

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Εργαστήριο Μηχανικής, Ανάπτυξης και Σχεδιασμού
Κρυστάλλων**



Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

**Βιομημητικές προσεγγίσεις στη διαχείριση πυριτίου από τα
διάτομα: πλειοτροπική δράση βιοπολυμερών και
συνθετικών πολυμερών**

Αργυρώ Σπινθάκη

Υπεύθυνος Καθηγητής: Κωνσταντίνος Δημάδης

Ηράκλειο 2016

**UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

Crystal Growth and Design Laboratory



Master Thesis

**Biomimetic approaches of diatoms inspirational
management of silicic acid: the pleiotropic role of
biopolymers and artificial polymers**

Argyro Spinthaki

Thesis Supervisor: Konstantinos D. Demadis

Heraklion 2016

Εξεταστική Επιτροπή

Κωνσταντίνος Δημάδης

Καθηγητής (Επιβλέπων), Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Κωνσταντίνος Μήλιος

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Κέλλυ Βελώνια

Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών, Πανεπιστήμιο
Κρήτης

Ευχαριστίες:

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους συνέβαλαν με τον τρόπο τους στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Αρχικά, το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης τόσο για την ευκαιρία υλοποίησης του παρόντος διπλώματος ειδίκευσης, όσο και για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε.

Ένα μεγάλο, από καρδιάς, ευχαριστώ στον επιβλέποντα μου Καθηγητή Κωνσταντίνο Δημάδη για την ευκαιρία και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε να συμμετάσχω στην ερευνητική του ομάδα. Η πολύτιμη καθοδήγηση του, η άμεση απόκριση του σε κάθε ανησυχία μου και η πάντα με χαμόγελο επίλυση του κάθε προβλήματος, αποτέλεσαν καθοριστικά χαρακτηριστικά, όχι μόνο για την ολοκλήρωση της παρούσης εργασίας, αλλά για την όμορφη λειτουργία του εργαστηρίου.

Οφείλω να ευχαριστήσω τα μέλη της επιτροπής μου που πρόθυμα δέχτηκαν να αξιολογήσουν την παρούσα εργασία: Αν. Καθ. Κωνσταντίνο Μήλιο και Επ. Καθ. Κέλλυ Βελώνια.

Για την παρέα τους, τη βοήθειά τους, την ικανότητα να δημιουργούν το καλύτερο κλίμα συνεργασίας, αλλά κυρίως για τις όμορφες στιγμές μας, ευχαριστώ τα μέλη του εργαστηρίου Μηχανικής, Ανάπτυξης και Σχεδιασμού Κρυστάλλων. Ιδιαίτερες ευχαριστίες στη Μελίνα που με τον πιο όμορφο τρόπο με εισήγαγε στη χημεία του διοξειδίου του πυριτίου. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τα μέλη του Εργαστηρίου Ανόργανης Χημείας του Αν. Καθ. Κωνσταντίνου Μήλιου για την ανεξάντλητη προθυμία τους για βοήθεια, συνεργασία και όμορφη παρέα.

Κανενός είδους προσπάθεια, μικρή ή μεγάλη δεν θα ήταν δυνατό να επιτευχθεί χωρίς τη συνεισφορά των αγαπημένων μου φίλων. Δεν μπορώ να παραλείψω την ανεκτίμητη στήριξη της ομάδας μου, που συχνά υπήρξε αρωγός δύναμή μου.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ σε αυτούς που πάντα ανιδιοτελώς θα με φροντίζουν και θα μου παρέχουν απλόχερα την αγάπη τους, την οικογένειά μου.

Βιογραφικό Σημείωμα

Αργυρώ Σπινθάκη – Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Διεύθυνση: Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Βασιλικά Βουτών 71003, Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα

Τηλέφωνο: +00306942232250

E-mail: iro.chemistry@gmail.com

Ημερομηνία γέννησης: 25 Οκτωβρίου 1992

Τόπος γέννησης: Τύλισος, Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα

Εκπαίδευση:

10/2014 – σήμερα: Μεταπτυχιακή φοιτήτρια στο Γενικό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη του Καθ. Κωνσταντίνου Δημάδη.

12/2010 – 09/2014: Πτυχίο Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης (Ελλάδα).

09/2013 – 01/2014: Εκπόνηση διπλωματικής εργασίας στο τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης υπό την επίβλεψη του Καθ. Κωνσταντίνου Δημάδη, με τίτλο «*Μελέτη Παρεμποδιστικής Ικανότητας Βιομορίων στον Πολυμερισμό του Πυριτικού Οξέος: Sericin & Peptide SPZ-10*».

06/2013 – 08/2013: Πρακτική άσκηση στο IPF- Leibniz Institute of Polymer Research in Dresden, Germany, DAAD Rise Internship. Θέμα: “*Biosurface Engineering on Polymer Brushes*”

Διδακτική Εμπειρία:

02/2015 – 05/2015 : Βοηθός στα προπτυχιακά εργαστήρια Βιοχημείας

02/2015 – 05/2015 : Βοηθός στα προπτυχιακά εργαστήρια Οργανικής Χημείας

Υποτροφία:

Υποτροφία DAAD Rise για εκπόνηση πρακτικής άσκησης στο IPF- Leibniz Institute

of Polymer Research στη Δρέσδη, Γερμανία, το διάστημα 06/2013 – 08/2013

Συνέδρια:

Προφορική παρουσίαση στο 13^ο Διεθνές συνέδριο Biomineralization, που πραγματοποιήθηκε στη Γρανάδα, Ισπανία, με τίτλο “Silicic Acid Stabilization by Recombinant Silaffin- Like Cationic Polypeptide P5S3 and its “Turn-off” by Anionic Polyelectrolytes” 18/09/2015

Σεμινάρια:

- Σεμινάριο Hellamco 10/03/15
- Εθελοντική συμμετοχή στη διοργάνωση των Tedx Heraklion 2014, 2015

Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά : ECPE (C2 Level)

Δημοσιεύσεις:

- 1) A. Spinthaki, A. Stathoulopoulou and K. D. Demadis*, «*Profound “turn-off” effects of anionic polymers on the inhibitory activity of cationic polyallylamine in the prevention of silica scale*», Int. J. Corros. Scale Inhib. 2015, **4**, no. 1, 85–95.
- 2) A. Spinthaki, A. Stathoulopoulou and K. D. Demadis* «*The interplay between cationic polyethyleneimine and anionic polyelectrolytes for the control of silica scale formation in process waters*» Int. J. Corros. Scale Inhib. 2015, **4**, no. 2, 125–138.
- 3) A. Spinthaki, C. Zerfaß, H. Paulsen, S. Hobe* and K. D. Demadis* «*Pleiotropic Role of Recombinant Silaffin-Like Cationic Polypeptide P5S3: Peptide-Induced Silicic Acid Stabilization, Silica Formation and Inhibition of Silica Dissolution*», 2016, υπεβλήθη για δημοσίευση.

Αθλητικές Δεξιότητες: Κατάκτηση 3^{ης} θέσης στο Πανελλήνιο Πρωτάθλημα Κολύμβησης που διεξήχθη στο ΟΑΚΑ, Αθήνα 2008.

Curriculum Vitae

Argyro Spinthaki – Graduate Student, University of Crete

Address: Department of Chemistry, University of Crete,

Vasilika Vouton 71003, Heraklion Crete, Greece

Mobile: +00306942232250

E-mail address: iro.chemistry@gmail.com

Date of birth: October 25th, 1992

Place of birth: Tylissos, Heraklion Crete, Greece

Nationality: Greek

Education:

10/2014 – today : Graduate student, Department of Chemistry, University of Crete
under the supervision of Prof. Konstantinos D. Demadis

12/2010 – 09/2014: B. Sc. in Chemistry, at the University of Crete (Greece).

09/2013 – 01/2014: Undergraduate Research Thesis at the Department of Chemistry,
University of Crete, under the supervision of Professor
Konstantinos D. Demadis, titled " Silicic Acid Stabilization by
biomolecules: Sericin and SPZ-10".

06/2013 – 08/2013: Training Placement in IPF- Leibniz Institute of Polymer Research
in Dresden, Germany, DAAD Rise Internship. Subject:
“Biosurface engineering on Polymer Brushes”

Teaching experience:

02/2015 – 05/2015 : Teaching assistant in the undergraduate Biochemistry Lab

02/2015 – 05/2015 : Teaching assistant in the undergraduate Organic Chemistry Lab

Fellowship:

DAAD Rise Internship during 06/2013 – 08/2013 for Training Placement in IPF
Leibniz Institute of Polymer Research in Dresden, Germany

Symposium:

Presentation of “Silicic Acid Stabilization by Recombinant Silaffin- Like Cationic Polypeptide P5S3 and its “Turn-off” by Anionic Polyelectrolytes” as a talk, in the 13th International Biomineralization Conference in Granada, Spain, 18/09/2015

Also attended:

- Hellamco Seminar 10/03/15
- Volunteer in Tedx Heraklion 2014, 2015

Languages

English : ECPE (C2 Level)

Publications:

1. A. Spinthaki, A. Stathoulopoulou and K. D. Demadis*, «*Profound “turn-off” effects of anionic polymers on the inhibitory activity of cationic polyallylamine in the prevention of silica scale*», Int. J. Corros. Scale Inhib. 2015 **4**, no. 1, 85–95.
2. A. Spinthaki, A. Stathoulopoulou and K. D. Demadis* «*The interplay between cationic polyethyleneimine and anionic polyelectrolytes for the control of silica scale formation in process waters*» Int. J. Corros. Scale Inhib. 2015, **4**, no. 2, 125–138.
3. A. Spinthaki, C. Zerfaß, H. Paulsen, S. Hobe* and K. D. Demadis* «*Pleiotropic Role of Recombinant Silaffin-Like Cationic Polypeptide P5S3: Peptide-Induced Silicic Acid Stabilization, Silica Formation and Inhibition of Silica Dissolution*», 2016, submitted.

Athletic Skills and Competences:

3rd winner of the National Swimming Championship in Athens, OAKA 2008

Περίληψη

Τα διάτομα είναι η κυριότερη κατηγορία μικροοργανισμών που ευθύνεται για την παγκόσμια διαχείριση του πυριτικού οξέος και άλλων ειδών “Si”. Έχουν την ικανότητα να συνθέτουν το κέλυφός τους από άμορφο διοξείδιο του πυριτίου, χρησιμοποιώντας ως πηγή το πυριτικό οξύ, το οποίο, μέσω πολύπλοκων μηχανισμών, συλλέγουν και αποθηκεύουν σε υπέρκορα διαλύματα.

Σκοπός της έρευνάς μας είναι η μελέτη και κατανόηση των μηχανισμών αυτών χρησιμοποιώντας συνθετικά, βιοεμπνεόμενα συστήματα. Στα πλαίσια αυτών, μελετάται η επίδραση πληθώρας μορίων στην αναστολή, αλλά και στην καταλυτική ενίσχυση του πολυμερισμού του πυριτικού οξέος. Πρωταγωνιστικό ρόλο στην παρούσα μελέτη διαδραματίζει το ανασυνδιασμένο (recombinant) (πολυ)πεπτίδιο με κωδική ονομασία *P5S3*, το οποίο πληροί τις προϋποθέσεις και για τις δύο αυτές πλευρές της χημείας του πυριτικού οξέος (σταθεροποίηση, συμπύκνωση). Θα επικεντρωθούμε στη σταθεροποίηση του μονομερούς, Si(OH)_4 (μονοπυριτικό οξύ), σε επίπεδα υψηλότερα εκείνων που φυσιολογικά επιτυγχάνονται *in vitro* (~180 ppm, ~ 2 mM), στις αλληλεπιδράσεις που είναι υπεύθυνες για τη διαδικασία αυτή, αλλά και στο πώς αυτή επηρεάζεται κατά την προσθήκη ανιοντικών ηλεκτρολυτών, όπως τα πολυακρυλικά (PAA) και τα φωσφορικά. Τέλος, αξιολογούνται συνθετικά ουδέτερα πολυμερή που επιβεβαιώνουν τη χρησιμότητα διαφορετικού τύπου λειτουργικών ομάδων, από εκείνες που μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν αναντικατάστατες.

Λέξεις κλειδιά: πυριτικό οξύ, διάτομα, πολυμερισμός, σταθεροποίηση

Abstract

Diatoms are an example of biomineralizing organisms that are capable of processing and metabolizing Si in the form of silica (SiO_2), and thus take part in the world's "Si" cycle. They need to manage the basic aspects of silica chemistry when they form their cell wall using polymeric, amorphous silica, starting out from monosilicic acid ($\text{Si}(\text{OH})_4$), in neutral pH environment.

This research uses artificial, biomimetic systems, getting one step closer to understanding the inspirational mechanism diatoms utilize for biosilica production. An important part of the project lies on the cationic, Silaffin-like recombinant polypeptide *P5S3*, which seems to affect more than one aspects of silica chemistry. We will focus on its ability to delay silica formation by stabilizing silicic acid at levels significantly above the saturation concentration (~180 ppm, ~ 2 mM), the interactions responsible for the stabilization process and the effects of anionic additives, such as (poly)acrylate (PAA) and phosphate. Some artificial polymers are also studied, giving silica stabilization process inspiring new insights.

Keywords: silicic acid, diatoms, polycondensation, stabilization

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες	II
Βιογραφικό Σημείωμα	III
Περίληψη	VII
Κεφάλαιο I: Εισαγωγή στη Χημεία του Διοξειδίου του Πυριτίου	1
I.1: Πυρίτιο	3
I.2: Η Χημεία του Διοξειδίου του Πυριτίου	4
I.2.1: Διαλυτότητα του Διοξειδίου του Πυριτίου	4
I.2.2: Πολυμερισμός του Διοξειδίου του Πυριτίου	8
I.3: Το Διοξείδιο του Πυριτίου στον Βιολογικό Κόσμο – Διάτομα	12
Κεφάλαιο II: Όργανα, Αντιδραστήρια και Βασικές Πειραματικές Διαδικασίες	17
II.1: Όργανα και Αντιδραστήρια	17
II.2: Παρασκευή Διαλυμάτων	18
II.3: Πειραματική Πορεία Μέτρησης του Διαλυτού SiO ₂	19
II.4: Πειραματική Πορεία Μέτρησης της Θολερότητας των Διαλυμάτων	21
II.5: Πειραματική Πορεία Λήψης Ιζημάτων για Φασματοσκοπία FT-IR, SEM (Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης), EDS (Στοιχειακή Ανάλυση)	22
Κεφάλαιο III: Πολυπεπτιδίο P5S3	23
III.1: Μελέτη Διαλυτότητας του Πυριτικού Οξέος σε Υδατικά Διαλύματα Παρουσία Του Κατιονικού Πολυπεπτιδίου P5S3	24
III.1.1: Αποτελέσματα Σταθεροποίησης Πυριτικού Οξέος σε 3-ήμερα Πειράματα	24
III.1.2: Αποτελέσματα Σταθεροποίησης Πυριτικού Οξέος σε 8-ωρα Πειράματα	26
III.1.3: Μελέτη των Ιζημάτων SiO ₂ παρουσία του Πολυπεπτιδίου P5S3	31
III.2: Μελέτη Διαλυτότητας του Πυριτικού Οξέος σε Υδατικά Διαλύματα Παρουσία του Πολυπεπτιδίου P5S3 και Ανιοντικών Συμπαρεμποδιστών	36
III.2.1: Αποτελέσματα προσθήκης Πολυακρυλικού Οξέος	36
III.2.2: Αποτελέσματα προσθήκης Δισόξινου Φωσφορικού Καλίου	46
III.2.3: Μελέτη των Ιζημάτων του Διοξειδίου του Πυριτίου παρουσία P5S3 και των Ανιοντικών Συμπαρεμποδιστών	48
III.3: Συνοπτική Ανακεφαλαίωση Συμπερασμάτων 3 ^{ου} Κεφαλαίου	55

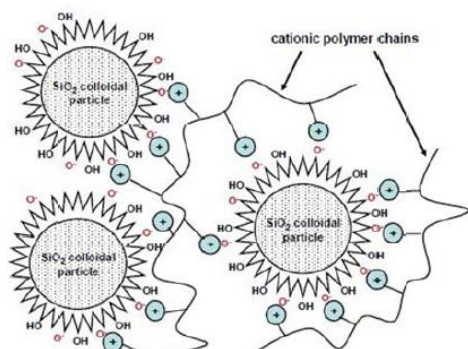
Κεφάλαιο IV: Συνθετικά Πολυμερή	57
IV.1: PM6-0% -PEG950, PM6-10% -PEG950	
IV.1.1: Αποτελέσματα Σταθεροποίησης Πυριτικού Οξέος σε 3-ήμερα Πειράματα	59
IV.1.2: Αποτελέσματα Σταθεροποίησης Πυριτικού Οξέος σε 8-ωρα Πειράματα	63
IV.1.3: Μελέτη των Ιζημάτων SiO ₂ παρουσία των PM6-(q)-PEG950	68
IV.2: 15ATX020-5 (Red)	
IV.2.1: Αποτελέσματα Σταθεροποίησης Πυριτικού Οξέος σε 3-ήμερα Πειράματα	72
IV.2.2: Αποτελέσματα Σταθεροποίησης Πυριτικού Οξέος σε 8-ωρα Πειράματα	74
IV.2.3: Μελέτη των Ιζημάτων SiO ₂ παρουσία του 15ATX020-5 (Red)	75
IV.3: Συμπεράσματα 4 ^ο Κεφαλαίου	77
Κεφάλαιο V: Συμπεράσματα - Προοπτικές	78
Βιβλιογραφία	82

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι:

Εισαγωγή στη Χημεία του Διοξειδίου του Πυριτίου

Ο σχηματισμός του διοξειδίου του πυριτίου και η αναστολή του σχηματισμού του αποτελούν διαδικασίες οι οποίες έχουν απασχολήσει έντονα την επιστημονική κοινότητα τα τελευταία χρόνια, αλλά και παλαιότερα, και σχετίζονται τόσο με τον βιομηχανικό, όσο και με τον βιοχημικό/βιολογικό κλάδο. Ο σχηματισμός του SiO_2 αποτελεί μείζον πρόβλημα για τα υδατικά βιομηχανικά συστήματα και η αποτροπή της επικάθισής του σε επιφάνειες με τη μορφή του άμορφου διοξειδίου του πυριτίου, είναι αφενός επιτακτική ανάγκη, αλλά και σημαντική πρόκληση για την επιστημονική κοινότητα^[1]. Όσον αφορά το βιολογικό κόσμο, υπό συνεχή μελέτη βρίσκονται οργανισμοί όπως τα διάτομα (diatoms) αλλά και είδη σπόγγων (sponges), λόγω της ιδιότητάς τους να συνθέτουν διοξείδιο του πυριτίου για να το χρησιμοποιήσουν ως δομικό υλικό, αφού πρώτα έχουν (προ)συγκεντρώσει και διατηρήσει πυριτικό οξύ σε υπέρκορα διαλύματα.

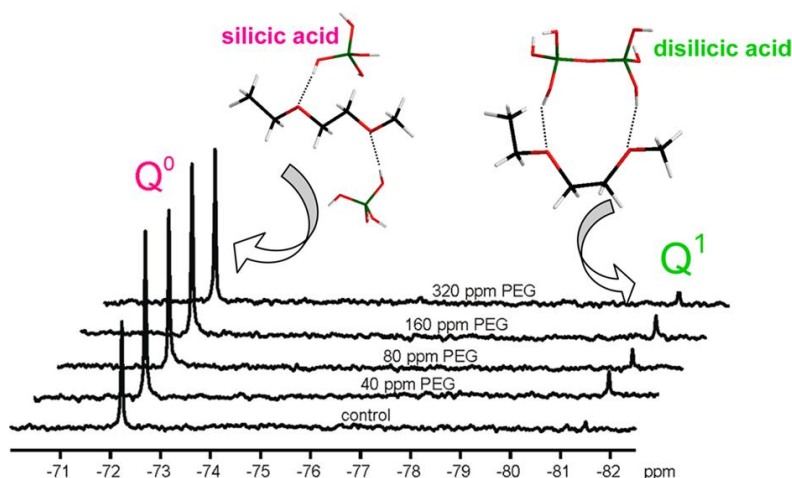
Η εργασία αυτή αποτελεί μέρος της ευρύτερης ερευνητικής μελέτης που πραγματοποιείται εδώ και αρκετά χρόνια στο εργαστήριο Μηχανικής, Ανάπτυξης και Σχεδιασμού Κρυστάλλων και αφορά στην παρεμπόδιση του σχηματισμού άμορφου διοξειδίου του πυριτίου σε υδατικά συστήματα, διατηρώντας έτσι τις «διαλυτές» μορφές του στο διάλυμα (δηλ. μονο- και διπυριτικό οξύ). Έχει προηγηθεί μελέτη διαφόρων χημικών προσθέτων, αρκετά εκ των οποίων έδειξαν σημαντικά αποτελέσματα. Παραδείγματα αυτών είναι διάφορα πολυαμιδικά κατιοντικά μακρομόρια όπως τα CATINs (cationic inulins)^[2] και τα πολυαμινοαμιδικά δενδριμερή (Polyaminoamide dendrimers)^[3,4] PAMAM 1 & PAMAM 2. Η παρεμποδιστική τους δράση φαινομενικά είναι αίτιο ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του κατιοντικού τους φορτίου, το οποίο προκύπτει από την



πρωτονίωση των αμινομάδων σε ουδέτερο pH και των πυριτικών ανιόντων, διαδικασία που παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 1.1.

Εικόνα 1.1: Σχηματική απεικόνιση της παρεμποδιστικής δράσης των κατιοντικών πολυμερικών προσθέτων
Ελήφθη από την παραπομπή [2].

Πρόσφατη μελέτη^[5] που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριό μας προτείνει το ενδιαφέρον σενάριο σύμφωνα με το οποίο η παρεμποδιστική ικανότητα ορισμένων πολυμερών δεν οφείλεται μόνο στο φορτίο τους, αλλά σε σχηματισμούς δεσμών υδρογόνου από δυνητικές ομάδες- δέκτες και δότες. Η έρευνα πραγματοποιήθηκε με χρήση μη φορτισμένων πολυμερών (πολυ)αιθυλενογλυκόλης (Polyethylene glycol, PEGs) και απέδειξε σαφή σταθεροποίηση μονοπυριτικών και διπυριτικών μονάδων με χρήση φασματοσκοπίας ²⁹Si NMR, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στην Εικόνα I.2. Προτείνεται πως οι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ των ομάδων σιλανόλης -Si-O-H και των αιθερικών ομάδων -CH₂- O- CH₂-.



Εικόνα I.2: Αποτελέσματα φασματοσκοπίας ²⁹Si όπου παρατηρείται με σαφήνεια μεγαλύτερη ένταση των κορυφών Q⁰ και Q¹ όταν χρησιμοποιείται PEG Mw 10.000 σε διάφορες συγκεντρώσεις σε σχέση με το διάλυμα ελέγχου (control). Ελήφθη από την παραπομπή [5].

Στην εργασία αυτή μελετάται η παρεμποδιστική ικανότητα του τεχνητού ανασυνδιασμένου κατιονικού πολυπεπτιδίου P5S3. Επίσης, μελετάται η ταυτόχρονη χρήση *συμπαρεμποδιστών* (*co-inhibitors*), μακρομόρια που σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου χρησιμοποιήθηκαν για να ‘ανακουφίσουν’ το θετικό φορτίο των παρεμποδιστών και να εμποδίσουν την ανεπιθύμητη κατακρήμνιση. Χρησιμοποιούνται το Πολυακρυλικό οξύ (Polyacrylic Acid, PAA), σε δύο διαφορετικά μοριακά βάρη, 2 kDa και 450 kDa και το δισόξινο φωσφορικό κάλιο. Η παρεμποδιστική ικανότητα των μορίων μελετήθηκε για διάφορες συγκεντρώσεις αυτών, κατά τη διάρκεια οκτάωρων (8h) και τριήμερων (3d) πειραμάτων σε υπέρκορα διαλύματα πυριτικού οξέος (προερχόμενου από sodium orthosilicate) συγκέντρωσης 500 ppm (8.3 mM). Η κύρια τιμή pH εργασίας ήταν το 7.0, αφενός

διότι οι περισσότερες υδατικές διεργασίες στη φύση πραγματοποιούνται σε ουδέτερα pH, και αφετέρου διότι το νερό που χρησιμοποιείται στα ψυκτικά συστήματα των βιομηχανιών και πλήττεται από την επικάλυψη του διοξειδίου του πυριτίου, βρίσκεται συνήθως σε ουδέτερα pH. Αξίζει επίσης να σημειωθεί πως σε τιμές pH κοντά στο 7 ο σχηματισμός του διοξειδίου του πυριτίου είναι μέγιστος και η δυνατότητα σταθεροποίησης πυριτικών ιόντων σε υπέρκορα διαλύματα είναι δυσκολότερη από ότι σε άλλη περιοχή pH. Στην εργασία επίσης μελετώνται τιμές pH 5.4 και 8.5.

I.1: Πυρίτιο

Το πυρίτιο (Silicon) είναι το χημικό στοιχείο με χημικό σύμβολο Si, ατομικό αριθμό 14 και ατομική μάζα 28,0855 amu. Ως μεταλλοειδές, εντάσσεται στους ημιαγωγούς φέροντας χαμηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα σε θερμοκρασία δωματίου, η οποία όμως αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας^[6]. Ως στοιχείο, το πυρίτιο σπάνια απαντά ελεύθερο στη φύση. Τα διάφορα ορυκτά και πετρώματα του πυριτίου αποτελούν το 87% του φλοιού της Γης, ενώ είναι το δεύτερο σε αφθονία χημικό στοιχείο στη γήινη φύση μετά το οξυγόνο, με ποσοστό 28% και το 7^ο πιο άφθονο στοιχείο στο Σύμπαν^[7]. Επίσης, είναι το δεύτερο μετά τον άνθρακα στοιχείο που σχηματίζει τις περισσότερες ενώσεις με άλλα στοιχεία και ο συνηθέστερος δεσμός που σχηματίζει είναι με το οξυγόνο^[8]. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ενέργεια δεσμού Si – O (452 kJ/mol) που είναι σχεδόν διπλάσια από την αντίστοιχη Si – Si (222 kJ/mol) και αισθητά μεγαλύτερη από αυτή του δεσμού Si – H (318 kJ/mol)^[9]. Επομένως, η χημεία του πυριτίου κυριαρχείται ως επί το πλείστον από ενώσεις με αλυσίδες και πλέγματα δεσμών πυριτίου-οξυγόνου. Τέτοιες είναι το διοξείδιο του πυριτίου και τα πυριτικά άλατα που απαντώνται περίπου στο 95% του γήινου φλοιού^[10]. Το πυρίτιο και οι ενώσεις του έχουν πολλές βιομηχανικές χρήσεις. Το ίδιο το πυρίτιο είναι κύριο συστατικό των περισσότερων ημιαγωγικών συστημάτων και των μικροτσιπ. Οι ημιαγωγικές ιδιότητες των ημιαγωγών πυριτίου παραμένουν σε υψηλότερες θερμοκρασίες σε σύγκριση με των αντίστοιχων του γερμανίου. Ακόμη, το φυσικό του οξείδιο είναι πιο εύρηστο και έτσι σχηματίζεται καλύτερο ζεύγος ημιαγωγών - διηλεκτρικών, σε σχέση με κάθε άλλο γνωστό υλικό. Ακόμη, στη μορφή του χαλαζία και διαφόρων πυριτικών ενώσεων σχηματίζει χρήσιμα υαλικά, τσιμέντα και κεραμικά προϊόντα. Είναι ακόμη ένα κύριο συστατικό

των σιλικονών, μια τάξη πολυμερών που περιέχουν πυρίτιο, άνθρακα, οξυγόνο και υδρογόνο (με γενικό τύπο $[R_2SiO]_n$, όπου R μονοσθενής οργανική ομάδα^[11]). Το πυρίτιο είναι απαραίτητο στοιχείο στη βιολογία, αν και ειδικά για τα ζώα αποτελεί απλά ιχνοστοιχείο, ενώ έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμο και για τον ανθρώπινο οργανισμό^[12]. Είναι όμως πιο σημαντικό για το μεταβολισμό των φυτών, ειδικότερα για πολλά ποώδη από αυτά^[13]. Επίσης, πολλοί μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τα πυριτικά που προκύπτουν από τη διάλυση αντίστοιχων πετρωμάτων και έτσι παίρνουν μέρος στον κύκλο του πυριτίου^[14]. Βασικό ρόλο στην παγκόσμια διαχείριση του πυριτίου παίζουν τα διάτομα^[15], που χρησιμοποιούν το διοξείδιο του πυριτίου για το σχηματισμό των κελυφών τους και θα μελετηθούν εκτενέστερα στο αντίστοιχο κεφάλαιο.

I.2: Η Χημεία του Διοξειδίου του Πυριτίου

Το διοξείδιο του πυριτίου είναι ένα στερεό ομοιοπολικού πλέγματος στο οποίο κάθε άτομο πυριτίου είναι ενωμένο ομοιοπολικά σε τετραεδρική διάταξη με τέσσερα άτομα οξυγόνου. Απαντάται σε διάφορες μορφές όπως είναι η κρυσταλλική, η άμορφη, η ενυδατωμένη και η υδροξυλιωμένη. Παράδειγμα κρυσταλλικής μορφής αποτελεί ο χαλαζίας (quartz), κύριο συστατικό των ηφαιστιογενών και ιζηματογενών πετρωμάτων. Στη φύση υπάρχει μια τεράστια ποικιλία πυριτικών ορυκτών με βασικές μονάδες τετράεδρα SiO_4 , όπως ο ζirkονίτης ($ZrSiO_4$), ο βιλλεμίτης (Zr_2SiO_4), η βήρυλλος ($Be_3Al_2(SiO_3)_6$ συστατικό των σμαραγδιών, το ορθόκλαστο ($KAlSiO_3$) συστατικό των γρανιτών, ο σποδουμένιος ($LiAl(SiO_3)_2$), ο μαρμαρυγίας, ο χρυσοτίλης κ.ά^[16].

I.2.1: Διαλυτότητα του Διοξειδίου του Πυριτίου

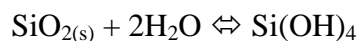
Η υδατική χημεία του διοξειδίου του πυριτίου σχετίζεται με έναν αριθμό συζευγμένων διαδικασιών, όπως η διάλυση και η κατακρήμνιση, η απορρόφηση και προσρόφηση, η βιολογική εναπόθεση, η υδατική συμπλοκοποίηση σε κατιονική ή ανιοντική μορφή και η αντίστοιχη διαδικασία στη διεπιφάνεια σωματιδίου-νερού^[17]. Η παρουσία του διοξειδίου του πυριτίου στους υδάτινους αποδέκτες βασίζεται στη διαλυτοποίηση των πυριτικών ορυκτών που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη

ενότητα. Στον πίνακα I.1 παρατίθενται οι βασικές τιμές διαλυτότητας του διοξειδίου του πυριτίου σε διάφορα υδάτινα είδη. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως η συγκέντρωση πυριτικού οξέος αυξάνεται ανάλογα με το βάθος της υδάτινης πηγής.

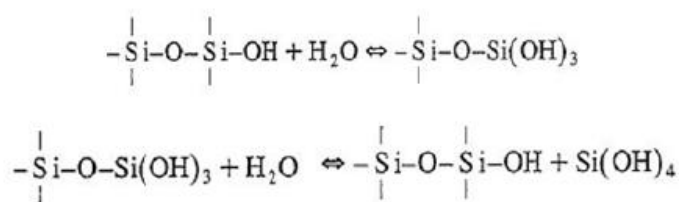
Πίνακας I.1^[10]: Τυπικές τιμές συγκέντρωσης πυριτικού οξέος σε διάφορα ύδατα.

<u>Φυσικά νερά</u>	<u>Συγκέντρωση (ppm)</u>
Λίμνες	1-3
Μεγάλα ποτάμια	3-15
Θαλασσινό νερό	1-10
Πηγές	2-60
Πηγές σε ηφαιστειογενής περιοχές ή πετρελαιοπηγές	5-300

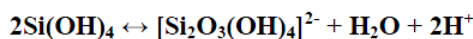
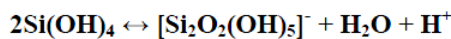
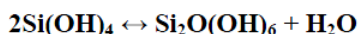
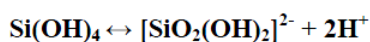
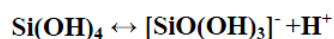
Από χημικής απόψεως, η διάλυση του διοξειδίου του πυριτίου βασίζεται στην υδρόλυση των δεσμών Si – O – Si^[17]. Πρόκειται για μία πολύπλοκη διαδικασία την οποία διέπουν πληθώρα χημικών ισορροπιών, που μπορούν να συνοψιστούν στην παρακάτω γενική έκφραση:



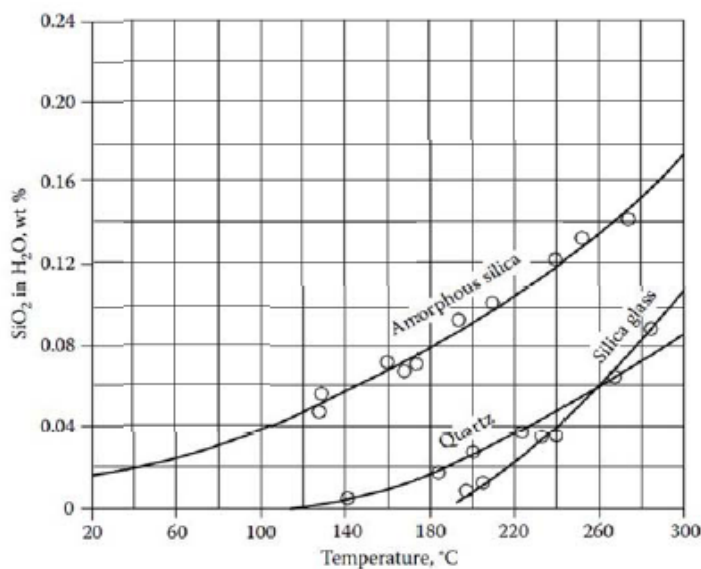
που μπορεί να αναλυθεί στα επιμέρους στάδια:



Η πλέον υδατοδιαλυτή μορφή του πυριτικού οξέος είναι τα ‘ορθοπυριτικά’ ή ‘μονοπυριτικά’ οξέα (molybdate – reactive silica), στη μέτρηση των οποίων βασίζεται και η πειραματική διαδικασία της παρούσας εργασίας. Πρόκειται για ασθενή οξέα που κυριαρχούν στα φυσικά νερά με pH > 9. Το διμερές του πυριτικού οξέος είναι επίσης υδατοδιαλυτό αλλά απαντάται σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις. Παρακάτω παρατίθενται τα πυριτικά είδη και ισορροπίες που τα διέπουν.



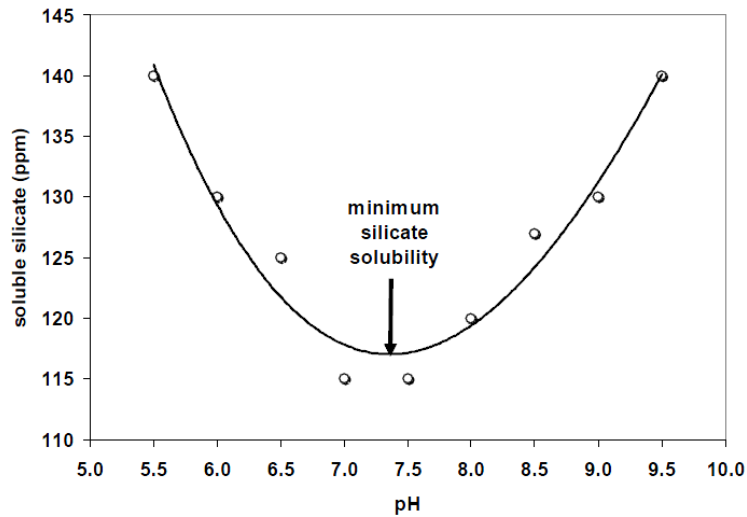
Η διαλυτότητα του διοξειδίου του πυριτίου είναι μία ιδιότητα εξαιρετικά εξαρτώμενη από διάφορες μεταβλητές, όπως οι τιμές pH του νερού, η θερμοκρασία, η παρουσία αλάτων, η μορφή στην οποία τα πυριτικά βρίσκονται κ.α. Όσον αφορά τη θερμοκρασία, η διαλυτότητα αυξάνεται ανάλογα με την αύξηση αυτής, όπως διαπιστώνεται και από το διάγραμμα της Εικόνας I.3^[18]. Επίσης, στο ίδιο διάγραμμα παρατηρείται λεπτομερώς η εξάρτηση της διαλυτότητας από τη μορφή στην οποία βρίσκεται το πυριτικό οξύ. Φαίνεται πως, το άμορφο διοξείδιο του πυριτίου είναι πιο ευδιάλυτο από το κρυσταλλικό, γεγονός που οφείλεται στην επιπρόσθετη σταθερότητα που προσδίδει η κρυσταλλική δομή.



