ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΥΛΙΚΩΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ ΓΙΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΔΡΟΓΕΛΩΝ

Γεωργίου Σαλώμη

Επιβλέπων Καθηγητής: Κουτσολέλος Αθανάσιος Συν-Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Μητράκη Άννα

НРАКЛЕІО 2023

UNIVERSITY OF CRETE DEPARTMENT OF CHEMISTRY

BIOINORGANIC CHEMISTRY LABORATORY BIOMATERIALS LABORATORY



Bachelor Thesis

REMOVAL OF METAL IONS USING HYDROGELS FOR ENVIRONMENTAL APLICATIONS

SALOMI GEORGIOU

Batchelor Thesis Supervisor: Coutsolelos Athanasios Co-supervisor: Mitraki Anna

HERAKLION 2023

Δήλωση

Δια του παρόντος δηλώνω ότι αυτή η εργασία έχει πραγματοποιηθεί από εμένα προσωπικά στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, στα πλαίσια των προπτυχιακών μου σπουδών. Επιπλέον, δηλώνω ότι έχω γράψει αυτό το έργο ανεξάρτητα, και ότι δε χρησιμοποίησα βοηθήματα ή άλλα εργαλεία πλέον όσον αναφέρονται, και ότι δεν αντέγραψα κείμενα τρίτων χωρίς να τα έχω επισημάνει.

Ηράκλειο, 20/02/2023

Σαλώμη Γεωργίου

Εξεταστική Επιτροπή

Αθανάσιος Κουτσολέλος Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Άννα Μητράκη

Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων καθηγητή μου κ. Αθανάσιο Κουτσολέλος και την συνεπιβλέπουσα καθηγήτρια μου κα. Άννα Μητράκη για όλη την βοήθεια και την καθοδήγηση τους καθ' όλη την διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την Ευητίνα Τριανταφύλλου, που είχε την επιμέλεια της διπλωματικής μου εργασίας, για την συνεχή καθοδήγηση και την υποστήριξη της καθώς και την Χρύσα Αποστολίδου και τον Γιώργο Νηστικάκη για την πολύτιμη βοήθεια τους. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοϋλικών του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών και ιδιαίτερα την Κωνσταντίνα Μητροπούλου, τον Πέτρο Ντιβανάκ και την Ρένα Φανουράκη. Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοανόργανης Χημείας του Τμήματος Χημείας και ιδίως την Κατερίνα Αχιλλέως, την Άννα Κατσαρή και την Μάγδα Τοπούζα. Τέλος, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πεπτιδικές υδρογέλες ως γνωστό είναι πολύ χρήσιμα υλικά λόγω των πολυάριθμων ιδιοτήτων τους, οι οποίες τους επιτρέπουν να εντάσσονται σε πολλούς τομείς εφαρμογών, όπως βιοϊατρικές και περιβαλλοντικές εφαρμογές. Συγκεκριμένα, έχουν απλή σύνθεση, είναι βιοδιασπώμενες, απλές στη χρήση και μέσω της τεχνικής της προσρόφησης μπορούν να απομακρύνουν αποτελεσματικά τοξικούς ρύπους όπως τα μεταλλικά ιόντα Ni²⁺ και Co²⁺ από ένα μολυσμένο υδάτινο περιβάλλον.

Αρχικά, συντέθηκε το διπεπτίδιο Fmoc-Phe-Leu-OH και μελετήθηκε η ικανότητα αυτοοργάνωσης του προς τον σχηματισμό υδρογελών ακολουθώντας το πρωτόκολλο "καλού/κακού" διαλύτη. Η αναλογία των διαλυτών ήταν 3:7 με την αιθανόλη και το νερό να αποτελούν τον "καλό" και "κακό" διαλύτη αντίστοιγα. Χρησιμοποιήθηκε η ποσότητα 2mg/ml διπεπτιδίου και αναλογία διαλυτών 3:7 αιθανόλη/νερό για τον σχηματισμό της υδρογέλης. Έπειτα, η υδρογέλη αυτή χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της ικανότητας δέσμευσης τοξικών μεταλλικών ιόντων νικελίου και κοβαλτίου από υδάτινο περιβάλλον. Στη συνέγεια, εξετάστηκε η ικανότητα επαναχρησιμοποίησης της υδρογέλης μέσω δύο διαφορετικών μεθόδων: (α) με χρήση Et2O και (β) με χρήση EDTA. Από την μελέτη αυτή αποδείχθηκε ότι μέσω και των δύο μεθόδων επιτυγχάνεται η επαναχρησιμοποίηση της υδρογέλης ωστόσο η μέθοδος με την χρήση του EDTA έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα. Συγκεκριμένα, με την μέθοδο χρήσης του Et₂O υπάρχει δυνατότητα επαναγρησιμοποίησης της υδρογέλης μέχρι 2 φορές με αρκετά υψηλά ποσοστά απορρόφησης, ενώ με την μέθοδο χρήσης του EDTA η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης διπλασιάζεται, καθώς η υδρογέλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί μέχρι και 4 φορές, με εξίσου υψηλά ποσοστά απορρόφησης. Αποδείχθηκε ότι η συγκεκριμένη υδρογέλη, κατά τον πρώτο κύκλο γρήσης της, μπορεί να απορροφήσει σε γρονικό διάστημα 3 ημερών το 44,23% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Ni²⁺, 0.1M και όγκου 1ml και το 40,67% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Co²⁺, 0.1M και όγκου 1ml. Στον δεύτερο κύκλο χρήσης της μπορεί να απορροφήσει 38,94% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Ni²⁺, 0.1M και όγκου 1ml και το 29,51% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Co²⁺, 0.1M και όγκου 1ml. Στον τρίτο κύκλο γρήσης της μπορεί να απορροφήσει 38.94% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Ni²⁺, 0.1M και όγκου 1ml και το 29,51% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Co^{2+} , 0.1M και όγκου 1ml. Στον τέταρτο κύκλο χρήσης της μπορεί να απορροφήσει 29,00% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Ni²⁺,

