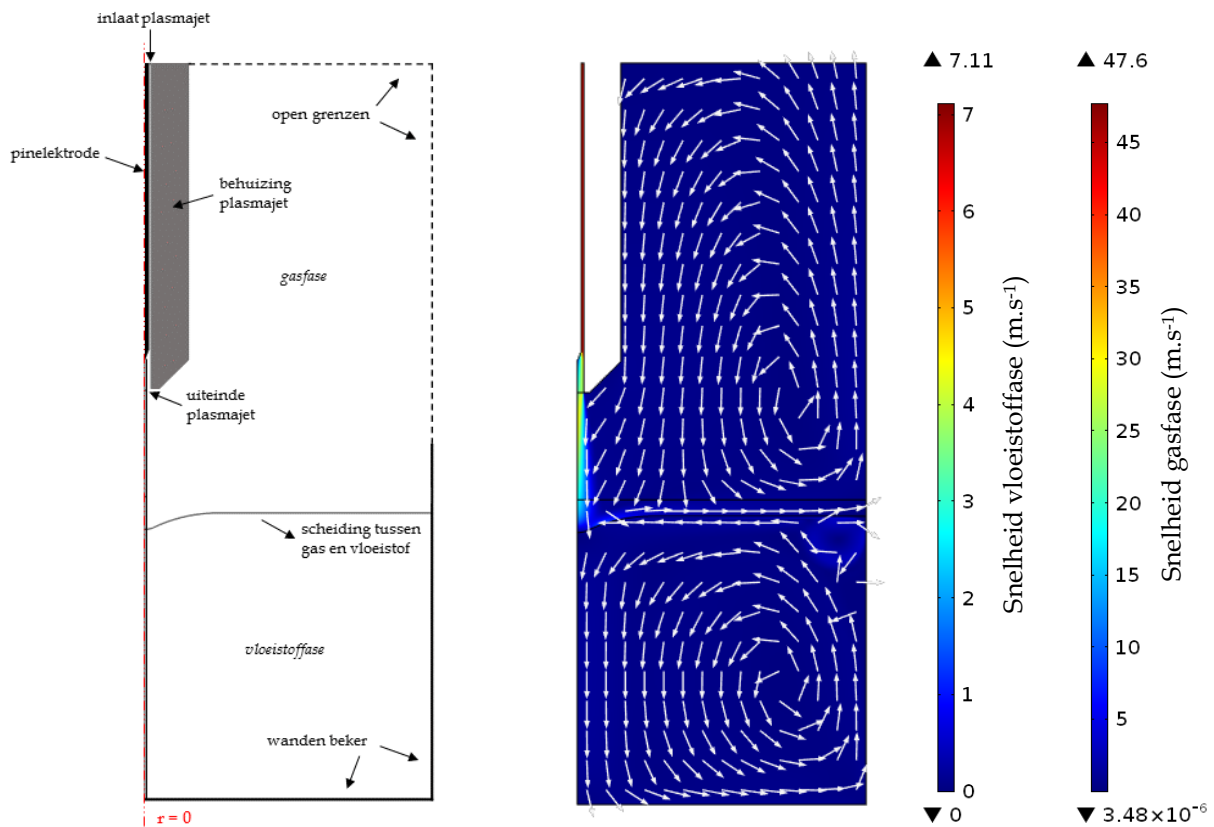
### 5.1.2 Vergelijking met de literatuur

Naast een vergelijking van het model met de uitgevoerde experimenten, kunnen we ook kijken of er in de (weliswaar beperkt beschikbare) literatuur gelijkaardige resultaten worden gerapporteerd. We kijken naar het snelheids- en temperatuurprofiel in de gas- en vloeistoffase en naar de concentraties van de deeltjes in de gasfase.

#### *Snelheidsprofiel*

Door Lindsay *et al*<sup>87</sup> werd recent een gelijkaardig model ontworpen, waarbij ook gebruikgemaakt wordt van het softwarepakket Comsol Multiphysics™. In dit artikel wordt de te behandelen vloeistof in een petrischaal beschouwd. Aangezien in deze thesis een beker gesimuleerd wordt, zal het snelheidsprofiel in de vloeistof er geheel anders uitzien. Het snelheidsprofiel van het ontwikkelde model in deze thesis bij conditie E uit Tabel 9 wordt weergegeven in Figuur 23. Hoewel Lindsay *et al* een lager gasdebiet gebruiken en dus een lagere snelheid verkrijgen, komt de vorm van het profiel van de gasstroom overeen (zie Appendix A.3.1). Het verschil in snelheid in de gasfase kan verklaren waarom het snelheidsprofiel in de vloeistof in Lindsay *et al* er iets anders uitziet, al is ook hier kwalitatief een goede overeenkomst zichtbaar.

De gasstroom (met in de effluent een snelheid van  $30 \text{ m.s}^{-1}$  aan de uitlaat van de plasmajet tot  $7 \text{ m.s}^{-1}$  aan het vloeistofoppervlak) buigt op het vloeistofoppervlak af naar de buitenkant van de beker en vloeit omhoog als het tegen de opstaande wand van de beker komt. De omringende lucht wordt aangezogen naar de plasmapluim, waardoor de hele lucht rondom de plasmajet circuleert. De vloeistof beweegt net aan de interface in dezelfde richting als de gasfase, met in een zeer dunne laag dezelfde snelheid als de gasfase (nl.  $7 \text{ m.s}^{-1}$  recht onder de plasmajet). De snelheid in de vloeistof neemt echter snel af tot veel lagere waarden verder van de interface en in de richting van de wand van de beker. Net onder het vloeistofoppervlak aan de rand van de beker wordt een vortex gevormd, waarna de vloeistof terug naar het midden van de beker en daar naar beneden stroomt. In de vortex is de snelheid van de vloeistof iets hoger dan in de bulk (nl.  $0,5 \text{ m.s}^{-1}$  t.o.v.  $0,05 - 0,1 \text{ m.s}^{-1}$ ). De concentratieprofielen in Figuur 22 volgen zeer duidelijk het snelheidsprofiel.



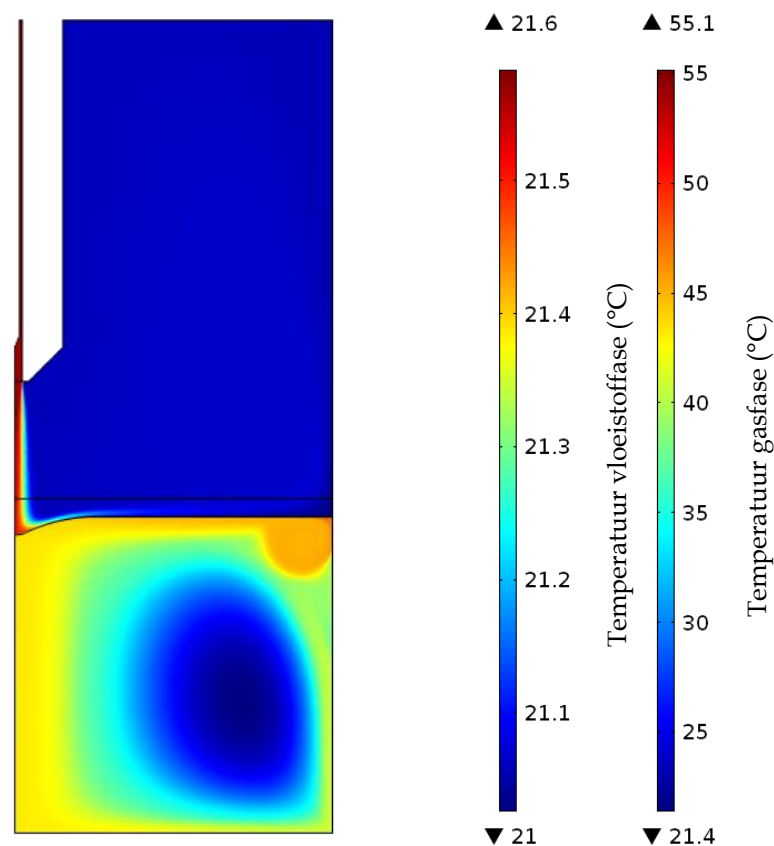
**Figuur 23:** Links: geometrie van het gebruikte model, ter herhaling. Rechts: snelheidsprofiel in het model bij conditie E uit Tabel 9. De kleur geeft de grootte van de snelheid aan, terwijl de pijlen de richting aangeven.

In ons model zijn duidelijk gevormde vortices in de vloeistof zichtbaar, terwijl dit in Lindsay *et al* niet wordt opgemerkt. Hefny *et al*<sup>131</sup> hebben de stroming in de vloeistof in een beker bij een helium gasstroom van 1,4 slm experimenteel bepaald (zie *Appendix A.3.1*). Zij toonden aan dat de vloeistof aan het oppervlak in dezelfde richting als het gas beweegt en dat er vortices gevormd worden onder het oppervlak. Dit is in overeenstemming met het snelheidsprofiel in ons model.

### Temperatuurprofiel

In de modellen gebruikt voor deze thesis stijgt de temperatuur van de vloeistof met 1 à 2 °C (zie *Figuur 24*). In hetzelfde artikel van Lindsay *et al*<sup>87</sup> wordt ook het temperatuurprofiel in het model besproken. Hierin wordt er een daling van de temperatuur van de vloeistof met 10 K gerapporteerd. Belangrijk om op te merken is dat in ons model de temperatuur van het plasma 33 °C hoger ligt dan de initiële temperatuur van de gas- en vloeistoffase, gebaseerd op het werk van Schmidt-Bleker *et al*<sup>114</sup>, waarbij ook de kINPen bestudeerd wordt. Bij Lindsay *et al* wordt de temperatuur van het plasma echter op kamertemperatuur gehouden. Zij vermelden dat als de opwarming van het gas door het plasma belangrijk is, er experimenteel eventueel een lichte stijging van de temperatuur van de vloeistof kan plaatsvinden. Dit komt dus kwalitatief overeen met de resultaten uit ons model. Of de temperatuur van de vloeistof effectief stijgt of daalt tijdens een plasmabehandeling kan in een experiment redelijk eenvoudig nagegaan worden. Dit werd in

deze thesis niet uitgevoerd, maar zou in de toekomst waardevolle informatie kunnen opleveren voor het verder uitbouwen van het model.



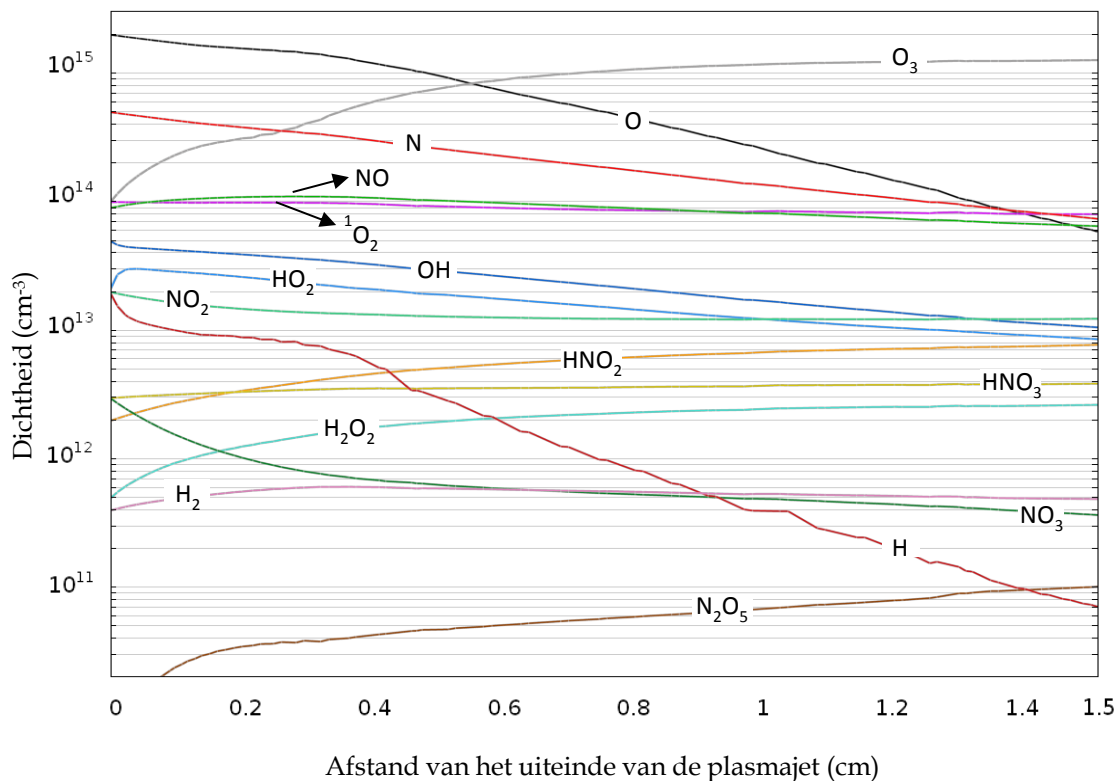
**Figuur 24:** Temperatuurprofiel in zowel de gas- als de vloeistoffase bij een initiële temperatuur van het gas en de vloeistof van 21 °C. De temperatuur van het plasma is 54 °C.

### *Dichtheidsprofielen in de gasfase*

Zoals vermeld worden voor de plasmadeeltjes aan de uitlaat van de plasmajet, en dus het begin van de effluent, de concentraties uit het werk van Schmidt-Bleker *et al*<sup>114</sup> genomen. Voor ons model is het belangrijk dat ook de gasfase gevalideerd wordt, aangezien de concentraties van de deeltjes die in de vloeistof terechtkomen rechtstreeks afhankelijk zijn van de concentraties in de gasfase (via de Henryconstante). In het werk van Schmidt-Bleker *et al* worden de concentraties in functie van de tijd (berekend met een 0D-model) weergegeven (zie [Appendix A.3.2](#)). Met behulp van ons model kunnen de dichtheidsprofielen van de verschillende deeltjes vanaf het uiteinde van de plasmajet tot het vloeistofoppervlak uitgezet worden in 1D, in functie van de afstand tot de uitlaat van de plasmajet (zie [Figuur 25](#)). Vermits het snelheidsprofiel gekend is, kunnen we de dichtheidsprofielen in functie van de tijd (zoals berekend in een 0D-model) vertalen naar dichtheidsprofielen in functie van de afstand. Hierdoor kan er rechtstreeks vergeleken worden met de dichtheidsprofielen in het artikel van Schmidt-Bleker *et al*<sup>114</sup>. Hierin wordt een gasdebiet van 3 slm gebruikt, waardoor er vergeleken wordt met conditie F uit [Tabel 9](#).

De dichtheidsprofielen komen zeer goed overeen met wat Schmidt-Bleker rapporteerde, hoewel wij maar een beperkt aantal reacties beschouwen (typisch veel minder dan in een 0D-model).

Hierdoor kunnen we concluderen dat de gasfase juist gesimuleerd wordt, wat alvast een noodzakelijke voorwaarde is om ook betrouwbare resultaten in de gesimuleerde vloeistoffase te bekomen.



**Figuur 25:** Weergave van de profielen van de dichtheid van alle deeltjes vanaf het uiteinde van de plasmajet tot op het vloeistofoppervlak ter vergelijking met de resultaten gerapporteerd in Schmidt-Bleker *et al*<sup>114</sup> (zie *Appendix A.3.2*).