Εικόνα I.3: Μελέτη της διαλυτότητας διάφορων μορφών του διοξειδίου του πυριτίου συναρτήσει της θερμοκρασίας. Ελήφθη από την παραπομπή [18].

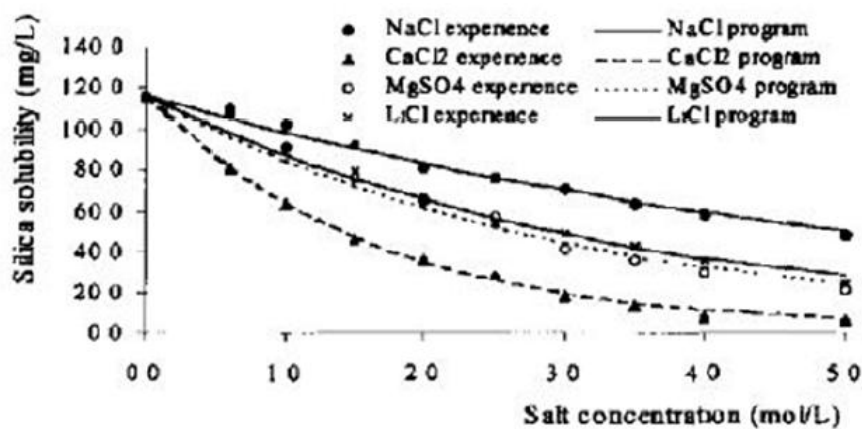
Η εξάρτηση της διαλυτότητας του διοξειδίου του πυριτίου από το pH διαγράφει μία διαφορετική πορεία. Από το διάγραμμα I.4 παρατηρείται η δημιουργία μιας καμπύλης με ανοδικά κοίλα, η οποία δηλώνει πως σε χαμηλές και υψηλές τιμές pH η διαλυτότητα είναι αυξημένη, ενώ όσο η καμπύλη τείνει σε φυσιολογικά pH η

ελάττωση της διαλυτότητας είναι ραγδαία. Η καμπύλη της διαλυτότητας εξηγείται βάσει του αρνητικού φορτίου του πυριτικού οξέος σε υψηλά pH. Υψηλός ιονισμών των πυριτικών οδηγεί σε παρεμπόδιση της διαδικασίας πολυμερισμού, καθώς οι αρνητικά φορτισμένες σιλανόλες απωθούνται μεταξύ τους.



Εικόνα 1.4: Η διαλυτότητα του διοξειδίου του πυριτίου συναρτήσει του pH Ελήφθη από την παραπομπή [2].

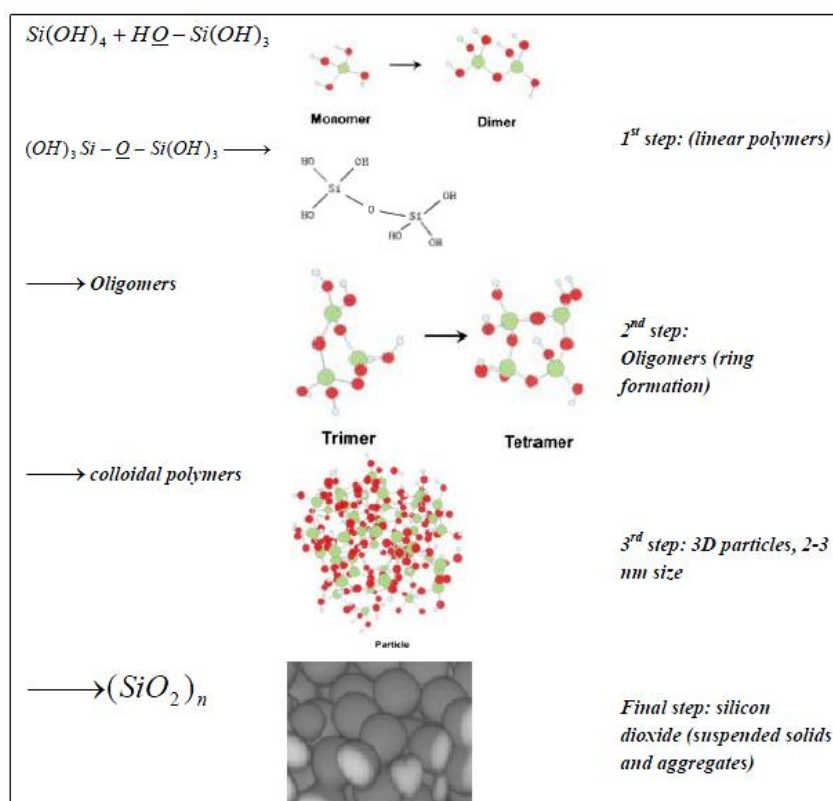
Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, η διαλυτότητα του διοξειδίου του πυριτίου εξαρτάται και από την παρουσία ή μη, ευδιάλυτων αλάτων στο νερό. Πλήθος πειραματικών μετρήσεων, πολλές εκ των οποίων παρατίθενται στο διάγραμμα 1.5 δείχνουν πως η διαλυτότητα αυξάνεται αντίστροφα από τη συγκέντρωση αλάτων όπως το CaCl_2 και το MgSO_4 [19]. Επίσης, όσο μεγαλύτερη είναι η ιοντική ακτίνα των μονοσθενών κατιόντων, τόσο αυξάνεται η διαλυτότητα του πυριτικού οξέος.



Εικόνα 1.5: Η εξάρτηση της διαλυτότητας του SiO_2 από την παρουσία διάφορων αλάτων. Ελήφθη από την παραπομπή [19].

I.2.2: Πολυμερισμός του Διοξειδίου του Πυριτίου

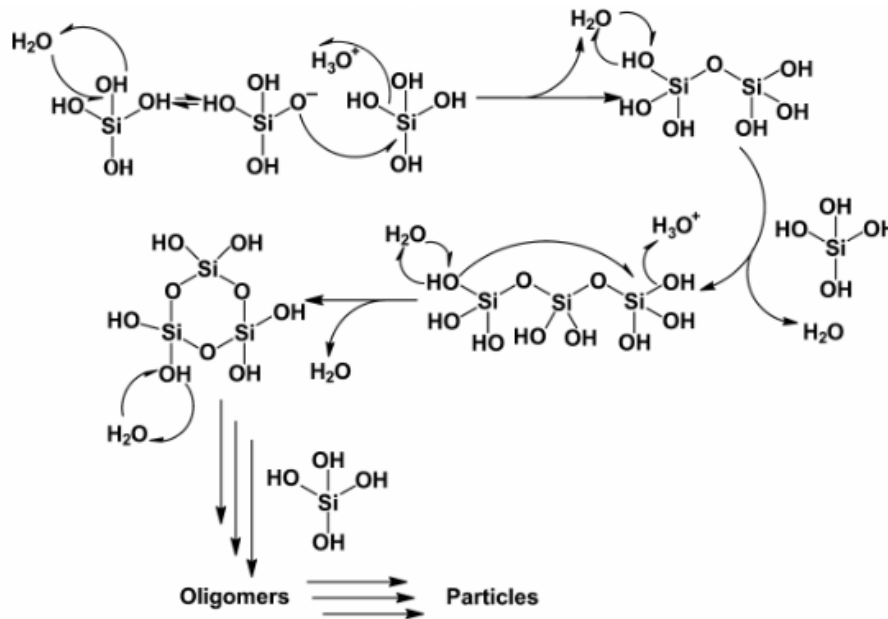
Το πυριτικό οξύ, σε υπέρκορα διαλύματα των περίπου 2×10^{-3} M και άνω, υπόκειται σε ταχύ πολυμερισμό. Σύμφωνα με αυτή τη διαδικασία, δύο μονομερή $\text{Si}(\text{OH})_4$ συμπυκνώνονται, υφιστάμενα ταυτόχρονα απώλεια ενός μορίου νερού. Από τη στιγμή που θα δημιουργηθεί το διμερές, η ταχύτητα πολυμερισμού αυξάνεται, καθώς η σταθερά ιονισμού των πολυμερικών ειδών είναι μεγαλύτερη από τη σταθερά ιονισμού του μονομερούς $\text{Si}(\text{OH})_4$. Εξαιτίας αυτού, ο σχηματισμός του διμερούς από το μονομερές είναι το κρίσιμο από κινητικής απόψεως στάδιο του πολυμερικού μηχανισμού. Η διαδικασία πολυμερισμού του πυριτικού οξέος παρουσιάζεται στην Εικόνα I.6.



Εικόνα I.6: Σχηματική αναπαράσταση του πολυμερισμού του πυριτικού οξέος. Ελήφθη από την παραπομπή [2].

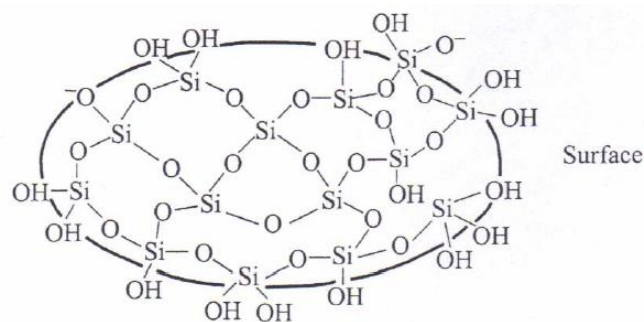
Μηχανιστικά, πρόκειται για μια αντίδραση πυρηνόφιλης υποκατάστασης δύο μορίων (τύπου $\text{S}_{\text{N}}2$), η οποία περιγράφεται από το σχήμα της Εικόνας I.7^[20]. Ιόντα υδροξυλίου του νερού λειτουργούν καταλυτικά, ιονίζοντας μόρια ορθοπυριτικού και

δημιουργώντας έτσι ιόντα σιλανόλης, τα οποία λειτουργούν ως τα προσβάλλοντα πυρηνόφιλα για τα άτομα πυριτίου μη ιονισμένων μονομερών.



Εικόνα 1.7: Μηχανιστική απεικόνιση της πορείας του πολυμερισμού του πυριτικού οξέος. Ελήφθη από την παραπομπή [20].

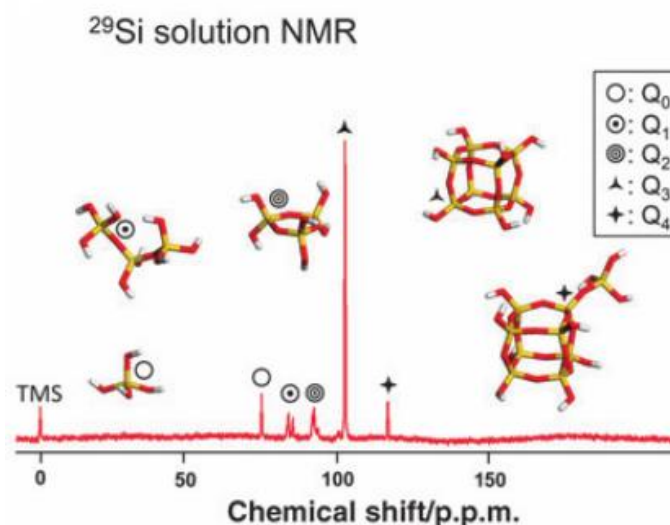
Όσο οι ομάδες $(\text{HO})_3\text{SiO}^-$ πληθαίνουν, επιταχύνεται και η διαδικασία πολυμερισμού, καθώς λειτουργούν ως βάσεις για ανάπτυξη νέων δεσμών Si-O-Si. Όσον αφορά το σχηματισμό του άμορφου διοξειδίου του πυριτίου, πρόκειται για ένα πολυμερές (συσσωμάτωμα)^[21] με πολλούς τέτοιους δεσμούς, το οποίο σχεδιαστικά μπορεί να περιγραφεί στην Εικόνα 1.8.



Εικόνα 1.8: Πολυμερές διοξειδίου του πυριτίου. Ελήφθη από την παραπομπή [21].

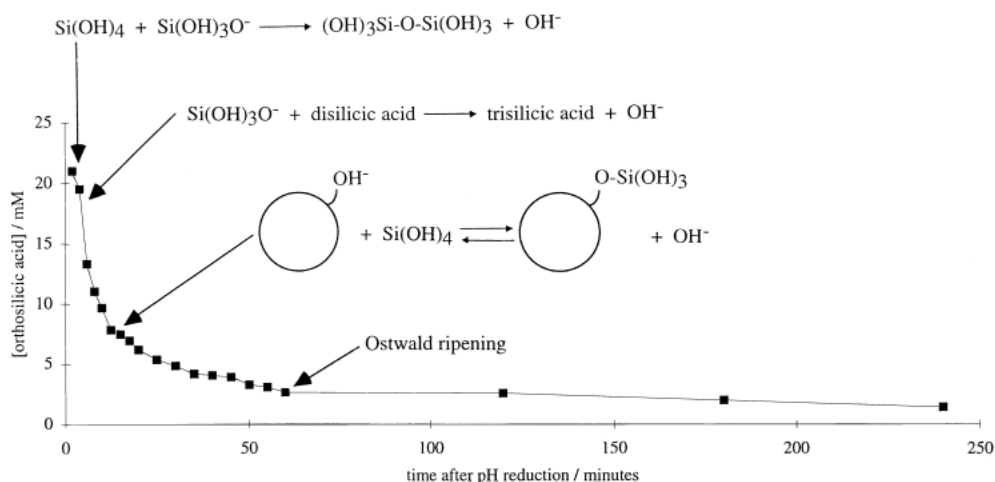
Η εικόνα 1.9 αφορά μια NMR απεικόνιση. Οι κορυφές ονομάζονται Q_0 - Q_4 ανάλογα με το πόσους δεσμούς Si-OH διαθέτουν τα άτομα πυριτίου, αφορά δηλαδή τον βαθμό πολυμερισμού του πυριτικού οξέος^[20]. Οι κορυφές διαφέρουν για πλήρως πυκνωμένα κέντρα $(-\text{O}_3\text{SiO}-) \rightarrow Q_4$ και για τα μερικώς πυκνωμένα κέντρα $(-\text{O}_3\text{SiOH}) \rightarrow Q_3$, $(-\text{O}_2\text{Si}(\text{OH})_2) \rightarrow Q_2$ και τελικά $(-\text{OSi}(\text{OH})_3) \rightarrow Q_1$. Η σχετική αναλογία ύπαρξης των

κέντρων αυτών μελετάται μέσω φασματοσκοπίας NMR στερεάς κατάστασης του ^{29}Si και συνήθως τα βιολογικά δείγματα διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την απεικόνιση αυτή.



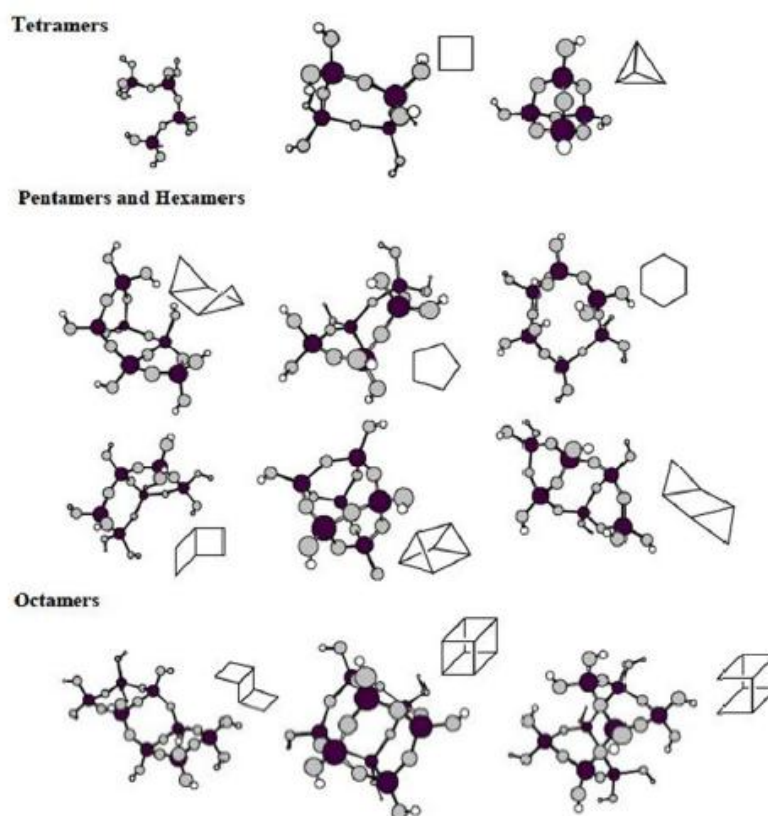
Εικόνα I.9: Φάσμα NMR ^{29}Si από κόκκους/ θραύσματα πυριτικών σπόγγων. TMS (τετρα-μεθυλοσιλάνιο). Ελήφθη από την παραπομπή [20].

Οι ισορροπίες που υπάρχουν κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, κάνουν τη διαδικασία εξαιρετικά ενδιαφέρονσα. Σε pH κοντά στο ουδέτερο, τα μονομερή των πυριτικών προτιμών, αντί να αντιδράσουν μεταξύ τους, να ενσωματωθούν σε ήδη πολυμερισμένα τμήματα SiO_2 , όπως συμβαίνει και με τα διμερή και τριμερή που, μέσω των ισορροπιών, διαλύονται για να αποτελέσουν και αυτά τμήματα των μεγαλύτερων μαζών. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται «Ostwald ripening»^[22] και περιγράφεται από το διάγραμμα της Εικόνας I.10, στο οποίο φαίνεται η μεταβολή στη συγκέντρωση του πυριτικού οξέος με την πάροδο του χρόνου.



Εικόνα I.10: 'Ostwald ripening'. Ελήφθη από την παραπομπή [22].

Οι δομές των ολιγομερών/ πολυμερών που σχηματίζονται μπορούν να είναι γραμμικής, διακλαδισμένης, ή κυκλικής μορφής (δακτύλιος) και για την ανάπτυξη οποιασδήποτε εκ των μορφών αυτών οι δεσμοί μεταξύ πυριτίου-οξυγόνου-πυριτίου δημιουργούνται με τυχαίο τρόπο^[23]. Στην Εικόνα I.11 απεικονίζονται κάποιες πολυμερικές δομές που προσφέρουν τη μέγιστη δυνατή σταθερότητα στην ένωση.

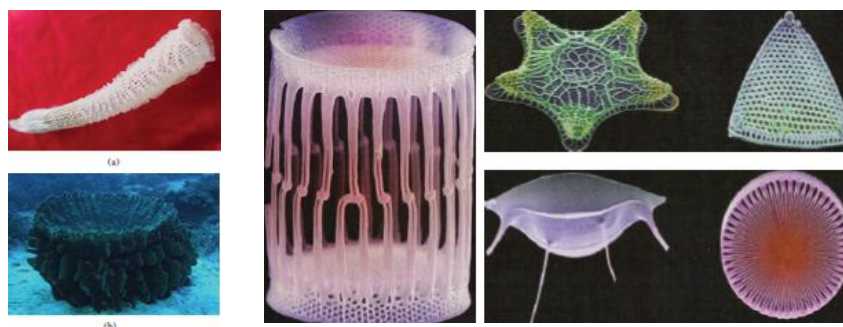


Εικόνα I.11: Δομές αναπτυσσόμενων πυριτικών ειδών με την ελάχιστη δυνατή ενέργεια- μέγιστη δυνατή σταθερότητα. Ελήφθη από την παραπομπή [23].

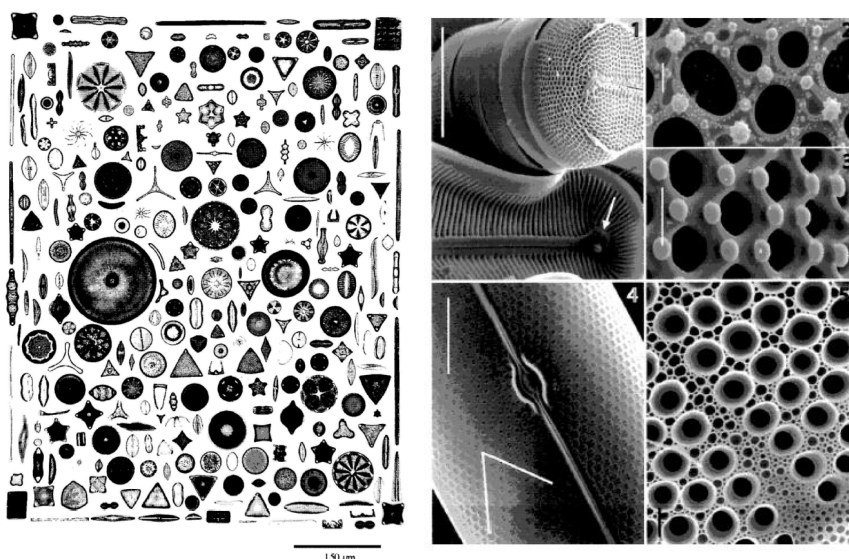
I.3: Το Διοξείδιο του Πυριτίου στον Βιολογικό Κόσμο

Η βασική χρησιμότητα του πυριτίου και των αργιλικών πετρωμάτων για τον βιολογικό κόσμο έγκειται στη γονιμότητα που αυτά προσφέρουν στο έδαφος, μέσω της ικανότητάς τους να απορροφούν νερό και διάφορα κατιοντικά είδη, απαραίτητα για τη διατροφή των φυτικών οργανισμών^[24]. Όσον αφορά τους ζωντανούς οργανισμούς, το πυρίτιο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό κελυφών, ενώ μεγάλες ποσότητες πυριτίου βρίσκονται στην ουρά του αλόγου, στο ρύζι, στο μαμπού κ.α. όπου η χρησιμότητά του έγκειται στην ενισχυτική μηχανική υποστήριξη που παρέχει. Η ύπαρξη του διοξειδίου του πυριτίου αποτελεί επίσης ενδιαφέρον φαινόμενο, ιδιαίτερα όσον αφορά συγκεκριμένα είδη μικροοργανισμών.

Τα διάτομα και είδη σπόγγων (Εικόνες I.12 και I.13) κατασκευάζουν το εξωτερικό τους κέλυφος συλλέγοντας και χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη πυριτικό οξύ, το οποίο με μηχανισμό όχι πλήρως κατανοητό ακόμη, μετατρέπουν σε άμορφο διοξείδιο του πυριτίου, σε περιβάλλοντα συνήθως ουδέτερου pH^[25,26]. Τα διάτομα έκαναν την εμφάνισή τους περίπου 185 εκατομμύρια χρόνια πριν. Πρόκειται για μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς που εμφανίζονται σε αποχρώσεις του κίτρινου και καφέ, λόγω της ύπαρξης καροτενοειδών χρωστικών. Τείνουν να ζουν σχηματίζοντας αποικίες σε διάφορους σχηματισμούς (αλυσίδας ή αστερόμορφους). Μέχρι στιγμής, έχει εκτιμηθεί η ύπαρξη πάνω από 100.000 διαφορετικών ειδών, τα οποία διακρίνονται με βάση τις μοναδικές μορφολογίες του κυτταρικού τους τοιχώματος, καθώς και της ποικιλίας στο μέγεθος αυτών, η οποία είναι συνήθως μερικά μικρόμετρα (2-200 μm), υπάρχουν όμως και παραδείγματα διατόμων μεγέθους μερικών νανομέτρων^[27]. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι ενδεικτικό της ικανότητας πλήρους μοριακού ελέγχου των οργανισμών αυτών.

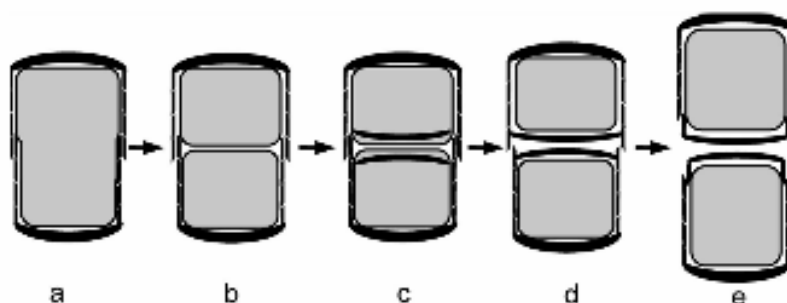


Εικόνα I.12: Αριστερά: Εικόνες διαφόρων ειδών σπόγγων. Α) Venus' Flower Basket, μέγιστες διαστάσεις 25 εκατοστόμετρα. Β) Barrel sponge. Δεξιά: Εικόνες διαφόρων διατόμων. Ελήφθη από την παραπομπή [8].



Εικόνα I.13: Ποικιλόμορφοι σχηματισμοί διατόμων, πηγή έμπνευσης και μελέτης. Ελήφθη από την παραπομπή [27].

Ο ταχύρρυθμος σχηματισμός του εξωτερικού κελύφους του διατόμου γίνεται επιτακτικός όταν παρουσιάζεται η ανάγκη της κυτταρικής διαίρεσης του μικροοργανισμού. Στην Εικόνα I.14 παρουσιάζεται σχηματικά η διαδικασία αυτή^[28].



Εικόνα I.14: Σχηματική αναπαράσταση κυτταρικής διαίρεσης διατόμου. a) Μητρικό κύτταρο έτοιμο για αναπαραγωγή. b) Φαίνονται τα δύο θυγατρικά κύτταρα, ακόμη μέσα στο μητρικό σκελετό. c) Σχηματισμός της «βαλβίδας», χαρακτηριστικό του διατομικού εξωκυτταρικού σκελετού. d,e) διαδικασία διαχωρισμού θυγατρικών κυττάρων. Ελήφθη από την παραπομπή [28].

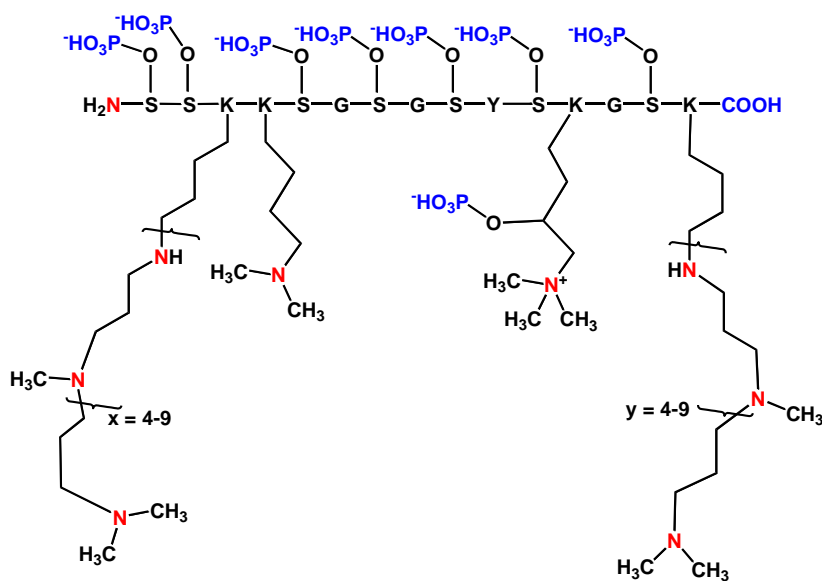
Ας δούμε όμως με πιο προσεκτική ματιά τα σημαντικότερα μέρη της διαδικασίας αυτής. Εντυπωσιακή είναι η ικανότητα των διατόμων να συλλέγουν επιλεκτικά το πυριτικό οξύ ακόμα και σε περιβάλλον χαμηλής συγκέντρωσης αυτού, όπως συνηθίζουν να είναι τα θαλάσσια ύδατα^[29]. Για τη βασική αυτή λειτουργία θέτουν σε χρήση ειδικές πρωτεΐνες μεταφοράς (Silicon Transport Proteins- SIT's), οι οποίες, σε ορισμένα είδη διατόμων, συντίθεται με ταχύτερο ρυθμό όταν τα επίπεδα πυριτίου στο εξωτερικό περιβάλλον μειώνονται^[30]. Όταν τα αποθέματα του μικροοργανισμού ανανεωθούν, η παραγωγή των πρωτεϊνών αυτών μειώνεται πάλι με γρήγορους ρυθμούς. Γενικά, ολόκληρη η διαδικασία μεταφοράς του πυριτικού οξέος μέσα στα διάτομα ελέγχεται αυστηρά από τις ανάγκες αυτών, οι οποίες κρίνονται από τη φάση του «κύκλου» ζωής του εξωτερικού σκελετού^[31]. Ταυτοποίηση των συστατικών που περιέχονται στις πρωτεΐνες μεταφοράς πυριτίου των διατόμων επετεύχθη με την κλωνοποίηση και χαρακτηρισμό των SIT's ενός από τα συνηθέστερα είδη διατόμων, του *Cylindrotheca fusiformis*.

Όταν εισέρθει στο εσωτερικό του διατόμου, το πυριτικό οξύ συγκεντρώνεται σε κυστοειδείς μορφές – θυλάκια, τα οποία καλύπτονται από μια λιπιδική μεμβράνη (*Silicon Transport Vesicles, STVs*)^[32] σε συγκεντρώσεις κατά πολύ μεγαλύτερες από αυτές που μπορούν εργαστηριακά να διατηρηθούν υπό συνθήκες ουδέτερου pH (100 mM / 6.000 ppm στους οργανισμούς versus 2.5 mM / 60-120 ppm εργαστηριακά)^[33-36]. Θεωρείται πως η σταθεροποίηση υποβοηθείται από πολύπλοκες οργανικές

μονάδες, τελικά σχηματίζοντας ένα «ταμιευτήριο» (Silicon pool) που περιέχει όχι μόνο ορθοπυριτικά (μονομερές πυριτικού οξέος) αλλά και διάφορα άλλα προϊόντα του πολυμερισμού^[37,38].

Τελικά, το πυριτικό οξύ μεταφέρεται στα κυστίδια εναπόθεσης πυριτίου (Silicon Deposition Vesicles – SDV's)^[28], όπου ξεκινά η διαδικασία πολυμερισμού και δημιουργίας του πυριτικού κελύφους, σε συνθήκες ελαφρώς όξινου χαρακτήρα (pH ~ 5.4)^[39]. Έχει αναφερθεί πως σε πολλά βιολογικά συστήματα η διαδικασία αυτή διαρκεί λιγότερο από 30 λεπτά, γεγονός που την καθιστά από τις γρηγορότερες στον κόσμο του biomineralization^[40]. Παρόλα αυτά αξίζει να σημειωθεί πως δεν έχει αποδειχθεί ακόμα η ύπαρξη των κυστιδίων αυτών, καθώς οι δομές που ενδεχομένως λειτουργούν για αυτό το σκοπό δεν φαίνεται να επαρκούν σε χωρητικότητα πυριτικών. Παρόλα αυτά, όπως και η silicon pool, αποτελούν το πιθανότερο μηχανιστικό σενάριο μεταφοράς της πρώτης ύλης στα διάτομα.

Βασικό χαρακτηριστικό στη συμπίκνωση του πυριτικού οξέος είναι η καταλυτική δράση διαφόρων βιοπολυμερών και μετα-μεταφραστικά τροποποιημένων πρωτεϊνών, όπως πολυπεπτίδια τροποποιημένα με αμινομάδες (συντά στα αμινοξέα λυσίνης) γνωστά ως σιλαφίνες (*silaffins*), βλ. Εικόνα I.15^[41]. Στην τροποποίηση αυτή οφείλεται η ικανότητα των πεπτιδίων αυτών να κατακρημνίζουν νανοσωματίδια διοξειδίου του πυριτίου. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί πως οι σιλαφίνες περιέχουν μεγάλο αριθμό υδρόξο-αμινοξέων, τα οποία αποτελούν βάσεις για άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Εξαιτίας αυτού, προσπάθειες απομόνωσης σιλαφινών αποτυγχάνουν, καθώς στην πορεία χάνονται οι τροποποιήσεις σε εκείνες τις ομάδες^[42].



Εικόνα I.15: Σχηματική δομή των σιλαφινών. Ελήφθη από την παραπομπή [41].

- Extreme Biosilicification^[43-45]

Κοντά στην επιφάνεια της γης, όπου σχηματίζονται θερμές πηγές, τα βιοστρώματα αποτελούν ένα μοντέλο οικοσύστημα, όπου η βιοσύνθεση του διοξειδίου του πυριτίου αποτελεί και πάλι πραγματικότητα από είδη διατόμων και άλλους μικροοργανισμούς. Τα μικρόβια αυτά έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν σε τέτοιου είδους περιβάλλοντα και να σχηματίζουν διάφορα βιοϋλικά όπως Fe_2O_3 , SiO_2 και MnO_2 , καθώς επίσης και να επάγουν ή να παρεμποδίσουν τη διαλυτοποίηση φυσικών ορυκτών μέσω διαφόρων ανεξιχνίαστων ακόμη μηχανισμών.

Είδη διατόμων που εμφανίστηκαν την Ύστερη Μεσοζωική περίοδο και τα ραδιολάρια (*radiolaria*) τα οποία εμφανίστηκαν την Πρώιμη Παλαιοζωική περίοδο αποτελούν μονοκύτταρους οργανισμούς που συνθέτουν πράσινα βιοστρώματα. Τα βιοστρώματα αυτά διανέμονται σε περιοχές όπου η θερμοκρασία του νερού κυμαίνεται από 30 έως 60 °C και σε βάθος μέχρι 30 εκατοστά.

Ενδιαφέρουσα είναι η διαπίστωση πως υπάρχει είδος κόκκινου φύκους, επονομαζόμενου *Cyanidium Caldarium* το οποίο επιβιώνει σε περιοχές με pH συνήθως μικρότερο του 2 (1,3-1,9), πλούσιες σε θειικό οξύ και υψηλές θερμοκρασίες (50-80 °C), συνθήκες όπου ελάχιστοι άλλοι μικροοργανισμοί μπορούν να επιβιώσουν. Το φύκος αυτό πραγματοποιεί σε αυτές τις αντίξοες συνθήκες πολυμερισμό πυριτικού οξέος για την κατασκευή του κελύφους του, διαδικασία προς το παρόν αδύνατη εργαστηριακά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II:

Όργανα, Αντιδραστήρια και Βασικές Πειραματικές Διαδικασίες

II.1: Όργανα και αντιδραστήρια

- Φασματοφωτόμετρο DR/890 της εταιρίας HACH με το οποίο έγιναν οι μετρήσεις των διαλυτών πυριτικών (πρόγραμμα 89, μολυβδαινοπυριτικά, high range) και απεικονίζεται ακολούθως:



Εικόνα II.1: Φασματοφωτόμετρο DR/890.

- Οπτικό Φασματοφωτόμετρο Thermo-Electron Nicolet 6700 FT-IR με ανιχνευτή DTGS KBr του εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης
- Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Scanning Electron Microscope-SEM) model JSM 6390LV, JEOL και Sputter Coater SCD050, BAL-TEC, εργαστήριο Ηλεκτρονικής μικροσκοπίας «Βασίλης Γαλανόπουλος» της Σχολής Θετικών Επιστημών.
- Συσκευή μέτρησης pH τύπου 315i WTW
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακρίβειας τριών δεκαδικών ψηφίων (KERN EW)
- Μembrάνη κυτταρίνης (Φ 47mm, πόρων 0,8 μm) της εταιρίας Whatman GmbH
- Φίλτρα πόρων 0,45 μm (Acrodisc Syringe Filters)
- Αυτόματες πιπέτες Gilson 100-1000 μL
- Απιονισμένο νερό, το οποίο ελέγχτηκε για τυχόν περιεκτικότητα σε πυριτικό και διπυριτικό οξύ και βρέθηκε πως η ποσότητες είναι αμελητέες.