0.1Μ και όγκου 1ml και το 20,46% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Co²⁺, 0.1Μ και όγκου 1ml.

Συνεπώς, το πεπτίδιο Fmoc-Phe-Leu-OH σχηματίζει καλά δομημένες υδρογέλες με δυνατότητα απορρόφησης τοξικών μεταλλικών ιόντων και λόγω της βιοαποικοδόμησης τους έχουν μεγάλες προοπτικές σε περιβαλλοντικές εφαρμογές όπως απορρύπανση των υδάτινων περιοχών.

Λέξεις Κλειδιά: Σύνθεση πεπτιδίων, Πεπτιδικές υδρογέλες, Υδρογέλες για απορρύπανση, Απομάκρυνση μεταλλικών ιόντων, Νικέλιο(Ni²⁺), Κοβάλτιο (Co²⁺), Σύνθεση πορφυρινών

ABSTRACT

Peptide-based hydrogels are very useful materials due to their many properties, which place them in many fields of applications such as biomedical and environmental. In particular, they are easily synthesized, biodegradable, simple to use and through the adsorption technique they can effectively remove toxic pollutants such as nickel and cobalt metal ions, from polluted aqueous environments. At first, the dipeptide Fmoc-Phe-Leu-OH was synthesized and then studied for its ability to self-assemble into hydrogels following the good/bad solvent protocol. The solvent ratio was 3:7 with ethanol and water being the good and bad solvent respectively. The amount of dipeptide 2mg/ml and a solvent ratio of 3:7 ethanol/water were used to form the peptide-based hydrogel. Then, the produced hydrogel was used for the study of adsorption of toxic metal ions in aqueous environments. Furthermore, the reusability of the hydrogel was also tested through two different methods: (a) using Et₂O and (b) using EDTA. Both methods achieve the reusability of the hydrogel, however the second method with the EDTA seems to be more effective. In particular, during the first method, with the Et₂O, there is the possibility of reusing the hydrogel up to 2 times with high absorption rates and with the second method, with the EDTA, the reusability of the hydrogel is doubled as it can be reused up to 4 times with equally high absorption rates. As it was shown through this study, this hydrogel, during its first cycle of use, can absorb within a period of 3 days the 44.23% of Ni²⁺ metal ions from 1ml stock solution 0.1M and 40.67%. of Co^{2+} metal ions from 1ml stock solution 0.1M. During the second cycle it can absorb the 38.94% of Ni^{2+} metal ions from 1ml stock solution 0.1M and 29.51%. of Co²⁺ metal ions from 1ml stock solution 0.1M. Throughout the third cycle it can absorb the 38.94% of Ni²⁺ metal ions from 1ml stock solution 0.1M and 29.51%. of Co^{2+} metal ions from 1ml stock solution 0.1M. Finally, in the course of its fourth cycle of use it can absorb the 29.00% of Ni²⁺ metal ions from 1ml stock solution 0.1M and 20.46%. of Co^{2+} metal ions from 1ml stock solution 0.1M.

Therefore, the peptide Fmoc-Phe-Leu-OH forms well-structured hydrogels capable of absorbing toxic metal ions and due to their biodegradation, they have great perspectives in environmental applications such as the depollution of aqueous environments.

Keywords: Peptide synthesis, peptide hydrogels, Depollution hydrogels, Removal of metal ions, Nickel (Ni²⁺), Cobalt (Co²⁺), Porphyrin synthesis

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1	Πορφυρίνες	11
1.2	Πεπτίδια	12
1.3	Αυτοοργάνωση (self-assembly)	13
1.4	Υδρογέλες	14
1.5	Υδρογέλες σε περιβαλλοντικές εφαρμογές	15
1.6	Βιβλιογραφία	17

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΙ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

2.1	Χρωματογραφία Στήλης	19
2.2	Φασματοσκοπία Ορατού-Υπεριώδους (UV-Vis)	20
2.3	Matrix Assisted Laser Desroption/Ionization-Mass Spectroscopy	23
2.4	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)	25
2.5	Βιβλιογραφία	26