### 5.1.3 Besluit over de validatie van het model

Bij de vergelijking tussen de experimenten en het model worden zowel goede als minder goede overeenkomsten opgemerkt. In *Tabel 15* wordt hiervan een samenvatting gegeven. Bovendien worden er in de literatuur overeenkomsten gevonden met het model wat betreft het snelheidsprofiel, de temperatuur en de concentraties in de gasfase. Ondanks het feit dat het model nog niet volledig op punt staat, wordt het toch voldoende realistisch beschouwd om reeds enkele verdere effecten mee te bestuderen. Deze uitgebreide computationele studie wordt in het volgende deel besproken.

**Tabel 15:** Samenvattende tabel van de overeenkomsten tussen de experimenten en de simulaties. Voor parameters waarvoor min of meer een overeenkomst verkregen is, staat een vinkje in de kolom van het deeltje waarvoor die overeenkomst geldt.

	$\text{NO}_2$	$\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{O}$	$\text{O}_3$
Relatieve concentratie t.o.v. andere deeltjes	✓		✓	✓
Effect van de plasmabehandelingstijd	(✓)			
Effect van de gap		✓	✓	✓
Effect van het gasdebiet		✓	✓	✓

## 5.2 Uitgebreide computationele studie

### 5.2.1 Effect van de temperatuur

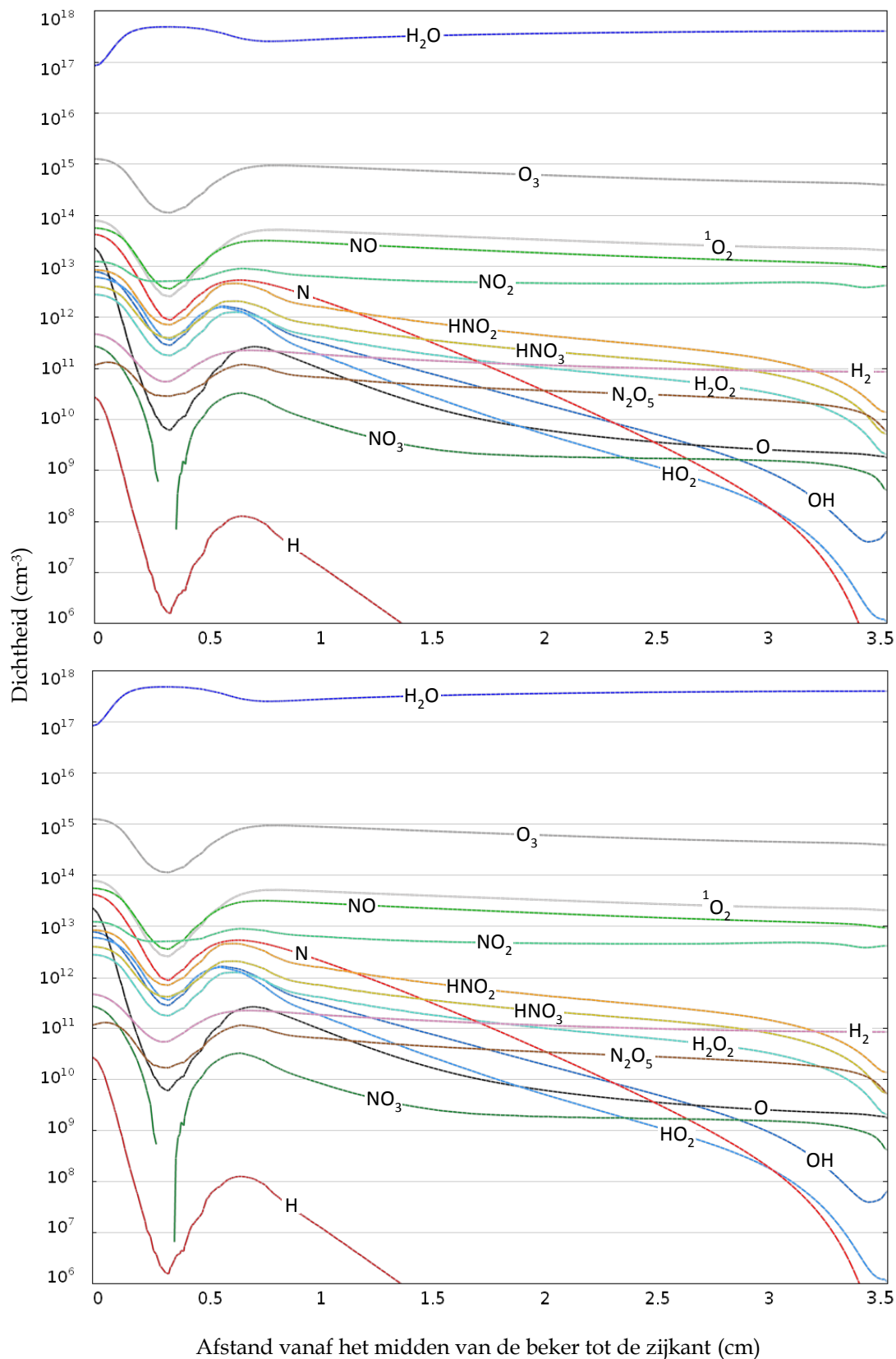
Om te bekijken of de temperatuur een grote invloed heeft op de concentraties van de deeltjes in de vloeistof worden er simulaties uitgevoerd waarbij de initiële temperatuur van de gas- en vloeistoffase 16 °C of 26 °C is in plaats van de 21 °C gebruikt in alle andere simulaties. Uit deze resultaten kan geconcludeerd worden dat deze kleine schommelingen in de temperatuur volgens het model geen invloed hebben op de concentraties van de deeltjes in de vloeistof (de gegevens worden daarom niet expliciet getoond).

### 5.2.2 Effect van de waterlaag boven het vloeistofoppervlak

Om het effect van de extra reacties met H<sub>2</sub>O in Tabel 10 te bestuderen, worden de concentraties van een aantal deeltjes in de vloeistof vergeleken bij conditie E uit Tabel 9 met of zonder deze extra reacties. Verwacht wordt, dat als de reacties met water boven het vloeistofoppervlak een rol spelen, de concentraties van enkele belangrijke deeltjes in de vloeistof zullen veranderen, aangezien de concentraties net boven het vloeistofoppervlak (net daar waar de waterlaag zich bevindt) bepalend zijn voor de hoeveelheid deeltjes die de vloeistof binnenkomen. Het model voorspelt echter dat de concentraties van alle deeltjes in de vloeistoffase onveranderd blijven na het toevoegen van deze extra reacties met water aan de reactieset. Enkel de concentratie van N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in de vloeistof daalt met een factor 1,5. Dit wordt geacht het gevolg te zijn van het feit dat er slechts weinig reacties in de gas- en vloeistoffase geïmplementeerd zijn die N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bevatten. Voor alle andere deeltjes waren er reeds meerdere reacties geïmplementeerd in het model en het is duidelijk dat deze extra reacties met H<sub>2</sub>O niet belangrijk zijn voor de productie of het verlies van deze deeltjes.

We kunnen ook het effect van de waterlaag bekijken om de dichtheidsprofielen van de verschillende deeltjes net boven het oppervlak (zie Figuur 26). Immers, zoals vermeld worden de concentraties in de vloeistof bepaald door de concentraties in de gasfase net boven de interface. Ook hier kan gezien worden dat de concentraties van de deeltjes niet veranderen door het toevoegen van deze extra reactieset. Er kan dus besloten worden dat met dit model de waterlaag boven het vloeistofoppervlak door het verdampen van een deel van het water geen rol speelt bij het vormen van de plasmagegenereerde deeltjes. In Bruggeman *et al*<sup>71</sup> wordt nochtans gesteld dat deze waterlaag zeer belangrijk is bij plasma-vloeistofinteracties. Men kan zich echter de vraag stellen of deze aan water oververzadigde laag nog wel als gasfase beschouwd kan worden. De extra reacties die toegevoegd zijn, zijn allemaal reacties die in de gasfase plaatsvinden. Aangezien er een hoge concentratie water aanwezig is net boven het oppervlak, zou het kunnen dat er ook reacties kunnen gebeuren die eigenlijk in water als solvent optreden (reacties nr 58 tot 91 uit Tabel 8). Misschien kan in de toekomst deze interface als een extra fase beschouwd worden, waarin bv.

wel ionen aanwezig kunnen zijn en ook reacties die in water gebeuren toegevoegd worden. In het huidige model kan de extra reactieset echter verwaarloosd worden.



**Figuur 26:** Dichtheidsprofielen van de deeltjes net boven het vloeistofoppervlak, in functie van de afstand vanaf het midden van de beker tot de zijkant. Boven: standaard reactieset, onder: met toegevoegde reactieset voor  $H_2O$ -reacties. De daling van de dichtheden tussen 0 en 0,5 cm is te wijten aan het bestaan van het kuiltje in het midden van de vloeistof waardoor de dichtheden daar niet net boven het oppervlak, maar een beetje hoger beschouwd worden. Er wordt geen verschil opgemerkt in de concentraties van de deeltjes bij het toevoegen van de extra reactieset, behalve voor  $N_2O_5$ .

### 5.2.3 Effect van de luchtvochtigheid

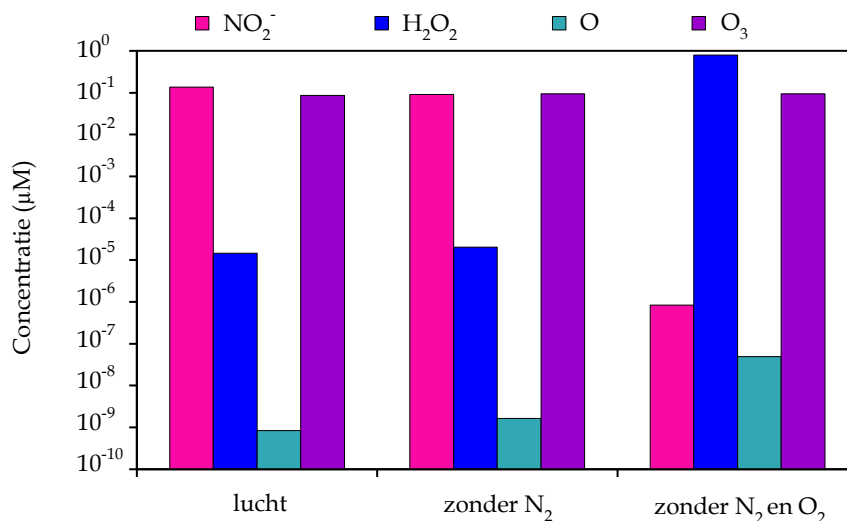
In het standaardmodel worden de inlaatconcentraties genomen uit het werk van Schmidt-Bleker *et al*<sup>114</sup>, waarbij droge lucht beschouwd wordt. De luchtvochtigheid wordt geacht een zeer grote rol te spelen voor het vormen van de reactieve deeltjes. Daarom wordt er een simulatie uitgevoerd (met de uitgebreide H<sub>2</sub>O-reeks) waarbij er een dichtheid van  $2 \times 10^{12} \text{ cm}^{-3}$  van H<sub>2</sub>O aan de inlaat wordt toegevoegd, wat overeenkomt met een relatieve vochtigheid van 50 %<sup>77</sup>. Deze toevoeging blijkt geen invloed te hebben op de resultaten. De concentraties van de deeltjes in de gasfase, en dus ook die in de vloeistoffase, veranderen niet (grafieken weergegeven in *Appendix A.4*). Dit lijkt op het eerste zicht een ietwat vreemd resultaat, aangezien dat zou betekenen dat de luchtvochtigheid geen invloed heeft op de vorming van reactieve deeltjes. Hierbij moet benadrukt worden dat de concentraties van alle andere deeltjes in de inlaat op dezelfde waarde gehouden worden. Dit betekent enkel dat de luchtvochtigheid geen invloed heeft op de reacties in de effluent. Het grote effect van de luchtvochtigheid is waarschijnlijk volledig van toepassing op de ontlading van het plasma zelf en vooral in de *afterglow*, waar nog elektron-impactreacties plaatsvinden. Aangezien de plasma-ontlading en elektron-impactreacties in de *afterglow* in het model niet beschouwd worden, kan het effect van de luchtvochtigheid niet rechtstreeks bestudeerd worden. Hiervoor zouden voor alle deeltjes aangepaste inlaatconcentraties genomen moeten worden, berekend met bv. een 0D-model.

### 5.2.4 Effect van N<sub>2</sub> en O<sub>2</sub> uit de lucht

In *Figuur 27* zijn de resultaten weergegeven voor het effect van het verwijderen van de N<sub>2</sub> en/of O<sub>2</sub> uit de omringende lucht op de concentraties van de deeltjes in de vloeistof. Hiervoor worden de hypothetische situaties gesimuleerd waarbij de concentratie van respectievelijk enkel N<sub>2</sub> of zowel N<sub>2</sub> als O<sub>2</sub> in de omgevingslucht op nul gezet worden, terwijl alle andere eigenschappen constant gehouden worden (bv. ook de inlaatconcentraties van N<sub>2</sub> en O<sub>2</sub>). Deze simulaties dienen om een inzicht te krijgen in het belang van de verschillende chemische processen die optreden en ze kunnen ook gerelateerd worden aan experimenten in een opstelling die afgeschermd is van de omgevingslucht, voor een gecontroleerde atmosfeer.

Bij het verwijderen van de N<sub>2</sub> uit de lucht, daalt de concentratie van NO<sub>2</sub> met 34 % en stijgt die van H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> met 39 %. De concentratie van O verdubbelt en die van O<sub>3</sub> stijgt met 10 %. Als vervolgens ook de O<sub>2</sub> uit de lucht verwijderd wordt, veranderen de concentraties drastisch. De concentratie van NO<sub>2</sub> daalt 5 grootteordes, die van H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stijgt bijna 6 grootteordes, de concentratie van O stijgt met bijna 1,5 grootteorde, terwijl die van O<sub>3</sub> zo goed als constant blijft (< 1 % verandering).





**Figuur 27:** Computacioneel bekomen resultaten voor het effect van het verwijderen van N<sub>2</sub> en/of O<sub>2</sub> uit de lucht op de concentraties van NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O en O<sub>3</sub> in de vloeistof.

Voor een verklaring van deze bevindingen moet er eerst gekeken worden naar de dichtheidsprofielen van de verschillende deeltjes in de gasfase in de drie gevallen (zie [Figuur 28](#)). De concentratie van HNO<sub>2</sub> in de gasfase daalt lichtjes bij het verwijderen van N<sub>2</sub> uit de lucht. Bij het extra wegnemen van O<sub>2</sub> uit de lucht, daalt de concentratie van HNO<sub>2</sub> ook zeer lichtjes, maar niet in die mate dat de daling van 5 grootteordes in de vloeistof verklaard kan worden. De concentraties H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en O<sub>3</sub> blijven constant in de gasfase, waardoor voor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de grote stijging in concentratie in de vloeistof bij het verwijderen van N<sub>2</sub> en O<sub>2</sub> uit de lucht niet verklaard kan worden. De concentratie van O stijgt met een halve grootteorde bij het wegnemen van N<sub>2</sub> en nog eens met meer dan 1,5 grootteorde bij het extra wegnemen van O<sub>2</sub> uit de lucht, omdat er minder deeltjes aanwezig zijn om mee te botsen en weg te reageren. De concentraties van de besproken deeltjes in de vloeistoffase zijn uiteraard niet enkel afhankelijk van hun respectievelijke concentraties in de gasfase, maar ook van hun productie in de vloeistoffase zelf. In [Tabel 16](#) worden voor elk deeltje de belangrijkste productie- en verliesreacties in de vloeistoffase weergegeven. Als de N<sub>2</sub> uit de lucht verwijderd wordt, blijven deze reacties dezelfde, maar zonder N<sub>2</sub> en O<sub>2</sub> zijn er voor sommige deeltjes andere reacties belangrijk voor de vorming en het verlies.