Ο πίνακας II.1 αφορά τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων και οι εταιρίες από τις οποίες αυτά έχουν προέλθει.

Πίνακας II.1: Αντιδραστήρια

<u>Αντιδραστήριο</u>	<u>Εταιρία</u>
Sodium silicate pentahydrate $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	EM Science (Merck)
Ammonium molybdate $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O})$	SIGMA - ALDRICH
Oxalic acid ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	SIGMA - ALDRICH
Sodium Hydroxide (NaOH)	EM Science (Merck)
Hydrochloric Acid (HCl (37% w/w))	SIGMA - ALDRICH
Polyacrylic Acid (PAA Mw 2 kDa)	POLYSCIENCES, INC.
Polyacrylic Acid (PAA Mw 450 kDa)	POLYSCIENCES, INC.
Potassium Phosphate Monobasic (KH_2PO_4)	Riedel de Haen

II.2: Παρασκευή διαλυμάτων

- Παρασκευή διαλύματος stock πυριτικών 500 ppm “SiO₂”

Σε πλαστικό δοχείο (για να αποφευχθεί τυχόν μόλυνση των δειγμάτων από γυάλινο σκεύος) των 2 λίτρων διαλύονται 4,08 g πυριτικού άλατος νατρίου $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού. Το μίγμα βρίσκεται υπό συνεχή ανάδευση για 15 περίπου λεπτά μέχρι την μερική ομογενοποίησή του. Έπειτα προστίθεται 1 λίτρο απιονισμένου νερού ακόμη και το διάλυμα αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση για τις επόμενες 24 ώρες.

- Παρασκευή Διαλυμάτων Stocks Παρεμποδιστών Πολυμερισμού

Το πολυπεπτίδιο P5S3 είναι ευδιάλυτη στο νερό ουσία μοριακού βάρους 5554,6 g/mol. Η διάλυσή του πραγματοποιήθηκε μέσα στα erpendorfs όπου κ ήταν ήδη συσκευασμένο για να αποφευχθούν απώλειες κατά τη μεταφορά του σε διαφορετικό σκεύος και ζύγιση του. Για stock 10.000 ppm διαλύονται 10 mg ανά ml.

Όμοια, για όλες τις χρησιμοποιούμενες ενώσεις ζυγίζεται η επιθυμητή ποσότητα και προστίθεται ανάλογη ποσότητα απιονισμένου νερού έτσι ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 10.000 ppm.

- Παρασκευή Διαλυμάτων Stocks για το Φασματοφωτομετρικό Τεστ

Για το αναλυτικό test προσδιορισμού της συγκέντρωσης του διαλυτού SiO₂ παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα:

- ✓ Διάλυμα Μολυβδαινικού Αμμωνίου: Σε 80 ml απιονισμένου νερού διαλύονται 25 ταμπλέτες καυστικού νατρίου, τις οποίες ακολουθεί διάλυση 10 gr (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O. Το pH του διαλύματος έπειτα ρυθμίζεται περίπου στο 7,7 - 7,8 προκειμένου να αποφευχθεί οι καταβύθιση κρυστάλλων σε χαμηλότερα pH.
- ✓ Διάλυμα HCl (1:1): Αναμιγνύονται ίσες ποσότητες απιονισμένου νερού και HCl 37% w/w.
- ✓ Διάλυμα Οξαλικού Οξέος (COOH)₂·2H₂O: 8,75 gr οξαλικού οξέος διαλύονται σε 100 ml νερού.

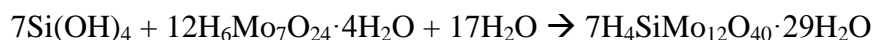
Π.3: Πειραματική Πορεία Μέτρησης του Διαλυτού SiO₂

Αρχή λειτουργίας της μεθόδου των μολυβδαινοπυριτικών^[46, 47]

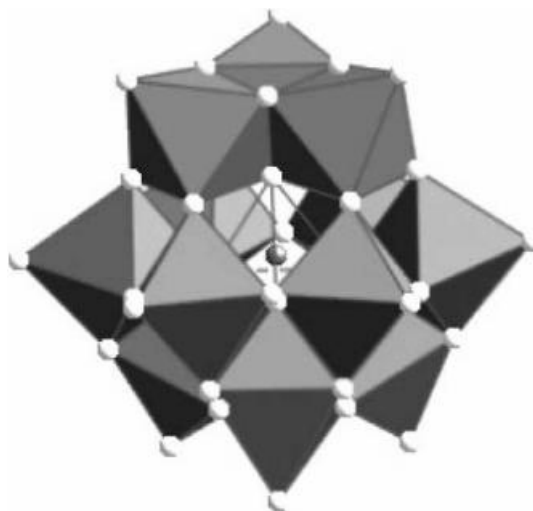
Η μέτρηση του διαλυτού πυριτικού οξέος (molybdate - reactive silica) πραγματοποιείται με χρήση φασματοφωτόμετρου HACH DR/890, το οποίο είναι κατάλληλο για την ανίχνευση των μονομερών και διμερών πυριτικών ιόντων που βρίσκονται σε διάλυμα. Η λειτουργία του βασίζεται στη μέθοδο των μολυβδαινοπυριτικών, η οποία αναλύεται ακολούθως, και έχει σφάλμα της τάξεως του ± 5%.

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου βασίζεται στη μέτρηση της έντασης του κίτρινου χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης διαλυτών πυριτικών ιόντων στο εκάστοτε δείγμα. Η απορρόφηση μετράται σε μήκος κύματος 420 nm. Κατά την προσθήκη μολυβδαινικού αμμωνίου στο δείγμα λαμβάνει χώρα η αντίδραση των

ριζών MoO_4^{4-} με το πυριτικό οξύ, για την πραγματοποίηση της οποίας απαιτείται όξινο περιβάλλον, γεγονός από το οποίο προκύπτει η ανάγκη προσθήκης υδροχλωρικού οξέος στο δείγμα. Πραγματοποιείται η αντίδραση:



Η παρατηρούμενη εκπομπή κίτρινου χρώματος οφείλεται στη διαδικασία συμπλοκοποίησης των μολυβδαινικών ιόντων με τα πυριτικά. Το σύμπλοκο μολυβδαινίου- πυριτίου (εικόνα II.2) έχει μορφή κλουβιού (cage-like). Το άτομο του πυριτίου βρίσκεται στο κέντρο μιας τετραεδρικής διάταξης, σχηματιζόμενης από άτομα οξυγόνου τα οποία ανήκουν στα 4 από τα 12 άτομα μολυβδαινίου που απαρτίζουν τη συνολική δομή. Κάθε άτομο μολυβδαινίου βρίσκεται στο κέντρο οκταέδρου που σχηματίζουν έξι άτομα οξυγόνου.



Εικόνα II.2: Η δομή της μεταλλικής πλειάδας των μολυβδαινοπυριτικών συμπλόκων. Το άτομο πυριτίου συμβολίζεται με γκρι, ενώ τα άτομα οξυγόνου με λευκό. Ελήφθη από την παραπομπή [46].

Ακολουθεί η προσθήκη οξαλικού οξέος, αφού έχει ολοκληρωθεί η παραπάνω αντίδραση, διότι καταλύει τη διάσπαση των μολυβδαινοφωσφορικών συμπλόκων που δημιουργούνται παρουσία φωσφορικών και συνεισφέρουν στο κίτρινο χρώμα, προκαλώντας συνεπώς μετρήσεις που δεν ανταποκρίνονται στην πραγματική συγκέντρωση των πυριτικών ιόντων (false positive).

Γίνεται σαφές πως το χρώμα οφείλεται μόνο στο μονομερές, και διμερές του πυριτικού οξέος, αφού μόνο αυτά έχουν την ικανότητα να αντιδράσουν με τα ιόντα MoO_4^- και να παράγουν τα σύμπλοκα κίτρινου χρώματος. Σε αυτήν την αντίδραση δεν συμμετέχει το ήδη πολυμερισμένο κολλοειδές (άμορφο) SiO_2 , το οποίο

χαρακτηρίζεται ως «μη ενεργό». Στο σημείο αυτό αξίζει να διευκρινιστεί πως, όταν αναφερόμαστε σε «διαλυτό» πυριτικό οξύ (molybdate- reactive silica), εννοούμε αποκλειστικά τις μορφές που αποκρίνονται στο τεστ των μολυβδαινοπυριτικών, τα μονομερή (H_4SiO_4), διμερή ($\text{H}_6\text{Si}_2\text{O}_7$) και τριμερή ($\text{H}_8\text{Si}_3\text{O}_{10}$)^[48]. Να σημειωθεί ότι στα πειράματά μας δεν έχουν μέχρι τώρα ανιχνευτεί τριμερή.

Από κάθε διάλυμα ελέγχου της εξέλιξης της διαδικασίας (control) και κάθε διάλυμα πυριτικών με παρεμποδιστή λαμβάνεται ποσότητα περίπου 2,5 ml με σύριγγα και φιλτράρεται με χρήση φίλτρου 0,45 μm. Με πιπέτα ακριβείας Gilson τοποθετούνται 2 ml από την ποσότητα αυτή σε ειδική γυάλινη κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm. Ο όγκος προσαρμόζεται στα 25 ml με προσθήκη απιονισμένου νερού και ακολουθεί τοποθέτηση στις κυψελίδες από 1 ml μολυβδαινικού αμμωνίου και 0,5 ml υδροχλωρικού οξέος. Το φασματόμετρο έχει ρυθμιστεί να λειτουργήσει σύμφωνα με το πρόγραμμα 89, επομένως πληκτρολογούνται τα πλήκτρα με ενδείξεις «timer» και «enter», τα οποία ξεκινούν αντίστροφη μέτρηση 10 λεπτών, χρόνος απαραίτητος και αρκετός ώστε να ολοκληρωθεί η προαναφερθείσα αντίδραση συμπλοκοποίησης. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως, ενώ το μονομερές του πυριτικού οξέος απαιτεί, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα^[47], μόνο 75 δευτερόλεπτα στους 20°C για να αντιδράσει εξ' ολοκλήρου, η διμερής μορφή απαιτεί 10 λεπτά, ενώ περαιτέρω πολυμερισμένες μορφές ακόμα περισσότερο χρόνο. Μετά το πέρας του χρόνου αυτού προστίθεται στο διάλυμα 1 ml οξαλικού οξέος και μετράται ξανά αντίστροφα χρόνος 2 λεπτών. Κατόπιν το φασματοφωτόμετρο μηδενίζεται (zero) χρησιμοποιώντας ως τυφλό διάλυμα απιονισμένο νερό και μετράται η απορρόφηση των δειγμάτων (read) στα 452 nm. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του πυριτικού οξέος η ένδειξη του φασματοφωτομέτρου επεξεργάζεται ως εξής: $C_{\text{πραγματικό}} = C_{\text{οργάνου}} \times (27,5/2)$, όπου 27,5/2 ο συντελεστής αραίωσης.

Π.4: Πειραματική Πορεία Μέτρησης της Θολερότητας των Διαλυμάτων

Η θολερότητα μετρήθηκε κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων, κάθε μία ώρα από τη χρονική στιγμή παρασκευής και ρύθμισης του pH των διαλυμάτων και συνολικά για 8 ώρες. Για την μέτρηση της θολερότητας χρησιμοποιήθηκε το

πρόγραμμα 95 του φασματοφωτομέτρου HACH DR/890 που διαθέτει το εργαστήριό μας. Η πειραματική διαδικασία συνοψίστηκε στα ακόλουθα βήματα:

- Μία από τις ειδικές γυάλινες κυψελίδες συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό ως τη γραμμή των 10 mL. Αυτή αποτέλεσε το τυφλό διάλυμα (blank), με το οποίο έγινε ο μηδενισμός του οργάνου (πατώντας το πλήκτρο “zero”).
- Ποσότητα 10 mL από τα εξεταζόμενα διαλύματα προστέθηκε σε γυάλινες κυψελίδες και σκουπίστηκαν επιμελώς οι εξωτερικές τους επιφάνειες.
- Οι κυψελίδες τοποθετήθηκαν με τη σειρά στην κατάλληλη υποδοχή του οργάνου και πατώντας το κουμπί με την ένδειξη “read”, λήφθηκαν οι τιμές θολερότητας εκφρασμένες σε μονάδες μέτρησης FAU.

Π.5: Πειραματική Πορεία Λήψης Ιζημάτων για Φασματοσκοπία FT-IR και για SEM (Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης), EDS (Στοιχειακή Ανάλυση)

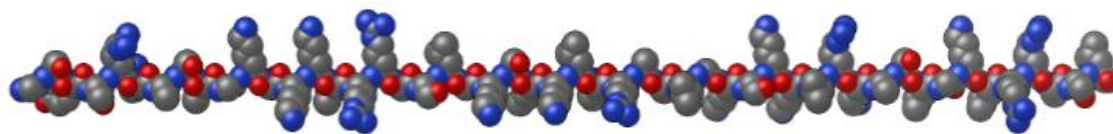
Τα ιζήματα που προκύπτουν από τα πειράματα λαμβάνονται με διήθηση υπό κενό, έκπλυση με απιονισμένο νερό και ξήρανση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 48 ώρες. Χωρίς καμία περαιτέρω διαδικασία τα ιζήματα τοποθετούνται στο Φασματοφωτόμετρο FT-IR για ανάλυση.

Για λήψη εικόνων Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης και Στοιχειακής Ανάλυσης ακολουθείται η εξής διαδικασία: επαναδιαλυτοποίηση των ιζημάτων με απιονισμένο νερό, σε συγκέντρωση 1:100 και ρήψη μίας σταγόνας των νέων διαλυμάτων σε καλυπτρίδες (μικρά τμήματα γυαλιού που χρησιμοποιούνται για την τοποθέτηση των δειγμάτων στο SEM). Η λήψη πολύ μικρής ποσότητας διαλύματος είναι απαραίτητη για λόγους ευκρίνειας κατά την οπτική απεικόνιση του δείγματος. Οι καλυπτρίδες, με το φερόμενο δείγμα, αφήνονται προς ξήρανση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 ώρες. Τέλος, πραγματοποιείται ρήψη χρυσού στα δείγματα με την βοήθεια του sputter coater SCD050 (της εταιρίας BAL-TEC), προκειμένου να καταστούν αγωγά και να είναι δυνατή η εξέτασή τους στο Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

Πολυπεπτίδιο P5S3

Η παραγωγή του πολυπεπτιδίου με κωδική ονομασία «P5S3» αποτελεί εργασία του Δρ. Christian Zerfaß στο Institute of General Botany στο Mainz της Γερμανίας. Πρόκειται για μια τεχνητή αλληλουχία 50 αμινοξέων με επαναλαμβανόμενες μονάδες που φέρει αρκετές θετικά φορτισμένες πλευρικές ομάδες, οι οποίες κυρίως προκύπτουν από τα αμινοξέα λυσίνη και αργινίνη. Στην Εικόνα ΙΙΙ.1 αναπαρίσταται σχηματικά το πολυπεπτίδιο. Τα άτομα που διακρίνονται στο μοντέλο είναι άνθρακας (γκρι), άζωτο (μπλε) και οξυγόνο (κόκκινο). Στην επιγραμμιακή απεικόνιση τονίζονται τα κατιοντικά αμινοξέα λυσίνη (K) και αργινίνη (R) με έντονη γραφή. Στις αγκύλες αναπαρίσταται η κεντρική αλληλουχία του πολυπεπτιδίου που επαναλαμβάνεται τρεις συνεχόμενες φορές μέσα στη συγκεκριμένη δομή.



Εικόνα ΙΙΙ.1: Σχηματική και επιγραμμιακή αναπαράσταση του πολυπεπτιδίου P5S3.

Το ισοηλεκτρικό σημείο του πεπτιδίου υπολογίζεται (expasy.org → ProtParam tool) στο 12.64, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως σε ουδέτερο pH όλα τα μόρια λυσίνης και αργινίνης θα είναι πρωτονιωμένα, ενώ οι τελικές καρβοξυλομάδες αποπρωτονιωμένες. Το μοριακό του βάρος υπολογίζεται στα 5554,6 Daltons.

Σε συνδυασμό με μελέτες ταυτόχρονες της παρούσης, έχουμε οδηγηθεί στο συμπέρασμα πως το πολυπεπτίδιο P5S3 έχει τριπλό ρόλο στη χημεία του διοξειδίου του πυριτίου. Επιγραμμιακά, μπορεί να σταθεροποιήσει το πυριτικό οξύ σε επίπεδα μεγαλύτερα από εκείνα που είναι εργαστηριακά εφικτά σε διαλύματα ουδέτερου pH, ενώ υπό διαφορετικές συνθήκες μπορεί να καθοδηγήσει το σχηματισμό διοξειδίου του πυριτίου. Τέλος, σε περιβάλλοντα με πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις πυριτικού οξέος, μπορεί να σταθεροποιήσει το διοξείδιο του πυριτίου.

Στην εργασία αυτή δίνεται βάση στην πρώτη του χαρακτηριστική ικανότητα, την αναστολή δηλαδή του σχηματισμού του διοξειδίου του πυριτίου, μέσω της

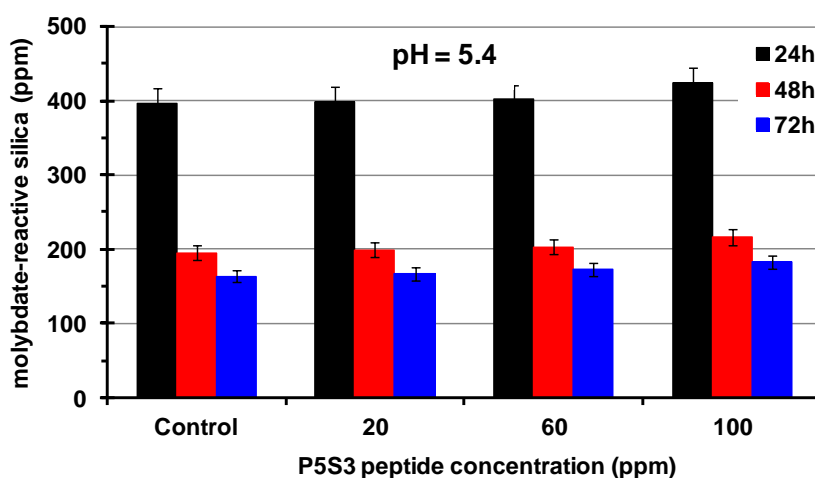
σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος. Για τις ανάγκες της μελέτης πραγματοποιούνται μακροπρόθεσμα (long-term, 3d) πειράματα με διάρκεια τριών ημερών, με δειγματοληψίες στις 24, 48 και 72 ώρες εξέλιξης του πολυμερισμού του πυριτικού οξέος και βραχυπρόθεσμα (short-term, 8h) πειράματα με διάρκεια οκτώ ωρών, με δειγματοληψίες κάθε μία ώρα. Επίσης, η διαδικασία σχηματισμού του διοξειδίου του πυριτίου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το pH, και για τους σκοπούς της μελέτης μας επιλέχθηκαν οι τιμές pH 5.4, 7.0 και 8.5.

III.1: Μελέτη Διαλυτότητας του Πυριτικού Οξέος σε Υδατικά Διαλύματα Παρουσία Του Κατιονικού Πολυπεπτιδίου P5S3

III.1.1: Αποτελέσματα Σταθεροποίησης Πυριτικού Οξέος σε 3-ήμερα Πειράματα

Πίνακας III.1: Μέτρηση διαλυτού πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε ppm, σε pH = 4.5, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη πολυπεπτιδίου P5S3 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 3-ήμερων πειραμάτων.

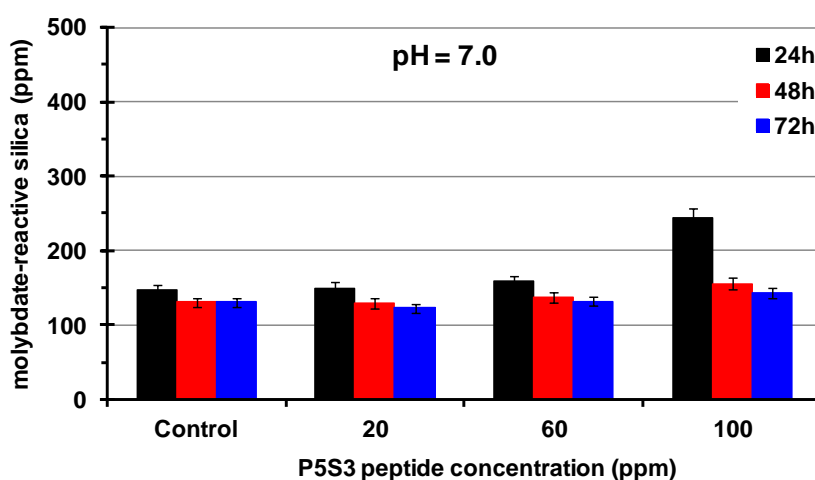
Συγκέντρωση P5S3	24h	48h	72h
Control	396	195	163
20 ppm	399	199	167
60 ppm	401	203	173
100 ppm	424	216	182



Εικόνα III.2: Αποτελέσματα σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος από το πολυπεπτίδιο χρησιμοποιούμενο σε διάφορες συγκεντρώσεις, σε pH 4.5 κατά τη διάρκεια 3-ήμερων πειραμάτων.

Πίνακας III.2: Μέτρηση διαλυτού πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε ppm, σε pH = 7, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη πολυπεπτιδίου P5S3 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 3-ήμερων πειραμάτων.

<u>Συγκέντρωση P5S3</u>	<u>24h</u>	<u>48h</u>	<u>72h</u>
Control	147	130	130
20 ppm	150	129	122
60 ppm	158	137	132
100 ppm	245	155	143

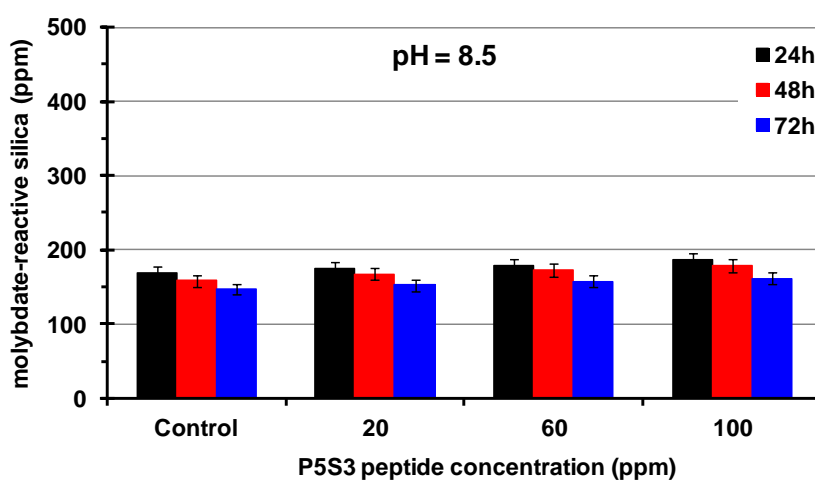


Εικόνα III.3: Αποτελέσματα σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος από το πολυπεπτίδιο χρησιμοποιούμενο σε διάφορες συγκεντρώσεις, σε pH 7.0 κατά τη διάρκεια 3-ήμερων πειραμάτων.

Παρατηρείται ποσοστό παρεμπόδισης 19,5% του πολυμερισμού του πυριτικού οξέος για συγκέντρωση πεπτιδίου 100 ppm κατά τη διάρκεια των πρώτων 24 ωρών η οποία φθίνει τις επόμενες ημέρες. Πιθανό αίτιο της παρεμποδιστικής ικανότητας του πεπτιδίου, είναι η δημιουργία ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων των θετικά φορτισμένων αμινομάδων με τις αποπρωτονιωμένες ομάδες του πυριτικού οξέος. Επίσης, πιθανή είναι και η δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ πυριτικού οξέος και ουδέτερων αμιδικών δεσμών, εκτενέστερη μελέτη των οποίων ακολουθεί στο αντίστοιχο υποκεφάλαιο.

Πίνακας III.3: Μέτρηση διαλυτού πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε ppm, σε pH = 8.5, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη πολυπεπτιδίου P5S3 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 3-ήμερων πειραμάτων.

Συγκέντρωση P5S3	24h	48h	72h
Control	169	158	147
20 ppm	174	167	152
60 ppm	179	173	157
100 ppm	186	178	161



Εικόνα III.4: Αποτελέσματα σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος από το πολυπεπτίδιο χρησιμοποιούμενο σε διάφορες συγκεντρώσεις, σε pH 8.5 κατά τη διάρκεια 3-ήμερων πειραμάτων.

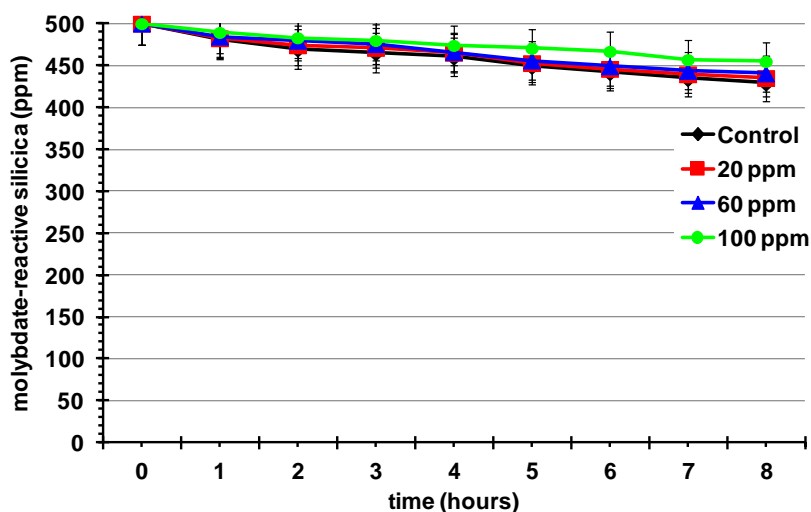
Τόσο για το pH =5.4 όσο και για pH = 8.5 δεν παρατηρείται διαφορά του διαλύματος ελέγχου και κατόπιν προσθήκης ποσότητας πεπτιδίου. Κατόπιν των μετρήσεων αυτών καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το πολυπεπτίδιο P5S3 αδυνατεί να σταθεροποιήσει το πυριτικό οξύ στη διαλυτή του μορφή για περισσότερες από 24 ώρες και σε συγκέντρωση μικρότερη των 100 ppm.

III.1.2: Αποτελέσματα Σταθεροποίησης Πυριτικού Οξέος σε 8-ωρα Πειράματα

Σε μια προσπάθεια να μελετήσουμε τη συμπεριφορά του πυριτικού οξέος παρουσία του πολυπεπτιδίου P5S3 στα πρώτα στάδια της διαδικασίας του πολυμερισμού, προβήκαμε σε 8-ωρα πειράματα, τα αποτελέσματα των οποίων παρατίθενται ακολούθως.

Πίνακας III.4: Μέτρηση διαλυτού πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε ppm, σε pH = 5.4, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη πολυπεπτιδίου P5S3 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων.

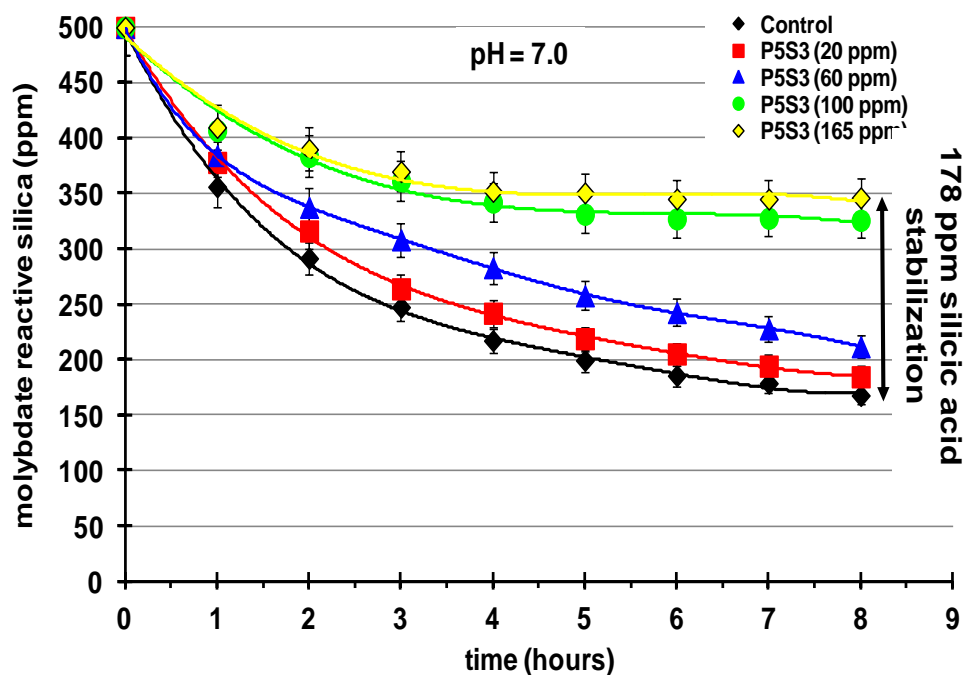
Time	Control	P5S3 (20ppm)	P5S3 (60ppm)	P5S3 (100ppm)
0h	500	500	500	500
1h	461	462	451	452
2h	458	459	449	446
3h	448	452	445	442
4h	448	445	444	449
5h	440	432	430	440
6h	426	436	432	434
7h	408	432	429	431
8h	405	411	420	426



Εικόνα III.5: Γραφική αναπαράσταση της προσπάθειας σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος από διάφορες συγκεντρώσεις πολυπεπτιδίου P5S3, κατά τις πρώτες 8 ώρες του πολυμερισμού, σε pH 5.4.

Πίνακας III.5: Μέτρηση διαλυτού πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε ppm, σε pH = 7, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη πολυπεπτιδίου P5S3 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων.

Time	Control	P5S3 (20ppm)	P5S3 (60ppm)	P5S3 (100ppm)	P5S3 (165 ppm)
0h	500	500	500	500	500
1h	356	378	384	407	410
2h	291	316	338	383	390
3h	247	264	308	361	370
4h	217	242	283	342	352
5h	199	219	258	331	350
6h	185	205	243	327	345
7h	178	194	228	328	345
8h	167	185	212	326	346

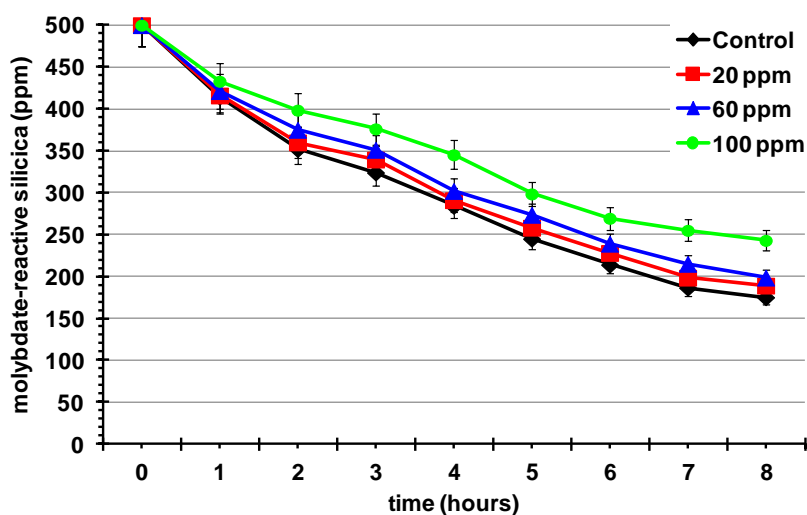


Εικόνα III.6: Γραφική αναπαράσταση της προσπάθειας σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος από διάφορες συγκεντρώσεις πολυπεπτιδίου P5S3, κατά τις πρώτες 8 ώρες του πολυμερισμού, σε pH 7.0.

Υπό αυτές τις συνθήκες διακρίνεται ξεκάθαρα η παρεμποδιστική ικανότητα του πολυπεπτιδίου. Στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (20 και 60 ppm) τα αποτελέσματα είναι μη ικανοποιητικά (18 και 45 ppm αντίστοιχα πάνω από το επίπεδο του πειράματος ελέγχου). Σε συγκέντρωση 100 ppm το πεπτίδιο έχει την ικανότητα να σταθεροποιήσει 158 ppm πυριτικό οξύ παραπάνω από το διάλυμα ελέγχου και το ποσοστό παρεμπόδισης υπολογίζεται 31,6% στις πρώτες 8 ώρες του πολυμερισμού. Όσον αφορά στη συγκέντρωση 165 ppm, παρατηρείται ελάχιστη αύξηση της παρεμποδιστικής ικανότητας του πεπτιδίου (20 ppm διαφορά από τη συγκέντρωση των 100 ppm) συγκριτικά με την 65% αύξηση της συγκέντρωσής του στο διάλυμα του πυριτικού οξέος. Το αποτέλεσμα κρίνεται μη ικανοποιητικό, καθώς ένα βιολογικό μόριο δεν δύναται συχνά να παράγεται σε μεγάλες ποσότητες. Παρατηρούμε αναλογία στην συγκέντρωση του πεπτιδίου με την παρεμποδιστική του ικανότητα μέχρι τη συγκέντρωση των 100 ppm, ενώ περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης οδηγεί το σύστημα σε πλατό. Πιθανό αίτιο της παρεμποδιστικής ικανότητας του πεπτιδίου, όπως προαναφέρθηκε, είναι οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και η δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ειδών του πυριτικού οξέος και των διαφόρων ομάδων του πεπτιδίου.

Πίνακας III.6: Μέτρηση διαλυτού πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε ppm, σε pH = 8.5, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη πολυπεπτιδίου P5S3 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων.

Time	Control	P5S3 (20ppm)	P5S3 (60ppm)	P5S3 (100ppm)
0h	500	500	500	500
1h	414	416	421	433
2h	352	360	375	398
3h	324	339	351	376
4h	284	291	302	345
5h	245	258	273	298
6h	214	228	239	269
7h	186	197	215	255
8h	175	189	198	243



Εικόνα III.7: Γραφική αναπαράσταση της προσπάθειας σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος από διάφορες συγκεντρώσεις πολυπεπτιδίου P5S3, κατά τις πρώτες 8 ώρες του πολυμερισμού, σε pH 8.5.

Η παρεμποδιστική ικανότητα του πεπτιδίου δεν εξαλείφεται εντελώς, αλλά μειώνεται στο ποσοστό 13,6%. Το γεγονός αυτό δικαιολογείται διότι αυξανόμενου του pH το πεπτίδιο φορτίζεται αρνητικά, παρόλο που ακόμη βρίσκεται κάτω από το ισοηλεκτρικό του σημείο (12,64).

III.1.3: Μελέτη των Ιζημάτων του Διοξειδίου του Πυριτίου παρουσία του Πολυπεπτιδίου P5S3

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων παρατηρήθηκε η δημιουργία λευκών, νεφελωδών ιζημάτων, τα οποία απομονώθηκαν με τη διαδικασία που αναφέρεται στο

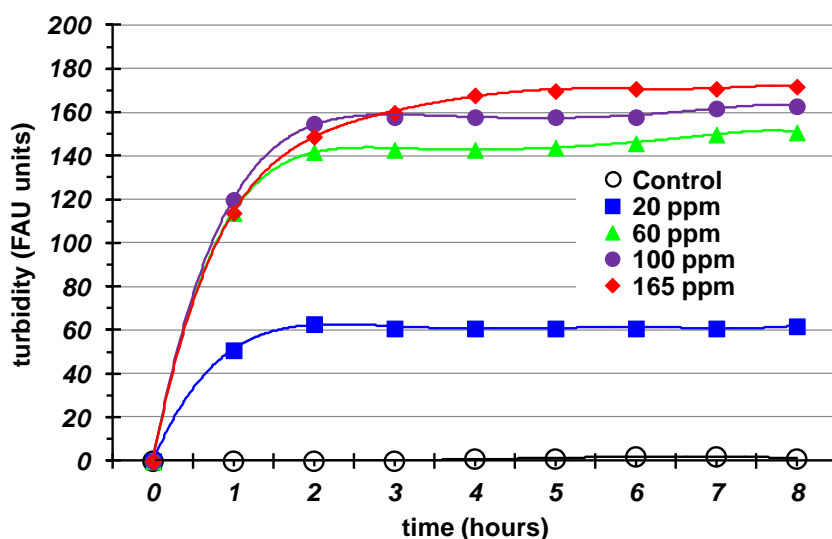
αντίστοιχο πειραματικό τμήμα και μελετήθηκαν με διάφορες τεχνικές, οι οποίες έδωσαν χρήσιμα συμπεράσματα.