κεφαλαίο 3. Σύνθεση

3.1	Σύνθε	εση τετραφαίνυλο-πορφυρίνης (H2-TPP)	
3.2	Σύνθε	εση Μονοάμινο-τετραφαίνυλοπορφυρίνης (TPP-NH2)	29
3.3	Σύνθε	εση διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH	31
3.4	Χαρακτηρισμός ενώσεων		
	3.4.1	Τετραφαίνυλο-πορφυρίνη (H2-TPP)	
	3.4.2	Μονοάμινο-τετραφαίνυλοπορφυρίνη (TPP-NH2)	33
	3.4.3	Διπεπτίδιο Fmoc-Phe-Leu-OH	35

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΥΤΟΟΡΓΑΝΩΣΗ ΔΙΠΕΠΤΙΔΙΟΥ Fmoc-Phe-OH

4.1	Σχηματισμός υδρογελών	36
-----	-----------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

5.1	Δέσμευση μεταλλικών ιόντων από τις υδρογέλες Fmoc-Phe-Leu-OH37					
5.2	Επανο	ιχρησιμοποίηση υδρογελών4	1			
	5.2.1	Χρήση διαιθυλαιθέρα (Et2O)41	l			
	5.2.2	Χρήση EDTA4	3			

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ6

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Πορφυρίνες 1,2

Οι πορφυρίνες είναι μια κατηγορία φυσικών μακροκυκλικών οργανικών ενώσεων οι οποίες βρίσκονται σε βιολογικές ενώσεις και παίζουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των ζωντανών οργανισμών. Επίσης, έχουν σημαντικό ρόλο στην φύση λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους στην απορρόφηση, εκπομπή, συμπλοκοποίηση και μεταφορά φορτίου ως αποτέλεσμα της δομής του δακτυλίου που αποτελεί ένα συζυγιακό σύστημα διπλών και απλών δεσμών. Συγκεκριμένα, οι πορφυρίνες αποτελούνται από τέσσερις μονάδες πυρρολίου συνδεδεμένες με τέσσερις γέφυρες μεθινίου (=CH-, methine bridges).



Εικόνα 1. Δομή απλούστερης πορφυρίνης. Φαίνονται οι γέφυρες μεθινίου και η σειρά αρίθμησης των ατόμων άνθρακα κατά IUPAC. Ελήφθη από την Παραπομπή 1.

Ο μακροκυκλικός, πορφυρινικός δακτύλιος χαρακτηρίζεται από ένα συζυγιακό σύστημα 22 πηλεκτρονίων εκ των οποίων μόνο τα 18 συμμετέχουν στην αρωματικότητα του δακτυλίου και υπακούουν στον νόμο του Hückel (4n+2 απεντοπισμένα π-ηλεκτόνια, όπου n=4). Αυτή η εξαιρετικά σταθερή διαμόρφωση απλών και διπλών δεσμών με αρωματικά χαρακτηριστικά επιτρέπουν την πραγματοποίηση των τυπικών ηλεκτρονιόφιλων αντιδράσεων για ένα αρωματικό σύστημα όπως αλογόνωση, νίτρωση, σουλφωνίωση, ακυλίωση, δευτερίωση και φορμυλίωση. Επίσης, είναι υπεύθυνο για τις έντονες ταινίες απορρόφησης που εμφανίζουν οι πορφυρίνες στο φάσμα UV-Vis και συνεπώς για τα έντονα χρώματα που παρουσιάζουν. Οι πορφυρίνες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο τύπους:

- a) Πορφυρίνες που υπάρχουν στην φύση με δύο ή περισσότερους υποκαταστάτες στον πυρρολικό δακτύλιο (β-pyrrole υποκατεστημένες πορφυρίνες). Θέσεις υποκατάστασης:
 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 και 18.
- b) Συνθετικές πορφυρίνες που φέρουν υποκαταστάτες στην γέφυρα του μεθινίου (mesoυποκατεστημένες πορφυρίνες). Θέσεις υποκατάστασης: 5, 10, 15 και 20.

Οι πορφυρίνες βρίσκονται στο κέντρο διαφόρων πρωτεϊνών με σημαντική χημική δράση όπως η μεταφορά και αποθήκευση οξυγόνου (αιμοσφαιρίνη), η μεταφορά ηλεκτρονίων (κυτόχρωμα c) και η μετατροπή ενέργειας (χλωροφύλλη).



Εικόνα 2. Τρισδιάστατη δομή αιμοσφαιρίνης (A), κυτοχρώματος c (B), δομή χλωροφύλλης α και β (Γ) (Ελήφθη από την παραπομπή 2)

1.2 Πεπτίδια ^{3,4,5}

Τα πεπτίδια είναι βιομόρια που περιέχουν από δύο εως πολλές δεκάδες υπολείμματα αμινοξέων ενωμένα με πεπτιδικούς δεσμούς. Κάθε αμινοξύ διαθέτει ένα αμινοτελικό και ένα καρβοξυτελικό άκρο και μεταξύ της καρβοξυλομάδας του πρώτου αμινοξέος και της αμινομάδας του δεύτερου σχηματίζεται ο πεπτιδικός δεσμός με ταυτόχρονη απώλεια ενός μορίου νερού.