Voor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hangt de vorming in de vloeistoffase af van HO<sub>2</sub> en O<sub>2</sub><sup>-</sup>, die via de pKa met elkaar in evenwicht staan. Zonder N<sub>2</sub> en O<sub>2</sub> in de lucht kan in de concentratieprofielen gezien worden dat de concentratie HO<sub>2</sub> in de gasfase stijgt, waardoor de stijging van H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deels verklaard kan worden. Het verlies van H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is bijna volledig afhankelijk van de concentratie van NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Aangezien NO<sub>2</sub><sup>-</sup> meer aanwezig is in de vloeistof, zal deze reactie normaal zeer snel gebeuren. Echter, als zowel N<sub>2</sub> en O<sub>2</sub> uit de lucht weggenomen zijn, daalt de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> concentratie (zie ook hieronder), en dus ook de rol van het belangrijkste verliesproces van H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in de vloeistoffase, waardoor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dichtheid stijgt.

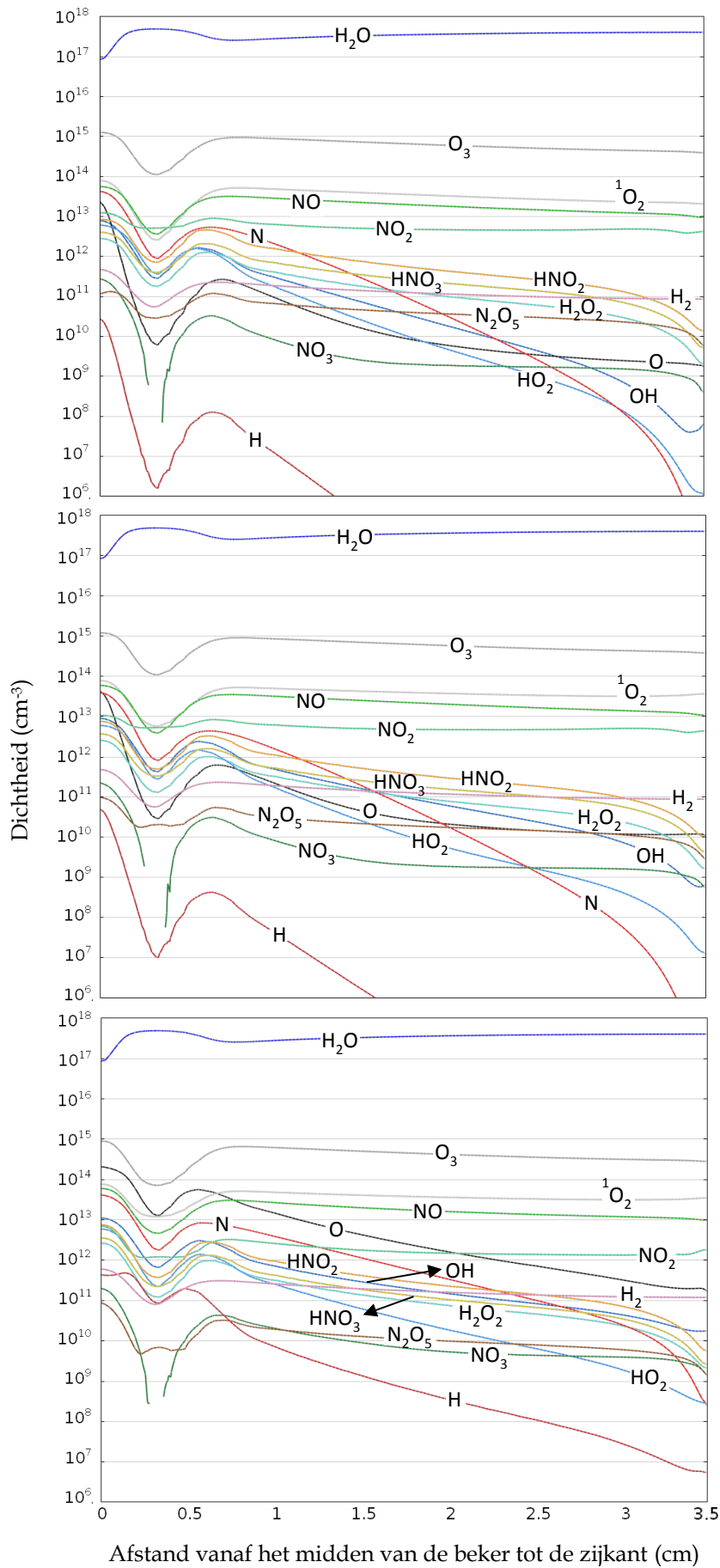
**Tabel 16: Belangrijkste productie- en verliesreacties in de vloeistoffase voor NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en O<sub>3</sub>. Boven: simulatie met lucht en na verwijderen van N<sub>2</sub>. Onder: simulatie na verwijderen van N<sub>2</sub> en O<sub>2</sub>. O wordt niet gevormd in de vloeistoffase. De nummers verwijzen naar de nummers van de reacties uit Tabel 8.**

Deeltje	Belangrijkste productiereacties	Nr	Belangrijkste verliesreacties	Nr
<i>Lucht en zonder N<sub>2</sub></i>				
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO + OH → NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + H <sup>+</sup>	81	O <sub>3</sub> + NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> → O <sub>2</sub> + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	70
	NO <sub>2</sub> + NO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O → H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> + NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	85		
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	HO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O + O <sub>2</sub> <sup>-</sup> → O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + OH <sup>-</sup>	77	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> → OONO <sup>-</sup> + H <sub>2</sub> O	78
O <sub>3</sub>	O + O <sub>2</sub> → O <sub>3</sub>	67	O <sub>3</sub> + NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> → O <sub>2</sub> + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	70
O	/		O + H <sub>2</sub> O → OH + OH	66
Deeltje	Belangrijkste productiereacties	Nr	Belangrijkste verliesreacties	Nr
<i>Zonder N<sub>2</sub> en O<sub>2</sub></i>				
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> + NO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O → H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> + NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> + H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	85	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> → OONO <sup>-</sup> + H <sub>2</sub> O	78
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	HO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O + O <sub>2</sub> <sup>-</sup> → O <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + OH <sup>-</sup>	77	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> → OONO <sup>-</sup> + H <sub>2</sub> O	78
			OH + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> → H <sub>2</sub> O + HO <sub>2</sub>	75
O <sub>3</sub>	O + O <sub>2</sub> → O <sub>3</sub>	67	O <sub>3</sub> + NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> → O <sub>2</sub> + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	70
			O <sub>3</sub> + O <sub>3</sub> + OH <sup>-</sup> → O <sub>2</sub> + O <sub>2</sub> + HO + O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	69
O	/		O + H <sub>2</sub> O → OH + OH	66

Vervolgens wordt de vorming van NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in de vloeistof bekeken. Die is afhankelijk van NO, OH en NO<sub>2</sub>. Bij het wegnemen van zowel N<sub>2</sub> als O<sub>2</sub> uit de lucht treedt de reactie van NO met OH niet meer op. De concentratie van NO blijft nochtans ongewijzigd bij het extra wegnemen van de O<sub>2</sub>, die van OH stijgt en die van NO<sub>2</sub> daalt, dus dat verklaart niet waarom deze reactie niet meer belangrijk is. De verklaring kan gevonden worden in de reacties voor het verlies van NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Zonder N<sub>2</sub> en O<sub>2</sub> wordt dit verlies afhankelijk van de concentratie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Omdat er door de stijging in HO<sub>2</sub> meer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aanwezig is, wordt deze reactie ook voor NO<sub>2</sub><sup>-</sup> plots zeer belangrijk. Hierdoor wordt er een soort van omslagpunt bereikt waarbij er veel meer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en veel minder NO<sub>2</sub><sup>-</sup> aanwezig zal blijven. Dit verklaart de grote daling en stijging in de concentratie van respectievelijk NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bij het verwijderen van zowel N<sub>2</sub> als O<sub>2</sub>.

Voor O<sub>3</sub> is de vorming afhankelijk van O, deze concentratie stijgt bij het wegnemen van de N<sub>2</sub> uit de lucht, waardoor ook de concentratie van O<sub>3</sub> lichtjes stijgt. Bij het extra wegnemen van de O<sub>2</sub> uit de lucht, stijgt de concentratie van O ook, maar blijft de concentratie van O<sub>3</sub> constant. Dit komt doordat de vorming van O<sub>3</sub> ook afhankelijk is van de concentratie O<sub>2</sub>, waardoor de productie afneemt. Bij het extra wegnemen van O<sub>2</sub> uit de lucht komt er voor O<sub>3</sub> ook een belangrijke verliesreactie bij. Dit is enkel te wijten aan het feit dat de oorspronkelijke verliesreactie van O<sub>3</sub> afhankelijk is van de concentratie van NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Doordat dit laatste deeltje veel minder aanwezig is, zal die verliesreactie minder optreden, waardoor beide verliesreacties nu even belangrijk worden. Het verlies neemt af, maar de productie ook, waardoor de concentratie van O<sub>3</sub> constant blijft.

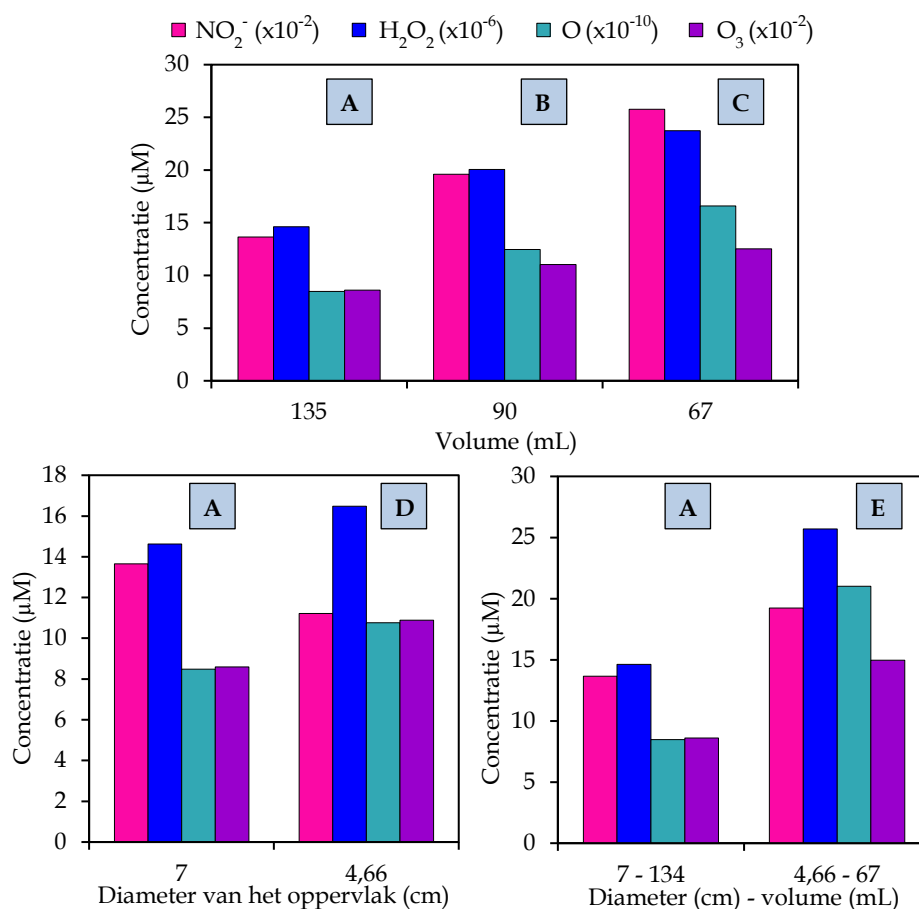
O wordt niet gevormd in de vloeistoffase en het verlies ervan is afhankelijk van de concentratie van O zelf en die van H<sub>2</sub>O. Daarom zal de concentratie van O in de vloeistof in principe enkel afhankelijk zijn van de concentratie O die vanuit de gasfase in de vloeistof terechtkomt. Deze stijgt in beide gevallen, waardoor de stijging in de concentratie van O verklaard kan worden.



**Figuur 28:** Dichtheidsprofielen van de deeltjes net boven het vloeistofoppervlak. Boven: lucht, midden: zonder  $\text{N}_2$ , onder: zonder  $\text{N}_2$  en  $\text{O}_2$ . De daling van de dichtheden tussen 0 en 0,5 cm is te wijten aan het bestaan van het kuiltje in het midden van de vloeistof waardoor de dichtheden daar niet net boven het oppervlak, maar iets hoger beschouwd worden.

### 5.2.5 Effect van vloeistofvolume en –oppervlak

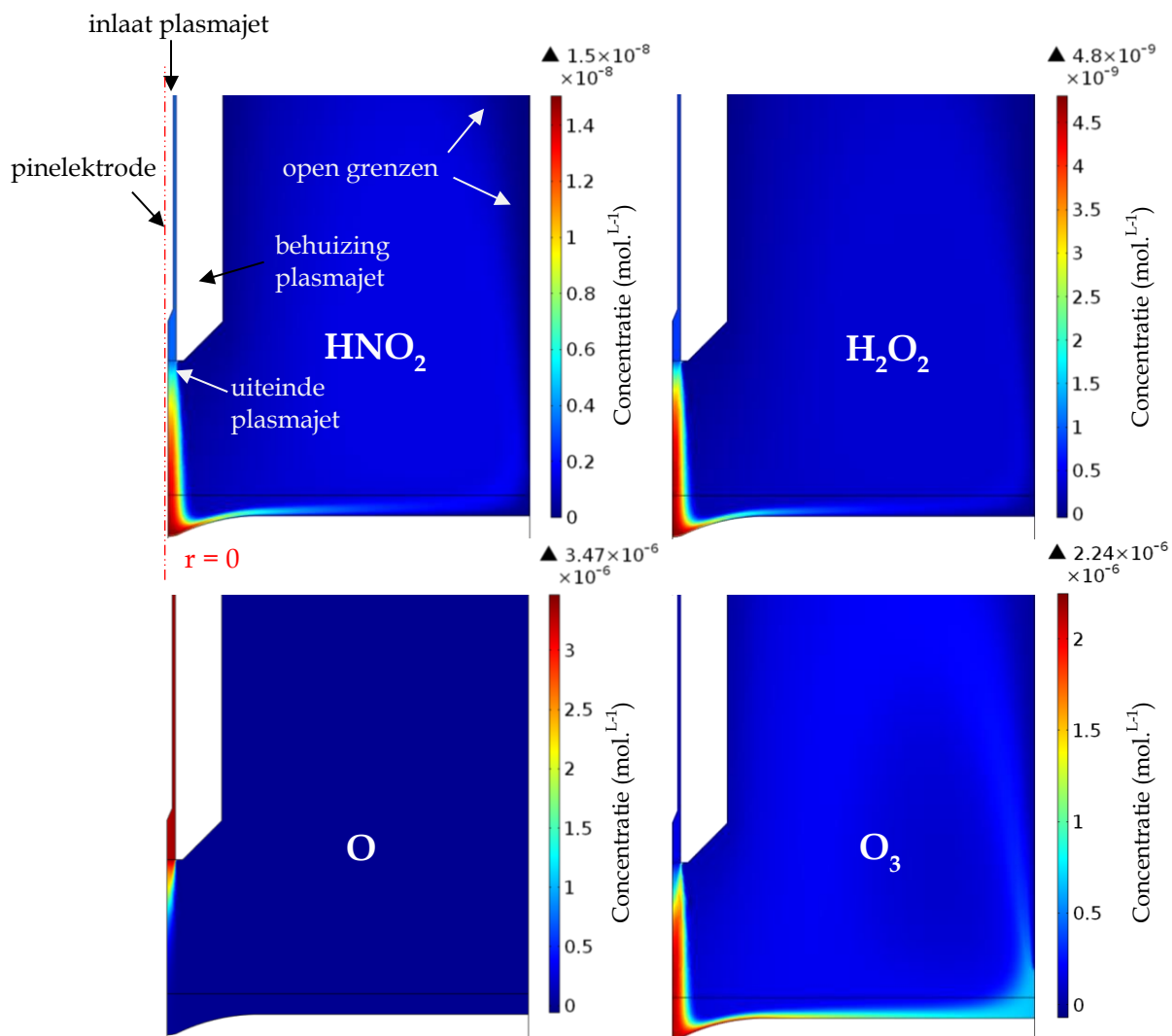
Er worden verschillende geometrieën van bekere gesimuleerd (zie Figuur 11) om te bestuderen wat het effect van het volume en de grootte van het vloeistofoppervlak is op de concentraties van de deeltjes in de vloeistof. In Figuur 29 (boven) wordt het effect van het volume getoond, waarbij de oppervlakte van de vloeistof constant blijft (bekers A-B-C). Een praktisch voorbeeld hiervan is wanneer een kleiner volume in eenzelfde beker/well behandeld wordt. Hier wordt gezien dat een kleiner volume resulteert in een hogere concentratie voor alle deeltjes. Dit kan verklaard worden doordat het oppervlak van de vloeistof niet verandert en er dus evenveel deeltjes de vloeistof kunnen binnenkomen vanuit de gasfase. Aangezien het totale volume waarin de deeltjes zich bevinden kleiner is, zal de concentratie hoger zijn.