- Μετρήσεις θολερότητας

Οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν ως ένας τρόπος ποσοτικοποίησης του οπτικού αποτελέσματος. Όπως αποδεικνύεται και από τα ακόλουθα αποτελέσματα, η αύξηση της θολερότητας και κατά συνέπεια η αύξηση της τελικής ποσότητας του ιζήματος που λήφθηκε, είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του πεπτιδίου που εισάγαμε σε κάθε διάλυμα πυριτικού οξέος. Ενδεικτικά, για τη συγκέντρωση των 100 ppm πεπτιδίου, το βάρος του ιζήματος που λάβαμε ήταν 8 mgr.

Πίνακας III.7: Μέτρηση θολερότητας διαλυμάτων πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε FAU, σε pH = 7, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη πολυπεπτιδίου P5S3 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων.

Time	Control	P5S3 (20ppm)	P5S3 (60ppm)	P5S3 (100ppm)	P5S3 (165ppm)
0h	0	0	0	0	0
1h	0	51	114	120	114
2h	0	63	139	153	149
3h	0	61	135	156	165
4h	1	61	136	161	173
5h	1	59	136	157	170
6h	2	60	140	158	169
7h	2	61	142	162	171
8h	1	62	146	163	173



Εικόνα III.8: Εξέλιξη της θολερότητας των διαλυμάτων του πυριτικού οξέος, τις πρώτες 8 ώρες της διαδικασίας του πολυμερισμού, με προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων πολυπεπτιδίου P5S3.

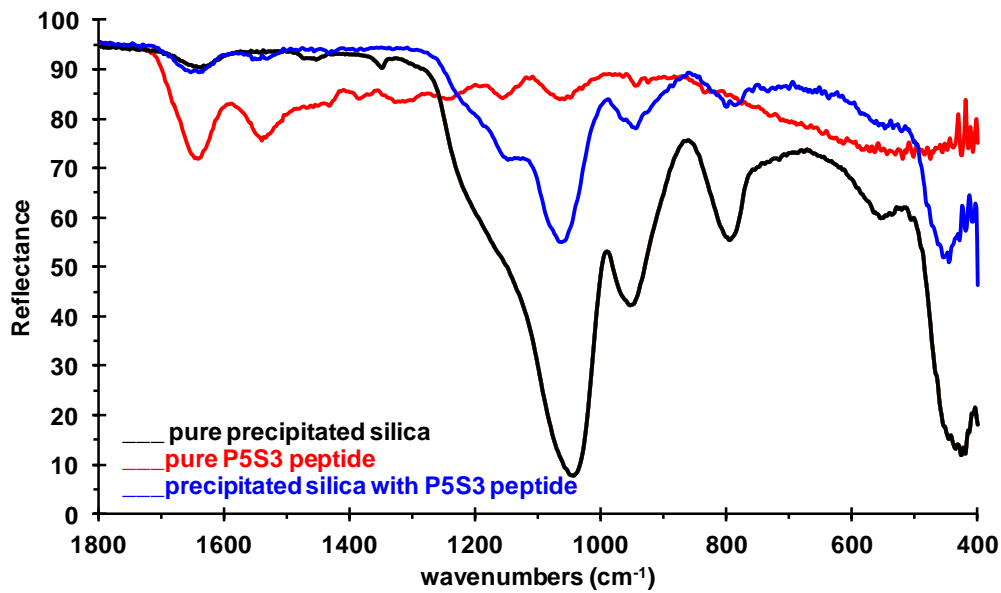
Χαρακτηρισμός με Φασματοσκοπία FT-IR

Ο χαρακτηρισμός μέσω φασματοσκοπίας FT-IR πραγματοποιήθηκε ως ένα μέσο εξακρίβωσης της παρουσίας, ή απουσίας του πεπτιδίου από τα συσσωματώματα του διοξειδίου του πυριτίου. Ο πίνακας III.8 παραθέτει το είδος των δονήσεων του διοξειδίου του πυριτίου που προκαλούν τις χαρακτηριστικές κορυφές στο φάσμα υπερύθρου.

Πίνακας III.8: Χαρακτηριστικές κορυφές στα φάσματα FT-IR των ιζημάτων διοξειδίου του πυριτίου. Ελήφθη από την αναφορά [49].

vibration (cm^{-1})	band assignment
3600–3300	water stretching bands + $\nu(\text{O}-\text{H})$ from Si–OH
1650	H ₂ O deformation
~1208 (sh)	asymmetric stretching Si–O and Si–O–(Si)
1124	asymmetric stretching Si–O and Si–O–(Si)
973 (sh)	Si–O [−] asymmetric
820	Si–O [−] symmetric
479	O–Si–O deformation

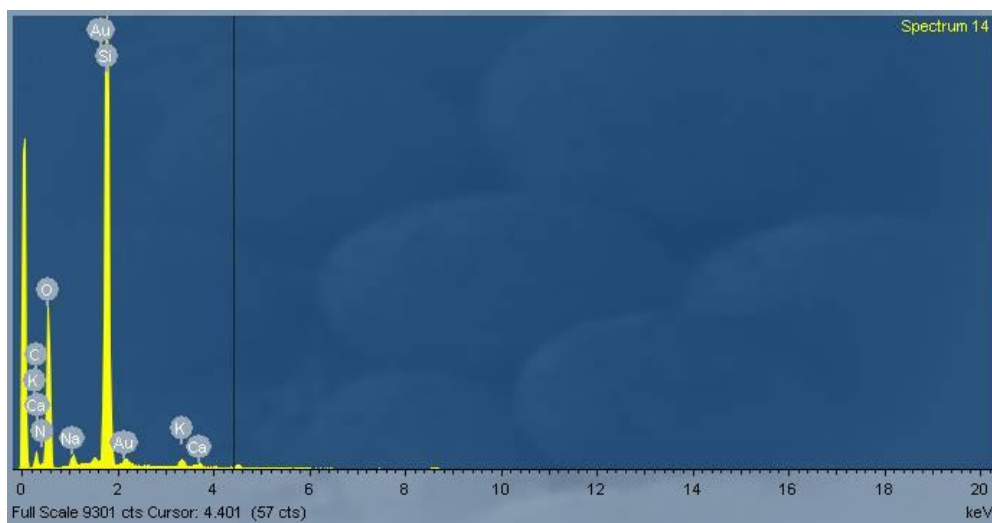
Στην Εικόνα III.9 παρατίθενται τα φάσματα FT-IR του πολυπεπτιδίου σε καθαρή μορφή, του διοξειδίου του πυριτίου και των ιζημάτων που λήφθηκαν από τα πειράματα σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος. Επιβεβαιώνεται η υπόθεσή μας, σύμφωνα με την οποία το πολυπεπτίδιο «εγκλωβίζεται» από τις άμορφες μάζες του διοξειδίου του πυριτίου και κατακρημνίζεται μαζί με αυτό, λειτουργώντας ως η οργανική «κόλλα» μεταξύ των συσσωματωμάτων από σίλικα. Οι δονήσεις κάμψεων των αμιδικών δεσμών που εμφανίζονται στους 1645 και 1540 κυματάρθμους (cm^{-1}) επιβεβαιώνουν την υπόθεση αυτή.



Εικόνα III.9: Φάσματα FT-IR: με κόκκινο εμφανίζεται το φάσμα του πολυπεπτιδίου P5S3 σε καθαρή μορφή, με μαύρο το διοξείδιο του πυριτίου και με μπλε τα ιζήματα διοξειδίου του πυριτίου κατά την προσπάθεια σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος από το πολυπεπτίδιο.

Χαρακτηρισμός μέσω Στοιχειακής Ανάλυσης (EDS)

Η στοιχειακή ανάλυση των ιζημάτων έρχεται να συμπληρώσει και να επιβεβαιώσει τον χαρακτηρισμό μέσω των προηγούμενων φασμάτων. Όπως παρατηρείται στην εικόνα III.10 η παρουσία του αζώτου και άνθρακα, πέραν των αναμενόμενων πυριτίου και οξυγόνου, επιβεβαιώνει την παρουσία του πολυπεπτιδίου στα ιζήματα.



Εικόνα III.10: Στοιχειακή ανάλυση των ιζημάτων που συλλέχτηκαν από τα πειράματα σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος μέσω του πολυπεπτιδίου.

Πίνακας III.8: ποσοστά εμφάνισης των στοιχείων στα ιζήματα που συλλέχθηκαν από τα πειράματα σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος μέσω του πολυπεπτιδίου.

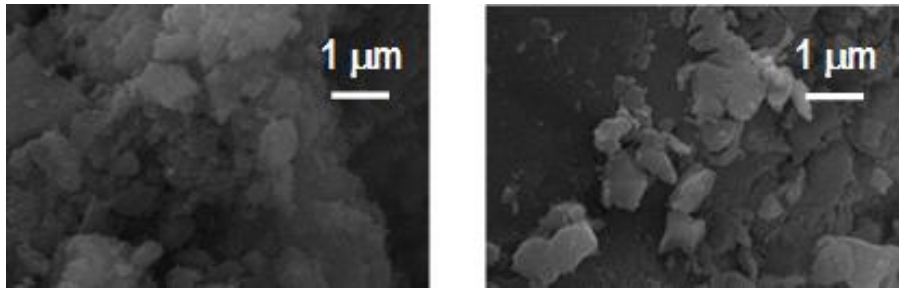
Element	App	Intensity	Weight%	Weight%	Atomic%
	Conc.	Conn.		Sigma	
C K	26.26	0.3249	15.71	1.33	22.63
N K	5.11	0.1634	6.08	1.15	7.51
O K	170.11	0.6824	48.45	1.04	52.41
Na K	4.53	0.8272	1.06	0.10	0.80
Si K	126.38	0.9425	26.06	0.58	16.06
K K	3.84	0.9803	0.76	0.06	0.34
Ca K	1.17	0.9397	0.24	0.06	0.10
Au M	5.47	0.6500	1.63	0.26	0.14
Totals			100.00		

Ο χρυσός που εμφανίζεται στην ανάλυση προέρχεται από τη διαδικασία sputtering που έχει αναπτυχθεί στο αντίστοιχο πειραματικό τμήμα της εργασίας, ενώ τα στοιχεία κάλιο, ασβέστιο και νάτριο πιθανώς προέρχονται από το νερό έκπλυσης των ιζημάτων.

Χαρακτηρισμός με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)

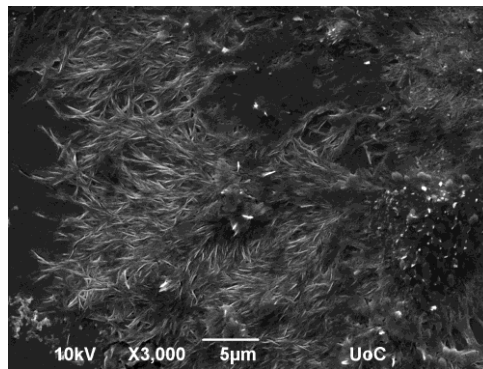
Στα συλλεχθέντα από τις μετρήσεις ιζήματα πραγματοποιήθηκε επίσης μελέτη με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, σκοπός της οποίας ήταν, όπως προαναφέρθηκε, να εκτιμηθεί η επίδραση του πεπτιδίου στη μορφολογία των σχηματιζόμενων μορφών διοξειδίου του πυριτίου. Οι εικόνες λήφθηκαν από ιζήματα σχηματισμένα σε pH = 7, μετά από 8 ώρες πολυμερισμού, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων του πολυπεπτιδίου P5S3.

Η εικόνα III.11 είναι μια οπτική απεικόνιση ιζήματος διοξειδίου του πυριτίου απουσία παρεμποδιστών ή άλλων προσθέτων, οκτώ ώρες μετά την έναρξη του πολυμερισμού. Παρατηρείται η ανομοιομορφία των σωματιδίων τόσο στο μέγεθος όσο και στο σχήμα τους, ο σχηματισμός μεγάλων συσσωματωμάτων και παντελής έλλειψη καθορισμένης γεωμετρίας.



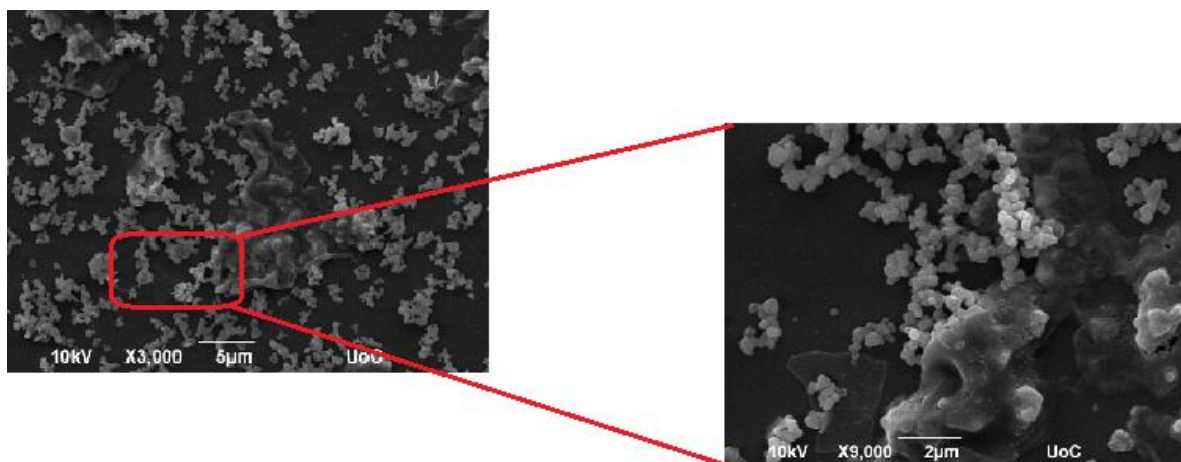
Εικόνα III.11: Επιλεγμένες εικόνες διαλυμάτων ελέγχου (control) έπειτα από 8 ώρες πολυμερισμού σε pH 7.0.

Προσθήκη μικρής ποσότητας πολυπεπτιδίου στο διάλυμα των πυριτικών (εικόνα III.1.12) μας δίνει ινώδεις μορφές, χαλαρά «δεμένες» μεταξύ τους.



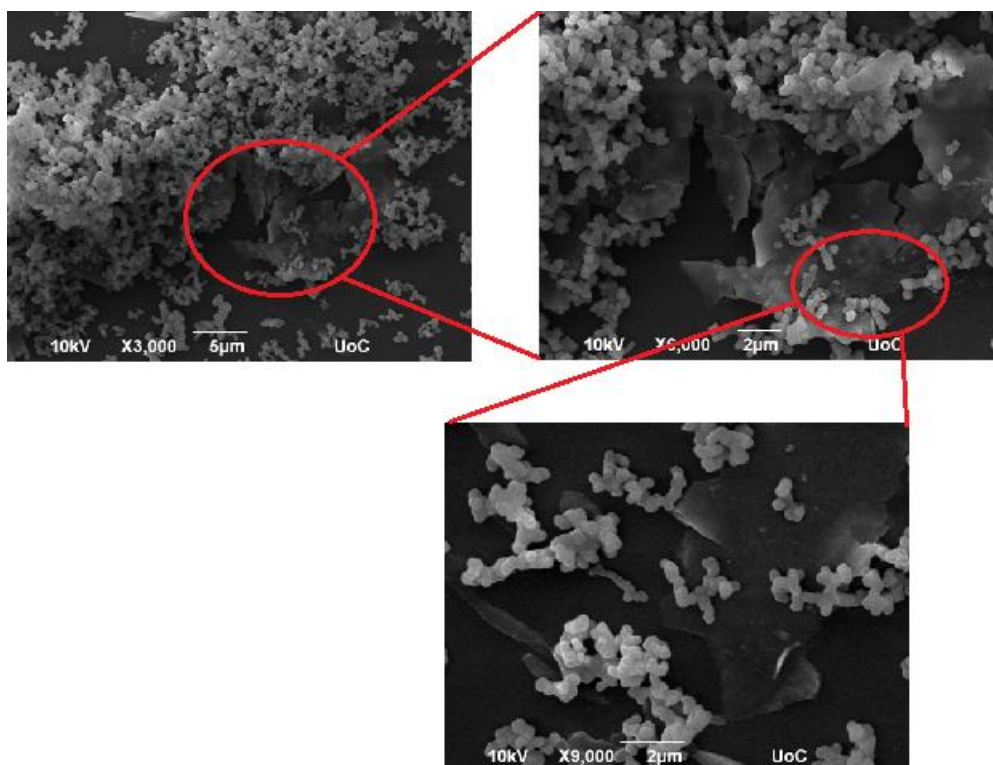
Εικόνα III.12: Οπτική απεικόνιση ιζήματος διοξειδίου του πυριτίου έπειτα από 8 ώρες πολυμερισμού σε pH 7.0 παρουσία 20 ppm P5S3.

Αυξανόμενης της συγκέντρωσης στα 60 ppm P5S3 (εικόνα III.13), οι κατακρημνίσεις αρχίζουν να δημιουργούν πιο ξεκάθαρη σφαιρική δομή, το ποσοστό συσσωμάτωσης όμως είναι σχετικά μικρό.



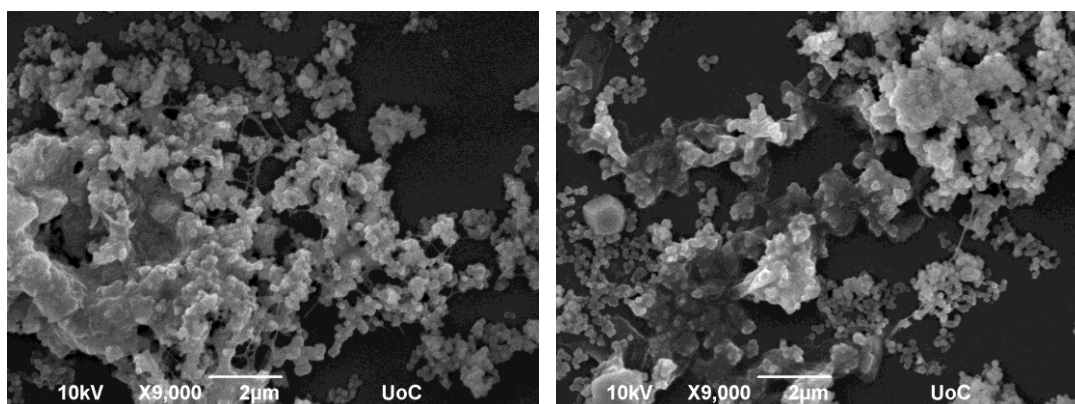
Εικόνα III.13: Επιλεγμένες εικόνες ιζήματος διοξειδίου του πυριτίου έπειτα από 8 ώρες πολυμερισμού σε pH 7.0 παρουσία 60 ppm P5S3.

Όταν τα διαλύματα των πυριτικών περιέχουν 100 ppm πολυπεπτιδίου (εικόνα III.14), η σφαιρική διαμόρφωση των μαζών είναι ακόμη πιο ξεκάθαρη, χωρίς να αλλάξει το μέγεθός τους, συγκριτικά με τα παραπάνω αποτελέσματα. Εντονότερη γίνεται η τάση προς συσσωμάτωση των ιζημάτων.



Εικόνα III.14: Επιλεγμένες εικόνες ιζήματος διοξειδίου του πυριτίου έπειτα από 8 ώρες πολυμερισμού σε pH 7.0 παρουσία 100 ppm P5S3.

Τελικά, όταν η συγκέντρωση του πολυπεπτιδίου αγγίζει τα 165 ppm (εικόνα III.15), τα συσσωματώματα είναι τα μεγαλύτερα που παρατηρούνται.



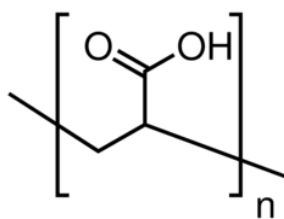
Εικόνα III.15: Επιλεγμένες εικόνες ιζήματος διοξειδίου του πυριτίου έπειτα από 8 ώρες πολυμερισμού σε pH 7.0 παρουσία 165 ppm P5S3.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αυτής τελικά δείχνουν να επιβεβαιώνουν και να τονίζουν την υπόθεση που προκύπτει με βάση το χαρακτηρισμό των ιζημάτων με φασματοσκοπία FT-IR. Το πολυπεπτιδίο δείχνει να εγκλωβίζεται μέσα στο πλέγμα του σχηματιζόμενου διοξειδίου του πυριτίου και πιθανά λειτουργεί ως το ενωτικό μέσο για τα διάφορα μεγεθών πολυμερή του, το οποίο αποδεικνύεται και σε αυτή την ενότητα, από την ανάλογα αυξανόμενη τάση συσσωμάτωσης με τη αύξηση της συγκέντρωσης του πολυπεπτιδίου.

III.2: Μελέτη Διαλυτότητας του Πυριτικού Οξέος σε Υδατικά Διαλύματα Παρουσία του Πολυπεπτιδίου P5S3 και Ανιοντικών Συμπαρεμποδιστών

III.2.1: Αποτελέσματα Προσθήκης Πολυακρυλικού Οξέος σε Διαλύματα $\text{Si}(\text{OH})_4$ Παρουσία του Πεπτιδίου P5S3

Το πολυακρυλικό οξύ είναι ένα πολυμερές διαφόρων μοριακών βαρών, που προέρχεται από ελεγχόμενο πολυμερισμό ακρυλικού οξέος. Σε υδατικά διαλύματα ουδέτερου pH διαθέτει αρνητικό συνολικό φορτίο καθώς πολλές από τις πλευρικές αλυσίδες αποπρωτονιώνονται. Η βασική του δομή παρουσιάζεται ακολούθως, στην εικόνα III.16. Για της ανάγκες της παρούσης έρευνας χρησιμοποιούνται πολυμερή βάρους 2.000 και 450.000 Dalton.

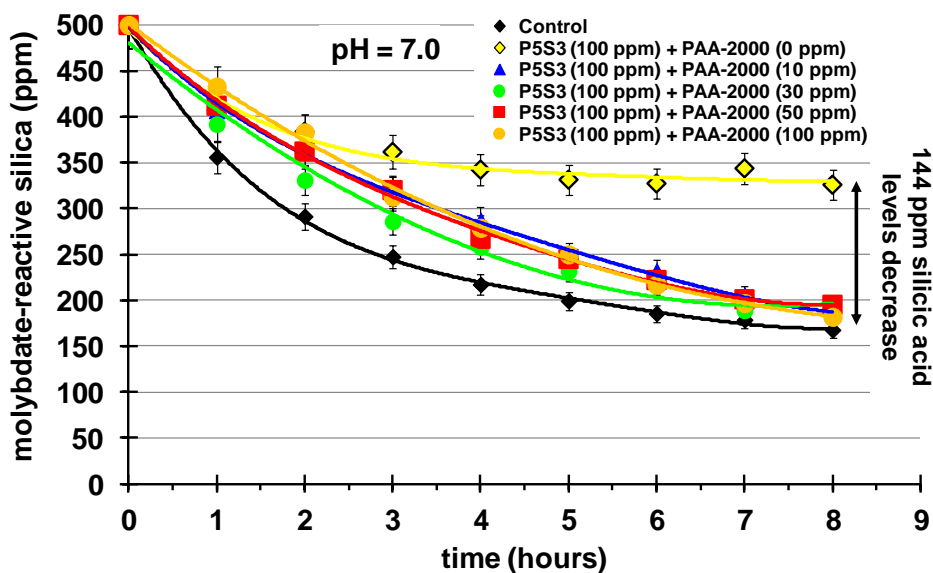


Εικόνα III.16: Σκελετική δομή του πολυακρυλικού οξέος.

Η χρήση ανιοντικού συμπαρεμποδιστή στη συγκεκριμένη περίπτωση σκοπό έχει να εμποδίσει την καταβύθιση των οντοτήτων διοξειδίου του πυριτίου-πεπτιδίου. Έτσι, ίσως μπορεί να αποφευχθεί η απώλεια του παρεμποδιστή από το διάλυμα και να αυξηθεί η σταθεροποιητική του ικανότητα πέραν των οκτώ ωρών.

Πίνακας III.9: Αποτελέσματα αναστολής της παρεμποδιστικής ικανότητας του πεπτιδίου από το Πολυακρυλικό οξύ μοριακού βάρους **2kDa**, σε $pH = 7$. Το πεπτίδιο βρίσκεται σε σταθερή συγκέντρωση (100 ppm) και ο ανιοντικός πολυηλεκτρολύτης σε συγκεντρώσεις (10 ppm, 30 ppm, 50 ppm και 100 ppm).

Time	Control	PAA 2kDa (10ppm)	PAA 2kDa (30ppm)	PAA 2kDa (50ppm)	PAA 2kDa (100ppm)	P5S3 (pure)
0h	500	500	500	500	500	500
1h	382	407	392	412	402	407
2h	348	365	331	362	371	383
3h	308	319	286	320	329	361
4h	276	287	258	267	261	342
5h	245	245	232	245	249	331
6h	221	232	221	222	225	327
7h	197	205	189	201	199	328
8h	184	186	188	190	189	326

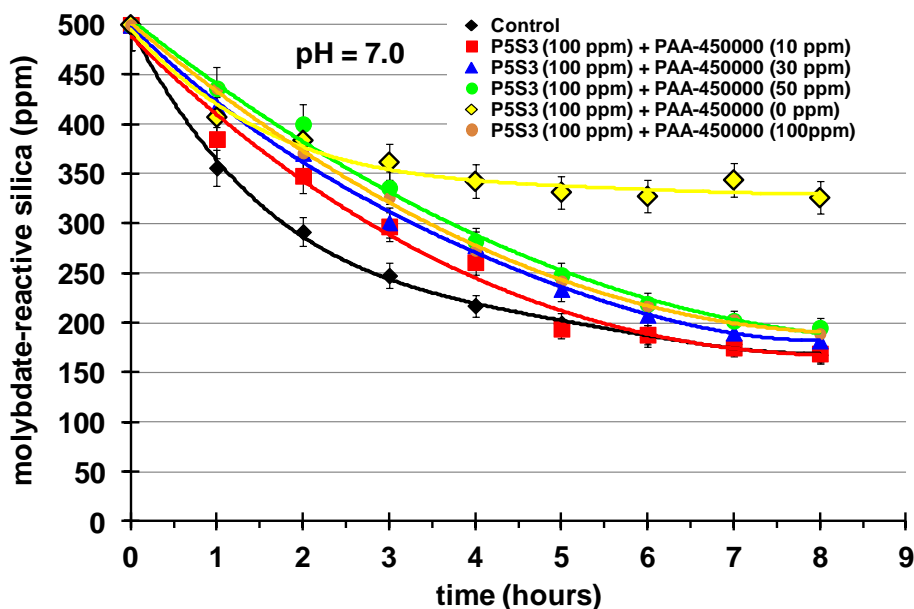


Εικόνα III.17: Τα αποτελέσματα προσθήκης του πολυακρυλικού οξέος μοριακού βάρους 2 kDa στον πολυμερισμό του πυριτικού οξέος.

Πίνακας III.10: Αποτελέσματα αναστολής της παρεμποδιστικής ικανότητας του πεπτιδίου από το Πολυακρυλικό οξύ μοριακού βάρους **450 kDa**, σε $pH = 7$. Το πεπτίδιο βρίσκεται σε σταθερή συγκέντρωση (100 ppm) και ο ανιοντικός πολυηλεκτρολύτης σε συγκεντρώσεις (10 ppm, 30 ppm, 50 ppm και 100 ppm).

Time	Control	PAA 450 (10ppm)	PAA 450 (30ppm)	PAA 450 (50ppm)	PAA 450 (100ppm)	P5S3 (pure)
0h	500	500	500	500	500	500
1h	381	385	418	436	416	407
2h	319	348	371	400	402	383
3h	264	297	301	336	323	361

4h	231	261	278	282	275	342
5h	200	194	234	248	245	331
6h	169	188	208	219	209	327
7h	156	175	190	202	200	328
8h	145	169	182	195	191	326



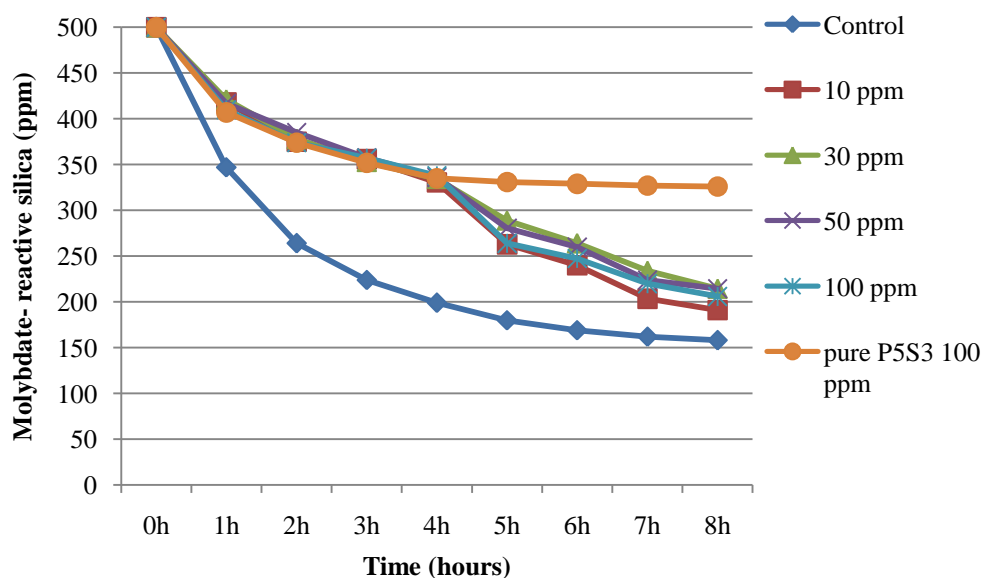
Εικόνα III.18: Τα αποτελέσματα προσθήκης του πολυακρυλικού οξέος μοριακού βάρους 450 kDa στον πολυμερισμό του πυριτικού οξέος.

Η χρήση και των δύο μοριακών βαρών πολυακρυλικού οξέος ανεξαρτήτως, μειώνει δραματικά τα αποτελέσματα σταθεροποίησης που έχει το πεπτίδιο, γεγονός το οποίο γεννά το εξής ερώτημα: εφόσον οι ανιοντικές ομάδες του πολυακρυλικού οξέος δύνανται να «μπλοκάρουν» μόνο τις θετικές ομάδες του πεπτιδίου και όχι τις ουδέτερες, γιατί η ικανότητα σταθεροποίησης του πεπτιδίου εξαλείφεται παντελώς;

Επόμενο βήμα για την εξιχνίαση του προβλήματος είναι η μελέτη του συστήματος πυριτικά – πολυπεπτίδιο – πολυακρυλικό οξύ, αυτή τη φορά με προσθήκη του ανιοντικού συμπαραεμποδιστή, *όχι από την έναρξη της διαδικασίας του πολυμερισμού, αλλά 4,5 ώρες μετά από αυτήν*. Το πολυπεπτίδιο μελετήθηκε σε δύο συγκεντρώσεις, 100 και 165 ppm και σε διάφορες συγκεντρώσεις «μικρού» και «μεγάλου» πολυακρυλικού οξέος.

Πίνακας III.11: Αποτελέσματα αναστολής της παρεμποδιστικής ικανότητας του πεπτιδίου από το Πολυακρυλικό οξύ μοριακού βάρους **2 kDa**, το οποίο έχει προστεθεί στο διάλυμα των πυριτικών σε χρόνο 4,5 ώρες μετά την έναρξη της διαδικασίας του πολυμερισμού, σε pH = 7. Το πεπτίδιο βρίσκεται σε σταθερή συγκέντρωση (**100 ppm**) και ο ανιοντικός πολυηλεκτρολύτης σε συγκεντρώσεις (10 ppm, 30 ppm, 50 ppm και 100 ppm).

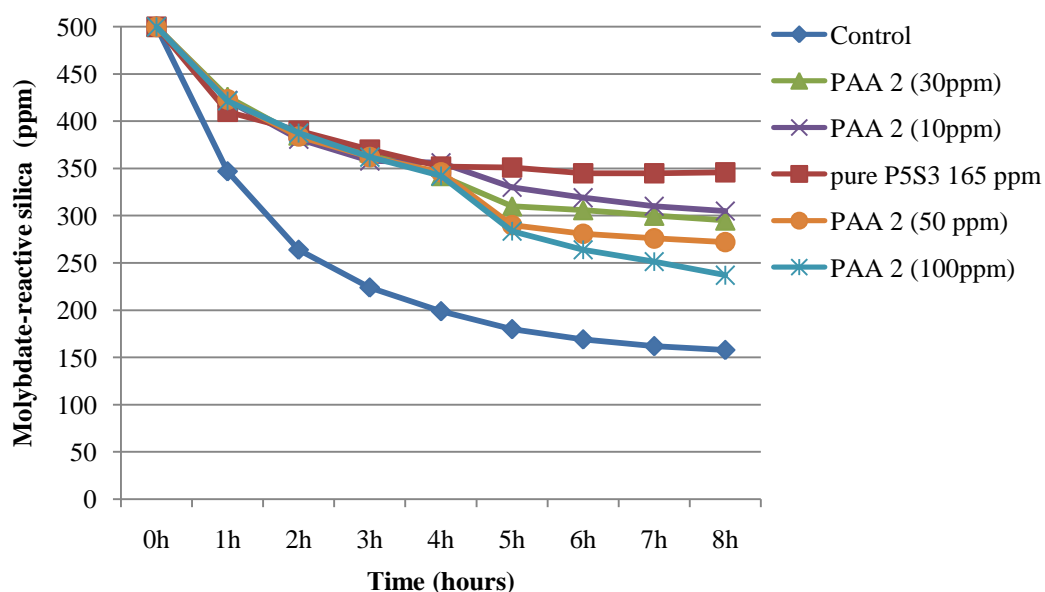
Time	Control	PAA 2 (10ppm)	PAA 2 (30ppm)	PAA 2 (50ppm)	PAA 2 (100 ppm)	pure P5S3 (100ppm)
0h	500	500	500	500	500	500
1h	347	418	421	417	410	407
2h	264	375	378	385	374	374
3h	224	356	353	357	357	352
4h	199	330	334	336	338	335
5h	180	263	289	280	264	331
6h	169	240	264	260	247	329
7h	162	203	234	224	220	327
8h	158	191	214	214	206	326



Εικόνα III.19: Αποτελέσματα προσθήκης PAA 2 kDa σε διάφορες συγκεντρώσεις σε διαλύματα πυριτικών με 100 ppm συγκέντρωση P5S3, 4,5 ώρες μετά την έναρξη της διαδικασίας του πολυμερισμού.

Πίνακας III.12: Αποτελέσματα αναστολής της παρεμποδιστικής ικανότητας του πεπτιδίου από το Πολυακρυλικό οξύ μοριακού βάρους **2 kDa**, το οποίο έχει προστεθεί στο διάλυμα των πυριτικών σε χρόνο 4,5 ώρες μετά την έναρξη της διαδικασίας του πολυμερισμού, σε pH = 7. Το πεπτίδιο βρίσκεται σε σταθερή συγκέντρωση (**165 ppm**) και ο ανιοντικός πολυηλεκτρολύτης σε συγκεντρώσεις (10 ppm, 30 ppm, 50 ppm και 100 ppm).