Εικόνα 3. Σχηματισμός πεπτιδικού δεσμού με ταυτόχρονη απώλεια ενός μορίου νερού. Ελήφθη από την παραπομπή 4.

Τα πεπτίδια διαθέτουν την βιοσυμβατότητα και την χημική ποικιλομορφία που υπάρχει στις πρωτεϊνες, όμως είναι πολύ πιο σταθερά και ανθεκτικά με αποτέλεσμα να μπορούν να συντίθενται εύκολα σε μεγάλη κλίμακα. Επίσης, έχουν εύκολη σύνθεση και ευρείες εφαρμογές στον βιολογικό και ιατρικό τομέα. Ένα πολύ γνωστό διπεπτίδιο είναι το Fmoc-Phe-Phe-OH το οποίο σχηματίζει αυτοοργανωμένες δομές νανοσωλήνων, ο σχηματισμός των οποίων διευκολύνεται από τους αρωματικούς δακτυλίους που διαθέτει η φαινυλαλανίνη καθώς λειτουργούν ως «κολλώδες» συστατικό για τις δομές των σταθεροποιημένων με δεσμούς υδρογόνου σωλήνων που προκύπτουν.



Εικόνα 4. Σχηματισμός διατεταγμένων νανοδομών από το απλό αρωματοκό διπεπτίδιο φαινυλαλανίνης. Ελήφθη από την παραπομπή 5.

Ωστόσο, το πεπτίδιο διφαινυλαλανίνη δεν είναι το μόνο που μπορεί να δημιουργήσει αυτοοργανωμένες δομές αλλά και το Fmoc-Phe-Leu-OH το οποίο μελετάται σε αυτή την διπλωματική εργασία φαίνεται ότι έχει την δυνατότητα να σχηματίζει μακροσκοπικές δομές υδρογέλης στη νανοκλίμακα.

1.3 Αυτοοργάνωση ⁵

Αυτοοργάνωση είναι η διαδικασία κατά την οποία τα απλά δομικά στοιχεία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους σχηματίζοντας μεγαλύτερα και πολυπλοκότερα υπερμοριακά συστήματα. Η

διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα μέσω δεσμών υδρογόνου, π-π stacking, μη ομοιοπολικών, υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Η διαδικασία της αυτό-οργάνωσης είναι φυσική και συμβαίνει αυθόρμητα "bottom-up", ενώ υπάρχει και η αντίθετη διαδικασία αυτής, η οποία βασίζεται στη διαμόρφωση των δομών μέσω της μικροτεχνικής της λιθογραφίας "top-down".





Οι προκύπτουσες δομές επηρεάζονται άμεσα τόσο από τους δομικούς λίθους τους όσο και από άλλους παράγοντες όπως τον διαλύτη, το pH, την θερμοκρασία και την συγκέντρωση. Τα μικρά πεπτίδια μπορούν να συζευχθούν αυθόρμητα ώστε να σχηματίσουν νανοσωλήνες, νανοσφαιρίδια αλλά και μακροσκοπικά συστήματα όπως οι υδρογέλες με τάξη νανοκλίμακας. Το διπεπτίδιο Fmoc-διφαινυλαλανίνης είναι το πιο γνωστό με την ικανότητα να σχηματίζει διακριτούς νανοσωλήνες, ινίδια που μοιάζουν με τα αμυλοειδή ινίδια καθώς και μακροσκοπικές υδρογέλες με τάξη νανοκλίμακας.

1.4 Υδρογέλες ^{6,7,8,11}

Οι υδρογέλες είναι ημιστερεά υλικά, των οποίων ένα μεγάλο μέρος τους αποτελείται από νερό. Από την αυτοοργάνωση μοριακών δικτύων προκύπτουν αυτές οι διακριτές τρισδιάστατες δομές σχεδιασμένες να δεσμεύουν μεγάλες ποσότητες μορίων νερού χωρίς να διαλύεται η δική τους χημική δομή, η οποία μοιάζει πολύ σε φυσικό ιστό. Ο σχηματισμός των υδρογελών λαμβάνει χώρα μέσω αλλαγών στις συνθήκες του διαλύματος, όπως η αλλαγή του pH, του διαλύτη, της θερμοκρασίας ή με μια ενζυματική αντίδραση. Οι υδρογέλες μπορούν να ταξινομηθούν σε χημικές και φυσικές υδρογέλες. Στην περίπτωση των χημικών υδρογελών οι δομικοί λίθοι συνδέονται με ομοιοπολικούς δεσμούς μέσω cross-linking και σχηματίζουν μόνιμες δομές. Ενώ, στην περίπτωση των φυσικών υδρογελών, η διαδικασία της αυτοοργάνωσης είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των μονομερών μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων όπως δεσμούς υδρογόνου, υδρόφοβες, αρωματικές, ηλεκτροστατικές και π-π αλληλεπιδράσεις. Επίσης, αυτή θεωρείται ως μια πιο εύκολη και γρήγορη διαδικασία.