**Figuur 29:** Computationeel verkregen resultaten voor het effect van oppervlakte en het volume van de behandelde vloeistof op de concentraties  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}$  en  $\text{O}_3$  in de vloeistof. Boven: effect van het verkleinen van het volume, waarbij het vloeistofoppervlak constant blijft. Linksonder: effect van het verkleinen van het oppervlak waarbij het totale volume constant blijft. Rechtsonder: effect van het verkleinen van het oppervlak, waarbij het totale volume ook verkleint. De letters staan voor de bekere uit Figuur 11.

Vervolgens wordt het effect bestudeerd van het veranderen van de grootte van het vloeistofoppervlak wanneer het totale volume hetzelfde blijft (zie Figuur 29, linksonder). Het behandelen van hetzelfde volume in een kleinere beker/well is hiervan een voorbeeld. Hier zien we dat de concentratie van  $\text{NO}_2^-$  daalt bij het verkleinen van de oppervlakte, maar dat die van  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}$  en  $\text{O}_3$  stijgen. Om dit te verklaren is het nodig te kijken naar alle deeltjes die de

concentratie van  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , O en  $\text{O}_3$  in de vloeistof bepalen. Zoals reeds vermeld zijn de respectievelijke concentraties in de gasfase belangrijk (weergegeven in [Figuur 30](#)), alsook de concentraties van de deeltjes die belangrijk zijn voor de vorming van  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , O en  $\text{O}_3$  in de vloeistof. Ook de concentratie van deze vormingsdeeltjes in de vloeistof is afhankelijk van de concentratie van dat deeltje in de gasfase. Aangezien deze simulaties in lucht gebeuren, zijn de belangrijkste reacties te vinden in het bovenste deel van [Tabel 16](#).



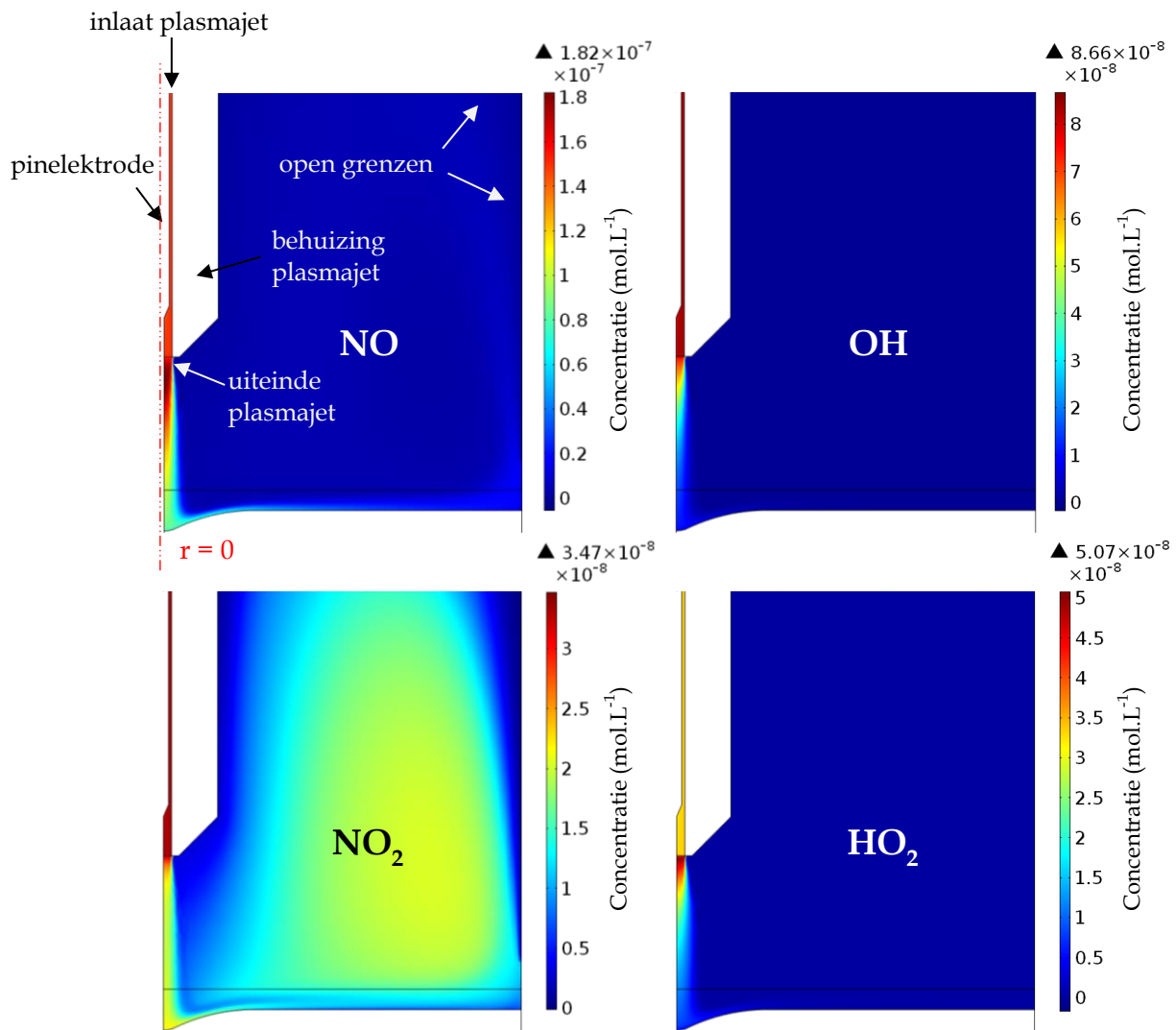
**Figuur 30:** Concentratieprofielen van  $\text{HNO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , O en  $\text{O}_3$  in de gasfase, bij conditie E uit [Tabel 9](#).

De vorming van  $\text{NO}_2^-$  is afhankelijk van de concentratie van NO, OH en  $\text{NO}_2$  in de vloeistoffase. Die van  $\text{H}_2\text{O}_2$  is afhankelijk van de concentraties  $\text{HO}_2$  en  $\text{O}_2^-$  (die met elkaar in evenwicht staan volgens de pKa) en de vorming van  $\text{O}_3$  in de vloeistof is afhankelijk van de concentratie O. Ook  $\text{H}_2\text{O}$  en  $\text{O}_2$  zullen voor respectievelijk  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{O}_3$  deeltjes mee de vorming bepalen, maar aangezien deze in de gasfase in veel hogere concentraties aanwezig zijn dan de andere belangrijke deeltjes, en dus steeds in overmaat aanwezig zijn, worden deze hier buiten beschouwing gelaten. Uit [Figuur 30](#) en [Figuur 31](#) blijkt dat zowel  $\text{HNO}_2$  als de deeltjes die  $\text{NO}_2^-$  vormen in de vloeistoffase (NO en  $\text{NO}_2$ ) zich over de gehele oppervlakte van de vloeistof bevinden. De concentratie van  $\text{NO}_2^-$  in de vloeistof zal dus kleiner worden als de oppervlakte verkleint. In

**Figuur 30** zien we dat  $\text{H}_2\text{O}_2$  zich ook over de gehele oppervlakte van de vloeistof bevindt, maar  $\text{HO}_2$  niet. Aangezien de concentratie van  $\text{H}_2\text{O}_2$  niet daalt bij het verkleinen van de oppervlakte zou gedacht kunnen worden dat de concentratie  $\text{H}_2\text{O}_2$  meer afhankelijk is van de vorming van  $\text{H}_2\text{O}_2$  in de vloeistof dan van de concentratie die vanuit de gasfase binnenkomt. Dit is echter zeer onwaarschijnlijk, aangezien  $\text{H}_2\text{O}_2$  een grote Henryconstante heeft en het evenwicht bijgevolg sterk richting de vloeistoffase ligt. Een andere en meer waarschijnlijke verklaring kan gevonden worden in het feit dat het verlies van  $\text{H}_2\text{O}_2$  afhankelijk is van de concentratie van  $\text{NO}_2^-$ . Aangezien deze laatste daalt, reageert er minder  $\text{H}_2\text{O}_2$  weg, waardoor de concentratie hoger is. Doordat we weten dat het verlies van  $\text{H}_2\text{O}_2$  in de vloeistoffase overschat wordt, is het mogelijk dat het effect van het vloeistofoppervlak op de concentratie  $\text{H}_2\text{O}_2$  niet juist gesimuleerd wordt. Aangezien  $\text{H}_2\text{O}_2$  zich als relatief langlevend deeltje over de gehele oppervlakte van de vloeistof bevindt, is het niet onwaarschijnlijk dat de concentratie ervan zou dalen bij een kleiner oppervlak.

De concentratie van O in de vloeistof is enkel afhankelijk van de concentratie O die binnenkomt vanuit de gasfase. Aangezien O zich enkel in het midden boven het vloeistofoppervlak bevindt, zal er dus geen effect van het verkleinen van het oppervlak te merken zijn. De stijging in de concentratie van O bij het verkleinen van het oppervlak is mogelijk te wijten aan het feit dat de O-atomen die in de vloeistof aanwezig zijn minder kans hebben om terug naar de gasfase te bewegen. De Henryconstante van O is zeer laag, waardoor het evenwicht van de concentratie richting de gasfase ligt. Echter, de concentratie aan O is in het algemeen zeer laag, waardoor er ondanks de grote stijging van de concentratie nog steeds een erg lage concentratie aan O in de vloeistof aanwezig is en het trekken van conclusies met de nodige voorzichtigheid moet gebeuren. Voor  $\text{O}_3$  geldt dat de concentratie over de gehele oppervlakte in de gasfase relatief hoog is. Het deeltje dat belangrijk is voor de vorming van  $\text{O}_3$ , nl. O, bevindt zich enkel in het midden van het oppervlak en zal dus geen invloed uitoefenen op de concentratie van  $\text{O}_3$  bij het verkleinen van het oppervlak. De stijging in de concentratie van  $\text{O}_3$  kan verklaard worden door het feit dat een kleiner oppervlak verhindert dat de  $\text{O}_3$  terug in de gasfase terechtkomt. Zeker omdat  $\text{O}_3$  een kleine Henryconstante heeft, zal het effect van het tegenhouden van  $\text{O}_3$  richting de gasfase hier belangrijker zijn dan het verminderen van de hoeveelheid die binnenkomt vanuit de gasfase.

Tenslotte worden in **Figuur 29** (rechtsonder) de resultaten getoond waarbij zowel het oppervlak als het volume van de beker gereduceerd worden. Hier wordt gezien dat alle concentraties stijgen bij een kleiner volume. Dit betekent voor  $\text{NO}_2^-$  dat het volume een grotere invloed heeft op de concentratie dan de oppervlakte, want voor dit deeltje hebben het veranderen van het volume en van de grootte van het oppervlak een tegengesteld effect. Voor de andere deeltjes hebben het oppervlak en het volume een gelijkaardig effect dus daar kan niets gezegd worden over welke invloed overheersend is.



Figuur 31: Concentratieprofielen van NO, OH, NO<sub>2</sub> en HO<sub>2</sub> in de gasfase bij conditie E uit Tabel 9.

Uiteraard moet er de kanttekening gemaakt worden dat het hier over relatief grote dimensies gaat. In de praktijk wordt de vloeistof steeds behandeld in een wellplaat in niet in een beker. Een well is veel kleiner dan een beker, waardoor het zou kunnen dat vooral het effect van de grootte van het oppervlak anders kan zijn. Hier wordt opgemerkt dat de concentraties H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O en O<sub>3</sub> groter worden bij een kleiner oppervlak, maar als het oppervlak heel klein wordt, kan het zijn dat deze bevinding niet meer geldt. Het simuleren van kleinere dimensies is momenteel nog niet mogelijk met het model door de lange rekentijden. Dit zou in principe opgelost worden door grotere tijdstappen te nemen, maar dat benadeelt snelle processen en/of kleine dimensies, waardoor convergentie zeer moeilijk bereikt kan worden. Er wordt verwacht dat dit na een verder optimalisatie van het model wel mogelijk wordt.

In het artikel van Yan *et al*<sup>61</sup> wordt gerapporteerd dat de concentraties van RNS en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalen bij een toenemend volume. Dat is in overeenstemming met onze resultaten. In dit werk wordt eveneens aangetoond dat de grootte van de wells waarin PAM behandeld wordt een invloed heeft op de celdood. Hoe groter de well, hoe meer celdood er verkregen wordt bij hetzelfde behandelde volume van PAM. Dit betekent dat de concentraties van de deeltjes toenemen bij een



grotere well. In deze thesis wordt voor  $\text{NO}_2^-$  hetzelfde resultaat verkegen, echter de concentratie van  $\text{H}_2\text{O}_2$  (dat de belangrijkste rol blijkt de spelen voor de celdood, zie *sectie 4.2*) daalt bij een grotere oppervlakte in onze simulaties. Dit kan eventueel te wijten zijn aan het hierboven beschreven feit dat bij wells kleinere dimensies gelden en dat tot andere effecten leidt. Meer waarschijnlijk komt dit door de overschatting van het verlies van  $\text{H}_2\text{O}_2$ , waardoor het effect van het vloeistofoppervlak op de concentratie  $\text{H}_2\text{O}_2$  in de vloeistof in het model waarschijnlijk nog niet juist berekend wordt.

## 6. Conclusie

### 6.1 Conclusie

In deze thesis werd het effect van plasmabehandelde vloeistoffen onderzocht op drie niveaus, nl. op de chemische samenstelling van plasmabehandelde PBS (pPBS), op de viabiliteit van drie kankercellijnen (U251, LN229 en U87) na toediening van pPBS en in een computationele studie. Dit onderzoek werd opgesplitst in twee luiken, waarbij in het eerste luik de concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  in de pPBS enerzijds en het effect van pPBS op de viabiliteit van de kankercellen anderzijds vergeleken werden. In het tweede luik werd het ontwikkelde model gevalideerd aan de hand van enkele experimenten en werd er een uitgebreide computationele studie uitgevoerd.