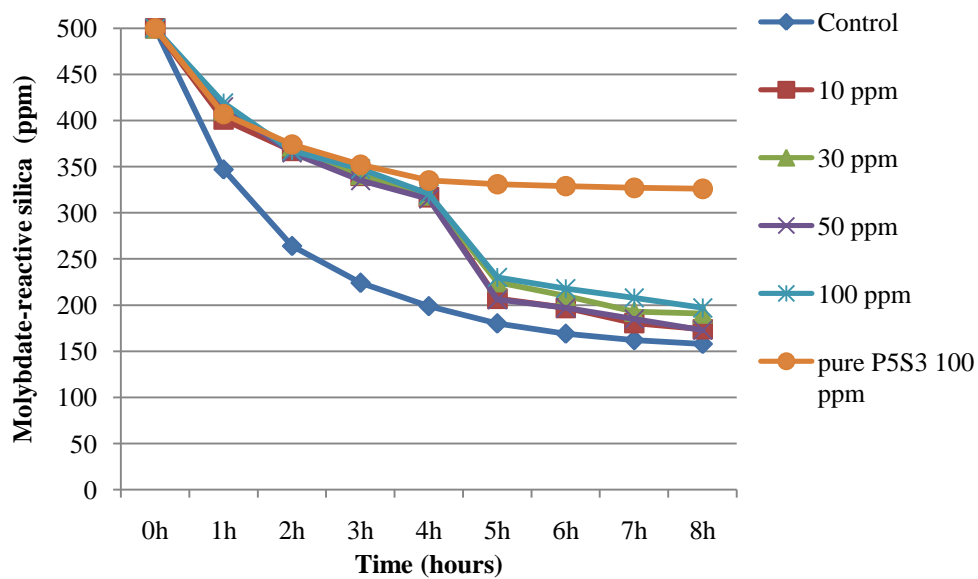
Time	Control	PAA 2 (10ppm)	PAA 2 (30ppm)	PAA 2 (50ppm)	PAA 2 (100ppm)	pure P5S3 (165 ppm)
0h	500	500	500	500	500	500
1h	347	422	426	423	421	410
2h	264	381	385	384	387	390
3h	224	358	367	362	362	370
4h	199	356	342	346	349	352
5h	180	330	310	290	283	351
6h	169	319	306	281	264	345
7h	162	310	300	276	251	345
8h	158	305	295	272	237	346



Εικόνα III.20: Αποτελέσματα προσθήκης PAA 2 kDa σε διάφορες συγκεντρώσεις σε διαλύματα πυριτικών με 165 ppm συγκέντρωση P5S3, 4,5 ώρες μετά την έναρξη της διαδικασίας του πολυμερισμού.

Πίνακας III.13: Αποτελέσματα αναστολής της παρεμποδιστικής ικανότητας του πεπτιδίου από το Πολυακρυλικό οξύ μοριακού βάρους **450 kDa**, σε χρόνο 4,5 ώρες σε pH = 7. Συγκέντρωση P5S3 (**100 ppm**) και PAA σε συγκεντρώσεις (10 ppm, 30 ppm, 50 ppm και 100 ppm).

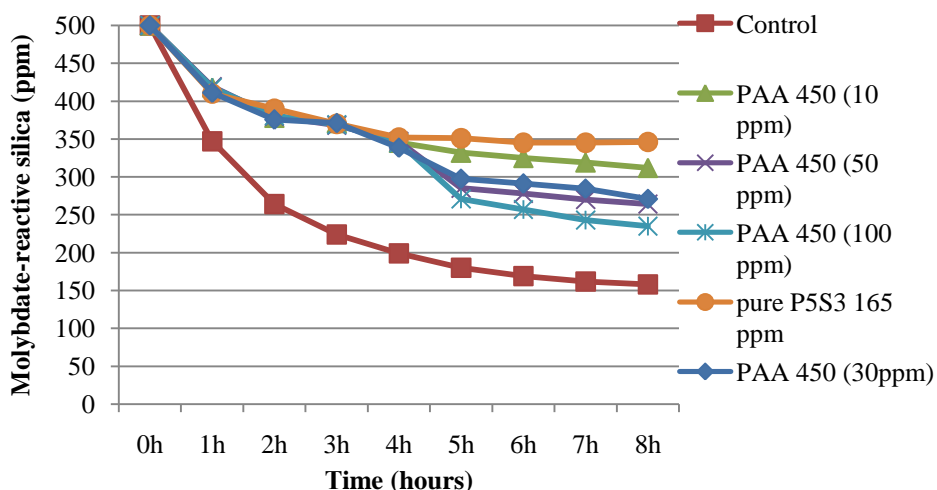
Time	Control	PAA 450 (10ppm)	PAA 450 (30ppm)	PAA 450 (50ppm)	PAA 450 (100 ppm)	pure P5S3 (100ppm)
0h	500	500	500	500	500	500
1h	347	401	411	415	419	407
2h	264	367	372	365	367	374
3h	224	340	341	335	347	352
4h	199	317	319	315	320	335
5h	180	207	225	206	230	331
6h	169	197	210	197	218	329
7h	162	180	193	185	208	327
8h	158	174	191	173	197	326



Εικόνα III.21: Αποτελέσματα προσθήκης PAA 450 kDa σε διάφορες συγκεντρώσεις σε διαλύματα πυριτικών με 100 ppm συγκέντρωση P5S3, 4,5 ώρες μετά την έναρξη της διαδικασίας του πολυμερισμού.

Πίνακας III.14: Αποτελέσματα αναστολής της παρεμποδιστικής ικανότητας του πεπτιδίου από το Πολυακρυλικό οξύ μοριακού βάρους **450 kDa**, το οποίο έχει προστεθεί στο διάλυμα των πυριτικών σε χρόνο 4,5 ώρες μετά την έναρξη της διαδικασίας του πολυμερισμού, σε pH = 7. Το πεπτίδιο βρίσκεται σε σταθερή συγκέντρωση (**165 ppm**) και ο ανιοντικός πολυηλεκτρολύτης σε συγκεντρώσεις (10 ppm, 30 ppm, 50 ppm και 100 ppm).

<u>Time</u>	<u>Control</u>	<u>PAA 450 (10ppm)</u>	<u>PAA 450 (30ppm)</u>	<u>PAA 450 (50ppm)</u>	<u>PAA 450 (100ppm)</u>	<u>pure P5S3 (165 ppm)</u>
0h	500	500	500	500	500	500
1h	347	418	411	419	418	410
2h	264	378	375	380	381	390
3h	224	371	371	368	369	370
4h	199	345	338	347	345	352
5h	180	332	297	285	271	351
6h	169	325	291	278	257	345
7h	162	319	284	270	243	345
8h	158	312	271	264	235	346



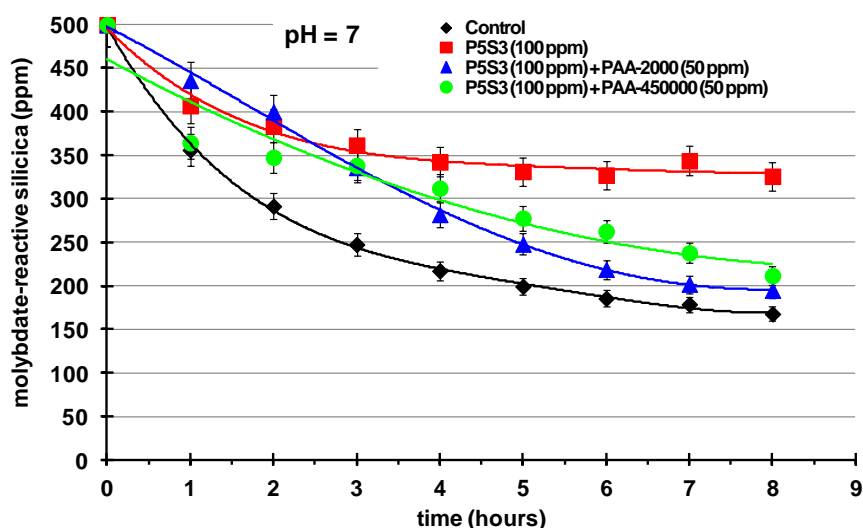
Εικόνα III.22: Αποτελέσματα προσθήκης PAA 450 kDa σε διάφορες συγκεντρώσεις σε διαλύματα πυριτικών με 165 ppm συγκέντρωση P5S3, 4.5 ώρες μετά την έναρξη της διαδικασίας του πολυμερισμού.

Η ικανότητα σταθεροποίησης των πυριτικών ιόντων από το πολύ πεπτίδιο φαίνεται να αναιρείται κατά την προσθήκη του πολυακρυλικού οξέος στο διάλυμα, ανεξαρτήτως του μοριακού βάρους της ανιοντικής πολυμερικής αλυσίδας. Η προσθήκη των αρνητικά φορτισμένων πολυμερών πολυακρυλικού οξέος, λειτουργεί μάλλον καταλυτικά στον πολυμερισμό του διοξειδίου του πυριτίου, πιθανώς αλληλεπιδρώντας με το θετικά φορτισμένο σε pH 7 πεπτίδιο και παρεμποδίζοντάς το έτσι να επιβραδύνει τον πολυμερισμό δια μέσου ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Παρόλα αυτά, η αναστολή σχηματισμού ιζημάτων πεπτιδίου – διοξειδίου του πυριτίου φάνηκε να στέφεται με επιτυχία, καθώς τα διαλύματα είναι σχεδόν διαυγή, ενώ ακόμη και στη μικρότερη συγκέντρωση PAA (10 ppm), καθίσταται σχεδόν αδύνατη η συλλογή ιζήματος. Περαιτέρω ανάλυση περί των ιζημάτων θα γίνει παρακάτω, στο αντίστοιχο υποκεφάλαιο. Αξίζει να σημειωθεί πως στην περίπτωση του PAA 450 kDalton η μείωση στο διαλυτό πυριτικό οξύ είναι σαφώς πιο γρήγορη και δραματική, γεγονός που πιθανώς να οφείλεται στον μεγάλο όγκο των μορίων αυτών. Η μελέτη αυτή μας δίνει μία απάντηση στο ερώτημα που θέσαμε παραπάνω, στο γιατί η παρεμποδιστική ικανότητα του πεπτιδίου εξαλείφεται εντελώς παρουσία του πολυακρυλικού οξέος. Υποθέτουμε πως ο όγκος και των δύο αλυσίδων του ανιοντικού πολυμερούς είναι αρκετά μεγάλος ώστε, όταν αλληλεπιδράσει ηλεκτροστατικά με τις θετικά φορτισμένες ομάδες του πεπτιδίου, οι ουδέτερες «μπλοκάρονται» στερεοχημικά και καθίσταται αδύνατη η προσέγγιση τους από μόρια πυριτικού οξέος. Έτσι, τα τελευταία αφήνονται ανεπηρέαστα να συνεχίσουν τη διαδικασία του πολυμερισμού.

Συγκριτικά αποτελέσματα μεταξύ των δύο μοριακών βαρών PAA παρουσία P5S3.

Πίνακας III.15: Συγκριτικά Αποτελέσματα των Δύο Μοριακών Βαρών PAA με σταθερή συγκέντρωση πολυπεπτιδίου P5S3 100 ppm και συγκέντρωση PAA 50 ppm.

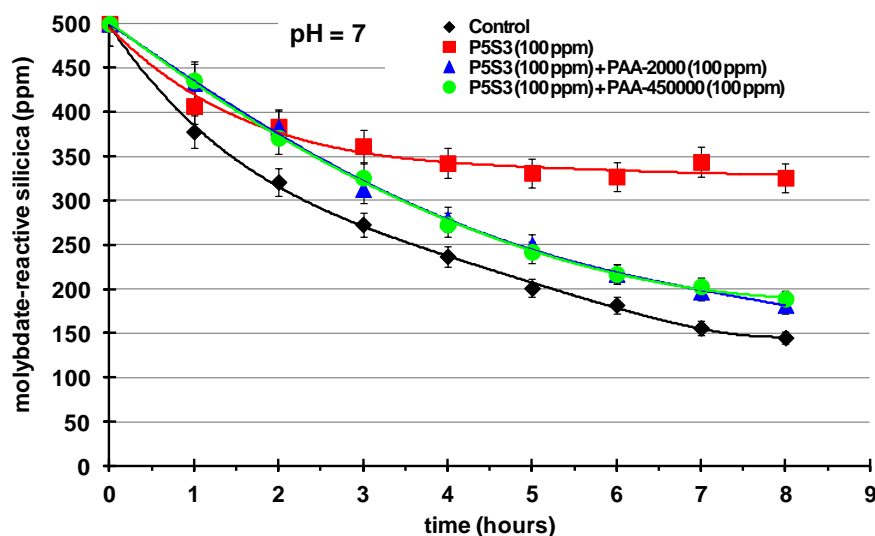
Time	Control	PAA 2kDa (50ppm)	PAA 450 (50ppm)	P5S3 (pure)
0h	500	500	500	500
1h	382	412	436	407
2h	348	362	400	383
3h	308	320	336	361
4h	276	267	282	342
5h	245	245	248	331
6h	221	222	219	327
7h	197	201	202	328
8h	184	190	195	326



Εικόνα III.23: Σύγκριση του βαθμού αναστολής της σταθεροποιητικής ικανότητας του πεπτιδίου από τα δύο μοριακά βάρη πολυακρυλικού οξέος σε ίδιες συγκεντρώσεις.

Πίνακας III.16: Συγκριτικά Αποτελέσματα των Δύο Μοριακών Βαρών PAA με σταθερή συγκέντρωση πολυπεπτιδίου P5S3 100 ppm και PAA 100 ppm.

Time	Control	PAA 2kDa (100ppm)	PAA 450 (100ppm)	P5S3 (pure)
0h	500	500	500	500
1h	382	402	416	407
2h	348	371	402	383
3h	308	329	323	361
4h	276	261	275	342
5h	245	249	245	331
6h	221	225	209	327
7h	197	199	200	328
8h	184	189	191	326

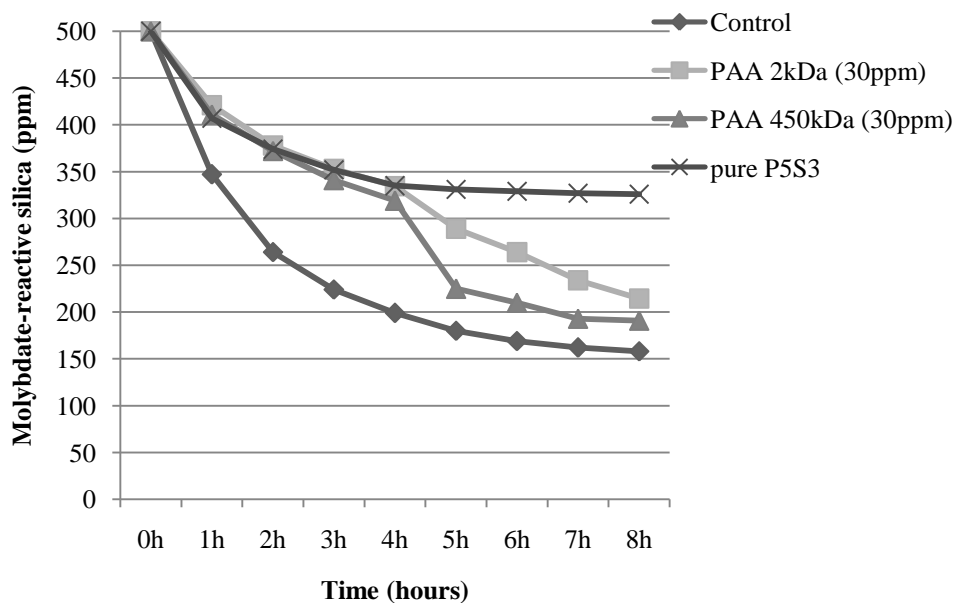


Εικόνα III.24: Σύγκριση του βαθμού αναστολής της σταθεροποιητικής ικανότητας του πεπτιδίου από τα δύο μοριακά βάρη πολυακρυλικού οξέος σε ίδιες συγκεντρώσεις.

Το πολυακρυλικό οξύ φαίνεται να αναστέλλει την παρεμποδιστική ικανότητα του πεπτιδίου, χωρίς να μπορεί να παρατηρηθεί κάποια αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ των δύο μοριακών βαρών, όταν το ανιοντικό πολυμερές προστίθεται στο σύστημα από την αρχή της διαδικασίας του πολυμερισμού.

Πίνακας III.17: Συγκριτικά Αποτελέσματα των Δύο Μοριακών Βαρών PAA στις 4,5 ώρες προσθήκης, με σταθερή συγκέντρωση του πολυπεπτιδίου P5S3 100 ppm και συγκέντρωση PAA 30 ppm.

Time	Control	PAA 2kDa (30ppm)	PAA 450kDa (30ppm)	pure P5S3
0h	500	500	500	500
1h	347	421	411	407
2h	264	378	372	374
3h	224	353	341	352
4h	199	334	319	335
5h	180	289	225	331
6h	169	264	210	329
7h	162	234	193	327
8h	158	214	191	326



Εικόνα III.24: Σύγκριση του βαθμού αναστολής της σταθεροποιητικής ικανότητας του πεπτιδίου από τα δύο μοριακά βάρη πολυακρυλικού οξέος σε ίδιες συγκεντρώσεις, στις 4,5 ώρες προσθήκης.

Στον παραπάνω συγκριτικό πίνακα είναι εμφανέστερη η επίδραση, ακόμα και μικρή, της διαφοράς στο μοριακό βάρος του χρησιμοποιούμενου ανιοντικού συμπαραεμποδιστή.

III.2.2: Αποτελέσματα προσθήκης Δισόξινου Φωσφορικού Καλίου (KH_2PO_4) σε Διαλύματα $\text{Si}(\text{OH})_4$

Με δεδομένα τα αποτελέσματα του προηγούμενου κεφαλαίου, και βασισμένοι στην υπόθεση ότι το πολυακρυλικό οξύ αναστέλλει την ικανότητα σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος από το πεπτίδιο, προβήκαμε στη μελέτη του συστήματός μας όταν σε αυτό προσθέσουμε ένα, πολύ μικρότερο σε όγκο, ανιοντικό ηλεκτρολύτη, το Δισόξινο Φωσφορικό Κάλιο (KH_2PO_4). Τα αποτελέσματα φάνηκαν, όχι μόνο να επιβεβαιώνουν τις υποθέσεις μας, αλλά μας έβαλαν σε νέες σκέψεις.

Υπολογίσαμε πως χρειάζονται τουλάχιστον 49 ppm KH_2PO_4 για να απενεργοποιηθούν όλες οι θετικά φορτισμένες ομάδες 100 ppm του πεπτιδίου. Ο υπολογισμός πραγματοποιήθηκε ως εξής:

Ισχύουν: 100 ppm πεπτιδίου αντιστοιχούν σε 18 μM , $\text{M}_{\text{P5S3}} = 5554,6 \text{ g/mole}$, 100 ppm = 100 mg /1000 ml

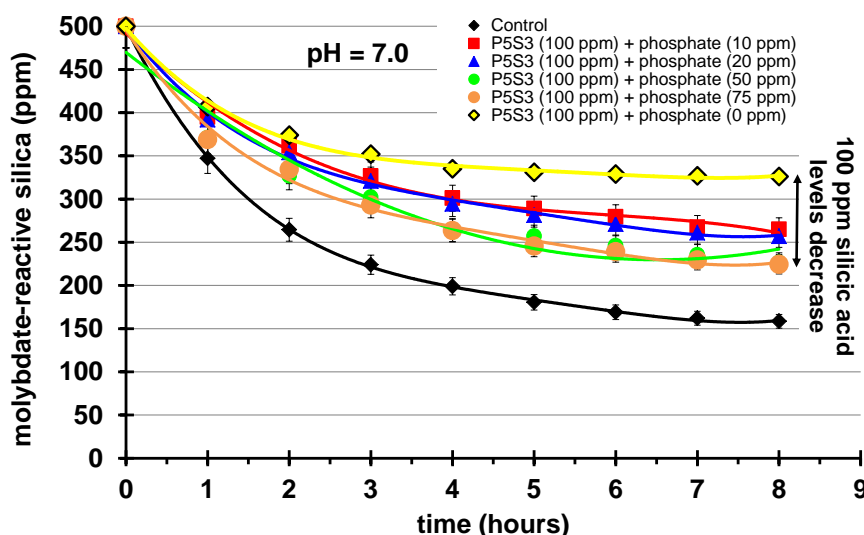
Συνεπώς: $0,1\text{g} \div 5554,6 \text{ g/mole} = 1,8 \times 10^{-6} \text{ moles}$ (100 ppm P5S3 αντιστοιχούν σε $1,8 \times 10^{-6} \text{ moles P5S3}$)

Κάθε πολυπεπτιδική αλυσίδα διαθέτει 20 θετικές ομάδες, άρα 1 mole αλυσίδας απαιτεί 20 moles KH_2PO_4 , και $1,8 \times 10^{-6} \text{ moles}$ απαιτούν $36 \times 10^{-6} \text{ moles KH}_2\text{PO}_4$.

$\text{Mr}_{\text{KH}_2\text{PO}_4} = 136,1 \text{ g/mole}$ άρα τελικά $m = 36 \times 10^{-6} \text{ moles} \times 136,1 \text{ g/mole} = 49 \text{ mg}$ στα 1000 ml = **49 ppm**.

Πίνακας III.18: Αποτελέσματα αναστολής της παρεμποδιστικής ικανότητας του πεπτιδίου από το KH_2PO_4 σε $\text{pH} = 7$. Το πεπτίδιο βρίσκεται σε σταθερή συγκέντρωση (100 ppm) και ο ανιοντικός ηλεκτρολύτης σε συγκεντρώσεις (10 ppm, 20 ppm, 50 ppm και 75 ppm).

Time	Control	KH_2PO_4 (10ppm)	KH_2PO_4 (20ppm)	KH_2PO_4 (50ppm)	KH_2PO_4 (75ppm)	pure P5S3 (100ppm)
0h	500	500	500	500	500	500
1h	347	395	392	371	369	407
2h	264	361	354	327	334	374
3h	224	326	321	302	293	352
4h	199	301	294	264	263	335
5h	180	289	281	257	245	331
6h	169	279	271	246	239	329
7h	162	267	261	235	229	327
8h	158	265	257	226	224	326

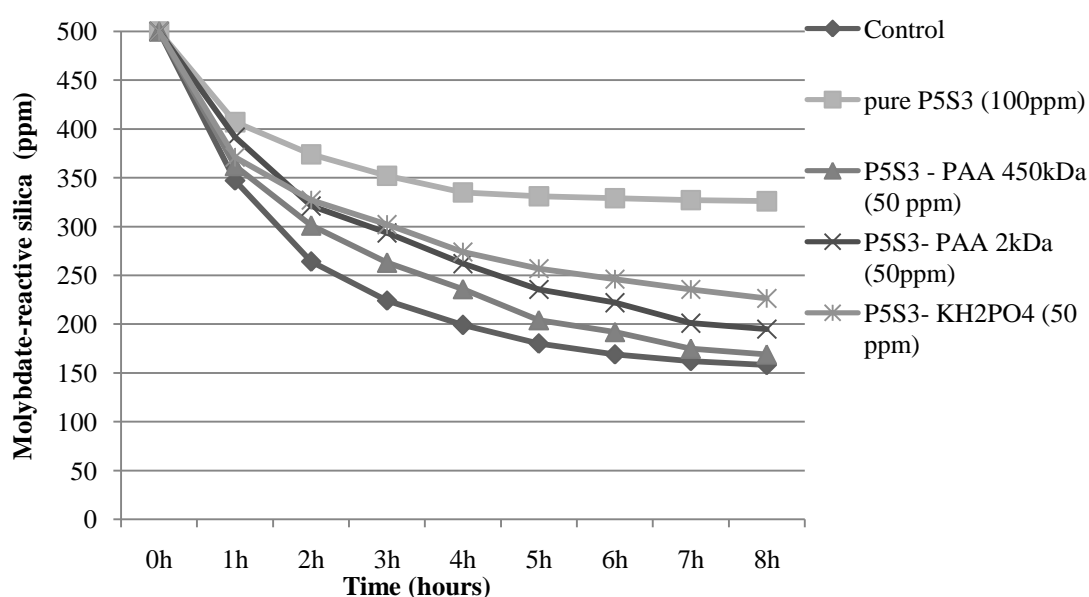


Εικόνα III.25: Δράση KH_2PO_4 σε διάφορες συγκεντρώσεις, σε διαλύματα αρχικής συγκέντρωσης 500 ppm SiO_2 και σταθερή συγκέντρωση P5S3 100 ppm.

Παρατηρείται αντιστρόφως αναλογική σχέση μεταξύ των διαλυτών πυριτικών και της συγκέντρωσης του KH_2PO_4 .

Πίνακας III.19: Συγκριτικά Αποτελέσματα PAA και KH_2PO_4 , παρουσία πολυπεπτιδίου P5S3.

Time	Control	pure P5S3 (100ppm)	P5S3 - PAA 450kDa (50 ppm)	P5S3- PAA 2kDa (50ppm)	P5S3 - KH_2PO_4 (50 ppm)
0h	500	500	500	500	500
1h	347	407	362	391	371
2h	264	374	301	321	327
3h	224	352	263	293	302
4h	199	335	236	262	274
5h	180	331	204	235	257
6h	169	329	192	222	246
7h	162	327	175	201	235
8h	158	326	169	195	226



Εικόνα III.26: Συγκριτικά Αποτελέσματα PAA και KH_2PO_4 .

Τελικά, το δισόξινο φωσφορικό κάλιο μειώνει την σταθεροποιητική ικανότητα του πολυπεπτιδίου, όχι όμως τόσο δραστικά όσο το πολυακρυλικό οξύ. Συγκεκριμένα βλέπουμε ότι όταν περάσουμε το «κατώφλι» των 49 ppm KH_2PO_4 , όσο και να αυξηθεί περαιτέρω η συγκέντρωση δεν μειώνονται άλλο τα επίπεδα του διαλυτού πυριτικού οξέος. Έτσι συμπεραίνουμε πως αυτός ο ανιοντικός ηλεκτρολύτης αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με τις θετικά φορτισμένες αμινομάδες του πολυπεπτιδίου και αφήνει ελεύθερους και ανοιχτούς τους αμιδικούς δεσμούς προς σχηματισμό δεσμών υδρογόνου.

III.2.3: Μελέτη των Ιζημάτων του Διοξειδίου του Πυριτίου παρουσία P5S3 και των Ανιοντικών Συμπαρεμποδιστών

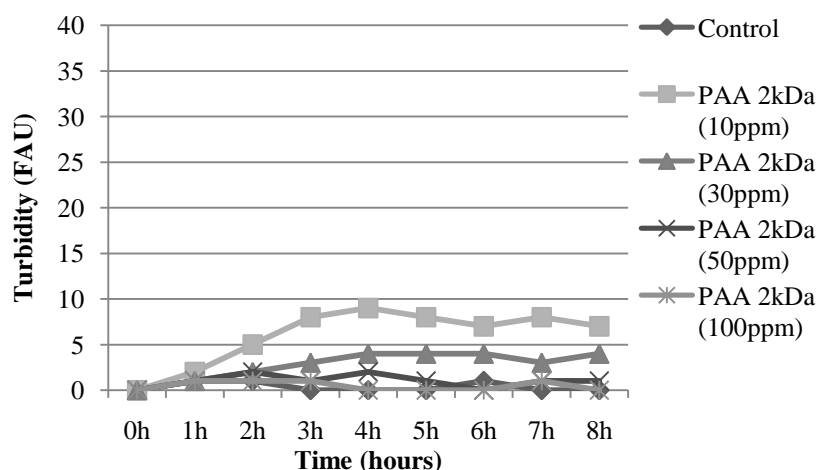
Οι μελέτες που ακολουθούν πραγματοποιήθηκαν για να εξακριβωθεί, αρχικά η παρουσία των ανιοντικών συμπαρεμποδιστών στα ιζήματα σίλικας/ πεπτιδίου και σε περίπτωση θετικών αποτελεσμάτων, η επίδραση αυτών στον όγκο και στη μορφολογία των ληφθέντων ιζημάτων.

Μετρήσεις Θολερότητας

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η συλλογή ιζήματος από πειράματα PAA αυτών των συνθηκών κρίθηκε σχεδόν αδύνατη και τα αντίστοιχα διαλύματα ήταν μέχρι το πέρας των οκτώ ωρών, σχεδόν διαυγή. Οι οπτικές αυτές παρατηρήσεις ποσοτικοποιούνται και επιβεβαιώνονται από τα πειράματα θολερότητας.

Πίνακας III.20: Μέτρηση θολερότητας διαλυμάτων πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε FAU, σε pH = 7, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη πολυπεπτιδίου P5S3 σε σταθερή συγκέντρωση 100 ppm και PAA 2 kDa σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων.

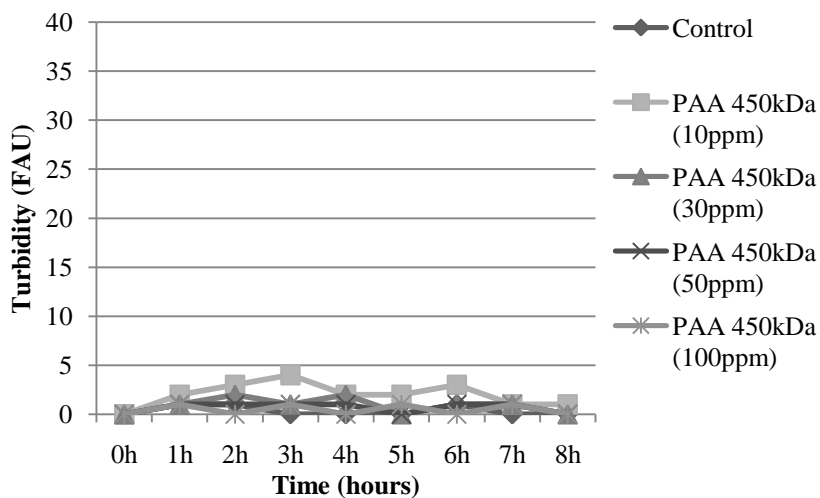
Time	Control	PAA 2kDa (10ppm)	PAA 2kDa (30ppm)	PAA 2kDa (50ppm)	PAA 2kDa (100ppm)
0h	0	0	0	0	0
1h	1	2	1	1	1
2h	1	5	2	2	1
3h	0	8	3	1	1
4h	0	9	4	2	0
5h	0	8	4	1	0
6h	1	7	4	0	0
7h	0	8	3	1	1
8h	0	7	4	1	0



Εικόνα III.27: Εξέλιξη της θολερότητας των διαλυμάτων του πυριτικού οξέος, τις πρώτες 8 ώρες της διαδικασίας του πολυμερισμού, με προσθήκη πολυπεπτιδίου P5S3 σε σταθερή συγκέντρωση 100ppm και διάφορες συγκεντρώσεις PAA 2 kDa.

Πίνακας III.21: Μέτρηση θολερότητας διαλυμάτων πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε FAU, σε pH = 7, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη πολυπεπτιδίου P5S3 σε σταθερή συγκέντρωση 100 ppm και PAA 450 kDa σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων.

Time	Control	PAA			
		PAA 450kDa (10ppm)	PAA 450kDa (30ppm)	PAA 450kDa (50ppm)	PAA 450kDa (100ppm)
0h	0	0	0	0	0
1h	1	2	1	1	1
2h	1	3	2	1	0
3h	0	4	1	1	1
4h	0	2	2	1	0
5h	0	2	0	0	1
6h	1	3	1	1	0
7h	0	1	1	1	1
8h	0	1	0	0	0

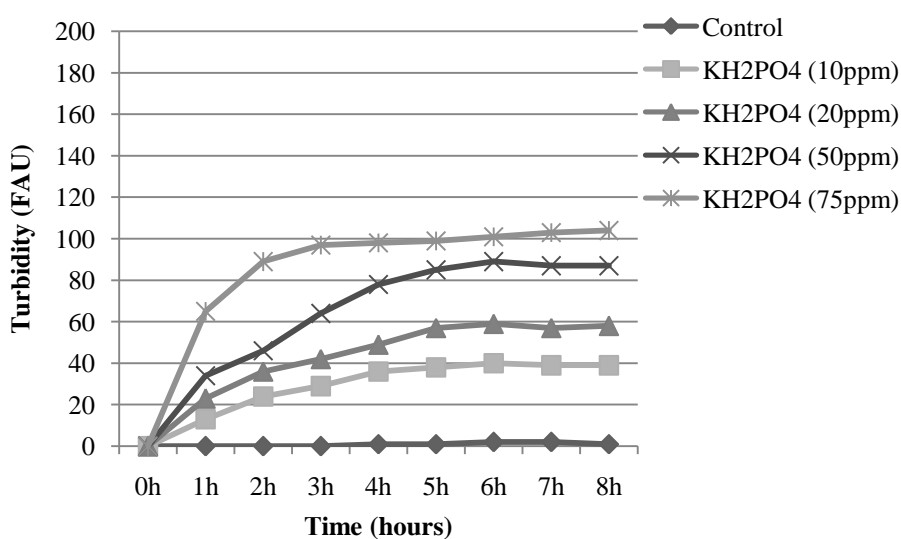


Εικόνα III.28: Εξέλιξη της θολερότητας των διαλυμάτων του πυριτικού οξέος, τις πρώτες 8 ώρες της διαδικασίας του πολυμερισμού, με προσθήκη πολυπεπτιδίου P5S3 σε σταθερή συγκέντρωση 100ppm και διάφορες συγκεντρώσεις PAA 450 kDa.

Τα πειράματα αυτά αποδεικνύουν τη διαύγεια των διαλυμάτων σίλικας- πεπτιδίου -πολυακρυλικού οξέος, γεγονός που επιβεβαιώνει την αποτροπή των PAAs για σχηματισμό ιζήματος.

Πίνακας III.22: Μέτρηση θολερότητας διαλυμάτων πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε FAU, σε pH = 7, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη πολυπεπτιδίου P5S3 σε σταθερή συγκέντρωση 100 ppm και KH_2PO_4 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων.

Time	Control	KH_2PO_4 (10ppm)	KH_2PO_4 (20ppm)	KH_2PO_4 (50ppm)	KH_2PO_4 (75ppm)
0h	0	0	0	0	0
1h	0	13	23	34	65
2h	0	24	36	46	89
3h	0	29	42	64	97
4h	1	36	49	78	98
5h	1	38	57	85	99
6h	2	40	59	89	101
7h	2	39	57	87	103
8h	1	39	58	87	104

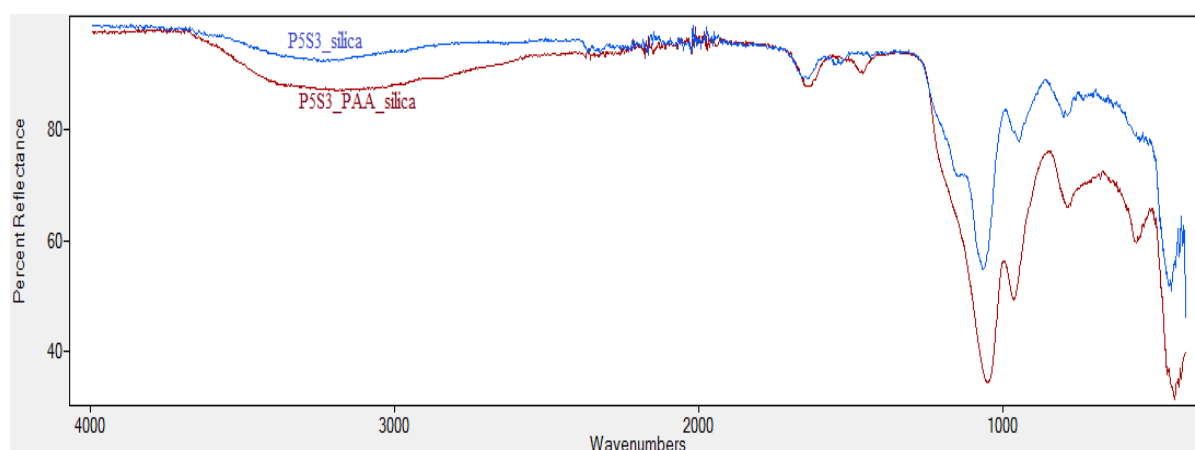


Εικόνα III.29: Εξέλιξη της θολερότητας των διαλυμάτων του πυριτικού οξέος, τις πρώτες 8 ώρες της διαδικασίας του πολυμερισμού, με προσθήκη πολυπεπτιδίου P5S3 σε σταθερή συγκέντρωση 100ppm και διάφορες συγκεντρώσεις KH_2PO_4 .