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση του σχηματισμού υδρογέλης μέσω της "bottom-up" διαδικασίας από δομικά στοιχεία μικρού μοριακού βάρους σε αυτοοργανωμένες ίνες που σχηματίζουν την υδρογέλη μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων. Ελήφθη από την παραπομπή 11.

Τα δραστικά διπεπτίδια με χαμηλό μοριακό βάρος έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως gelators. Συνήθως, τα ολιγοπεπτίδια δραστικοποιούνται μέσω της σύνδεσης τους στο N-άκρο με μια υδρόφοβη, ογκώδη, αρωματική ομάδα, όπως το Fmoc, η οποία δρα ως προστατευτική ομάδα. Αυτά τα αρωματικά τμήματα συμβάλλουν στις π-π αλληλεπιδράσεις στοίβαξης καθώς και στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, διευκολύνοντας έτσι την διαδικασία της αυτοοργάνωσης των πεπτιδίων προς τον σχηματισμό της υδρογέλης σε υδατικό περιβάλλον. Επίσης, τα προστατευμένα με Fmoc ολιγοπεπτίδια, είναι αναγνωρισμένα στην βιβλιογραφία ως αντιφλεγμονώδεις παράγοντες και κατ' επέκταση οι υδρογέλες με βάση τα Fmoc-ολιγοπεπτίδια έχουν μεγάλες προοπτικές σε βιοϊατρικές εφαρμογές όπως π.χ η μηχανική ιστών, η χορήγηση φαρμάκων και η εγκαψυλλίωση κυττάρων.

1.5 Υδρογέλες σε περιβαλλοντικές εφαρμογές 9,10,12,13

Οι αυτοοργανομένες δομές υδρογελών έχουν υψηλή συμβατότητα με το νερό και επομένως έχουν μεγάλες προοπτικές για χρήση ως παράγοντες περιβαλλοντικής αποκατάστασης. Συγκεκριμένα,

μπορούν να συμβάλουν στον καθαρισμό των υδάτων μέσω επιλεκτικής αφαίρεσης πολύτιμων βαρέων μετάλλων από τα λύματα.

Η μολυσματικότητα του νερού προκαλείται από πολλούς παράγοντες και περιέχουν πολλών ειδών ρύπους, όπως τοξικά βαρέα μέταλλα και οργανικές βαφές, που απελευθερώνονται στα ύδατα από μεταλλουργικές βιομηχανίες και υφαντουργικές εγκαταστάσεις. Οι ρύποι αυτοί αποτελούν μεγάλη απειλή για την φύση και το περιβάλλον καθώς και για την ανθρώπινη υγεία. Οι τοξικοί μεταλλικοί ρύποι όπως Co, Ni, Cd, Cr, Cu και άλλα, υπάρχουν σε ευρεία κλίμακα στα βιομηχανικά λύματα από βιομηχανίες μπαταριών, ηλεκτροπλακών και βαφών. Μπορεί να προκληθεί συσσώρευση αυτών των ρύπων τόσο στο ανθρώπινο σώμα όσο και στο περιβάλλον για μεγάλη χρονική περίοδο, εάν εκτίθενται σε μεγάλες ποσότητες αυτών. Επομένως, κρίνεται αναγκαίο να γίνει προσπάθεια δέσμευσης αυτών των ρύπων από τα ύδατα ώστε να αποφευχθούν οι αρνητικές τους επιπτώσεις στον ανθρώπινο οργανισμό αλλά και στο περιβάλλον.

Οι συνήθεις τεχνικές για την διαχείριση των λυμάτων είναι η ηλεκτροχημική επεξεργασία, ο διαχωρισμός μεμβράνης, η ανταλλαγή ιόντων κ.α. Ωστόσο, αυτές οι τεχνικές έχουν περιορισμένη ισχύ λόγω των υψηλών απαιτήσεων ενέργειας, του κόστους, της χαμηλής ευαισθησίας, της ατελούς απομάκρυνσης και της πολυπλοκότητάς τους. Για αυτό τον λόγο η προσρόφηση θεωρείται ως μια καλή εναλλακτική τεχνική χρησιμοποιώντας υδρογέλες πεπτιδίων.

Οι υδρογέλες με βάση τα πεπτίδια έχουν απλή οργανική σύνθεση, είναι βιοδιασπώμενες, απλές στη χρήση, μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν, έχουν μεγάλη επιφάνεια προσρόφησης και λόγω της υψηλής υδατοπερατότητάς τους μπορούν να δεσμεύσουν στο εσωτερικό τους τα ιόντα βαρέων μετάλλων.