#### 6.1.1 Conclusie over de experimentele studie

Voor de vergelijking tussen de chemische samenstelling van pPBS en het effect van pPBS op de viabiliteit van kankercellen werden eerst de effecten van het gasdebiet, de gap en de plasmabehandelingstijd bestudeerd. Het verhogen van het gasdebiet zorgt voor een daling van de concentratie  $\text{NO}_2^-$  en een stijging van de concentratie  $\text{H}_2\text{O}_2$  en van de celdood. Een vergroting van de gap zorgt voor een daling van de concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  en van de celdood. Zowel de concentraties  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  als de celdood volgen een quasi lineair verloop met de behandelingstijd. Uit de verschillende effecten kan geconcludeerd worden dat wellicht  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en niet  $\text{NO}_2^-$ , het belangrijkste deeltje is voor de anti-kankerwerking van pPBS.

Daarnaast werd ook de stabiliteit van pPBS bij kamertemperatuur onderzocht. Hieruit blijkt dat de concentraties van  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  constant blijven in pPBS gedurende minstens 2 uur. Als de pPBS aan celmedium wordt toegevoegd, blijft de concentratie  $\text{NO}_2^-$  ook constant voor minstens 2 uur. De concentratie  $\text{H}_2\text{O}_2$  kon in dit geval niet bepaald worden door overmatige schuimvorming bij het schudden van de oplossing, wat nodig was voor de analyse. Bij het toevoegen aan de kankercellen blijkt de pPBS zelf wel effectief tot 2 uur na de behandeling, maar de pPBS in celmedium niet. Hieruit kan geconcludeerd worden dat pPBS wellicht een beter opslagmiddel is voor plasmadeeltjes dan het celmedium zelf, omdat de plasmadeeltjes reageren met de organische moleculen die aanwezig zijn in het celmedium en zo de plasmabehandelde vloeistof zijn anti-kankerwerking deels verliest.

Tenslotte werd ook aangetoond dat  $\text{O}_3$  geen noemenswaardige rol speelt in de anti-kankerwerking van pPBS, aangezien dit deeltje hier niet gedetecteerd wordt, wellicht omdat het eens in de vloeistoffase terechtgekomen of gevormd, zeer snel terug naar de gasfase keert.

### 6.1.2 Conclusie over de computationele studie

In het tweede luik van deze thesis werd een fluid model ontwikkeld om het effect van een aantal parameters op plasmabehandelde vloeistoffen te bestuderen. Eerst werd het model gevalideerd aan de hand van een aantal experimenten en resultaten uit de literatuur voor het snelheidsprofiel, het temperatuurprofiel en de concentraties van de deeltjes in de gasfase. Hoewel er nog ruimte is voor optimalisatie, wordt het model al voldoende realistisch bevonden om experimentele fenomenen te reproduceren en te voorspellen. Een steeds weerkerende afwijking in het model is de overschatting van het verlies van  $\text{H}_2\text{O}_2$  in de vloeistoffase. Nadat de simulaties voor deze thesis werden uitgevoerd, is voor deze afwijking (althans gedeeltelijk) een oplossing gevonden. De overschatte verliesreactie van  $\text{H}_2\text{O}_2$  blijkt pH-afhankelijk en bij het toevoegen van de pH-waarde aan de reactiesnelheid, vertraagt deze reactie en is dus ook het verlies van  $\text{H}_2\text{O}_2$  kleiner. Door deze aanpassing komt de concentratie van  $\text{H}_2\text{O}_2$  in dezelfde grootteorde als die van  $\text{NO}_2^-$  te liggen. Deze oplossing zal in de toekomst uiteraard geïmplementeerd worden in het model. Daarnaast is gebleken dat het effect van de plasmabehandelingstijd en van de luchtvochtigheid nog niet bestudeerd kan worden met het model. Er gebeurt een te snelle stabilisatie van de concentraties van de deeltjes met de tijd en de luchtvochtigheid heeft enkel een grote invloed op de plasma-ontlading zelf, die in het model niet wordt beschouwd.

Verder kan geconcludeerd worden dat kleine schommelingen in de temperatuur van de lucht en de vloeistof, alsook de reacties in de waterdamp laag boven het vloeistofoppervlak, geen effect blijken te hebben op de concentraties van de deeltjes in de plasmabehandelde vloeistof. Ook het effect van de  $\text{N}_2$  en  $\text{O}_2$  in de omgevingslucht op de concentraties in de vloeistof werd onderzocht. Dit is uiteraard een hypothetische studie, maar ze laat toe om meer inzicht te krijgen in het belang van de verschillende chemische processen in de gasfase en vloeistoffase. Zonder  $\text{N}_2$  in de lucht wordt er in de vloeistof minder  $\text{NO}_2^-$  en meer  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}$  en  $\text{O}_3$  gevormd. Bij het wegnemen van zowel  $\text{N}_2$  als  $\text{O}_2$  uit de lucht daalt de  $\text{NO}_2^-$  en stijgt de  $\text{H}_2\text{O}_2$ -concentratie enorm. Dit effect is weliswaar afhankelijk van de reactie die verantwoordelijk is voor het overschatte verlies van  $\text{H}_2\text{O}_2$  in de vloeistof, waardoor ook deze grote veranderingen waarschijnlijk overschat zijn. Tegelijk wordt een stijging in de concentratie van  $\text{O}$  verkregen en blijft die van  $\text{O}_3$  constant. Tenslotte werd het effect van de geometrie van de beker, meer bepaald het behandelde volume en de grootte van het vloeistofoppervlak, besproken. Voor deeltjes zoals  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  die zich in de gasfase over de gehele oppervlakte bevinden en een redelijk hoge Henryconstante hebben, daalt de concentratie met het verkleinen van het oppervlak, omdat er een kleinere hoeveelheid van deze deeltjes in de vloeistof terecht komt. De concentraties van deeltjes met een lage Henryconstante worden bevorderd door het verkleinen van het oppervlak. In dit geval is het belangrijker om te verhinderen dat de deeltjes terug naar de gasfase bewegen dan om zo veel mogelijk deeltjes in de vloeistof te krijgen.

## 6.2 Toekomstperspectief

Het gebruik van plasmabehandelde vloeistoffen voor het behandelen van kanker heeft een groot potentieel. Toch moet er nog veel onderzoek gebeuren voordat deze behandelingsmethode bij patiënten toegepast zal kunnen worden. Vooreerst moeten er bij de analyse van de chemische samenstelling nog meer deeltjes worden beschouwd, zoals  $\text{NO}_3^-$  en  $\text{ONOOH}$ , om het effect op de kankercellen hiervan te bepalen. Ook het variëren van de te behandelen vloeistof om het effect op de celdood te optimaliseren, behoort tot de mogelijkheden bij verder onderzoek. Daarnaast is er ondertussen in talrijke onderzoeken aangetoond dat een plasmabehandeling kan leiden tot celdood bij kankercellen, en werd er reeds meermaals over de selectiviteit van een plasmabehandeling gerapporteerd. Over dit laatste bestaat nog onzekerheid. Hiervoor is de vergelijking nodig tussen kankercellen en gezonde cellen van hetzelfde type als ze beide in hetzelfde medium aanwezig zijn. Bovendien werd er in deze thesis enkel gekeken naar de viabiliteit van de kankercellen na een plasmabehandeling, maar om de onderliggende mechanismen te begrijpen die leiden tot de celdood, moet er onderzoek gebeuren naar welke *pathways* gestimuleerd of geïnhibeerd worden door de plasmadeeltjes.

Voor het computationele gedeelte moet het model verder worden geoptimaliseerd om de betrouwbaarheid van de bekomen resultaten te verhogen. Hiertoe moet voornamelijk de vloeistoffase verder worden gevalideerd. Het gebruik van het model is zeer veelbelovend, al zullen sommige effecten enkel bestudeerd kunnen worden in samenspel met bv. een 0D-model (voor bv. de luchtvochtigheid), aangezien de plasma-ontlading en de elektron-impactreacties in de *afterglow* vaak een grote rol spelen en deze in dit model niet gesimuleerd kunnen worden omwille van te lange rekentijden.

## 7. Referenties

- (1) Von Woedtke, T.; Reuter, S.; Masur, K.; Weltmann, K.-D. Plasmas for Medicine. *Phys. Rep.* **2013**, *530*, 291–320.
- (2) Kong, M. G.; Kroesen, G.; Morfill, G.; Nosenko, T.; Shimizu, T.; Van Dijk, J.; Zimmermann, J. L. Plasma Medicine: An Introductory Review. *New J. Phys.* **2009**, *11*, 115012.
- (3) Neyts, E. C.; Yusupov, M.; Verlack, C. C.; Bogaerts, A. Computer Simulations of Plasma-Biomolecule and Plasma-Tissue Interactions for a Better Insight in Plasma Medicine. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2014**, *47*, 29.
- (4) Fridman, A. *Plasma Chemistry*; Cambridge University Press, 2008.
- (5) Hirst, A. M.; Frame, F. M.; Arya, M.; Maitland, N. J.; O'Connell, D. Low Temperature Plasmas as Emerging Cancer Therapeutics: The State of Play and Thoughts for the Future. *Tumor Biol.* **2016**, *37*, 7021–7031.
- (6) Graves, D. B. The Emerging Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Redox Biology and Some Implications for Plasma Applications to Medicine and Biology. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2012**, *45*, 263001.
- (7) Keidar, M. Plasma for Cancer Treatment. *Plasma Sources Sci. Technol.* **2015**, *24*, 033001.
- (8) Fridman, G.; Friedman, G.; Gutsol, A.; Shekhter, A. B.; Vasilets, V. N.; Fridman, A. Applied Plasma Medicine. *Plasma Process. Polym.* **2008**, *5*, 503–533.
- (9) Rossi, F.; Kylián, O.; Rauscher, H.; Hasiwa, M.; Gilliland, D. Low Pressure Plasma Discharges for the Sterilization and Decontamination of Surfaces. *New J. Phys.* **2009**, *11*, 115017.
- (10) McCombs, G. B.; Darby, M. L. New Discoveries and Directions for Medical, Dental and Dental Hygiene Research: Low Temperature Atmospheric Pressure Plasma. *Int. J. Dent. Hyg.* **2010**, *8*, 10–15.
- (11) Misra, N. N.; Patil, S.; Moiseev, T.; Bourke, P.; Mosnier, J. P.; Keener, K. M.; Cullen, P. J. In-Package Atmospheric Pressure Cold Plasma Treatment of Strawberries. *J. Food Eng.* **2014**, *125*, 131–138.
- (12) Nosenko, T.; Shimizu, T.; Morfill, G. E. Designing Plasmas for Chronic Wound Disinfection. *New J. Phys.* **2009**, *11*, 115013.
- (13) Kalghatgi, S. U.; Fridman, G.; Cooper, M.; Nagaraj, G.; Peddinghaus, M.; Balasubramanian, M.; Vasilets, V. N.; Gutsol, A. F.; Fridman, A.; Friedman, G. Mechanism of Blood Coagulation by Nonthermal Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Discharge Plasma. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **2007**, *35*, 1559–1566.
- (14) Partecke, L. I.; Evert, K.; Haugk, J.; Döring, F.; Normann, L.; Diedrich, S.; Weiss, F.-U.; Evert, M.; Hübner, N. O.; Günther, C.; *et al.* Tissue Tolerable Plasma (TTP) Induces Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells in Vitro and in Vivo. *BMC Cancer* **2012**, *12*, 473.
- (15) Barekzi, N.; Laroussi, M. Dose-Dependent Killing of Leukemia Cells by Low-Temperature Plasma. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2012**, *45*, 422002.
- (16) Vandamme, M.; Robert, E.; Pesnel, S.; Barbosa, E.; Dozias, S.; Sobilo, J.; Lerondel, S.; Pape, A. Le; Pouvesle, J. M. Antitumor Effect of Plasma Treatment on U87 Glioma Xenografts: Preliminary Results. *Plasma Process. Polym.* **2010**, *7*, 264–273.
- (17) Vandamme, M.; Robert, E.; Lerondel, S.; Sarron, V.; Ries, D.; Dozias, S.; Sobilo, J.; Gosset, D.; Kieda, C.; Legrain, B.; *et al.* ROS Implication in a New Antitumor Strategy Based on Non-Thermal Plasma. *Int. J. Cancer* **2012**, *130*, 2185–2194.
- (18) Keidar, M. Cold Plasma Selectivity and the Possibility of a Paradigm Shift in Cancer Therapy. *Br. J. Cancer* **2011**, *105*, 1295–1301.
- (19) Zucker, S. N.; Zirnheld, J.; Bagati, A.; DiSanto, T. M.; Des Soye, B.; Wawrzyniak, J. A.; Etemadi, K.; Nikiforov, M.; Berezney, R. Preferential Induction of Apoptotic Cell Death in Melanoma Cells as Compared with Normal Keratinocytes Using a Non-Thermal Plasma Torch. *Cancer Biol. Ther.* **2012**, *13*, 1299–1306.

- (20) Siu, A.; Volotskova, O.; Cheng, X.; Khalsa, S. S.; Bian, K.; Murad, F.; Keidar, M.; Sherman, J. H. Differential Effects of Cold Atmospheric Plasma in the Treatment of Malignant Glioma. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–14.
- (21) Kaushik, N. K.; Attri, P.; Kaushik, N.; Choi, E. H. A Preliminary Study of the Effect of DBD Plasma and Osmolytes on T98G Brain Cancer and HEK Non-Malignant Cells. *Molecules* **2013**, *18*, 4917–4928.
- (22) Wang, M.; Holmes, B.; Cheng, X.; Zhu, W.; Keidar, M.; Zhang, L. G. Cold Atmospheric Plasma for Selectively Ablating Metastatic Breast Cancer Cells. *PLoS One* **2013**, *8*, e73741.
- (23) Georgescu, N.; Lupu, A. R. Tumoral and Normal Cells Treatment with High-Voltage Pulsed Cold Atmospheric Plasma Jets. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **2010**, *38*, 1949–1956.
- (24) Zirnheld, J. L.; Zucker, S. N.; DiSanto, T. M.; Berezney, R.; Etemadi, K. Nonthermal Plasma Needle: Development and Targeting of Melanoma Cells. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **2010**, *38*, 948–952.
- (25) Kim, J. Y.; Kim, S. O.; Wei, Y.; Li, J. A Flexible Cold Microplasma Jet Using Biocompatible Dielectric Tubes for Cancer Therapy. *Appl. Phys. Lett.* **2010**, *96*, 203701.
- (26) Keidar, M.; Shashurin, A.; Volotskova, O.; Ann Stepp, M.; Srinivasan, P.; Sandler, A.; Trink, B. Cold Atmospheric Plasma in Cancer Therapy. *Phys. Plasmas* **2013**, *20*, 057101.
- (27) Volotskova, O.; Hawley, T. S.; Stepp, M. A.; Keidar, M. Targeting the Cancer Cell Cycle by Cold Atmospheric Plasma. *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 636.
- (28) Weltmann, K.-D.; von Woedtke, T. Plasma Medicine—Current State of Research and Medical Application. *Plasma Phys. Control. Fusion* **2017**, *59*, 014031.
- (29) Stoffels, E.; Flikweert, A. J.; Stoffels, W. W.; Kroesen, G. M. W. Plasma Needle: A Non-Destructive Atmospheric Plasma Source for Fine Surface Treatment of (bio)materials. *Plasma Sources Sci. Technol.* **2002**, *11*, 383–388.
- (30) Schutze, A.; Jeong, J. Y.; Babayan, S. E.; Selwyn, G. S.; Hicks, R. F. The Atmospheric-Pressure Plasma Jet: A Review and Comparison to Other Plasma Sources. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **1998**, *26*, 1685–1694.
- (31) Fridman, G.; Peddinghaus, M.; Balasubramanian, M.; Ayan, H.; Fridman, A.; Gutsol, A.; Brooks, A. Blood Coagulation and Living Tissue Sterilization by Floating-Electrode Dielectric Barrier Discharge in Air. *Plasma Chem. Plasma Process.* **2006**, *26*, 425–442.
- (32) Schneider, S.; Lackmann, J.-W.; Narberhaus, F.; Bandow, J. E.; Denis, B.; Benedikt, J. Separation of VUV/UV Photons and Reactive Particles in the Effluent of a He/O<sub>2</sub> Atmospheric Pressure Plasma Jet. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2011**, *44*, 379501.
- (33) Weltmann, K. D.; Kindel, E.; von Woedtke, T.; Hähnel, M.; Stieber, M.; Brandenburg, R. Atmospheric-Pressure Plasma Sources: Prospective Tools for Plasma Medicine. *Pure Appl. Chem.* **2010**, *82*, 1223–1237.
- (34) Yusupov, M. Atomic Scale Simulations for a Better Insight in Plasma Medicine, Universiteit Antwerpen, 2014.
- (35) Lu, X.; Laroussi, M.; Puech, V. On Atmospheric-Pressure Non-Equilibrium Plasma Jets and Plasma Bullets. *Plasma Sources Sci. Technol.* **2012**, *21*, 034005.
- (36) Stewart, B. W.; Wild, C. P. World Cancer Report 2014. *World Heal. Organ.* **2014**, 1–2.
- (37) Pecorino, L. *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*; Third Edit.; Oxford University Press, 2012.
- (38) Kajiyama, H.; Utsumi, F.; Nakamura, K.; Tanaka, H.; Toyokuni, S.; Hori, M.; Kikkawa, F. Future Perspective of Strategic Non-Thermal Plasma Therapy for Cancer Treatment. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2017**, *60*, 33–38.
- (39) Baudino, T. a. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr. Drug Discov. Technol.* **2015**, *12*, 3–20.
- (40) Martin-Liberal, J.; Ochoa de Olza, M.; Hierro, C.; Gros, A.; Rodon, J.; Tabernero, J. The Expanding Role of Immunotherapy. *Cancer Treat. Rev.* **2017**, *54*, 74–86.
- (41) Doyen, J.; Falk, A. T.; Floquet, V.; Hérault, J.; Hannoun-Lévi, J. M. Proton Beams in Cancer Treatments: Clinical Outcomes and Dosimetric Comparisons with Photon Therapy. *Cancer Treat. Rev.* **2016**, *43*, 104–112.