Στα πειράματα με χρήση δισόζινου φωσφορικού ως ανιοντικό συμπαραεμποδιστή η κατακρήμνιση δεν αποτρέπεται όπως έγινε με το πολυακρυλικό οξύ. Αυτό ενδεχομένως οφείλεται στις ικανότητες δημιουργίας συσσωματωμάτων των φωσφορικών^[50]. Ο χαρακτηρισμός των ιζημάτων αυτών ακολουθεί παρακάτω.

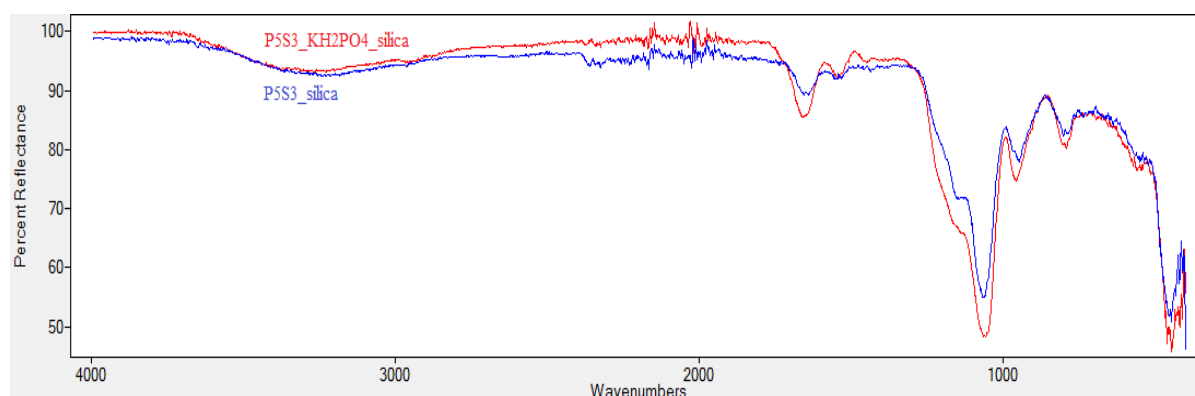
Χαρακτηρισμός με Φασματοσκοπία FT-IR

Στην εικόνα III.30 πραγματοποιείται σύγκριση μεταξύ των φασμάτων υπέρυθρου που προκύπτουν από τα ιζήματα SiO_2 - P5S3 100 ppm και SiO_2 - P5S3 100 ppm- PAA 2 kDa 10 ppm. Το συμπέρασμα που εξάγουμε είναι πως το ανιοντικό πολυμερές δεν δύναται να εγκλωβιστεί μαζί με το πολυπεπίδιο μέσα στο ελάχιστης ποσότητας ίζημα που δημιουργείται. Σε οποιοσδήποτε άλλες συνθήκες παρουσία πολυακρυλικού οξέος στάθηκε αδύνατη η συλλογή ιζήματος για μελέτη.



Εικόνα III..30: Σύγκριση φασμάτων FT-IR P5S3-σίλικας (μπλε) και P5S3- PAA 2kDa- σίλικας (κόκκινο).

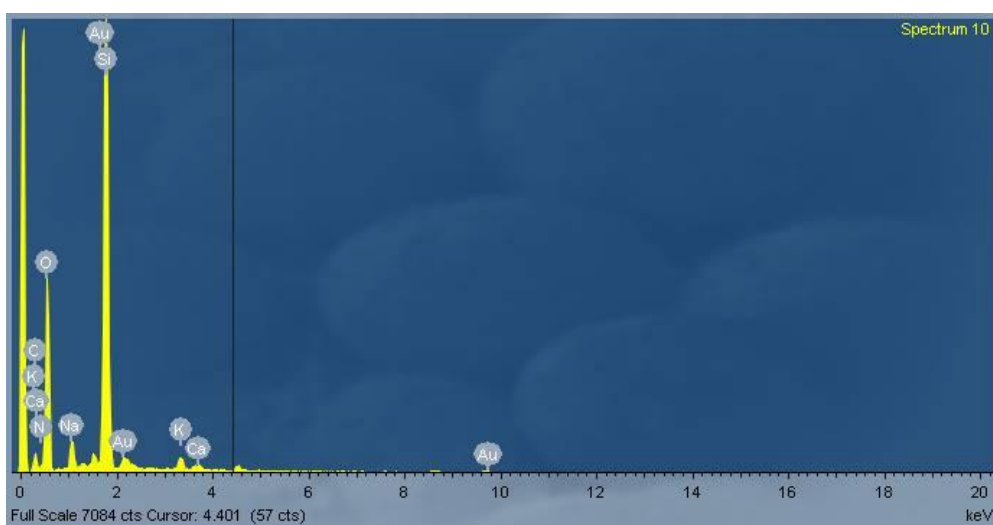
Στην εικόνα III.31 πραγματοποιείται σύγκριση μεταξύ των φασμάτων υπέρυθρου που προκύπτουν από τα ιζήματα SiO_2 - P5S3 100 ppm και SiO_2 - P5S3 100 ppm- KH_2PO_4 75 ppm. Όπως και στην περίπτωση του πολυακρυλικού οξέος, ο ανιοντικός ηλεκτρολύτης δεν φαίνεται να εμπλέκεται στη μήτρα του ιζήματος. Καθώς όμως δεν αποτρέπει τη δημιουργία του, πιθανά να συμβάλλει σε αυτήν μέσω της ικανότητάς του να δημιουργεί συσσωματώματα.



Εικόνα III.31: Σύγκριση φασμάτων FT-IR P5S3-σίλικας (μπλε) και P5S3- KH_2PO_4 - σίλικας (κόκκινο).

Μετρήσεις Στοιχειακής Ανάλυσης (EDS)

Η απουσία των ανιοντικών συμπαρεμποδιστών από τα ληφθέντα ιζήματα έρχεται να σφραγιστεί και από τα αποτελέσματα της στοιχειακής ανάλυσης. Είναι γνωστό πως αυτού του είδους η αναλυτική μέθοδος δεν κρίνεται κατάλληλη για ποσοτικοποιήσεις, παρόλα αυτά, στην περίπτωση του πολυακρυλικού οξέος σκεφτήκαμε πως μπορούμε να «μετρήσουμε» την εξής πληροφορία. Οι αναλογίες άνθρακα/ οξυγόνου/ αζώτου είναι πανομοιότυπες μεταξύ των ιζημάτων SiO₂- P5S3 100 ppm και SiO₂- P5S3 100 ppm- PAA 2 kDa 10 ppm.



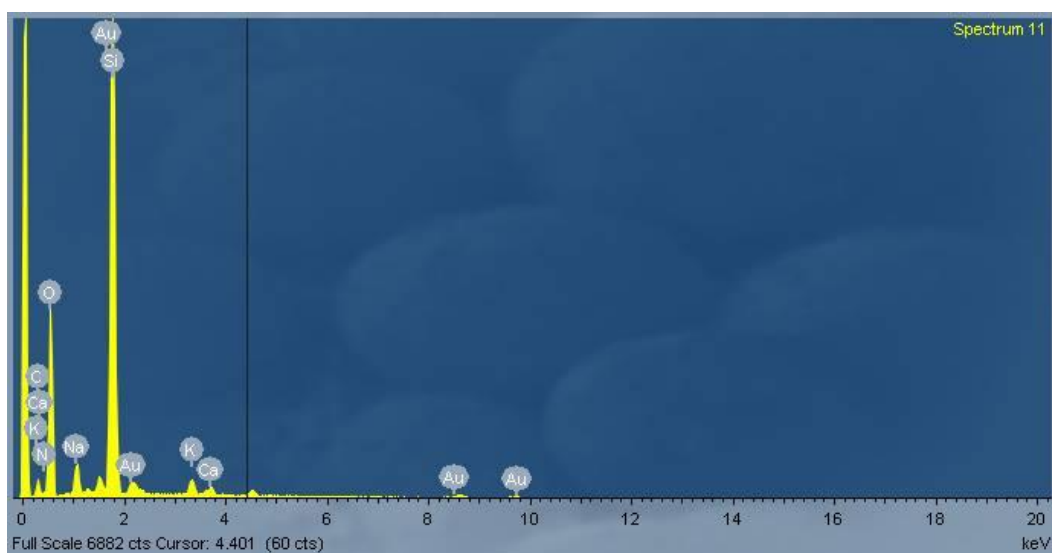
Εικόνα III.32: Στοιχειακή ανάλυση ιζήματος SiO₂- P5S3 100 ppm- PAA 2 kDa 10 ppm.

Πίνακας III.23: Στοιχειακή ανάλυση ιζήματος SiO₂- P5S3 100 ppm- PAA 2 kDa 10 ppm.

Element	App	Intensity	Weight%	Weight%	Atomic%
	Conc.	Corn.		Sigma	
C K	17.91	0.3309	12.77	1.55	18.69
N K	4.56	0.1769	6.09	1.24	7.64
O K	154.77	0.7232	50.50	1.20	55.48
Na K	9.03	0.8193	2.60	0.15	1.99
Si K	96.52	0.9262	24.59	0.61	15.39
K K	4.42	0.9826	1.06	0.08	0.48
Ca K	1.42	0.9404	0.36	0.07	0.16
Au M	5.65	0.6541	2.04	0.32	0.18
Totals			100.00		

Σε περίπτωση ύπαρξης πολυακρυλικού οξέος στο ίζημα, η αναλογία C/N/O θα διέφεραν, καθώς θα διακρινόταν στο ίζημα μεγαλύτερη ποσότητα άνθρακα και οξυγόνου, μοναδικά στοιχεία στο πολυακρυλικό οξύ.

Όσον αφορά στην απουσία του δισόξινου φωσφορικού καλίου από τα αντίστοιχα ιζήματα, αυτή επιβεβαιώνεται από την απουσία του φωσφόρου στα φάσματα EDS.



Εικόνα III.33: Στοιχειακή ανάλυση ιζήματος SiO_2 - P5S3 100 ppm- KH_2PO_4 75 ppm.

Πίνακας III.24: Στοιχειακή ανάλυση ιζήματος SiO_2 - P5S3 100 ppm- KH_2PO_4 75 ppm.

Element	App	Intensity	Weight%	Weight%	Atomic%
	Conc.	Corn.		Sigma	
C K	16.78	0.3221	13.40	1.60	19.87
N K	3.13	0.1664	4.84	1.34	6.16
O K	135.46	0.7125	48.88	1.23	54.43
Na K	8.81	0.8334	2.72	0.16	2.11
Si K	93.32	0.9329	25.72	0.66	16.32
K K	5.21	0.9800	1.37	0.09	0.62
Ca K	2.20	0.9373	0.60	0.08	0.27
Au M	6.24	0.6508	2.47	0.35	0.22
Totals			100.00		

III.3: Συνοπτική Ανακεφαλαίωση Συμπερασμάτων 3^{ου} Κεφαλαίου

Η αποτροπή πολυμερισμού του πυριτικού οξέος από το υπό μελέτη βιοπολυμερές πραγματοποιήθηκε σε ικανοποιητικό βαθμό.

Η ικανότητά του αυτή είναι βραχυπρόθεσμη, καθώς αδυνατεί να σταθεροποιήσει το πυριτικό οξύ σε κορεσμένα διαλύματα με pH 7 για περισσότερες από 24 ώρες και σε συγκέντρωση μικρότερη των 100 ppm.

Κατά τις πρώτες οκτώ ώρες του πολυμερισμού των πυριτικών, η παρεμποδιστική ικανότητα του πεπτιδίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσής του, ενώ ενδεικτικά, καταφέρνει να σταθεροποιήσει έως και 180 ppm διαλυτού πυριτικού οξέος πάνω από το διάλυμα ελέγχου (control) μέχρι την όγδοη ώρα του πολυμερισμού. Θεωρούμε πως οι ομάδες υπεύθυνες για τη σταθεροποίηση των πυριτικών είναι οι θετικά φορτισμένες αμινομάδες, που δρουν με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και οι ουδέτερου φορτίου αμιδικοί δεσμοί, που καθίστανται ικανοί να δημιουργήσουν δεσμούς υδρογόνου. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αυτών προκύπτουν ιζήματα, μελέτη των οποίων οδηγεί στο συμπέρασμα πως το πολυπεπτίδιο παγιδεύεται μέσα στη μήτρα του σχηματιζόμενου διοξειδίου του πυριτίου.

Σε μια απόπειρα ανακούφισης του θετικού φορτίου του πολυπεπτιδίου και ενίσχυση της σταθεροποιητικής του ικανότητας μέσω αποφυγής της κατακρήμνισης του παρεμποδιστή, χρησιμοποιείται ο ανιοντικός πολυηλεκτρολύτης πολυακρυλικό οξύ σε μοριακά βάρη 2 και 450 kDalton. Η επίδρασή του είναι καταστρεπτική ως προς την παρεμποδιστική ικανότητα του πολυπεπτιδίου καθώς την αναιρεί στο σύνολό της, παρόλο που επιτυχώς αποφεύγεται η δημιουργία ιζημάτων. Η ολοκληρωτική αναίρεση της επίδρασης του πεπτιδίου στο πυριτικό οξύ δημιουργεί την υπόθεση πως, πέραν των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που δημιουργούνται μεταξύ πεπτιδίου και πολυακρυλικού οξέος, το τελευταίο παρεμποδίζει στερεοχημικά και τις ουδέτερες ομάδες, αποτρέποντάς τις από τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου με τα πυριτικά. Για την επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής χρησιμοποιείται ένας πολύ μικρότερου όγκου ανιοντικός ηλεκτρολύτης, το δισόξινο φωσφορικό κάλιο, μέσω του οποίου αποδεικνύεται τελικά η χρησιμότητα και η λειτουργία κάθε χαρακτηριστικής ομάδας στη σταθεροποίηση του πυριτικού οξέος, ιδιαίτερα των μέχρι πρόσφατα αμφισβητήσιμων ουδέτερων ομάδων και της δημιουργίας δεσμών υδρογόνου. Ανάλυση των ιζημάτων από τις μελέτες αυτές

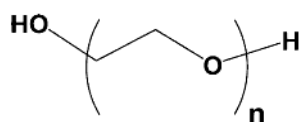
δείχνουν πως ο εκάστοτε ανιοντικός συμπαρεμποδιστής δεν παγιδεύεται, όπως το πολυπεπτίδιο, στη μήτρα του διοξειδίου του πυριτίου.

Όσον αφορά στις υδροξυλικές ομάδες, μελέτες έχουν δείξει πως οργανικά μόρια με υψηλή περιεκτικότητα αυτού του είδους των ομάδων δεν συμμετέχουν καθόλου στο σχηματισμό του διοξειδίου του πυριτίου^[51]. Σε περιπτώσεις ύπαρξης τέτοιων δομών σε μήτρες διοξειδίου του πυριτίου, οι ομάδες υδροξυλίου βοηθούν στη σταθερότητα και τη διαλυτότητα των δομών αυτών. Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός πως οι περιοχές πλούσιες σε υδροξυλικές ομάδες των silicateins έχουν έμμεσο ρόλο στη βιολογική δημιουργία διοξειδίου του πυριτίου (biosilicification), όπως η προστασία των ενεργών κέντρων των πρωτεϊνών ή η ενίσχυση στην απόκτηση της τελικής τους συνδεσμολογίας^[52]. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αρκετά πρωτότυπα, δεδομένης της ικανότητας μορίων τροποποιημένων με υδροξυλομάδες να ρυθμίζουν την *in vitro* κρυσταλλοποίηση (mineralization), ενώσεων όπως το ανθρακικό ασβέστιο^[53].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

Συνθετικά Πολυμερή

Προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριό μας έδειξαν πως οι αιθερικοί δεσμοί των πολυαιθυλενο-γλυκολών (Polyethylene glycol, PEG) είναι ικανοί να αναπτύξουν δεσμούς υδρογόνου με το μονο- και διπυριτικό οξύ^[5]. Σύμφωνα με τις μελέτες εκείνες, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν σε αυθεντική μορφή PEGs διαφόρων μοριακών βαρών (2.000 – 20.000), βρέθηκε ότι αποτελεσματικότερα ήταν τα μόρια μεσαίου μοριακού βάρους (10.000 και 12.000), ενώ τα μικρότερου μοριακού βάρους δεν επηρέασαν με κανένα τρόπο το πολυμερισμό του πυριτικού οξέος. Στην εικόνα IV.1 παρατίθενται ενδεικτικά τα βασικά μόρια PEGs και η αντιστοιχία μεταξύ μοριακού βάρους και επαναλαμβανόμενων μονάδων.



Εικόνα IV.1: Polyethylene Glycols (PEGs)

n	Molecular Weight
35	1550
45	2000
136	6000
227	10000
273	12000
454	20000

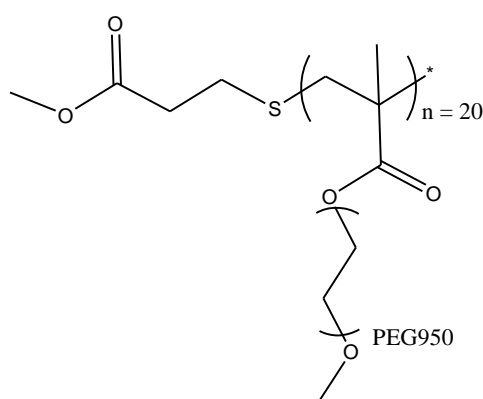
Έτσι, συντέθηκαν από συνεργάτες μας νέα πολυμερή με βάση μικρού αυτή τη φορά μοριακού βάρους PEGs, με σκοπό την ενίσχυση της δομής και της συγκέντρωσης των σημαντικών αιθερικών ομάδων στο ίδιο μόριο. Αυτό είναι σημαντικό, καθώς, κατ' αντιστοιχία με τα θετικά φορτία που ηλεκτροστατικά σταθεροποιούν το πυριτικό οξύ, πρέπει να βρίσκονται σε αλυσίδα συγκεκριμένου και πάνω μήκους. Για παράδειγμα, μόρια αμμωνίου δεν είναι ικανά στην αναστολή της πολυμερικής διαδικασίας.

Συγκεκριμένα, στο υποκεφάλαιο IV.1 θα αναλυθεί η δράση δύο πολυμερών που συντέθηκαν από τον Prof. Nan-Loh Yang, (Department of Chemistry and Center for Engineered Polymeric Materials, The City University of New York, New York, New York 10314, United States), ενώ στο υποκεφάλαιο IV.2 θα αναλυθεί η δράση ενός πολυμερούς από τον Prof. Ghislain David, Institut Charles Gerhardt Montpellier UMR5253 CNRS-UM2-ENSCM-UM1, Equipe Ingenierie et Architectures

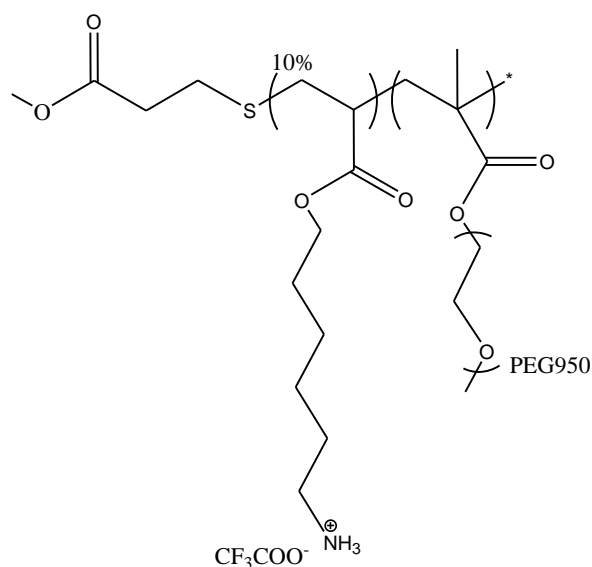
Macromoleculaires, ENSCM, 8 rue de l'École Normale, 34296 Montpellier Cedex 5, France).

IV.1: PM6-0%-PEG950 & PM6-10%-PEG950

Μέσω μια πολυμερικής διαδικασίας που περιλαμβάνει AIBN (2,2'-Azobis (2-methylpropionitrile), MMP (Methyl 3-mercaptopropionate), ακετονιτρίλιο για 18 ώρες στους 65° C και TFA για 3 ώρες, συντίθεται το πολυμερές με κωδική ονομασία PM6-0%-PEG950 (εικόνα IV.2) και το πολυμερές PM6-10%-PEG950 (εικόνα IV.3).



Εικόνα IV.2: Σχηματική δομή του πολυμερούς PM6-0%-PEG950.

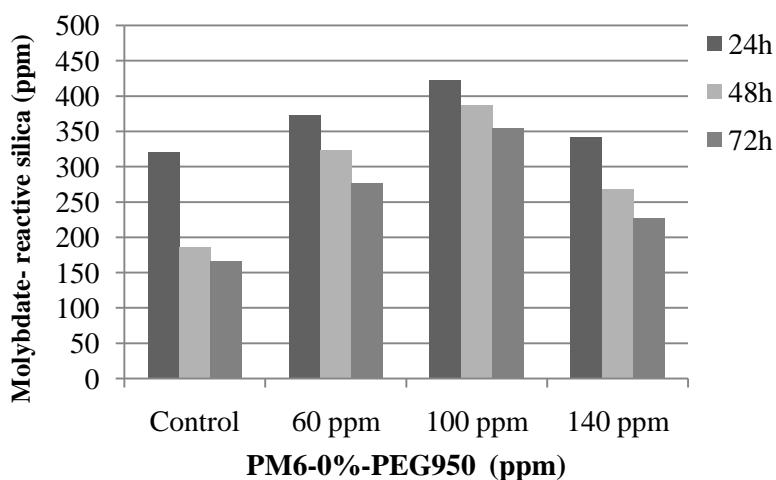


Εικόνα IV.3: Σχηματική δομή του πολυμερούς PM6-10%-PEG950.

IV.1.1: Αποτελέσματα Σταθεροποίησης Πυριτικού Οξέος σε 3-ήμερα Πειράματα

Πίνακας IV.1: Μέτρηση διαλυτού πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε ppm, σε pH = 5.4 συγκεντρώσεις, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη PM6-0%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 3-ήμερων πειραμάτων.

Συγκέντρωση PM6-0%-PEG950	24h	48h	72h
Control	321	187	167
60 ppm	372	323	276
100 ppm	423	387	355
140 ppm	342	268	227



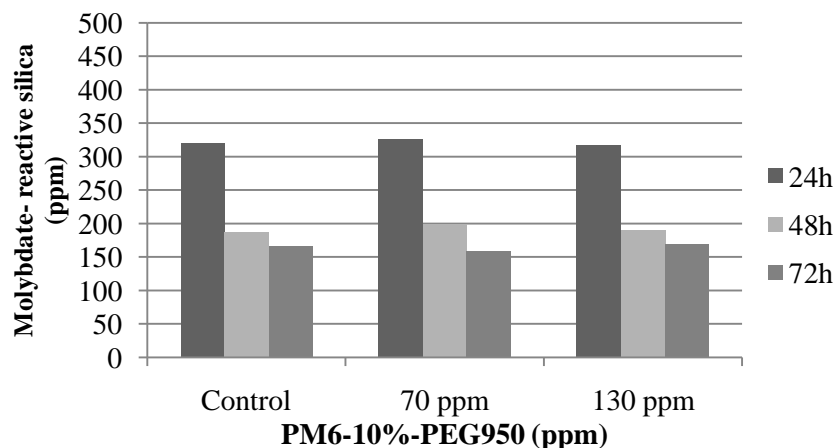
Εικόνα IV.4: Γραφική αναπαράσταση της σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος με προσθήκη PM6-0%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 3-ήμερων πειραμάτων σε pH 5.4.

Για τις πρώτες 24 ώρες των πειραμάτων αυτών, ενδιαφέρουσα είναι η σταθεροποίηση που προκύπτει από τα 100 ppm συγκέντρωσης του πολυμερούς (102 ppm διαφορά από το control), ενώ η ικανότητα διατηρείται και τις 48 ώρες (200 ppm διαφορά από το control) και στις 72 ώρες (178 ppm διαφορά από το control). Όπως και σε αρκετές παρόμοιες μελέτες^[54], η παρεμποδιστική ικανότητα της πρόσθετης ουσίας αυξάνεται ανάλογα με τη συγκέντρωσή της, ενώ από ένα όριο και πάνω φτάνει σε πλατό.

Ο πίνακας IV.2 και η εικόνα IV.5 παρουσιάζουν τα αντίστοιχα αποτελέσματα (διερευνητικές μελέτες σε pH = 5.4) για το πολυμερές PM6-10%-PEG950. Είναι εύκολο να παρατηρηθεί πως δεν υπάρχει καμία διαφορά μεταξύ των πειραμάτων ελέγχου και των πειραμάτων σταθεροποίησης, ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης του πολυμερούς. Ενδεικτικά, παρατίθενται οι μελέτες στις συγκεντρώσεις 70 και 130 ppm.

Πίνακας IV.2: Μέτρηση διαλυτού πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε ppm, σε pH = 5.4, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη PM6-10%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 3-ήμερων πειραμάτων.

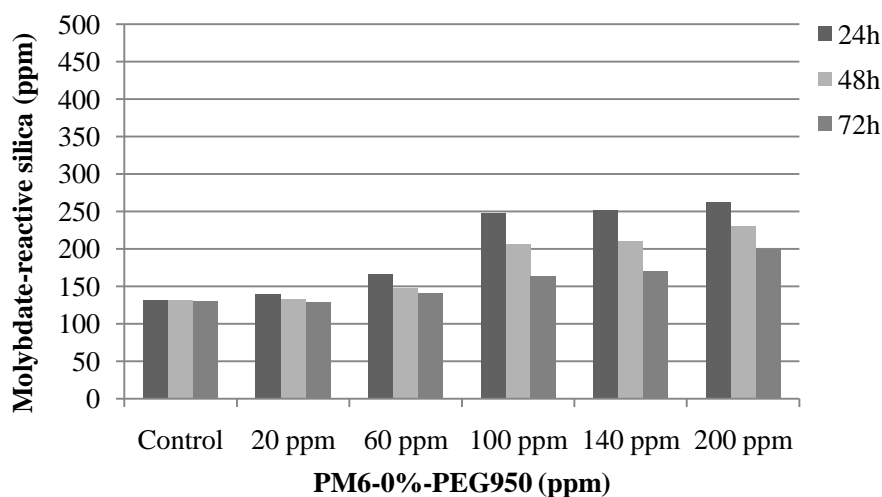
<u>Συγκέντρωση PM6-10%-PEG950</u>	<u>24h</u>	<u>48h</u>	<u>72h</u>
Control	321	187	166
70 ppm	326	199	159
130 ppm	318	191	169



Εικόνα IV.5: Γραφική αναπαράσταση της σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος με προσθήκη PM6-10%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 3-ήμερων πειραμάτων σε pH 5.4.

Πίνακας IV.3: Μέτρηση διαλυτού πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε ppm, σε pH = 7.0, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη PM6-0%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 3-ήμερων πειραμάτων.

<u>Συγκέντρωση PM6-0%-PEG950</u>	<u>24h</u>	<u>48h</u>	<u>72h</u>
Control	132	131	130
20 ppm	139	132	129
60 ppm	166	147	140
100 ppm	248	206	163
140 ppm	251	210	170
200 ppm	262	229	199

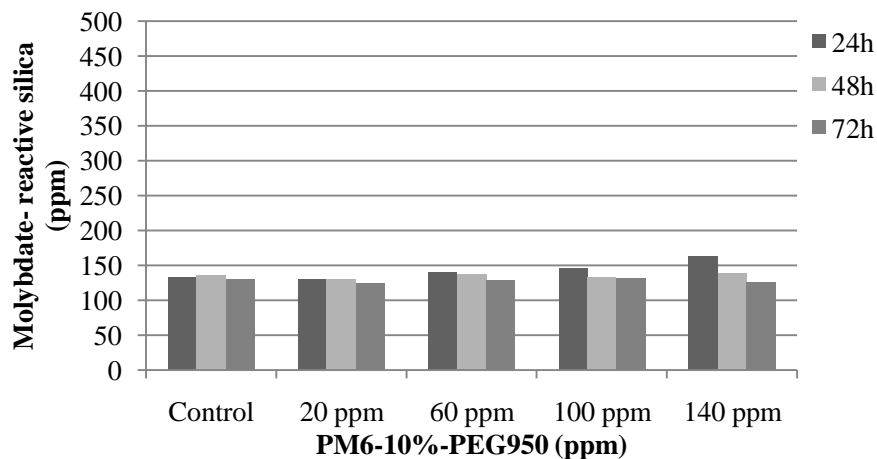


Εικόνα IV.6: Γραφική αναπαράσταση της σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος με προσθήκη PM6-10%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 3-ήμερων πειραμάτων σε pH 7.0.

Τα αποτελέσματα του συνθετικού πολυμερούς στην τιμή αυτή του pH είναι πολύ ικανοποιητικά, καθώς η διαφορά από το διάλυμα ελέγχου αγγίζει τα 116 ppm, για τη συγκέντρωση των 100 ppm, τις πρώτες 24 ώρες του πολυμερισμού. Οι συγκεντρώσεις 140 και 200 ppm έχουν εξίσου καλά αποτελέσματα, είναι όμως δυσανάλογα σε σχέση με την αύξηση της συγκέντρωσης του πολυμερούς. Ακόμη μια φορά δηλαδή διακρίνουμε πλατό και καταλήγουμε πως η ιδανική συγκέντρωση για το πολυμερές αυτό είναι τα 100 ppm.

Πίνακας IV.4: Μέτρηση διαλυτού πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε ppm, σε pH = 7.0, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη PM6-10%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 3-ήμερων πειραμάτων.

Συγκέντρωση PM6-10%-PEG950	24h	48h	72h
Control	132	136	130
20 ppm	129	129	124
60 ppm	140	137	129
100 ppm	145	132	131
140 ppm	163	139	125

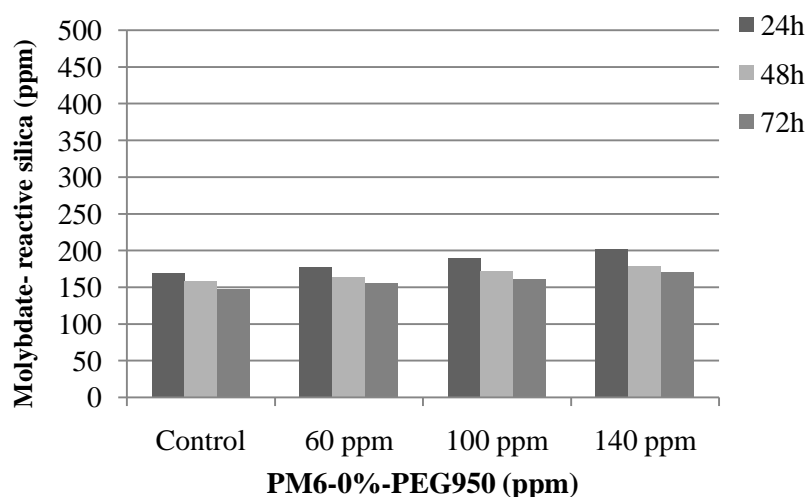


Εικόνα IV.7: Γραφική αναπαράσταση της σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος με προσθήκη PM6-10%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 3-ήμερων πειραμάτων σε pH 7.0.

Από τον πίνακα IV.4 και την εικόνα IV.7 παρατηρούμε πως το πολυμερές PM6-10%-PEG950 δεν επηρεάζει σε κανένα βαθμό τον πολυμερισμό του πυριτικού οξέος ούτε και σε αυτά τα επίπεδα pH.

Πίνακας IV.5: Μέτρηση διαλυτού πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε ppm, σε **pH = 8.5** συγκεντρώσεις, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη PM6-0%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 3-ήμερων πειραμάτων.

<u>Συγκέντρωση PM6-0%-PEG950</u>	<u>24h</u>	<u>48h</u>	<u>72h</u>
Control	169	158	147
60 ppm	177	163	156
100 ppm	189	171	161
140 ppm	201	179	171

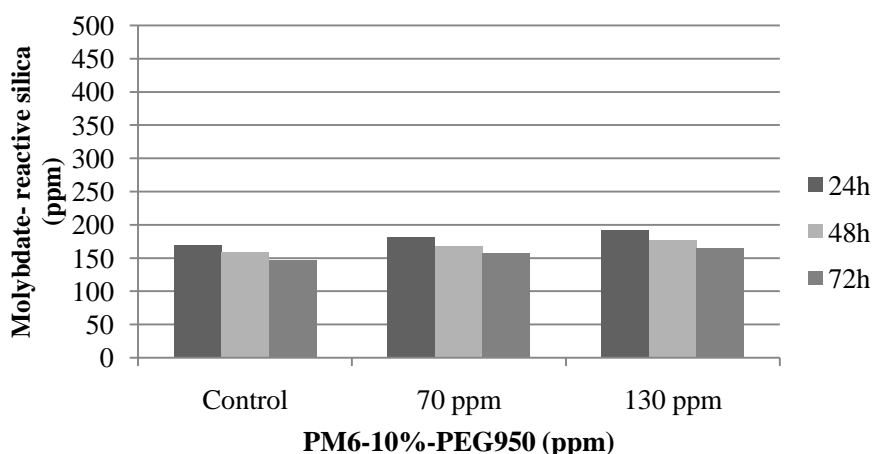


Εικόνα IV.8: Γραφική αναπαράσταση της σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος με προσθήκη PM6-0%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 3-ήμερων πειραμάτων σε pH 8.5.

Όσον αφορά στο pH 8.5, κανένα από τα δύο πολυμερή δεν παρουσιάζει διαφορετικές τιμές, συγκριτικά με αυτές των πειραμάτων ελέγχου. Ο πίνακας IV.5 και η εικόνα IV.8 αφορούν το πολυμερές PM6-0%-PEG950, ενώ ο πίνακας IV.6 και η εικόνα IV.9 αφορούν το πολυμερές PM6-10%-PEG950.

Πίνακας IV.6: Μέτρηση διαλυτού πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε ppm, σε **pH = 8.5**, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη PM6-10%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 3-ήμερων πειραμάτων.

<u>Συγκέντρωση PM6-10%-PEG950</u>	<u>24h</u>	<u>48h</u>	<u>72h</u>
Control	169	158	147
70 ppm	181	167	156
130 ppm	191	177	165



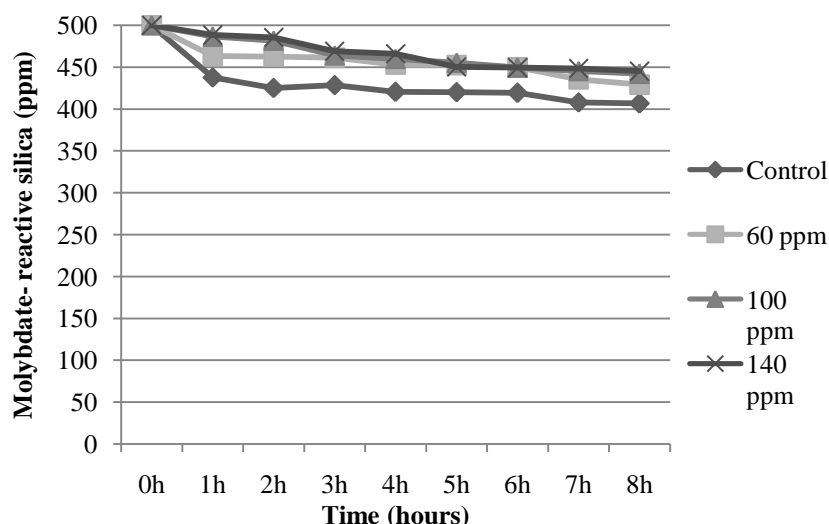
Εικόνα IV.9: Γραφική αναπαράσταση της σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος με προσθήκη PM6-10%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 3-ήμερων πειραμάτων σε pH 8.5.