Το φυσιολογικό όριο των ιόντων μετάλλων Ni²⁺ και Co²⁺ στο πόσιμο νερό είναι 0,07mg/ml και 0,002mg/ml αντίστοιχα και η υπέρβαση αυτών των ορίων μπορεί να προκαλέσει χρόνιες διαταραχές της υγείας. Η πρόσληψη τοξικής δόσης ιόντων βαρέων μετάλλων μπορεί να επιφέρει από ήπια (πονοκεφάλους,κράμπες) εως σοβαρά συμπτώματα (στείρωση, εγκεφαλική βλάβη και θάνατο). Επιπλέον, μπορούν να προκληθούν τροφικές δηλητηριάσεις από την κατανάλωση τροφών που περιέχουν συσσωρευμένα μέταλλα Ni²⁺ και Co²⁺ (η μόνη απαίτηση του οργανισμού σε κοβάλτιο είναι ως συστατικό της βιταμίνης B₁₂). Η μόλυνση των τροφών οφείλεται κυρίως στην ρύπανση των ποταμών και των λιμνών, στην επαφή του τροφίμου με τα μηχανήματα επεξεργασίας και στη μόλυνση του πόσιμου νερού.

16

Μεγάλο ενδιαφέρον έχει η ανάπτυξη των "super-gelators", στα οποία απαιτείται πολύ μικρή ποσότητα πεπτιδίου για τον σχηματισμό της υδρογέλης (<0,1% w/v) και μπορούν να λειτουργήσουν ως απορριμματοσυλλέκτες για τα τοξικά μεταλλικά λύματα με οικονομικό και αποδοτικό τρόπο. Ένα παράδειγμα πεπτιδίου αυτής της κατηγορίας αποτελεί το H-Leu-Phe-OMe. Ωστόσο, στην δική μας περίπτωση μελετήθηκε το Fmoc-Phe-Leu-OH, το οποίο επίσης σχηματίζει υδρογέλες σε αρκετά χαμηλή συγκέντρωση (2mg/ml) και μέσω της αρωματικής προστατευτικής ομάδας (Fmoc) ενισχύεται ο σχηματισμός της αυτοοργανωμένης δομής του μέσω των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων.

1.6 Βιβλιογραφία

- Rita Giovannetti, "Use of Sectrophotometry UV-Vis for the study of Porphyrins", University of Camerino, Chemistry Section of School of Environmental Sciences, Camerino, Italy, Book "Macro To Nano Spectroscopy", Jamal Uddin, InTechOpen Publishing, Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia, 2012.
- Voet Donald, Judith Voet, Charlotte Pratt, "Βιοχημεία: Βασικές Αρχές σε μοριακό επίπεδο", Εκδόσεις Τζιόλα, Αθήνα, 2019, ISBN:9789604186280, 5^η έκδοση.
- Paula Judith Perez Espitia, Nilda de Fatima Ferreira Soares, Jane Selia dos Reis Coimbra, Nelio Jose de Andrade, Renato Souza Cruz, Eber Antonio Alves Medeiros (2012). Bioactive Peptides: Synthesis, Properties and Applications in the Packaging and Preservation of Food. 11(2), 187-204, doi:10.1111/j.1541-4337.2011.00179.x
- Dietzen, Dennis J.(2018). Principles and Applications of Molecular Diagnostics II Amino Acids, Peptides and Proteins., 345-380, doi:10.1016/B978-0-12-816061-9.00013-8
- 5. Gazit E. Self-assembled peptide nanostructures: The design of molecular building blocks and their technological utilization. Chem Soc Rev. 2007,36(8):1263–9.
- Awhida Salmah, Draper, Emily R., McDonald, Tom O., Adams, Dave J. (2015). Probing gelation ability for a library of dipeptides gelators. Journal of Colloid and Interface Science, 455, 24-31. Doi:10.1016/j.cis.2015.05.032
- Fichman G, Gazit E. Self-assembly of short peptides to form hydrogels: Design of building blocks, physical properties and technological applications. Acta Biomater,(2014) 10(4):1671–82.

- Li Fei, Han Jinsong, Cao Tian, William Lam, Fan Baoer, Wen Tang, Sijie Chen, Kin Lam Fok, Linxian Li (2019). Design of self-assembly dipeptide hydrogels and machine learning via their chemical features. Proceedings of the National Academy of Sciences, 201903376, doi:10.1073/pnas.1903376116
- Babatunde O. Okesola, Sindhu K. Suravaram, Alison Parkin, David K. Smith (2016). Selective extraction and In Situ Reduction of Precious Metal Salts from Model Waste To Generate Hybrid Gels with Embedded Electrocatalytic Nanoparticles. Angewandte Chemie International Edition, 55(1), 183-187, doi:10.1002/anie.201507684
- Mondal B, Bairagi D, Nandi N, Hansda B, Das K.S, Charlotte J.C. Edwards-gayle, Castelletto V, Ian W. Hamley, Banerjee A. (2020). "Peptide-based gel in environmental remediation: Removal of toxic organic dyes and hazardous Pb²⁺ and Cd²⁺ ions from wastewater and oil spill recovery", Langmuir, 36(43), pp. 12942–12953. doi: 10.1021/acs.langmuir.0c02205.
- Babatunde O. Okesola, David K. Smith (2016). "Applying low-molecular weight supermolecular gelators in an environmental setting-self-assembled gels as smart materials for pollutant removal". Chem. Soc. Rev. doi:10.1039/ C6CS00124F
- Nandi N., Baral A., Basu K., Roy S., Banerjee A., (2017). "A dipeptide-based superhydrogel: Removal of toxic dyes and heavy metal ions from waste water", Biopolymers, 108(1). doi: 10.1002/bip.22915
- 13. Β. Μακρόπουλος, Δ. Ματθόπουλος (2013) Αθήνα. "Δημόσια υγεία και φυτοπροστατευτικά προϊόντα", ΕΛ.ΙΝ.Υ.Α.Ε. ISBN: 978-960-6818-32-5