- (42) Ratovitski, E. a.; Cheng, X.; Yan, D.; Sherman, J. H.; Canady, J.; Trink, B.; Keidar, M. Anti-Cancer Therapies of 21st Century: Novel Approach to Treat Human Cancers Using Cold Atmospheric Plasma. *Plasma Process. Polym.* **2014**, *11*, 1128–1137.
- (43) Schlegel, J.; Köritzer, J.; Boxhammer, V. Plasma in Cancer Treatment. *Clin. Plasma Med.* **2013**, *1*, 2–7.
- (44) Tanaka, H.; Mizuno, M.; Ishikawa, K.; Nakamura, K.; Kajiyama, H.; Kano, H.; Kikkawa, F.; Hori, M. Plasma-Activated Medium Selectively Kills Glioblastoma Brain Tumor Cells by Down-Regulating a Survival Signaling Molecule, AKT Kinase. *Plasma Med.* **2011**, *1*, 265–277.
- (45) Ahn, H. J.; Kim, K. Il; Kim, G.; Moon, E.; Yang, S. S.; Lee, J. S. Atmospheric-Pressure Plasma Jet Induces Apoptosis Involving Mitochondria via Generation of Free Radicals. *PLoS One* **2011**, *6*, 6–12.
- (46) Yan, X.; Xiong, Z.; Zou, F.; Zhao, S.; Lu, X.; Yang, G.; He, G.; Ostrikov, K. Plasma-Induced Death of HepG2 Cancer Cells: Intracellular Effects of Reactive Species. *Plasma Process. Polym.* **2012**, *9*, 59–66.
- (47) Lee, H. J.; Shon, C. H.; Kim, Y. S.; Kim, S.; Kim, G. C.; Kong, M. G. Degradation of Adhesion Molecules of G361 Melanoma Cells by a Non-Thermal Atmospheric Pressure Microplasma. *New J. Phys.* **2009**, *11*, 115026.
- (48) Kim, G. C.; Kim, G. J.; Park, S. R.; Jeon, S. M.; Seo, H. J.; Iza, F.; Lee, J. K. Air Plasma Coupled with Antibody-Conjugated Nanoparticles: A New Weapon against Cancer. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2008**, *42*, 032005.
- (49) Cheng, X.; Murphy, W.; Recek, N.; Yan, D.; Cvelbar, U.; Vesel, A.; Mozetič, M.; Canady, J.; Keidar, M.; Sherman, J. H. Synergistic Effect of Gold Nanoparticles and Cold Plasma on Glioblastoma Cancer Therapy. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2014**, *47*, 335402.
- (50) Vandamme, M.; Robert, E.; Dozias, S.; Sobilo, J.; Lerondel, S.; Le Pape, A.; Pouvesle, J.-M. Response of Human Glioma U87 Xenografted on Mice to Non Thermal Plasma Treatment. *Plasma Med.* **2011**, *1*, 27–43.
- (51) Vermeylen, S.; De Waele, J.; Vanuytsel, S.; De Backer, J.; Van der Paal, J.; Ramakers, M.; Leyssens, K.; Marcq, E.; Van Audenaerde, J.; Smits, E. L. J.; *et al.* Cold Atmospheric Plasma Treatment of Melanoma and Glioblastoma Cancer Cells. *Plasma Process. Polym.* **2016**, *13*, 1195–1205.
- (52) Zhao, S.; Xiong, Z.; Mao, X.; Meng, D.; Lei, Q.; Li, Y.; Deng, P.; Chen, M.; Tu, M.; Lu, X.; *et al.* Atmospheric Pressure Room Temperature Plasma Jets Facilitate Oxidative and Nitrate Stress and Lead to Endoplasmic Reticulum Stress Dependent Apoptosis in HepG2 Cells. *PLoS One* **2013**, *8*, 1–14.
- (53) Kaushik, N. K.; Kaushik, N.; Park, D.; Choi, E. H. Altered Antioxidant System Stimulates Dielectric Barrier Discharge Plasma-Induced Cell Death for Solid Tumor Cell Treatment. *PLoS One* **2014**, *9*, 1–11.
- (54) Köritzer, J.; Boxhammer, V.; Schäfer, A.; Shimizu, T.; Klämpfl, T. G.; Li, Y. F.; Welz, C.; Schwenk-Zieger, S.; Morfill, G. E.; Zimmermann, J. L.; *et al.* Restoration of Sensitivity in Chemo - Resistant Glioma Cells by Cold Atmospheric Plasma. *PLoS One* **2013**, *8*, 64498.
- (55) Ma, R. N.; Feng, H. Q.; Liang, Y. D.; Zhang, Q.; Tian, Y.; Su, B.; Zhang, J.; Fang, J. An Atmospheric-Pressure Cold Plasma Leads to Apoptosis in *Saccharomyces Cerevisiae* by Accumulating Intracellular Reactive Oxygen Species and Calcium. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2013**, *46*, 285401.
- (56) Ishaq, M.; Kumar, S.; Varinli, H.; Han, Z. J.; Rider, a. E.; Evans, M. D. M.; Murphy, a. B.; Ostrikov, K. Atmospheric Gas Plasma-Induced ROS Production Activates TNF-ASK1 Pathway for the Induction of Melanoma Cancer Cell Apoptosis. *Mol. Biol. Cell* **2014**, *25*, 1523–1531.
- (57) Trachootham, D.; Alexandre, J.; Huang, P. Targeting Cancer Cells by ROS-Mediated Mechanisms: A Radical Therapeutic Approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8*, 579–591.
- (58) Yan, D.; Sherman, J. H.; Cheng, X.; Ratovitski, E.; Canady, J.; Keidar, M. Controlling Plasma Stimulated Media in Cancer Treatment Application. *Appl. Phys. Lett.* **2014**, *105*, 0–4.
- (59) Adachi, T.; Tanaka, H.; Nonomura, S.; Hara, H.; Kondo, S. I.; Hori, M. Plasma-Activated Medium Induces A549 Cell Injury via a Spiral Apoptotic Cascade Involving the Mitochondrial-Nuclear Network. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *79*, 28–44.
- (60) Utsumi, F.; Kajiyama, H.; Nakamura, K.; Tanaka, H.; Mizuno, M.; Ishikawa, K.; Kondo, H.; Kano, H.; Hori, M.; Kikkawa, F. Effect of Indirect Nonequilibrium Atmospheric Pressure Plasma on Anti-



- Proliferative Activity against Chronic Chemo-Resistant Ovarian Cancer Cells in Vitro and in Vivo. *PLoS One* **2013**, *8*, 1–10.
- (61) Yan, D.; Talbot, A.; Nourmohammadi, N.; Cheng, X.; Canady, J.; Sherman, J.; Keidar, M. Principles of Using Cold Atmospheric Plasma Stimulated Media for Cancer Treatment. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 18339.
- (62) Sato, T.; Yokoyama, M.; Johkura, K. A Key Inactivation Factor of HeLa Cell Viability by a Plasma Flow. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2011**, *44*, 372001.
- (63) Utsumi, F.; Kajiyama, H.; Nakamura, K.; Tanaka, H.; Hori, M.; Kikkawa, F. Selective Cytotoxicity of Indirect Nonequilibrium Atmospheric Pressure Plasma against Ovarian Clear-Cell Carcinoma. *Springerplus* **2014**, *3*, 398.
- (64) Torii, K.; Yamada, S.; Nakamura, K.; Tanaka, H.; Kajiyama, H.; Tanahashi, K.; Iwata, N.; Kanda, M.; Kobayashi, D.; Tanaka, C.; *et al.* Effectiveness of Plasma Treatment on Gastric Cancer Cells. *Gastric Cancer* **2015**, *18*, 635–643.
- (65) Hara, H.; Taniguchi, M.; Kobayashi, M.; Kamiya, T.; Adachi, T. Plasma-Activated Medium-Induced Intracellular Zinc Liberation Causes Death of SH-SY5Y Cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *584*, 51–60.
- (66) Yan, D.; Nourmohammadi, N.; Talbot, A.; Sherman, J. H.; Keidar, M. The Strong Anti-Glioblastoma Capacity of the Plasma-Stimulated Lysine-Rich Medium. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2016**, *49*, 274001.
- (67) Boehm, D.; Heslin, C.; Cullen, P. J.; Bourke, P. Cytotoxic and Mutagenic Potential of Solutions Exposed to Cold Atmospheric Plasma. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21464.
- (68) Judée, F.; Fongia, C.; Ducommun, B.; Yousfi, M.; Lobjois, V.; Merbahi, N. Short and Long Time Effects of Low Temperature Plasma Activated Media on 3D Multicellular Tumor Spheroids. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21421.
- (69) Kurake, N.; Tanaka, H.; Ishikawa, K.; Kondo, T.; Sekine, M.; Nakamura, K.; Kajiyama, H.; Kikkawa, F.; Mizuno, M.; Hori, M. Cell Survival of Glioblastoma Grown in Medium Containing Hydrogen Peroxide And/or Nitrite, or in Plasma-Activated Medium. *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, *605*, 102–108.
- (70) Van der Paal, J.; Aernouts, S.; van Duin, A. C. T.; Neyts, E. C.; Bogaerts, A. Interaction of O and OH Radicals with a Simple Model System for Lipids in the Skin Barrier: A Reactive Molecular Dynamics Investigation for Plasma Medicine. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2013**, *46*, 395201.
- (71) Bruggeman, P. J.; Kushner, M. J.; Locke, B. R.; Gardeniers, J. G. E.; Graham, W. G.; Graves, D. B.; Hofman-Caris, R. C. H. M.; Maric, D.; Reid, J. P.; Ceriani, E.; *et al.* Plasma-liquid Interactions: A Review and Roadmap. *Plasma Sources Sci. Technol.* **2016**, *25*, 053002.
- (72) Dorai, R.; Kushner, M. J. A Model for Plasma Modification of Polypropylene Using Atmospheric Pressure Discharges. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2003**, *36*, 666–685.
- (73) Stalder, K. R.; Vidmar, R. J.; Nersisyan, G.; Graham, W. G. Modeling the Chemical Kinetics of High-Pressure Glow Discharges in Mixtures of Helium with Real Air. *J. Appl. Phys.* **2006**, *99*, 093301.
- (74) Liu, D. X.; Bruggeman, P.; Iza, F.; Rong, M. Z.; Kong, M. G. Global Model of Low-Temperature Atmospheric-Pressure He + H<sub>2</sub>O Plasmas. *Plasma Sources Sci. Technol.* **2010**, *19*, 025018.
- (75) Liu, D. X.; Yang, a J.; Wang, X. H.; Rong, M. Z.; Iza, F.; Kong, M. G. Wall Fluxes of Reactive Oxygen Species of an Rf Atmospheric-Pressure Plasma and Their Dependence on Sheath Dynamics. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2012**, *45*, 305205.
- (76) Murakami, T.; Niemi, K.; Gans, T.; O’Connell, D.; Graham, W. G. Interacting Kinetics of Neutral and Ionic Species in an Atmospheric-Pressure Helium–oxygen Plasma with Humid Air Impurities. *Plasma Sources Sci. Technol.* **2013**, *22*, 045010.
- (77) Van Gaens, W.; Bogaerts, a. Kinetic Modelling for an Atmospheric Pressure Argon Plasma Jet in Humid Air. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2013**, *46*, 275201.
- (78) Bobkova, E. S.; Smirnov, S. A.; Zalipaeva, Y. V.; Rybkin, V. V. Modeling Chemical Composition for an Atmospheric Pressure Dc Discharge in Air with Water Cathode by 0-D Model. *Plasma Chem. Plasma Process.* **2014**, *34*, 721–743.