Τελικά, παρατηρούμε αδράνεια αυτού του είδους συνθετικών πολυμερών όταν η σύνθεσή τους περιλαμβάνει έστω και σε μικρό ποσοστό (10% στη δική μας περίπτωση) PM6. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από την απόσταση που αποκτούν μεταξύ τους οι ομάδες PEG, καθώς και από τη μείωσή τους σε ίδιο βάρος ουσίας. Αντί γι' αυτές έχει προστεθεί μια μακριά ανθρακική αλυσίδα που, πέραν της προαναφερθείσας συνέπειας, επιπλέον «μπλοκάρει» στερεοχημικά τις εναπομείνουσες PEGs.

IV.1.2: Αποτελέσματα Σταθεροποίησης Πυριτικού Οξέος σε 8-ωρα Πειράματα

Πίνακας IV.7: Μέτρηση διαλυτού πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε ppm, σε pH = 5.4, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη PM6-0%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων.

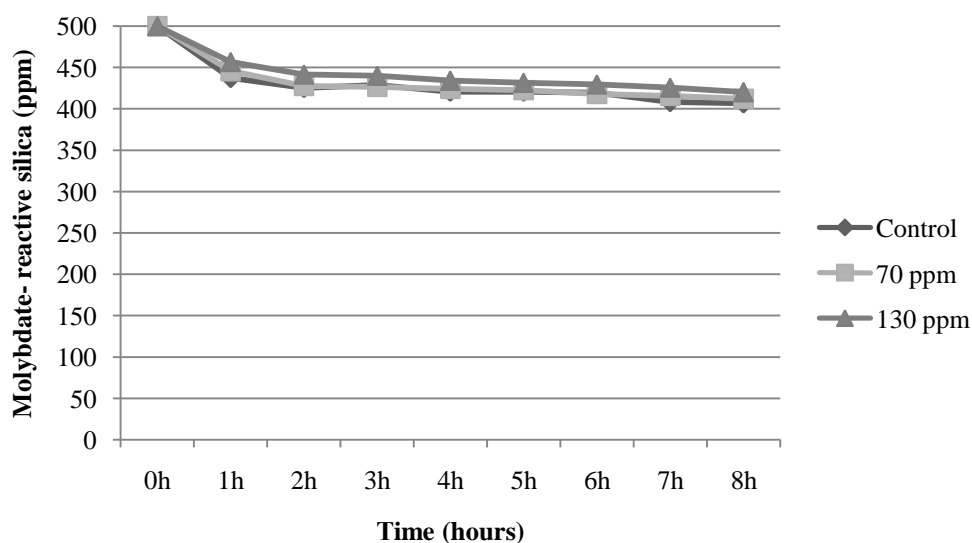
Time	Control	60ppm	100ppm	140 ppm
0h	500	500	500	500
1h	437	463	486	488
2h	425	462	481	485
3h	428	461	464	469
4h	420	453	460	466
5h	420	452	455	450
6h	419	450	449	449
7h	408	435	445	448
8h	406	429	442	445



Εικόνα IV.10: Γραφική αναπαράσταση της σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος με προσθήκη PM6-0%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων σε pH 5.4.

Πίνακας IV.8: Μέτρηση διαλυτού πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε ppm, σε pH = 5.4, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη PM6-10%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων.

<u>Time</u>	<u>Control</u>	<u>70 ppm</u>	<u>130 ppm</u>
0h	500	500	500
1h	437	445	456
2h	425	427	441
3h	428	426	440
4h	420	424	434
5h	420	422	431
6h	419	418	429
7h	408	415	425
8h	406	412	420

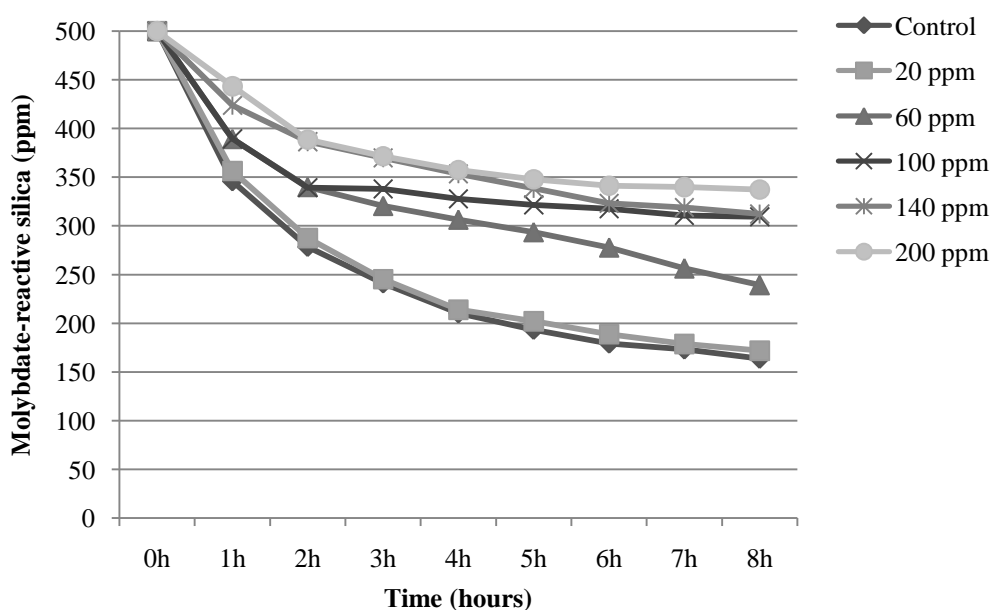


Εικόνα IV.11: Γραφική αναπαράσταση της σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος με προσθήκη PM6-10%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων σε pH 5.4.

Για pH 5.4 κανένα από τα δύο συνθετικά πολυμερή δεν επηρεάζει με κάποιο τρόπο τη διαδικασία πολυμερισμού του πυριτικού οξέος.

Πίνακας IV.9: Μέτρηση διαλυτού πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε ppm, σε pH = 7.0, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη PM6-0%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων.

Time	Control	20ppm	60ppm	100ppm	140 ppm	200 ppm
0h	500	500	500	500	500	500
1h	346	356	389	389	424	443
2h	278	287	340	339	386	388
3h	241	245	320	338	370	371
4h	210	214	306	328	353	357
5h	193	202	293	322	338	348
6h	179	189	278	318	323	341
7h	173	179	256	311	319	340
8h	163	172	239	309	312	337



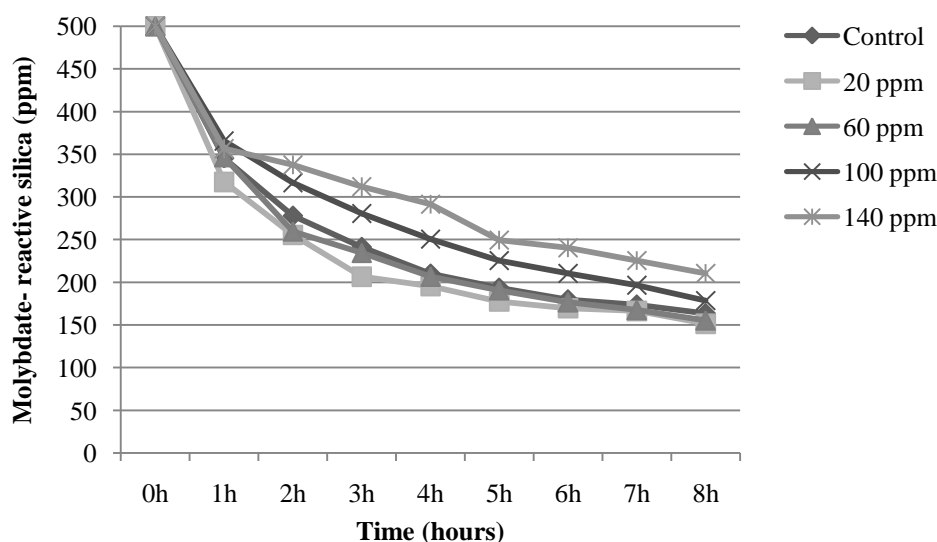
Εικόνα IV.12 : Γραφική αναπαράσταση της σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος με προσθήκη PM6-0%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων σε pH 7.0.

Τα αποτελέσματα του συνθετικού πολυμερούς στην τιμή αυτή του pH είναι πολύ ικανοποιητικά και κατά τα βραχυπρόθεσμα πειράματα, ενώ όπως και στις αντίστοιχες μετρήσεις, η συγκέντρωση των 100 ppm του πολυμερούς κρίνεται η καταλληλότερη (σταθεροποίηση 146 ppm παραπάνω από το control στις πρώτες 8 ώρες). 140 ppm του πολυμερούς σταθεροποιούν 149 ppm πυριτικού οξέος και 200 ppm πολυμερούς σταθεροποιούν αντίστοιχα 174 ppm. Η σημασία των αποτελεσμάτων αυτών έγκειται

στην αντίθεση με τα γραμμικά μόρια PEGs αντίστοιχου μοριακού βάρους, που δεν έδειξαν κάποια σταθεροποιητική ικανότητα.

Πίνακας IV.10: Μέτρηση διαλυτού πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε ppm, σε pH = 7.0, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη PM6-10%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων.

Time	Control	20ppm	60ppm	100ppm	140 ppm
0h	500	500	500	500	500
1h	345	317	346	365	356
2h	278	255	259	316	337
3h	241	206	234	280	312
4h	210	195	206	250	291
5h	193	177	190	225	249
6h	179	169	176	210	240
7h	173	166	167	196	225
8h	163	151	155	178	210



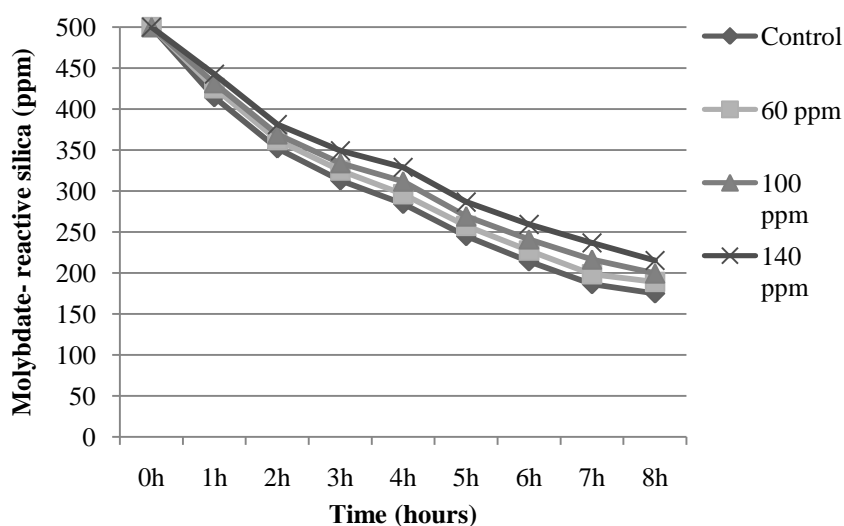
Εικόνα IV.13: Γραφική αναπαράσταση της σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος με προσθήκη PM6-10%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων σε pH 7.0.

Η παρεμποδιστική ικανότητα που δείχνει στη συγκεκριμένη τιμή pH το πολυμερές PM6-0%-PEG950 φαίνεται να αναιρείται στην περίπτωση του δεύτερου πολυμερούς, αποτελέσματα που παρατηρήσαμε και στα 3-ήμερα πειράματα.

Σε μεγαλύτερες τιμές pH (8.5) παρατηρούμε και πάλι αδράνεια των πολυμερών ως προς τον ανεπιθύμητο πολυμερισμό.

Πίνακας IV.11: Μέτρηση διαλυτού πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε ppm, σε pH = 8.5, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη PM6-0%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων.

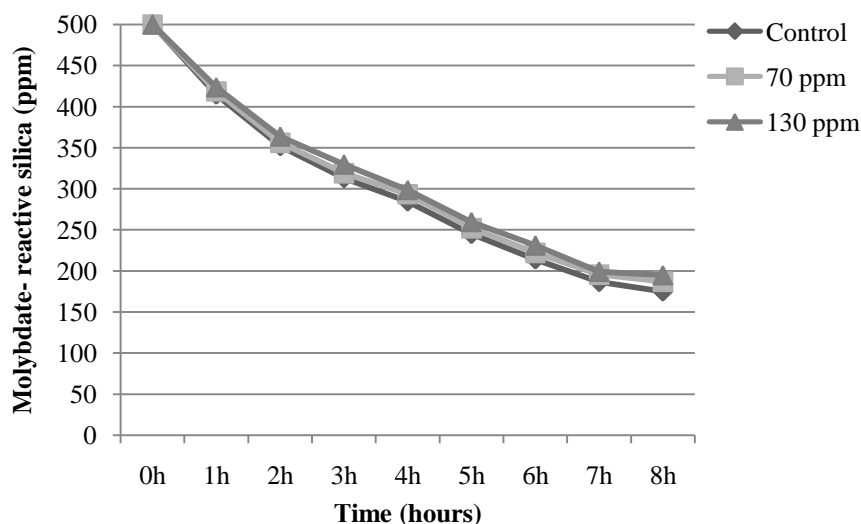
<u>Time</u>	<u>Control</u>	<u>60ppm</u>	<u>100ppm</u>	<u>140 ppm</u>
0h	500	500	500	500
1h	414	425	431	442
2h	352	362	369	381
3h	313	325	334	349
4h	284	296	311	329
5h	245	257	269	286
6h	214	227	241	259
7h	186	198	216	236
8h	175	189	199	215



Εικόνα IV.14: Γραφική αναπαράσταση της σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος με προσθήκη PM6-0%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων σε pH 8.5.

Πίνακας IV.12: Μέτρηση διαλυτού πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε ppm, σε pH = 8.5, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη PM6-10%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων.

<u>Time</u>	<u>Control</u>	<u>70ppm</u>	<u>130ppm</u>
0h	500	500	500
1h	414	418	423
2h	352	356	363
3h	313	319	329
4h	284	293	298
5h	245	252	259
6h	214	222	231
7h	186	195	199
8h	175	187	195



Εικόνα IV.15: Γραφική αναπαράσταση της σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος με προσθήκη PM6-10%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων σε pH 8.5.

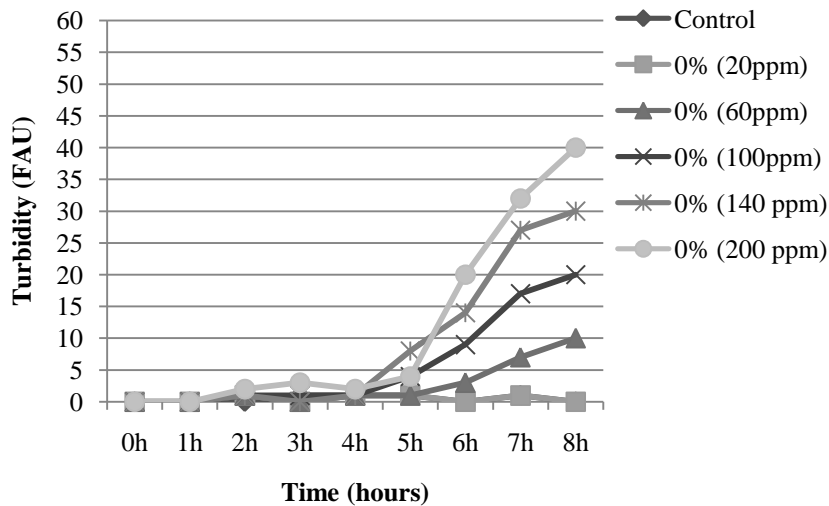
IV.1.3: Μελέτη των Ιζημάτων SiO₂ παρουσία των PM6 -0%, 10% -PEG950

Μετρήσεις Θολερότητας

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων θολερότητας δείχνουν πως, ενώ για το πολυμερές PM6 -0% -PEG950 (πίνακας IV.13, εικόνα IV.16) υπάρχουν ξεκάθαρες ενδείξεις κατακρήμνισης και δυνατότητα συλλογής ιζήματος, το πολυμερές PM6 -10% -PEG950 (πίνακας IV.14, εικόνα IV.17) δεν αφήνει αυτή την επιλογή, καθώς τα διαλύματα που σχηματίζονται είναι διαυγή, ανεξαρτήτως συγκεντρώσεων.

Πίνακας IV.13: Μέτρηση θολερότητας διαλυμάτων πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε FAU, σε pH = 7.0, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη PM6-0%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων.

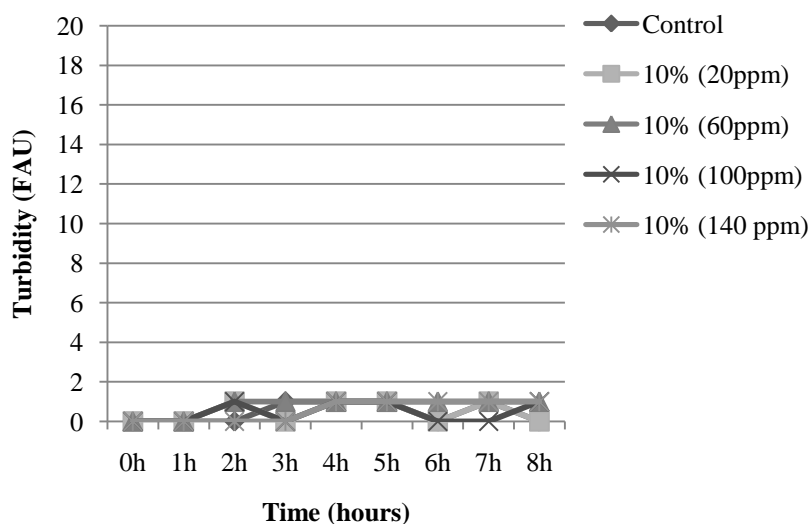
Time	Control	0% (20ppm)	0% (60ppm)	0% (100ppm)	0% (140 ppm)	0% (200 ppm)
0h	0	0	0	0	0	0
1h	0	0	0	0	0	0
2h	0	1	1	1	1	2
3h	1	0	0	1	0	3
4h	1	1	1	1	1	2
5h	1	1	1	4	8	4
6h	0	0	3	9	14	20
7h	1	1	7	17	27	32
8h	0	0	10	20	30	40



Εικόνα IV.16: Εξέλιξη της θολερότητας των διαλυμάτων του πυριτικού οξέος, τις πρώτες 8 ώρες της διαδικασίας του πολυμερισμού, με προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων PM6-0%-PEG950.

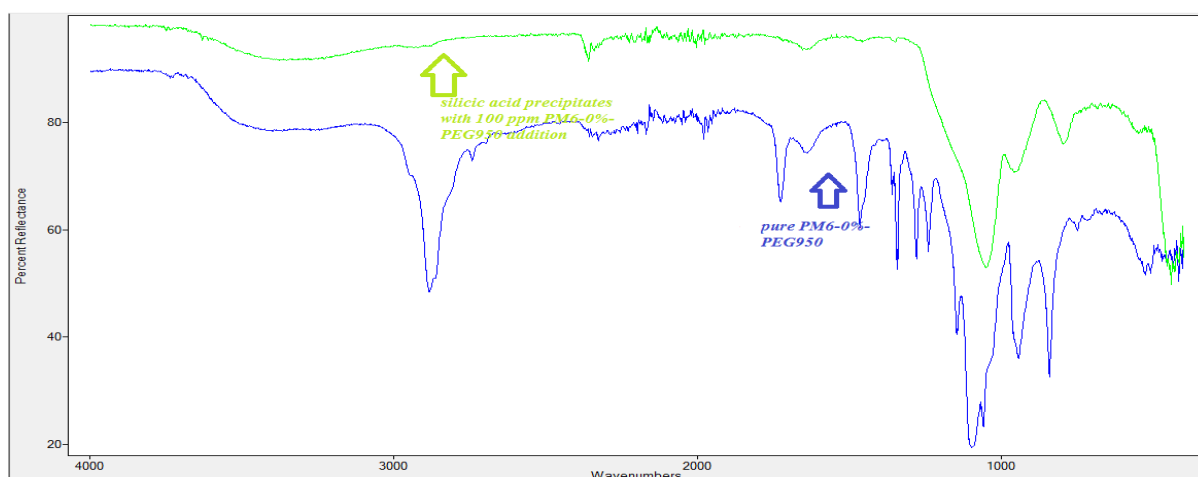
Πίνακας IV.14: Μέτρηση θολερότητας διαλυμάτων πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε FAU, σε pH = 7.0, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη PM6-10%-PEG950 σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων.

Time	Control	10% (20ppm)	10% (60ppm)	10% (100ppm)	10% (140 ppm)
0h	0	0	0	0	0
1h	0	0	0	0	0
2h	0	1	1	1	0
3h	1	0	1	0	0
4h	1	1	1	1	1
5h	1	1	1	1	1
6h	0	0	1	0	1
7h	1	1	1	0	1
8h	0	0	1	1	1



Εικόνα IV.17: Εξέλιξη της θολερότητας των διαλυμάτων του πυριτικού οξέος, τις πρώτες 8 ώρες της διαδικασίας του πολυμερισμού, με προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων PM6-10%-PEG950.

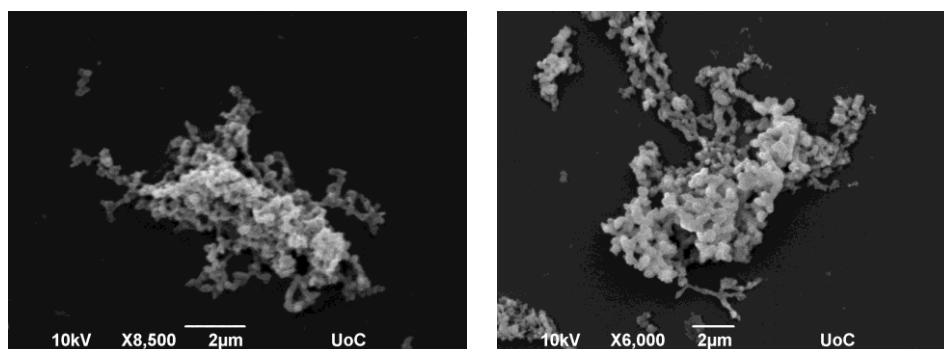
Χαρακτηρισμός με Φασματοσκοπία FT-IR



Εικόνα IV.18: Φάσματα FT-IR: με μπλε εμφανίζεται το φάσμα του πολυμερούς σε καθαρή μορφή και με πράσινο τα ιζήματα διοξειδίου του πυριτίου κατά την προσπάθεια σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος.

Στην εικόνα IV.18 παρατίθενται τα φάσματα FT-IR του πολυμερούς σε καθαρή μορφή και των ιζημάτων που λήφθηκαν από τα πειράματα σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος. Στο φάσμα του καθαρού πολυμερούς διακρίνονται ξεκάθαρα οι χαρακτηριστικές κορυφές στα 3425 cm^{-1} (τάση O-H), 2889 cm^{-1} (τάση C-H) και 1096 cm^{-1} (τάση C-O-C). Το σενάριο είναι του εγκλωβισμού του πολυμερούς από το SiO_2 υφίσταται και αυτή τη φορά καθώς στο φάσμα του ιζήματος, μαζί με τις αναμενόμενες κορυφές του SiO_2 , εμφανίζεται μια κορυφή στους 2362 cm^{-1} που οφείλεται στο πολυμερές.

Χαρακτηρισμός με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)

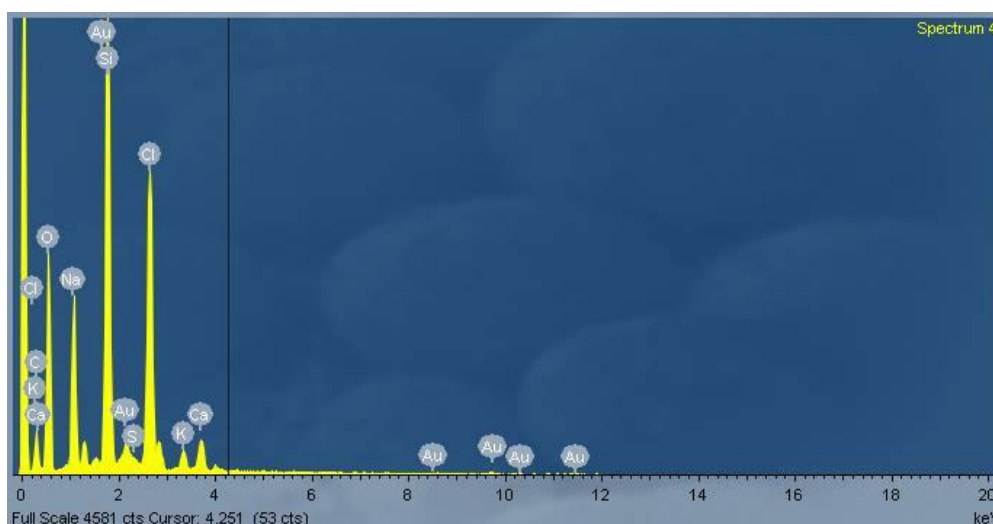


Εικόνα IV.19: Επιλεγμένες εικόνες ιζήματος διοξειδίου του πυριτίου έπειτα από 8 ώρες πολυμερισμού σε pH 7. 0 παρουσία 100 ppm PM6-0%-PEG950.

Το διοξείδιο του πυριτίου παρατηρείται να έχει σχηματίσει συσσωματώματα κατ' αναλογία με εκείνα που παρατηρήθηκαν με το βιοπολυμερές του προηγούμενου κεφαλαίου. Η τάση συσσωμάτωσης είναι αυξημένη, ενώ πιθανά το πολυμερές βρίσκεται στο κέντρο του συσσωματώματος και λειτουργεί ως πυρήνας δημιουργίας του SiO₂.

Μετρήσεις Στοιχειακής Ανάλυσης (EDS)

Ο εγκλωβισμός του πολυμερούς στα ληφθέντα ιζήματα έρχεται να σφραγιστεί και από τα αποτελέσματα της στοιχειακής ανάλυσης. Η παρουσία του άνθρακα σε αρκετά μεγάλο ποσοστό, καθώς και του θείου, υποδηλώνει πως η μήτρα των ιζημάτων περιέχει πολυμερές. Το νάτριο και το χλώριο προέρχονται από τη διαδικασία ρύθμισης του pH των διαλυμάτων, ο χρυσός από τη διαδικασία sputtering και το κάλιο και το ασβέστιο από το νερό έκλυσης των ιζημάτων.



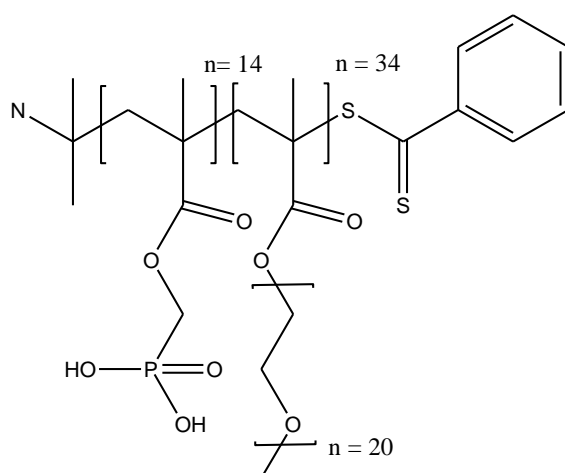
Εικόνα IV.20 : Στοιχειακή ανάλυση ιζήματος SiO₂- PM6-0%-PEG950 100 ppm..

Πίνακας IV.15: Στοιχειακή ανάλυση ιζήματος SiO₂- PM6-0%-PEG950 100 ppm..

Element	App	Intensity	Weight%	Weight%	Atomic%
	Conc.	Corn.		Sigma	
C K	24.28	0.2426	20.56	2.13	31.32
O K	113.45	0.5978	38.97	1.15	44.56
Na K	37.43	0.8915	8.62	0.29	6.86
Si K	62.42	0.9140	14.02	0.42	9.13
S K	1.68	0.8544	0.40	0.08	0.23
Cl K	46.83	0.7648	12.57	0.39	6.49
K K	4.72	0.9609	1.01	0.07	0.47
Ca K	7.27	0.9264	1.61	0.09	0.74
Au M	7.86	0.7225	2.23	0.34	0.21
Totals			100.00		

IV.2: 15ATX020-5 (Red)

Το δεύτερο πολυμερές που συντέθηκε από συνεργάτη μας και μελετήθηκε, παρατίθεται σχηματικά στην Εικόνα IV.20. Ανήκει στην κατηγορία των copolymers και έχει συνολικό μοριακό βάρος 35.500 g / mol. Διαθέτει 34 μονάδες από PEGs μικρού μοριακού βάρους και εντύπωση κάνει ο αρωματικός δακτύλιος, όπως και οι φωσφονικές ομάδες. Αξιοσημείωτο είναι πως σε pH μικρότερο του 7 η φωσφονική ομάδα χάνει το ένα όξινο πρωτόνιο, ενώ σε μεγαλύτερο pH, και το δεύτερο, γεγονός που καθιστά το πολυμερές συνολικά ελαφρώς αρνητικού φορτίου^[55].

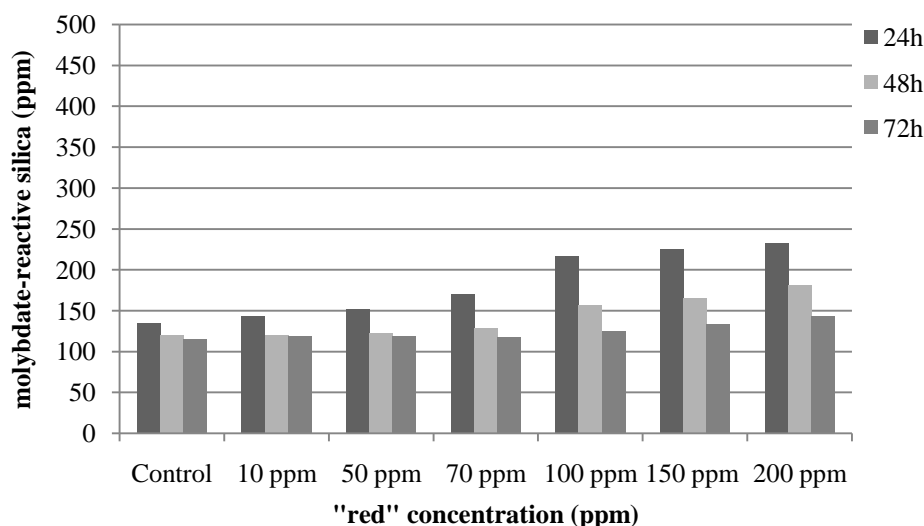


Εικόνα IV.21 : Σχηματική αναπαράσταση της δομής του πολυμερούς 15ATX020-5 (Red)

IV.2.1: Αποτελέσματα Σταθεροποίησης Πυριτικού Οξέος σε 3-ήμερα Πειράματα

Πίνακας IV.16: Μέτρηση διαλυτού πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε ppm, σε pH = 7.0, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη 15ATX020-5 (Red) σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 3-ήμερων πειραμάτων.

Red Concentration	24h	48h	72h
Control	134	120	115
10 ppm	143	120	118
50 ppm	152	122	119
70 ppm	170	128	117
100 ppm	216	157	124
150 ppm	225	165	133
200 ppm	232	181	143



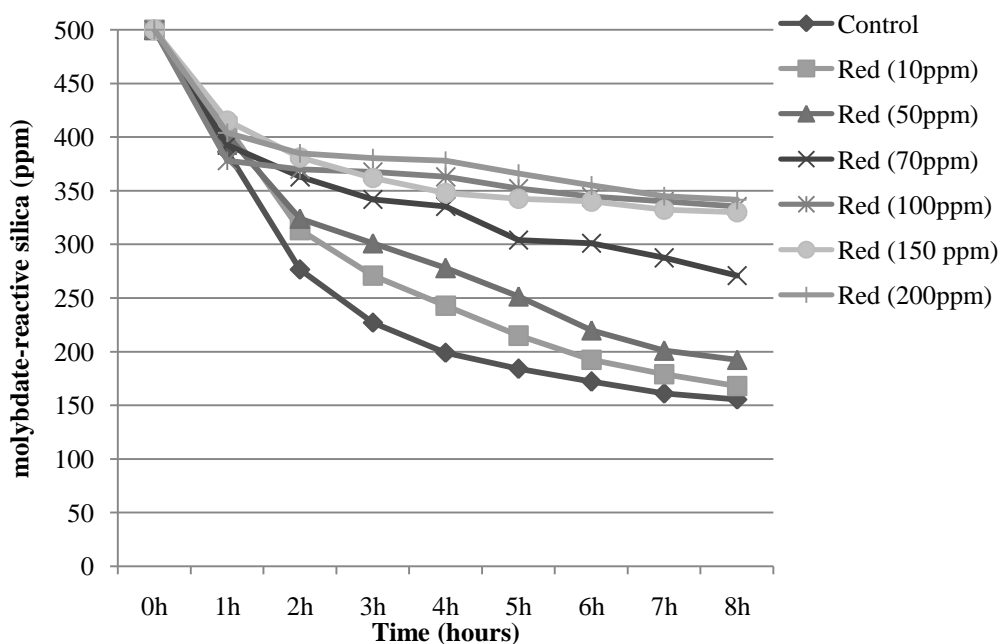
Εικόνα IV.22: Γραφική αναπαράσταση της σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος με προσθήκη 15ATX020-5 (Red) σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 3-ήμερων πειραμάτων σε pH 7.0.

Η διαφορά από το διάλυμα ελέγχου για αυτό το πολυμερές αγγίζει τα 82 ppm, για τη συγκέντρωση των 100 ppm, τις πρώτες 24 ώρες του πολυμερισμού. Οι συγκεντρώσεις 150 και 200 ppm έχουν σταθεροποιούν 92 και 99 ppm αντίστοιχα, είναι όμως δυσανάλογα σε σχέση με την αύξηση της συγκέντρωσης του πολυμερούς. Ακόμη μια φορά δηλαδή διακρίνουμε πλατό και καταλήγουμε πως η ιδανική συγκέντρωση για το πολυμερές αυτό είναι τα 100 ppm. Όσον αφορά στον αρωματικό δακτύλιο, θεωρούμε πως δεν συμμετέχει καθόλου στη σταθεροποίηση του πυριτικού οξέος, όπως έδειξαν και προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας με το μόριο poly phenylalanine^[56].

IV.2.2: Αποτελέσματα Σταθεροποίησης Πυριτικού Οξέος σε 8-ωρα Πειράματα

Πίνακας IV.17: Μέτρηση $Si(OH)_4$, εκφραζόμενο σε ppm, σε pH = 7.0, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη 15ATX020-5 (Red) σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων.

Time	Control	10ppm	50ppm	70ppm	100ppm	150 ppm	200ppm
0h	500	500	500	500	500	500	500
1h	386	410	401	392	378	415	404
2h	276	313	324	363	370	381	385
3h	227	271	301	342	367	362	380
4h	199	243	278	335	363	348	378
5h	184	215	251	304	352	342	366
6h	172	192	220	301	344	340	355
7h	161	179	201	287	340	332	345
8h	155	168	192	271	335	330	341



Εικόνα IV.23: Γραφική αναπαράσταση της σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος με προσθήκη 15ATX020-5 (Red) σε διάφορες συγκεντρώσεις, κατά τη διάρκεια 8-ωρων πειραμάτων σε pH 7.0.