2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΙ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

2.1 Χρωματογραφία Στήλης^{8,9,10}

Η χρωματογραφία στήλης κατατάσσεται στην ευρύτερη κατηγορία της υγρής χρωματογραφίας στην οποία η στατική φάση μπορεί να είναι στερεή ή υγρή και η κινητή φάση είναι υγρή. Η χρωματογραφία στήλης βασίζεται στην αρχή διαχωρισμού των μορίων ενός μίγμα τοποθετημένα στην στατική φάση, τα οποία διαχωρίζονται μεταξύ τους καθώς συμπαρασύρονται από την ροή της κινητής φάσης. Ως στατική φάση μπορεί να χρησιμοποιηθούν τα υλικά (α) αγαρόζη, (β) κυτταρίνη, (γ) δεξτράνη και (γ) σίλικα, ανάλογα με τις ανάγκες του διαχωρισμού. Η κινητή φάση μπορεί να είναι ένας συγκεκριμένος διαλύτης ή μίγμα διαλυτών η οποία κινείται με την δύναμη της βαρύτητας. Συγκεκριμένα, η διαδικασία είναι η εξής:

Αρχικά, η στατική φάση τοποθετείται σε μια γυάλινη στήλη, πακετάρεται προσεκτικά και προστατεύεται στο πάνω μέρος από ένα λεπτό στρώμα άμμου. Προστίθεται το μίγμα προς διαχωρισμό και με την προσθήκη του διαλύτη έκλουσης (κινητή φάση) τα μόρια του μίγματος διαχωρίζονται καθώς μετακινούνται κατά μήκος της στήλης με διαφορετικές ταχύτητες εξαρτώμενες από την συγγένεια του κάθε μορίου ως προς την στατική και την κινητή φάση αντίστοιχα. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με την συλλογή διαφόρων κλασμάτων τα οποία αναλύονται με περεταίρω φασματοσκοπίες για την ταυτοποίηση των διαλυμένων ουσιών που εμπεριέχονται στο κάθε ένα από αυτά.



Εικόνα 2.1 Εικονική αναπαράσταση διαδικασίας διαχωρισμού μορίων ενός μίγματος με χρωματογραφία στήλης. Ελήφθη από την παραπομπή 10.

2.2 Φασματοσκοπία Ορατού-Υπεριώδους (UV-Vis)^{4,5,6}

Τα φάσματα UV-Vis λήφθηκαν σε φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV-1700 PharmaSpec και χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες χαλαζία με μήκος οπτικής διαδρομής 1cm.

Η φασματοφωτομετρία ορατού-υπεριώδους είναι μία φασματοσκοπική μέθοδος χημικής ανάλυσης που στηρίζεται στην αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας-ύλης και χρησιμοποιείται στην μελέτη της δομής, της κινητικής, στην ταυτοποίηση και την ποσοτική ανάλυση διαφόρων ενώσεων.

Η φασματοφωτομετρία ορατού-υπεριώδους βασίζεται στην διέλευση της ακτινοβολίας μέσω του διαλύματος εντός της κυψελίδας (προσπίπτουσα ακτινοβολία) μέρος της οποίας απορροφάται από την ουσία που περιέχεται στο διάλυμα και έπειτα εξέρχεται με χαμηλότερη ένταση(εξερχόμενη ακτινοβολία). Για να υπάρξει απορρόφηση θα πρέπει τα φωτόνια που προσκρούουν στο δείγμα να έχουν ενέργεια ίση με αυτή που απαιτείται για να προκληθεί μια κβαντισμένη ενεργειακή μεταβολή.



Εικόνα 2.2. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία *I*_o διέρχεται μέσω του διαλύματος εντός της κυψελίδας και εξέρχεται ως ακτινοβολία *I* μικρότερης έντασης. Ελήφθη από την Παραπομπή 6.

Η απορρόφηση της ακτινοβολίας από ένα δείγμα μπορεί να οδηγήσει σε ποσοτική ανάλυση του δείγματος. Η ποσοτική σχέση δίνεται από το νόμο Beer-Lambert.