- (79) Soloshenko, I. a; Tsiolko, V. V; Pogulay, S. S.; Kalyuzhnaya, a G.; Bazhenov, V. Y.; Shchedrin, a I. Effect of Water Adding on Kinetics of Barrier Discharge in Air. *Plasma Sources Sci. Technol.* **2009**, *18*, 045019.
- (80) Yusupov, M.; Neyts, E. C.; Khalilov, U.; Snoeckx, R.; Van Duin, A. C. T.; Bogaerts, A. Atomic-Scale Simulations of Reactive Oxygen Plasma Species Interacting with Bacterial Cell Walls. *New J. Phys.* **2012**, *14*, 093043.
- (81) Van der Paal, J.; Aernouts, S.; van Duin, A. C. T.; Neyts, E. C.; Bogaerts, A. Interaction of O and OH Radicals with a Simple Model System for Lipids in the Skin Barrier: A Reactive Molecular Dynamics Investigation for Plasma Medicine. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2013**, *46*, 395201.
- (82) Bogaerts, A.; Yusupov, M.; Van der Paal, J.; Verlactt, C. C. W.; Neyts, E. C. Reactive Molecular Dynamics Simulations for a Better Insight in Plasma Medicine. *Plasma Process. Polym.* **2014**, *11*, 1156–1168.
- (83) Yusupov, M.; Bogaerts, A.; Huygh, S.; Snoeckx, R.; van Duin, a C. T.; Neyts, E. C. Plasma-Induced Destruction of Bacterial Cell Wall Components: A Reactive Molecular Dynamics Simulation. *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 5993–5998.
- (84) Yusupov, M.; Neyts, E. C.; Verlactt, C. C.; Khalilov, U.; van Duin, A. C. T.; Bogaerts, A. Inactivation of the Endotoxic Biomolecule Lipid A by Oxygen Plasma Species: A Reactive Molecular Dynamics Study. *Plasma Process. Polym.* **2015**, *12*, 162–171.
- (85) Yusupov, M.; Neyts, E. C.; Simon, P.; Berdiyrov, G.; Snoeckx, R.; van Duin, A. C. T.; Bogaerts, A. Reactive Molecular Dynamics Simulations of Oxygen Species in a Liquid Water Layer of Interest for Plasma Medicine. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2014**, *47*, 025205.
- (86) Van der Paal, J.; Verlactt, C. C.; Yusupov, M.; Neyts, E. C.; Bogaerts, a. Structural Modification of the Skin Barrier by OH Radicals: A Reactive Molecular Dynamics Study for Plasma Medicine. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2015**, *48*, 155202.
- (87) Lindsay, A.; Anderson, C.; Slikboer, E.; Shannon, S.; Graves, D. Momentum, Heat, and Neutral Mass Transport in Convective Atmospheric Pressure Plasma-Liquid Systems and Implications for Aqueous Targets. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2015**, *48*, 424007.
- (88) Norberg, S. A.; Tian, W.; Johnsen, E.; Kushner, M. J. Atmospheric Pressure Plasma Jets Interacting with Liquid Covered Tissue: Touching and Not-Touching the Liquid. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2014**, *47*, 475203.
- (89) Tian, W.; Kushner, M. J. Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Discharges Interacting with Liquid Covered Tissue. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2014**, *47*, 165201.
- (90) Chen, C.; Liu, D. X.; Liu, Z. C.; Yang, a. J.; Chen, H. L.; Shama, G.; Kong, M. G. A Model of Plasma-Biofilm and Plasma-Tissue Interactions at Ambient Pressure. *Plasma Chem. Plasma Process.* **2014**, *34*, 403–441.
- (91) Babaeva, N. Y.; Tian, W.; Kushner, M. J. The Interaction between Plasma Filaments in Dielectric Barrier Discharges and Liquid Covered Wounds: Electric Fields Delivered to Model Platelets and Cells. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2014**, *47*, 1–11.
- (92) Zhang, S.; van Gaens, W.; van Gessel, B.; Hofmann, S.; van Veldhuizen, E.; Bogaerts, A.; Bruggeman, P. Spatially Resolved Ozone Densities and Gas Temperatures in a Time Modulated RF Driven Atmospheric Pressure Plasma Jet: An Analysis of the Production and Destruction Mechanisms. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2013**, *46*, 205202.
- (93) Nagaraja, S.; Yang, V.; Yin, Z.; Adamovich, I. Ignition of Hydrogen-Air Mixtures Using Pulsed Nanosecond Dielectric Barrier Plasma Discharges in Plane-to-Plane Geometry. *Combust. Flame* **2014**, *161*, 1026–1037.
- (94) Vasko, C. A.; Liu, D. X.; Van Veldhuizen, E. M.; Iza, F.; Bruggeman, P. J. Hydrogen Peroxide Production in an Atmospheric Pressure RF Glow Discharge: Comparison of Models and Experiments. *Plasma Chem. Plasma Process.* **2014**, *34*, 1081–1099.
- (95) Van Gaens, W.; Bruggeman, P. J.; Bogaerts, A. Numerical Analysis of the NO and O Generation Mechanism in a Needle-Type Plasma Jet. *New J. Phys.* **2014**, *16*, 063054.

- (96) Parsons, D. W.; Parsons, D. W.; Jones, S.; Zhang, X.; Lin, J. C.; Leary, R. J.; Angenendt, P.; Mankoo, P.; Carter, H.; Siu, I.; *et al.* An Integrated Genomic Analysis of. *Science* (80-. ). **2010**, *1807*, 1807–1813.
- (97) Eramo, A.; Ricci-Vitiani, L.; Zeuner, A.; Pallini, R.; Lotti, F.; Sette, G.; Pilozzi, E.; Larocca, L. M.; Peschle, C.; De Maria, R. Chemotherapy Resistance of Glioblastoma Stem Cells. *Cell Death Differ.* **2006**, *13*, 1238–1241.
- (98) Eisenberg, G. Colorimetric Determination of Hydrogen Peroxide. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **1943**, *15*, 327–328.
- (99) Lukes, P.; Dolezalova, E.; Sisrova, I.; Clupek, M. Aqueous-Phase Chemistry and Bactericidal Effects from an Air Discharge Plasma in Contact with Water: Evidence for the Formation of Peroxynitrite through a Pseudo-Second-Order Post-Discharge Reaction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and HNO<sub>2</sub>. *Plasma Sources Sci. Technol.* **2014**, *23*, 015019.
- (100) Satterfield, C. N.; Bonnell, a. H. Interferences in Titanium Sulfate Method for Hydrogen Peroxide. *Anal. Chem.* **1955**, *27*, 1174–1175.
- (101) Anbar, M.; Taube, H. Interaction of Nitrous Acid with Hydrogen Peroxide and with Water. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 6243–6247.
- (102) Fox, J. B. Kinetics and Mechanisms of the Griess Reaction. *Anal. Chem.* **1979**, *51*, 1493–1502.
- (103) Weckhuysen, B. M.; Heidler, R.; Schoonheydt, R. A. Electron Spin Resonance Spectroscopy. *Mol. Sieves* **2004**, *4*, 295–335.
- (104) Janzen, E. G.; Blackburn, B. J. Detection and Identification of Short-Lived Free Radicals by an Electron Spin Resonance Trapping Technique. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 5909–5910.
- (105) Gorbanev, Y.; O'Connell, D.; Chechik, V. Non-Thermal Plasma in Contact with Water: The Origin of Species. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22*, 3496–3505.
- (106) Takamatsu, T.; Uehara, K.; Sasaki, Y.; Miyahara, H.; Matsumura, Y.; Iwasawa, A.; Ito, N.; Azuma, T.; Kohno, M.; Okino, A. Investigation of Reactive Species Using Various Gas Plasmas. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 39901–39905.
- (107) Matsumura, Y.; Iwasawa, A.; Kobayashi, T.; Kamachi, T.; Ozawa, T.; Kohno, M. Detection of High-Frequency Ultrasound-Induced Singlet Oxygen by the ESR Spin-Trapping Method. *Chem. Lett.* **2013**, *42*, 1291–1293.
- (108) Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107–1112.
- (109) Vichai, V.; Kirtikara, K. Sulforhodamine B Colorimetric Assay for Cytotoxicity Screening. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1112–1116.
- (110) Bekeschus, S.; Schmidt, A.; Weltmann, K. D.; von Woedtke, T. The Plasma Jet kINPen: A Powerful Tool for Wound Healing. *Clin. Plasma Med.* **2016**, *4*, 19–28.
- (111) Stella, M.; Tiede, R.; Gavenis, K.; Daeschlein, G.; Bussiahn, R.; Weltmann, K.; Emmert, S.; Woedtke, T. Von; Ahmed, R. Introduction to DIN-Specification 91315 Based on the Characterization of the Plasma Jet kINPen S MED. *Clin. Plasma Med.* **2016**, *4*, 35–45.
- (112) Weiss, M.; Gumbel, D.; Hanschmann, E.-M.; Mandelkow, R.; Gelbrich, N.; Zimmermann, U.; Walther, R.; Ekkernkamp, A.; Sckell, A.; Kramer, A.; *et al.* Cold Atmospheric Plasma Treatment Induces Anti-Proliferative Effects in Prostate Cancer Cells by Redox and Apoptotic Signaling Pathways. *PLoS One* **2015**, *10*, e0130350.
- (113) Coleman, B. D.; Mizel, V. J. Thermodynamics and Departures from Fourier's Law of Heat Conduction. *Arch. Ration. Mech. Anal.* **1963**, *13*, 245–261.
- (114) Schmidt-Bleker, A.; Winter, J.; Bösel, A.; Reuter, S.; Weltmann, K.-D. On the Plasma Chemistry of a Cold Atmospheric Argon Plasma Jet with Shielding Gas Device. *Plasma Sources Sci. Technol.* **2016**, *25*, 015005.
- (115) Liu, Z. C.; Guo, L.; Liu, D. X.; Rong, M. Z.; Chen, H. L.; Kong, M. G. Chemical Kinetics and Reactive Species in Normal Saline Activated by a Surface Air Discharge. *Plasma Process. Polym.* **2017**, *14*, 1–9.
- (116) Wilcox, D. C. *Turbulence Modelling for CFD*; DCW Industries, Inc., 1993.

- (117) Van Gaens, W.; Iseni, S.; Schmidt-Bleker, A.; Weltmann, K. D.; Reuter, S.; Bogaerts, A. Numerical Analysis of the Effect of Nitrogen and Oxygen Admixtures on the Chemistry of an Argon Plasma Jet Operating at Atmospheric Pressure. *New J. Phys.* **2015**, *17*, 033003.
- (118) Sakiyama, Y.; Graves, D. B.; Chang, H.-W.; Shimizu, T.; Morfill, G. E. Plasma Chemistry Model of Surface Microdischarge in Humid Air and Dynamics of Reactive Neutral Species. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2012**, *45*, 425201.
- (119) Sander, R. Compilation of Henry ' S Law Constants for Inorganic and Organic Species of Potential Importance in Environmental Chemistry. *Database* **1999**, *20*, 107.
- (120) Wise, D. L.; Houghton, G. Diffusion Coefficients of Neon, Krypton, Xenon, Carbon Monoxide and Nitric Oxide in Water at 10–60°C. *Chem. Eng. Sci.* **1968**, *23*, 1211–1216.
- (121) Holz, M.; Heil, S. R.; Sacco, A. Temperature-Dependent Self-Diffusion Coefficients of Water and Six Selected Molecular Liquids for Calibration in Accurate <sup>1</sup>H-NMR PFG Measurements. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, *2*, 4740–4742.
- (122) Johnson, P. N.; Davis, R. a. Diffusivity of Ozone in Water. *J. Chem. Eng. Data* **1996**, *41*, 1485–1487.
- (123) Stewart, D. J.; Griffiths, P. T.; Cox, R. a. Reactive Uptake Coefficients for Heterogeneous Reaction of N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> with Submicron Aerosols of NaCl and Natural Sea Salt. *Atmos. Chem. Phys.* **2004**, *4*, 1381–1388.
- (124) Antoine, M. C. Tensions Des Vapeurs: Nouvelle Relation Entre Les Tensions et Les Températures. *Comptes Rendus des Séances l'Académie des Sci.* **1888**, *107*, 836–837.
- (125) Tian, W.; Kushner, M. J. Long-Term Effects of Multiply Pulsed Dielectric Barrier Discharges in Air on Thin Water Layers over Tissue: Stationary and Random Streamers. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2015**, *48*, 494002.
- (126) NIST Solution Kinetics Database <http://kinetics.nist.gov/solution/>.
- (127) Loegager, T.; Sehested, K. Formation and Decay of Peroxynitric Acid: A Pulse Radiolysis Study. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10047–10052.
- (128) Merenyi, G.; Lind, J. Free Radical Formation in the Peroxynitrous Acid (ONOOH)/peroxynitrite (ONOO-) System. *Chem Res Toxicol* **1998**, *11*, 243–246.
- (129) NIST Chemical Kinetics Database <http://kinetics.nist.gov/kinetics/>.
- (130) Winter, J.; Wende, K.; Masur, K.; Iseni, S.; Dünbier, M.; Hammer, M. U.; Tresp, H.; Weltmann, K.-D.; Reuter, S. Feed Gas Humidity: A Vital Parameter Affecting a Cold Atmospheric-Pressure Plasma Jet and Plasma-Treated Human Skin Cells. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2013**, *46*, 295401.
- (131) Hefny, M. M.; Pattyn, C.; Lukes, P.; Benedikt, J. Atmospheric-Plasma Generates Oxygen Atoms as Oxidizing Species in Aqueous Solutions. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2016**, *00*, 1–35.

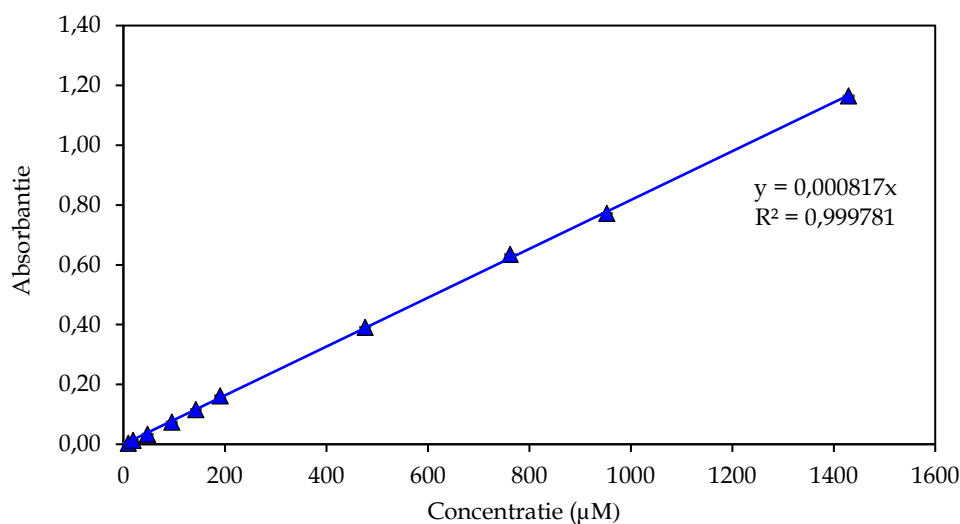
# Appendix

## A.1 Kalibratiecurven

### A.1.1 Kalibratie van H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Tabel A.1: Resultaten van de kalibratie voor de absorptantie in functie van de concentratie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De absorptantie is weergegeven als het gemiddelde van drie herhalingen ± de standaardafwijking op het gemiddelde.

Concentratie (μM)	A	Relatieve fout (%)
9,5	0,003 ± 0,002	65
19,1	0,013 ± 0,001	5,3
47,7	0,033 ± 0,002	6,4
95,3	0,074 ± 0,002	3,2
143,0	0,116 ± 0,002	1,9
190,6	0,161 ± 0,003	1,6
476,5	0,391 ± 0,001	0,3
762,4	0,635 ± 0,001	0,2
953,0	0,772 ± 0,002	0,2
1429,5	1,164 ± 0,002	0,2

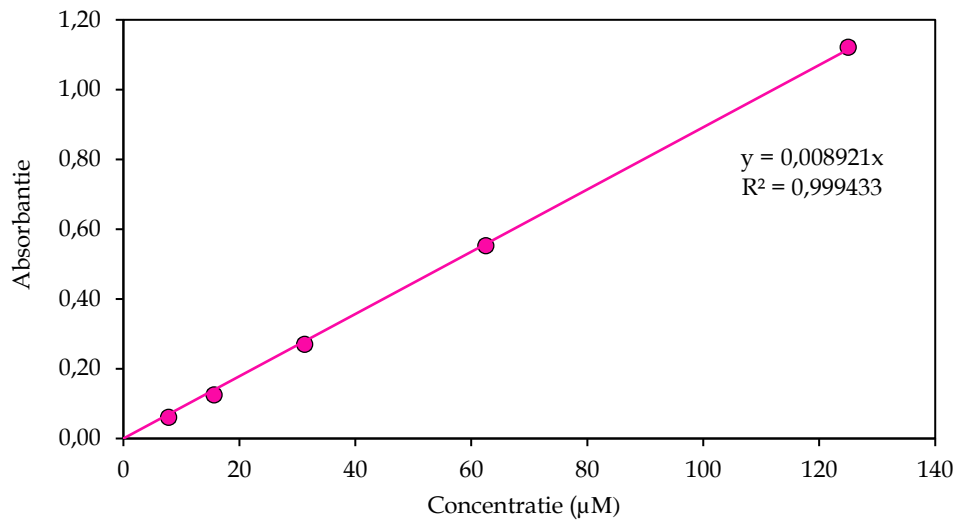


Figuur A.1: Kalibratiecurve voor de absorptantie in functie van de concentratie van H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De R<sup>2</sup>-waarde is 0,9998, wat duidt op een lineair verband en de bekomen extinctiecoëfficiënt is 816,58 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

### A.1.2 Kalibratie van NO<sub>2</sub><sup>-</sup>

Tabel A.2: Resultaten van de kalibratie voor de absorptantie in functie van de concentratie NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. De absorptantie is weergegeven als het gemiddelde van drie herhalingen ± de standaardafwijking op het gemiddelde.