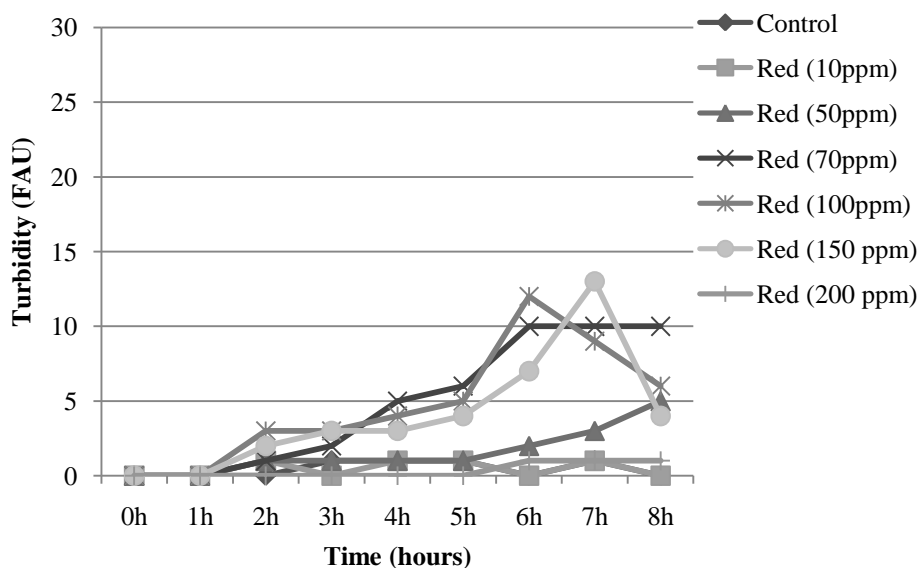
Η συγκέντρωση των 100 ppm του πολυμερούς κρίνεται και πάλι η καταλληλότερη (σταθεροποίηση 180 ppm παραπάνω από το control στις πρώτες 8 ώρες). 150 ppm του πολυμερούς σταθεροποιούν 175 ppm πυριτικού οξέος και 200 ppm πολυμερούς σταθεροποιούν αντίστοιχα 186 ppm. Αξίζει να σημειωθεί πως και 70 ppm του πολυμερούς μπορούν να σταθεροποιήσουν 116 ppm πυριτικού οξέος.

IV.2.3: Μελέτη των Ιζημάτων SiO₂ παρουσία του 15ATX020-5 (Red)

Μετρήσεις Θολερότητας

Πίνακας IV.18: Μέτρηση θολερότητας διαλυμάτων πυριτικού οξέος, εκφραζόμενο σε FAU, σε pH = 7, σε αρχικά διαλύματα 500ppm, με προσθήκη πολυμερούς 15ATX020-5 (Red) σε διάφορες συγκεντρώσεις.

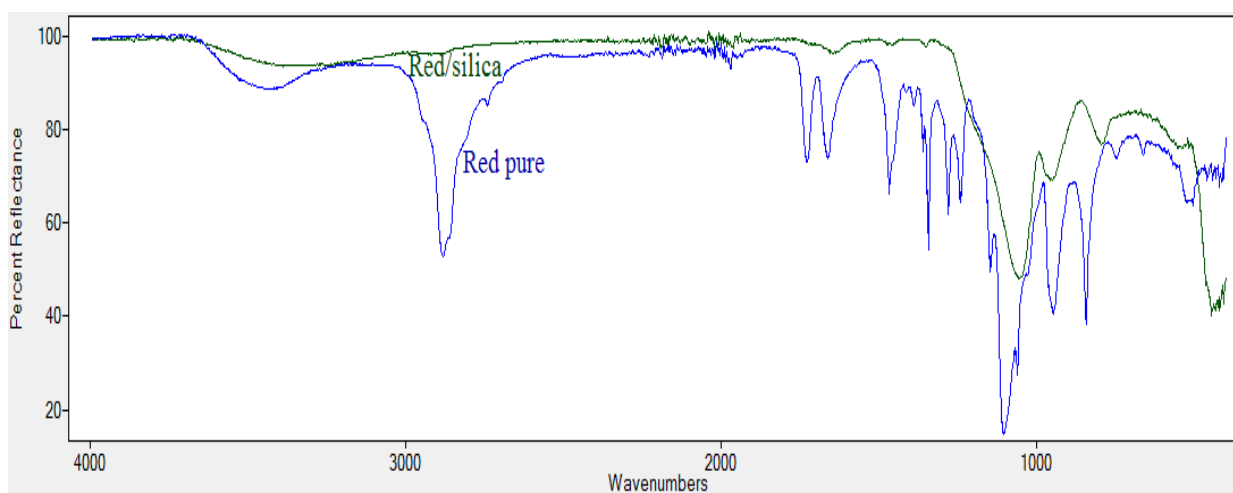
Time	Control	Red (10ppm)	Red (50ppm)	Red (70ppm)	Red (100ppm)	Red (150 ppm)	Red (200 ppm)
0h	0	0	0	0	0	0	0
1h	0	0	0	0	0	0	0
2h	0	1	1	1	3	2	0
3h	1	0	1	2	3	3	0
4h	1	1	1	5	4	3	0
5h	1	1	1	6	5	4	0
6h	0	0	2	10	12	7	1
7h	1	1	3	10	9	13	1
8h	0	0	5	10	6	4	1



Εικόνα IV.24: Εξέλιξη της θολρότητας των διαλυμάτων του πυριτικού οξέος, τις πρώτες 8 ώρες της διαδικασίας του πολυμερισμού, με προσθήκη διαφόρων συγκεντρώσεων.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων θολρότητας δεν καταλήγουν σε μία σταθερή τιμή, όπως εκείνες που βλέπαμε στα προηγούμενα κεφάλαια. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως ενώ τα διαλύματα θόλωσαν αρκετά, τελικά τα σωματίδια κατακρημνίστηκαν, αφήνοντας τα υπερκείμενα σχεδόν διαυγή.

Χαρακτηρισμός με Φασματοσκοπία FT-IR



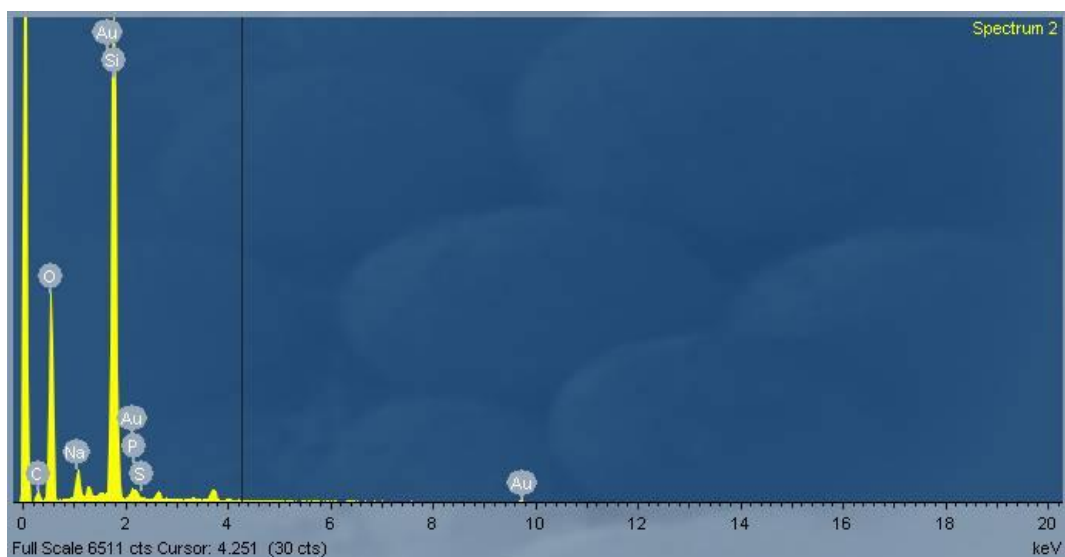
Εικόνα IV.25: Φάσματα FT-IR: με μπλε εμφανίζεται το φάσμα του πολυμερούς σε καθαρή μορφή και με πράσινο τα ιζήματα διοξειδίου του πυριτίου κατά την προσπάθεια σταθεροποίησης του πυριτικού οξέος.

Στην εικόνα IV.24 παρατίθενται τα φάσματα FT-IR του πολυμερούς σε καθαρή μορφή και των ιζημάτων που λήφθηκαν από τα πειράματα σταθεροποίησης του

πυριτικού οξέος. Παρατηρείται συγγένεια μεταξύ των φασμάτων όσον αφορά τις κορυφές στους 2889 και 1396 cm^{-1} , οι οποίες εμφανίζονται και στα δύο φάσματα και οφείλονται στην τάση C-H και στη δόνηση κάμψης C-C αντίστοιχα. Καταλήγουμε πως και σε αυτή την περίπτωση, και κατ' αντιστοιχία με τις PEG αλυσίδες, ο εγκλωβισμός του πολυμερούς στο διοξείδιο του πυριτίου αποτελεί πιθανό σενάριο.

Μετρήσεις Στοιχειακής Ανάλυσης (EDS)

Η παρουσία του άνθρακα, του θείου και του αζώτου επιβεβαιώνει τα συμπεράσματα της φασματοσκοπίας υπέρυθρου, πως στη μήτρα των ιζημάτων του διοξειδίου του πυριτίου περιέχεται και πολυμερές. Το νάτριο πιθανά προέρχεται από το νερό έκπλυσης, ενώ ο χρυσός από τη διαδικασία sputtering.



Εικόνα IV.26 : Στοιχειακή ανάλυση ιζήματος SiO_2 - “red” 100 ppm..

Πίνακας IV.19: Στοιχειακή ανάλυση ιζήματος SiO_2 - “red” 100 ppm.

Element	App	Intensity	Weight%	Weight%	Atomic%
	Conc.	Corn.		Sigma	
C K	9.04	0.2776	10.49	0.86	16.18
O K	142.88	0.8804	52.32	0.75	60.55
Na K	8.39	0.8515	3.17	0.17	2.56
Si K	89.97	0.9386	30.90	0.49	20.37
P K	0.07	0.9557	0.02	0.15	0.01
S K	0.23	0.7395	0.10	0.10	0.06
Au M	5.79	0.6245	2.99	0.62	0.28
Totals			100.00		

IV.3: Συμπεράσματα 4^ο Κεφαλαίου

Στο κεφάλαιο αυτό μελετήθηκαν δύο ειδών πολυμερικά παράγωγα πολυαιθυλενικών γλυκολών (PEGs) μικρού μοριακού βάρους, ώστε να διαπιστωθεί αν η συσσώρευση των μικρών αυτών αλυσίδων σε ένα μεγαλύτερου μεγέθους και βάρους πολυμερές θα είχε κάποια ανασταλτική ικανότητα στον πολυμερισμό του πυριτικού οξέος.

Το πολυμερές PM6-0%-PEG950 έδειξε ενδιαφέροντα αποτελέσματα, τόσο στα μακροπρόθεσμα πειράματα (pH 5.4 και 7.0) όσο και στα βραχυπρόθεσμα (pH 7.0) και οι χαρακτηρισμοί των ιζημάτων με φασματοσκοπία FT-IR, λήψη εικόνων SEM και στοιχειακή ανάλυση δείχνουν πως τα ιζήματα της σίλικα δεν περιέχουν πολυμερές. Όταν το πολυμερές αυτό συντίθεται στη μορφή του PM6-10%-PEG950 η παρεμποδιστική του δράση αναστέλλεται σχεδόν ολοκληρωτικά, γεγονός που πιθανά οφείλεται στην αραιώση των ομάδων PEG μεταξύ τους, στη μικρότερη συνολική περιεκτικότητά τους στο πολυμερές, καθώς και στη στερεοχημική παρεμπόδιση που επιβάλλει η πρόσθετη ανθρακική αλυσίδα. Οι χαρακτηρισμοί των ιζημάτων με φασματοσκοπία υπερύθρου και στοιχειακή ανάλυση συνηγορούν στον εγκλωβισμό του πολυμερούς στη μήτρα του διοξειδίου του πυριτίου, κατ' αντιστοιχία μετά «καθαρά» (pure) PEGs.

Το πολυμερές 15ATX020-5 (Red) έδειξε εντυπωσιακά αποτελέσματα σε ουδέτερες τιμές pH, ιδιαίτερα στα 8-ωρα πειράματα που ήδη από τη συγκέντρωση των 70 ppm έχει σταθεροποιητικές ικανότητες. Οι μετρήσεις θολερότητας έδειξαν τη γρήγορη κατακρήμνιση των ιζημάτων, ενώ η σύγκριση των φασμάτων FT-IR και στοιχειακής ανάλυσης αποδεικνύει την παρουσία του πολυμερούς στα ιζήματα του διοξειδίου του πυριτίου. Τα αποτελέσματα του πολυμερούς αυτού είναι σημαντικά καθώς, σε ουδέτερα pH, είναι ουδέτερο, ή αρνητικά φορτισμένο λόγω απώλειας του ενός ή και των δύο όξινων πρωτονίων των φωσφονικών ομάδων. Είναι η πρώτη φορά που τέτοιου είδους πολυμερές λαμβάνει μέρος στη σταθεροποίηση του πυριτικού οξέος.

Κεφάλαιο V

Συμπεράσματα – Προοπτικές

Ανακεφαλαίωση συμπερασμάτων

Όσον αφορά στην παρούσα εργασία, η αποτροπή πολυμερισμού του πυριτικού οξέος από το ανασυνδυασμένο πολυπεπτιδίο πραγματοποιήθηκε σε ικανοποιητικό βαθμό. Παρατηρήσαμε πως πρόκειται για βραχυπρόθεσμη ικανότητα, πιθανόν διότι η δημιουργία συσσωματωμάτων με το σχηματιζόμενο διοξείδιο του πυριτίου προκαλεί την κατακρήμνιση του συνόλου της μάζας του και κατά συνέπεια, την απώλειά του από τη διαλυτή φάση.

Κατά τις πρώτες οκτώ ώρες του πολυμερισμού των πυριτικών, η παρεμποδιστική ικανότητα του πεπτιδίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσής του, ενώ ενδεικτικά, καταφέρνει να σταθεροποιήσει έως και 180 ppm διαλυτού πυριτικού οξέος πάνω από το διάλυμα ελέγχου (control) μέχρι την όγδοη ώρα του πολυμερισμού. Η βραχυπρόθεσμη αυτή ικανότητά του έρχεται σε συμφωνία με τη βιομιμητική φύση της μελέτης μας. Θεωρούμε πως οι ομάδες υπεύθυνες για τη σταθεροποίηση των πυριτικών είναι οι θετικά φορτισμένες αμινομάδες, που δρουν με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις στα ιοντισμένα μόρια του πυριτικού οξέος. Επίσης, οι ουδέτερου φορτίου αμιδικοί δεσμοί, των οποίων το οξυγόνο μπορεί να διαθέσει τα ασύζευκτα ζεύγη ηλεκτρονίων του και καθίστανται ικανοί να δημιουργήσουν δεσμούς υδρογόνου με τα μη ιοντισμένα μονομερή πυριτικού. Οι υδροξυλικές ομάδες καθίστανται ανίκανες για αυτό το σκοπό, γεγονός που αποδεικνύεται και από άλλες μελέτες^[51,52].

Σε μια απόπειρα ανακούφισης του θετικού φορτίου του πολυπεπτιδίου και ενίσχυση της σταθεροποιητικής του ικανότητας μέσω αποφυγής της κατακρήμνισης του παρεμποδιστή, χρησιμοποιείται ο ανιοντικός πολυηλεκτρολύτης πολυακρυλικό οξύ σε μοριακά βάρη 2 και 450 kDalton. Η επίδρασή του είναι καταστρεπτική ως προς την παρεμποδιστική ικανότητα του πολυπεπτιδίου καθώς την αναιρεί στο σύνολό της, παρόλο που επιτυχώς αποφεύγεται η δημιουργία ιζημάτων. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως, πέραν των θετικά φορτισμένων ομάδων, το πολυακρυλικό οξύ παρεμποδίζει στερεοχημικά και τις ουδέτερες ομάδες, αποτρέποντάς τις από τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου με τα πυριτικά. Το δισόξινο

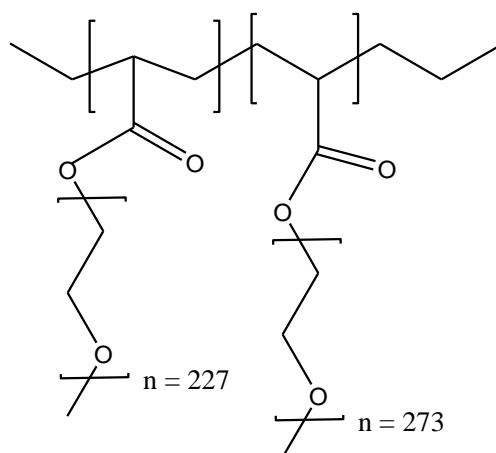
φωσφορικό κάλιο επιβεβαιώνει την υπόθεσή μας και αποδεικνύεται τελικά η χρησιμότητα και η λειτουργία κάθε χαρακτηριστικής ομάδας στη σταθεροποίηση του πυριτικού οξέος, ιδιαίτερα των μέχρι πρόσφατα αμφισβητήσιμων ουδέτερων ομάδων και της δημιουργίας δεσμών υδρογόνου. Ανάλυση των ιζημάτων από τις μελέτες αυτές δείχνουν πως ο εκάστοτε ανιοντικός συμπαραεμποδιστής δεν παγιδεύεται, όπως το πολυπεπτίδιο, στη μήτρα του διοξειδίου του πυριτίου.

Μελετώνται επίσης δύο ειδών πολυμερικά παράγωγα πολυαιθυλενικών γλυκολών (PEGs) μικρού μοριακού βάρους, ώστε να διαπιστωθεί αν η συσσώρευση των μικρών αυτών αλυσίδων σε ένα μεγαλύτερου μεγέθους και βάρους πολυμερές θα είχε κάποια ανασταλτική ικανότητα στον πολυμερισμό του πυριτικού οξέος. Η μελέτη αυτή προκύπτει ως επιβεβαίωση προηγούμενης του εργαστηρίου μας^[5], σύμφωνα με την οποία μικρού μοριακού βάρους PEGs αδυνατούν να δράσουν με τον επιθυμητό κατ'εμάς τρόπο. Το πολυμερές PM6-0%-PEG950 έδειξε ενδιαφέροντα αποτελέσματα, τόσο στα μακροπρόθεσμα πειράματα (pH 5.4 και 7.0) όσο και στα βραχυπρόθεσμα (pH 7.0). Όταν το πολυμερές αυτό συντίθεται στη μορφή του PM6-10%-PEG950 η παρεμποδιστική του δράση αναστέλλεται σχεδόν ολοκληρωτικά, γεγονός που πιθανά οφείλεται στην αραίωση των ομάδων PEG μεταξύ τους, στη μικρότερη συνολική περιεκτικότητά τους στο πολυμερές, καθώς και στη στερεοχημική παρεμπόδιση που επιβάλλει η πρόσθετη ανθρακική αλυσίδα. Το πολυμερές 15ATX020-5 (Red) έδειξε εντυπωσιακά αποτελέσματα σε ουδέτερες τιμές pH, ιδιαίτερα στα 8-ωρα πειράματα που ήδη από τη συγκέντρωση των 70 ppm έχει σταθεροποιητικές ικανότητες.

Η προσπάθεια αναστολής σχηματισμού του διοξειδίου του πυριτίου μέσω της σταθεροποίησης του πυριτικού αποτελεί πεδίο εντατικής έρευνας εδώ και αρκετά χρόνια, τόσο από το εργαστήριό μας όσο και από άλλα ερευνητικά τμήματα στον κόσμο. Η καινοτόμος πρόταση της κατανόησης του πολυμερισμού του πυριτικού οξέος με χρήση ενός βιολογικού (και ως φυσικό επακόλουθο περιβαλλοντικά φιλικού) μορίου μπορεί να μελετηθεί υπό δύο οπτικές γωνίες. Αφενός, αποτελεί μέρος του κλάδου της Χημείας, γνωστή ως «Πράσινη Χημεία» με βασικό στόχο την προστασία του περιβάλλοντος μέσω της ήπιας διαχείρισης. Αφετέρου, η επίλυση της διαδικασίας διαχείρισης του διοξειδίου του πυριτίου αλλά και η προηγηθείσα διατήρηση του πυριτικού οξέος σε υπέρκορα διαλύματα στοχεύει στην κατανόηση των οργανισμών που ευθύνονται για την παγκόσμια διαχείριση του πυριτίου.

Προοπτικές

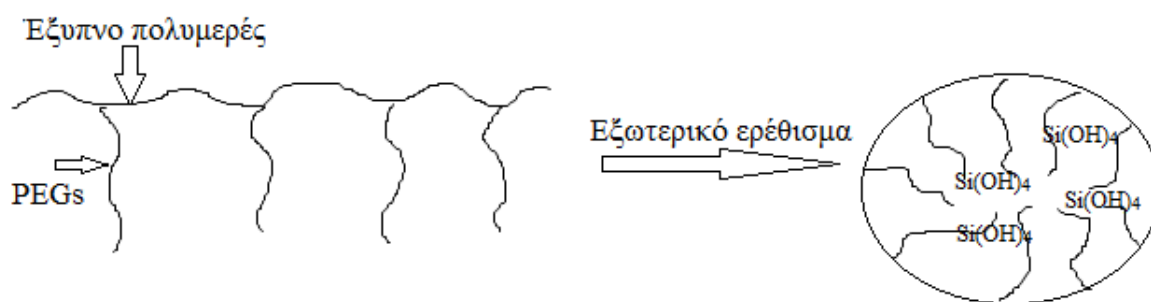
Με αφορμή τη μελέτη που έχει γίνει στο παρελθόν γύρω από συνθετικά πολυμερή και σε συνδυασμό με την παρούσα έρευνα θα μπορούσε κανείς εύλογα να αναρωτηθεί ποιο θα ήταν το αποτέλεσμα στη σταθεροποίηση του πυριτικού οξέος, ενός συνθετικού πολυμερούς σαν αυτό που παρατίθεται σχηματικά στην εικόνα V.1. Πρόκειται για συνδυασμό των αποτελεσμάτων των «καλύτερων» PEGs (10.000, 12.000) και της συγκεντροποίησης των δραστικών μονάδων.



*Εικόνα V.1: Συνθετικό πολυμερές για χρήση ως παρεμποδιστής πολυμερισμού του πυριτικού οξέος.
n = 227: PEG 10.000 και n = 273: PEG 12.000.*

Η παραπάνω σκέψη συνεχίζει ως εξής. Βασικό στοιχείο στη διαχείριση του πυριτικού οξέος από τα διάτομα, όπως έχει αναφερθεί ξανά στην εισαγωγή της εργασίας, είναι ο πιθανός σχηματισμός των silicon pools και η συγκέντρωση των δομικών μονάδων της σίλικα ($\text{Si}(\text{OH})_4$) σε διαλυτή μορφή. Η προσομοίωση αυτού του είδους της δομής θα μπορούσε να αποτελέσει θεμελιώδους σημασίας χαρακτηριστικό για την κατανόηση των πολύπλοκων βιολογικών μηχανισμών των διατόμων και επιβεβαίωση στις μέχρι στιγμής επιστημονικές «εικασίες». Συνεπώς, ποια θα ήταν η πιθανή αποτελεσματικότητα που θα είχε ο συνδυασμός βιολογικών ή συνθετικών μακρομορίων – πολυμερών, τα οποία θα περιέχουν γνωστές σταθεροποιητικές ομάδες (αμινομάδες, βάσεις δεσμών υδρογόνου κ.α.), ενώ ταυτόχρονα θα είναι επιρρεπή σε κάποιο εξωτερικό, ελεγχόμενο ερέθισμα; Σαφέστερα, αν το πολυμερές- φορέας των παραπάνω PEGs ανήκει στην κατηγορία των γνωστών smart polymers; Είναι γνωστή η απόκριση συγκεκριμένων πολυμερών, σε ερεθίσματα όπως η θερμοκρασία (pNiPAAm)^[57] και το pH (pDPA)^[58]. Ανάλογα

με τα όρια συγκεκριμένων κρίσιμων τιμών, που εξαρτώνται από τη φύση του εκάστοτε πολυμερούς, παρατηρείται μεταβολή στον υδρόφιλο / υδρόφοβο χαρακτήρα της δομής. Τροποποίηση ενός τέτοιου πολυμερούς με κάποιο γνωστό σταθεροποιητικό μόριο (π.χ. PEGs) θα μπορούσε να οδηγήσει στο σχηματισμό της πρώτης τεχνητής silicon pool. Η σκέψη αυτή παρουσιάζεται σύντομα σχηματικά στην εικόνα V.2.



Εικόνα V.2: Η τροποποίηση ενός έξυπνου πολυμερούς με ομάδες PEGs θα μπορούσε υπό ιδανικές συνθήκες να προσομοιάσει την silicon pool.

Μία ίσως πιο βατή απόπειρα προσομοίωσης της βιοσύνθεσης του διοξειδίου του πυριτίου είναι η εκ του μηδενός σύνθεση δομών στενά συνυφασμένων με εκείνη των σιλαφινών. Στην περίπτωση αυτή είναι δυνατή η μελέτη της σταθεροποιητικής ικανότητας των μορίων αυτών, όχι όμως της πλήρους εικόνας του ρόλου τους κατά τον κύκλο αναπαραγωγής του διατόμου.

Οι μελέτες αυτές θα μπορούσαν να ολοκληρωθούν με προσομοίωση των πειραματικών συνθηκών σε συμφωνία με τις βιολογικές (pH, θερμοκρασία συγκεκριμένων υδάτινων μαζών που χαρακτηρίζονται από τη διαβίωση των διατόμων). Αυτό θα ανοίξει πόρτες σε μία νέα και ακόμη ελάχιστα μελετημένη πλευρά της βιοσύνθεσης του διοξειδίου του πυριτίου, εκείνης που αναφέρεται ως “Extreme Biomineralization”.

Βιβλιογραφία

- [1] K.D. Demadis, “Water Treatment’s ‘Gordian Knot’”, *Chemical Processing*, 66(5) (2003), 29.
- [2] K.D. Demadis, Silica Scale Inhibition Relevant to Desalination Technologies: Progress and Recent Developments, Editors: Daniel J. Delgado and Pablo Moreno,(2008), 249-259.
- [3] E. Neofotistou, K. D. Demadis, Use of antiscalants for mitigation of silica (SiO₂) fouling and deposition: fundamentals and applications in desalination systems, *Desalination* 167 (2004) 257–272.
- [4] K.D. Demadis, A. Stathoulopoulou, “Solubility Enhancement of Amorphous Silica with Polyamine/ Polyammonium Cationic Macromolecules: Relevance to Silica Laden Process Waters”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 45 (2006), 4436 -4440.
- [5] M. Preari, K. Spinde, J. Lazic, E. Brunner, K.D. Demadis, “Bioinspired Insights into Silicic Acid Stabilization Mechanisms: Dominant Role of Polyethylene Glycol-Induced Hydrogen Bonding”, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 4236–4244.
- [6] Ebbing, Gammon, General Chemistry, Sixth Edition, 599-562.
- [7] Wedepohl, K. H. The composition of the continental crust *Geochim. Cosmochim. Acta* **1995**, 59, 1217–1232.
- [8] Otzen, D. The role of proteins in biosilicification *Scientifica* (Cairo). 2012, **2012**, Article ID 867562.
- [9] J. E. Huheey, Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity, Harper Collins, 4th. Ed., New York **1993**
- [10] R.Y. Ning, Discussion of silica speciation, fouling, control and maximum reduction, *Desalination*, (2002), 151, 67-73.
- [11] Nielsen, FH, Ultratrace Elements in Nutrition, Annual Review of Nutrition 4 (1984), 21–41.
- [12] E.M. Carlisle, “Silicon: a possible factor in bone calcification”, *Science*, 167, 279-280, **1970**.
- [13] Brady , Weil, R. The Nature and Properties of Soils 14th ed. Prentice Hall, **2007**.
- [14] Bidle, K. D.; Manganelli, M.; Azam, F. Regulation of oceanic silicon and carbon preservation by temperature control on bacteria. *Science* (80-.). **2002**, 298, 1980–1984.
- [15] Seckbach, J.; Kociolek, J. P. The Diatom World; Springer: Dordrecht, **2011**.
- [16] Shriver & Atkins, Inorganic Chemistry, 5th ed. W. H. Freeman and Company New York, **2009**.

- [17] Sjöberg S. Silica in aqueous environments *J. Non. Cryst. Solids* **1996**, 196, 51-57.
- [18] K.D. Demadis, Recent developments in Controlling Silica and Magnesium Silicate Foulants in industrial Water Systems, Editor: Zahid Amjad, CRC Press, The Science and Technology of Industrial Water Treatment, 179-203.
- [19] B. Hamrouni, M. Dhahbi, Analytical aspects of silica in saline waters – application to desalination of brackish waters, *Desalination*, 136 (**2001**), 225-232.
- [20] D.J. Belton, O. Deschaume, C.C. Perry, An overview of the fundamentals of the chemistry of silica with relevance to biosilicification and technological advances *FEBS Journal* **2012**, 279, 1710.
- [21] Stephen Mann, Biom mineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry, Oxford Chemistry Masters.
- [22] C.C. Perry, T. Keeling-Tucker, Aspects of the bioinorganic chemistry of silicon in conjunction with the biometals calcium, iron and aluminium, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 69 (**1998**), 181-191.
- [23] C.C. Perry, Silicification: The processes by which organisms capture and mineralize silica, *Reviews in Mineralogy & Geochemistry*, Vol. 54, ch.10, 291-327.
- [24] S.V. Patwardhan, M. F. Durstock, S.J. Clarson, Silicification and Biosilicification- Part 2. Silicification at pH 7 in the Presence of a Cationically Charged Polymer in Solution and Immobilized on Substrates, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**.
- [25] Perry, C. C. Silicification: The Processes by Which Organisms Capture and Mineralize Silica Rev. Mineral. Geochemistry 2003, 54, 291–327.
- [26] Ehrlich, H. Biological materials of marine origin. Invertebrates; Dordrecht; New York : Springer, 2010.
- [27] F. A. S. Sterrenburg, R. Gordon, M. A. Tiffany, S. S. Nagy, Diatoms: living in a constructal environment, part 3, Vol. 11, Springer 2007.
- [28] Hildebrand, M. Diatoms, Biom mineralization Processes, and Genomics Chem. Rev. 2008, 108, 4855–4874.
- [29] Tréguer, P.; Nelson, D. M.; Van Bennekom, A. J.; Demaster, D. J.; Leynaert, A.; Quéguiner, B. The silica balance in the world ocean: a reestimate. *Science* 1995, 268, 375–379.
- [30] Hildebrand, M.; Volcani, B. E.; Gassmann, W.; Schroeder, J. I. A gene family of silicon transporters *Nature* **1997**, 385, 688–689.
- [31] Sullivan, C. Silicon Uptake in Diatoms Revisited: A Model for Saturable and Nonsaturable Uptake Kinetics and the Role of Silicon Transporters, *Plant Phycol.* **1977**, 13, 86.

[32] Annenkov, V. V.; Basharina, T. N.; Danilovtseva, E. N.; Grachev, M. A. Putative silicon transport vesicles in the cytoplasm of the diatom *Synedra acus* during surge uptake of silicon *Protoplasma* **2013**, 250, 1147–1155.

[33] Iler, R. K. The chemistry of silica: Solubility, polymerization, colloid and surface properties, and biochemistry; Wiley: New York, **1979**.

[34] H. Ehrlich, “Biological Materials of Marine Origin. Invertebrates”, Springer, New York (**2010**).

[35] J. P. Smol, E. F. Stoermer Editors, The Diatoms. Applications for the Environmental and Earth Sciences, Cambridge University Press, Second edition, New York (**2010**).

[36] W.E.G. Muller, M.A. Grachev Editors, Biosilica in Evolution, Morphogenesis, and Nanobiotechnology – Case Study Lake Baikal, Springer, German (**2009**).

[37] Gröger, C.; Sumper, M.; Brunner, E. Silicon uptake and metabolism of the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*: Solid-state ²⁹Si NMR and fluorescence microscopic studies *J. Struct. Biol.* **2008**, 161, 55–63.

[38] Kinrade, S. D.; Gillson, A.-M. E.; Knight, C. T. G. Silicon-29 NMR evidence of a transient hexavalent silicon complex in the diatom *Navicula pelliculosa*. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, **2002**, 307–309.

[39] Vrieling, E. G.; Gieskes, W. W. C.; Beelen, T. P. M. Silicon Deposition in Diatoms: Control by the pH Inside the Silicon Deposition Vesicle *J. Phycol.* **1999**, 35, 548–559.

[40] Patwardhan, S.; Mukherjee, N.; Clarson, S. Effect of process parameters on the polymer mediated synthesis of silica at neutral pH *Silicon Chem.* **2002**, 1, 47–54.

[41] Kröger, N.; Deutzmann, R.; Sumper, M. Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation *Science* **1999**, 286, 1129–1132.

[42] Kröger, N.; Lorenz, S.; Brunner, E.; Sumper, M. Self-assembly of highly phosphorylated silaffins and their function in biosilica morphogenesis *Science* **2002**, 298, 584–586.

[43] W. O. Hobbs, A. P. Wolfe, W. P. Inskeep, L. Amskold. K.O. Konhauser, Epipelagic diatoms from an extreme acid environment: Beowulf Spring.

[44] R. Asada, K. Tazaki, Silica Biomineralization of Unicellular Microbes Under Strongly Acidic Conditions, *The Canadian Mineralogist* Vol. 39, pp. 1-16 (**2001**).

[45] Guilera A., Eukaryotic Organisms in Extreme Acidic Environments, the Río Tinto Case, *Life* **2013**, 3, 363-374.

[46] Coradin, T.; Eglin, D.; Livage, J. The silicomolybdic acid spectrophotometric

method and its application to silicate/biopolymer interaction studies *Spectroscopy* **2004**, 18, 567–576.

[47] Alexander, G. B. The Reaction of Low Molecular Weight Silicic Acids with Molybdc Acid *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 5655–5657.

[48] Icopini, G. A.; Brantley, S. L.; Heaney, P. J. Kinetics of silica oligomerization and nanocolloid formation as a function of pH and ionic strength at 25°C *Geochim. Cosmochim. Acta* **2005**, 69, 293–303.

[49] K.D. Demadis, E. Mavredaki, M. Somara, “Additive – Driven Dissolution Enhancement of Colloidal Silica. 1. Basic Principles and Relevance to Water Treatment”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 50 (**2011**), 12587-12595.

[50] M. Sumper, Biomimetic Patterning of Silica by Long-Chain Polyamines, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 2251 –2254

[51] G.E. Tilburey, S.V. Patwardhan, J. Huang, D. L. Kaplan, C. C. Perry, Are Hydroxyl-Containing Biomolecules Important in Biosilicification? A Model Study, *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111, 4630-4638.

[52] Murr, M. M.; Morse, D. E. Fractal intermediates in the self-assembly of silicatein filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, 102 (33), 11657-11662.

[53] Aizenberg, J.; Black, A. J.; Whitesides, G. M. Control of crystal nucleation by patterned self-assembled monolayers. *Nature* **1999**, 398 (6727), 495-498.

[54] K. Spinde, K. Pachis, I. Antonakaki, S. Paasch, E. Brunner, and K.D. Demadis, Influence of Polyamines and Related Macromolecules on Silicic Acid Polycondensation: Relevance to “Soluble Silicon Pools”?, *Chem.Mat.*(**2011**), ACS .

[55] K. Popov, H. Ronkkomaki, L. H. J. Lajunen, Critical Evaluation of Stability Constants of Phosphonic Acids, *Pure Appl. Chem.*, Vol. 73, No. 10, 1641–1677, **2001**.

[56] K.D. Demadis, S.I. Brückner, E. Brunner, S. Paasch, I. Antonakaki, M. Casolaro, The Intimate Role of Imidazole in the Stabilization of Silicic Acid by a 2 pH-Responsive, Histidine-Grafted Polyampholyte, *Chem. Mat. ACS*, **2015**, 27 (19), 6827–6836.

[57] H. Dautzenberg, Y. Gao, M. Hahn, Formation, structure, and temperature behavior of polyelectrolyte complexes between ionically modified thermosensitive polymers, *Langmuir*, 16 (**2000**), 9070–9081.

[58] J.Qian, C. Berkland, PH- sensitive triblock copolymers for efficient siRNA encapsulation and delivery, *Polym. Chem.*, **2015**, 6, 3472.