Concentratie (μM)	A	Relatieve fout (%)
7,8	0,061 ± 0,004	5,8
15,6	0,125 ± 0,004	3,4
31,3	0,270 ± 0,005	1,8
62,5	0,553 ± 0,007	1,2
125,0	1,12 ± 0,02	1,4

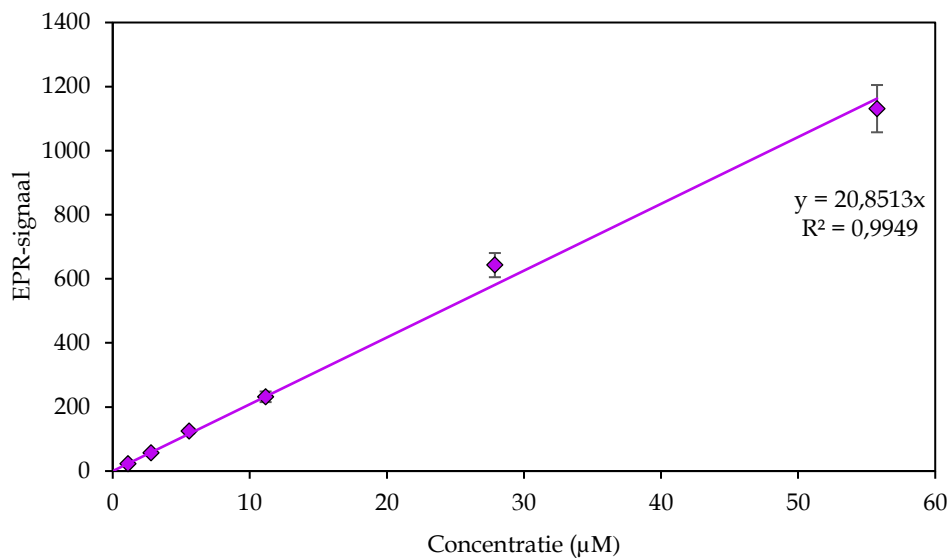


**Figuur A.2:** Kalibratiecurve voor de absorptie in functie van de concentratie van  $\text{NO}_2$ . De  $R^2$ -waarde is 0,9994, wat duidt op een lineair verband en de bekomen extinctiecoëfficiënt is  $8921 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

### A.1.3 Kalibratie van 4-hydroxy-TEMPO

**Tabel A.3:** Resultaten van de kalibratie voor de absorptie in functie van de concentratie 4-hydroxy-TEMPO. De absorptie is weergegeven als het gemiddelde van zes herhalingen  $\pm$  de standaardafwijking op het gemiddelde.

Concentratie ( $\mu\text{M}$ )	A	Relatieve fout (%)
1,1	$23,0 \pm 1,9$	8,4
2,8	$56,8 \pm 1,8$	3,2
5,6	$124,9 \pm 7,1$	5,7
11,2	$232 \pm 17$	7,2
27,9	$643 \pm 38$	5,9
55,8	$1131 \pm 74$	6,5



**Figuur A.3:** Kalibratiecurve voor de absorptie in functie van de concentratie van  $\text{NO}_2$ . De  $R^2$ -waarde is 0,9949, wat duidt op een lineair verband. De verhouding van het EPR-signaal op de concentratie radicalen in  $\mu\text{M}$  is 20,8513.



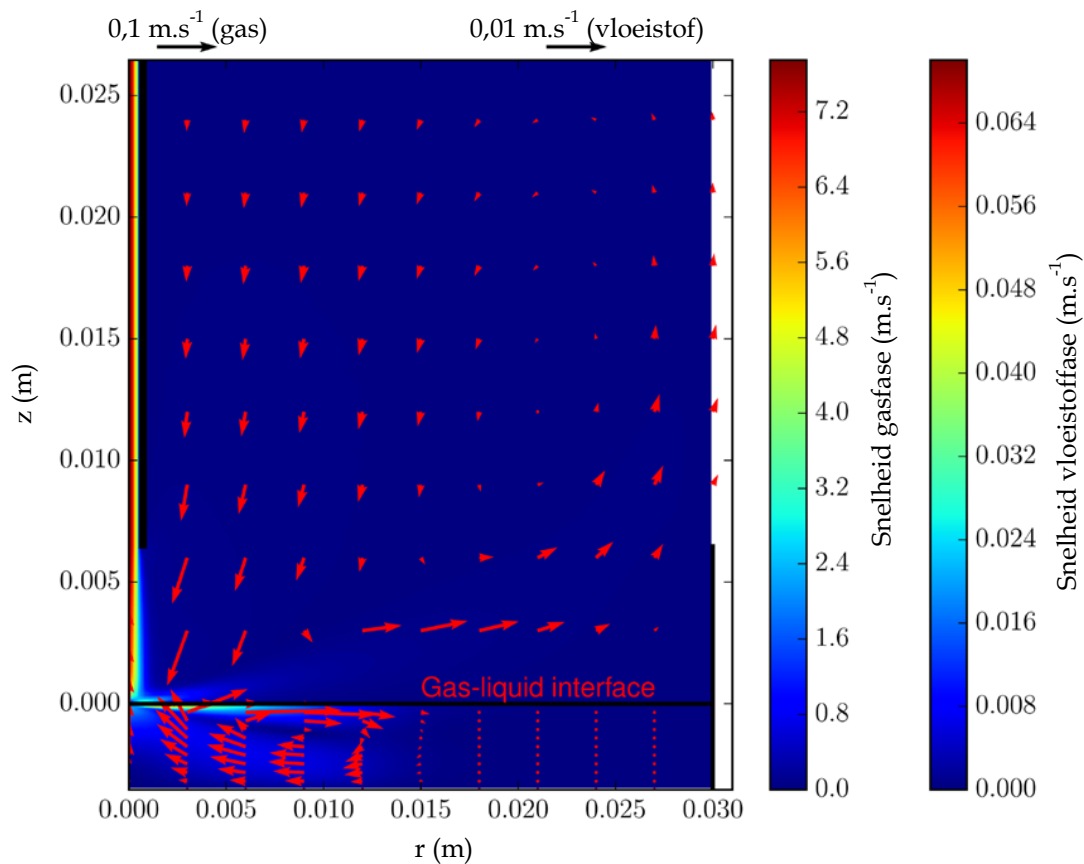
## A.2 Evaporatie van de vloeistof

Tabel A.4: Resultaten voor de evaporatie van de vloeistof bij de plasmabehandeling van 1 mL PBS bij de aangegeven condities. Tijd staat voor de plasmabehandelingstijd. De massa van de PBS werd voor en na de behandeling bepaald en het verschil daartussen is een maat voor de verdampte hoeveelheid water. Hoewel PBS waarschijnlijk een iets andere dichtheid heeft dan water, wordt er benaderd dat 1 mL PBS een massa van 1 g heeft.

Gasdebiet (slm)	Gap (mm)	Tijd (min)	Vershil in massa (g)	Evaporatie (%)
1	10	0,5	0,020	2,0
1	10	1	0,034	3,4
1	10	1,5	0,044	4,4
1	10	2	0,058	5,8
1	10	3	0,089	8,9
1	10	5	0,152	15,2
1	10	7	0,205	20,5
1	30	1	0,066	6,6
1	30	7	0,365	36,5
3	20	4	0,137	13,7
5	10	1	0,024	2,4
5	10	7	0,166	16,6
5	30	1	0,052	5,2
5	30	7	0,277	27,7

## A.3 Vergelijking van het model met de literatuur

### A.3.1 Snelheidsprofiel



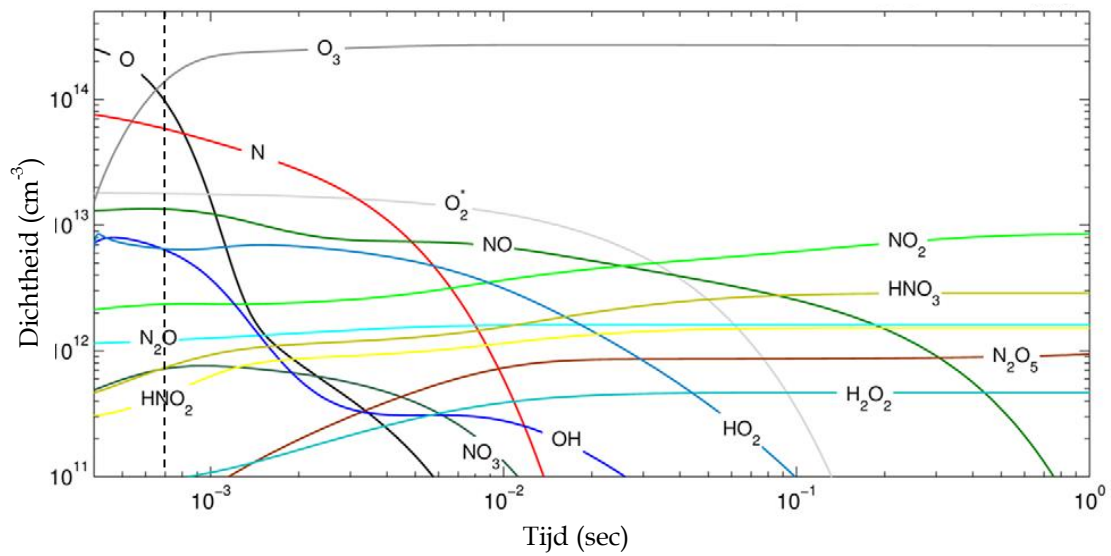
Figuur A.4: Snelheidsprofiel overgenomen uit Lindsay *et al*<sup>87</sup> ter vergelijking met het snelheidsprofiel uit ons model. Hier wordt een petrischaal beschouwd in plaats van een beker in ons model. Het gasdebiet is ook veel lager, waardoor het snelheidsprofiel er in de vloeistof lichtjes anders uitziet.





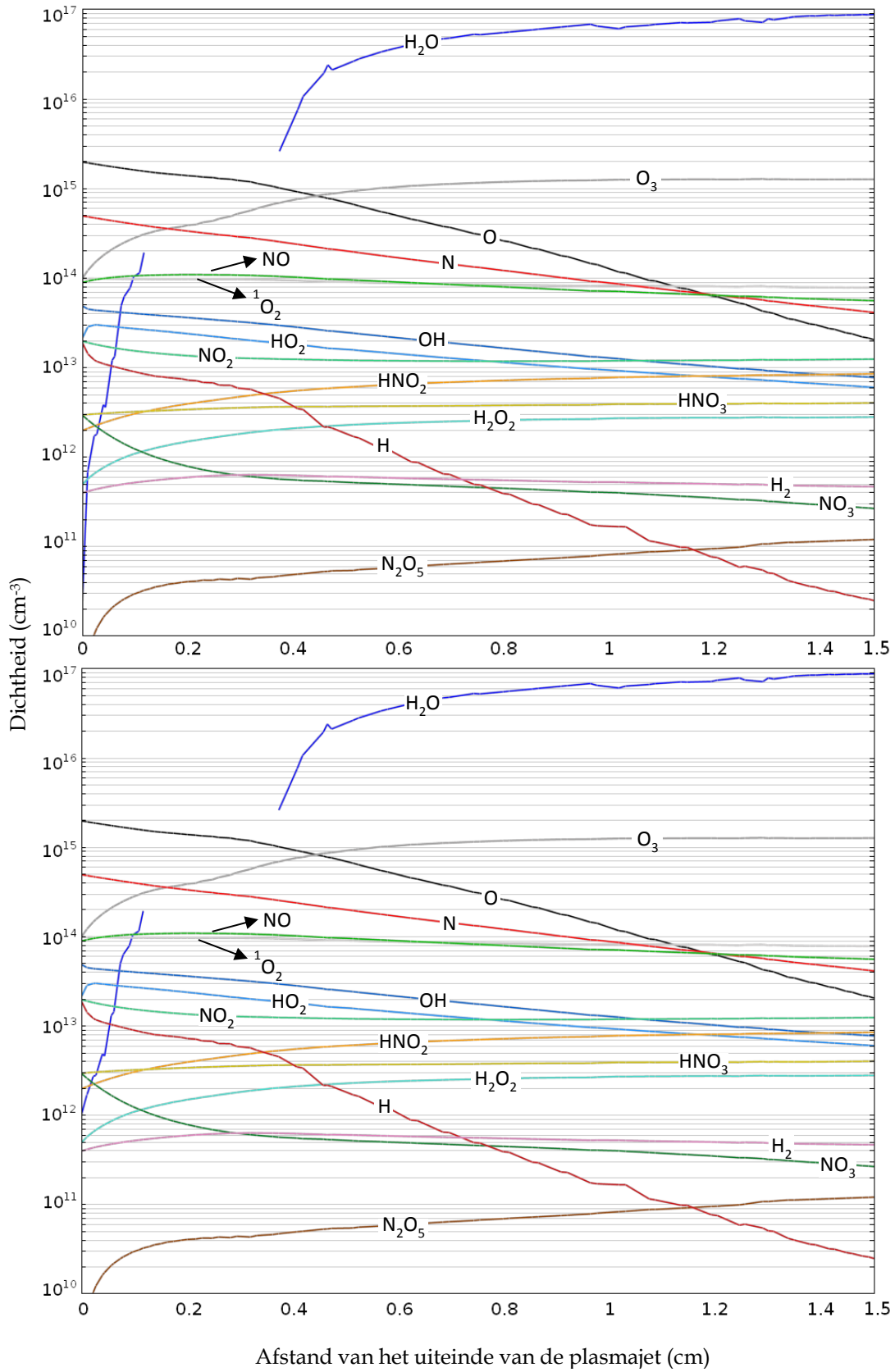
Figuur A.5: Foto's van de gevisualiseerde stroming in water met een helium gasstroom van 1,4 slm, overgenomen uit Hefny *et al*<sup>131</sup>. Hier zijn de vortices die in ons model opgemerkt worden in de vloeistoffase duidelijk zichtbaar.

### A.3.2 Dichtheidsprofielen in de gasfase



Figuur A.6: Dichtheidsprofielen in de gasfase, overgenomen uit Schmidt-Bleker *et al*<sup>114</sup>. Bij een snelheid van 3 slm doet de gasstroom er ongeveer  $7 \times 10^{-4}$  sec over om het vloeistofoppervlak te bereiken. De tijd waarop de vergelijking met de dichtheidsprofielen uit ons model moeten worden gemaakt is aangeduid met een verticale stippellijn.

## A.4 Effect van de luchtvochtigheid



Figuur A.7: Dichtheidsprofielen van de deeltjes vanaf het uiteinde van de plasmajet tot op het vloeistofoppervlak. Boven: standaard model, onder: met toegevoegde reactieset voor H<sub>2</sub>O-reacties en inlaatconcentratie voor H<sub>2</sub>O.