Σύμφωνα με το νόμο Beer-Lambert η απορρόφηση Α είναι ανάλογη ως προς την συγκέντρωση C και δίνεται από την σχέση:

$$A = \varepsilon . b . C \qquad (1)$$

Α: απορρόφηση (δεν έχει μονάδες μέτρησης)

C: συγκέντρωση της ουσίας σε mol/L

b: μήκος οπτικής διαδρομής σε cm

ε: συντελεστής απορροφητικότητας σε M⁻¹cm⁻¹ (χαρακτηριστικό της ουσίας που δηλώνει πόσο φως απορροφάται σε συγκεκριμένο μήκος κύματος)

Επίσης, η απορρόφηση Α συνδέεται με την διαπερατότητα Τ με την εξής σχέση:

 $A = -\log(T) \quad (2)$

Η διαπερατότητα Τ ορίζεται ως το κλάσμα της ακτινοβολίας που διέρχεται από το δείγμα και παίρνει τιμές 0-1:

$$T = \frac{I}{I_0} \qquad (3)$$

Ι: προσπίπτουσα ακτινοβολία

Ιο: εξερχόμενη ακτινοβολία μικρότερης έντασης

Για να ισχύει ο νόμος του Beer-Lambert πρέπει να πλοιρούνται οι προϋποθέσεις:

- 1. Ο όγκος του διαλύματος να είναι ομοιόμορφος
- 2. Η ακτινοβολία να είναι μονοχρωματική
- Κάθε χημικό είδος πρέπει να απορροφά ανεξάρτητα και να μην αλληλοεπιδρά κατά την απορρόφηση
- 4. Το μοναδικό φαινόμενο να είναι η απορρόφηση

Το διάγραμμα της απορρόφησης Α σε σχέση με το μήκος κύματος λ της ακτινοβολίας αποτελεί το φάσμα απορρόφησης της ουσίας στο UV-Vis. Το μήκος κύματος της ακτινοβολίας στο οποίο παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση ονομάζεται λ_{max} και είναι το μήκος κύματος που χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ουσίας. Μόνο στην περιοχή λ_{max} μπορεί να εφαρμοστεί ο νόμος Beer-Lambert καθώς μόνο εκεί η τιμή του ε παραμένει σταθερή.



Εικόνα 2.3. Γραφική απεικόνιση της απορρόφησης Α ενός διαλύματος ως προς το μήκος κύμματος λ της ακτινοβολίας. Φάσμα απορρόφησης. Ελήφθη από την Παραπομπή 6.

Οι πορφυρίνες είναι γνωστά χρωμοφόρα, μακροκυκλικά μόρια τα οποία εμφανίζουν ισχυρές ταινίες απορρόφησης στην περιοχή του ορατού. Η ιδιότητα τους αυτή οφείλεται στο δομικό χαρακτηριστικό του εσωτερικού αρωματικού δακτυλίου με το συζυγιακό σύστημα 18π ηλεκτρονίων που διαθέτουν. Συγκεκριμένα, στο φάσμα απορρόφησης εμφανίζουν μία πολύ έντονη ταινία απορρόφησης που ονομάζεται Soret ή B-band στην περιοχή 380-500 nm, με μοριακό συντελεστή απορρόφησης αλλά και πάλι σημαντικής έντασης που ονομάζονται Q-bands στην περιοχή 500-700 nm, με μοριακό συντελεστή απορροφητικότητας της τάξη του 10⁴ M⁻¹cm⁻¹.



Εικόνα 2.4. Τυπικό φάσμα απορρόφησης μίας πορφυρίνης στο οποίο διακρίνονται η Soret -band και οι 4 Q-bands.

Οι πορφυρίνες εμφανίζουν έντονα χρώματα λόγω των μεταπτώσεων $\pi \to \pi^*$ του τετραπυρρολικού δακτυλίου. Για την εξήγηση των ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων στον πορφυρινικό δακτύλιο ο Gouterman δημιούργησε ένα θεωρητικό μοντέλο τεσσάρων τροχιακών. Οι μεταπτώσεις προέρχονται από δύο τροχιακά HOMO με συμμετρία a_{1u} και a_{2u} και δύο τροχιακά LUMO συμμετρίας e_g . Η Soret band οφείλεται στην μετάπτωση a_{1u} (π) $\to e_g^*$ (π) και οι Q bands οφείλονται στην μετάπτωση a_{2u} (π) $\to e_g^*(\pi)$.



Η διαφορά μεταξύ μίας ελεύθερης πορφυρίνης και μίας μεταλλοπορφυρίνης στο φάσμα Εικόνα 2.5. Ηλεκτρονιακή δομή πορφυρινών. Ελήφθη από την Παραπομπή 6.

άζωτα, ενώ η μεταλλοπορφυρίνη εμφανίζει μόνο δύο Q-bands υποδεικνύοντας την υψηλότερη συμμετρία D_{4h}, χαρακτηριστικό της συναρμογής της πορφυρίνης σε ένα μεταλλικό ιόν μέσω των τεσσάρων N-ετεροπυρήνων. Η Soret band σε κάθε περίπτωση μεταλλοπορφυρίνης μετατοπίζεται ελαφρώς ανάλογα με τους meso-υποκαταστάτες.



Εικόνα 2.6. Φάσμα απορρόφησης UV-Vis για μία ελεύθερη πορφυρίνη (a) και μία μεταλλωμένη (c) αντίστοιχα. Ελήφθη από την Παραπομπή 6.

2.3 Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Mass Spectroscopy ^{1,2,3}

Τα φάσματα μάζας υψηλής ανάλυσης λήφθηκαν μέσω του φασματόμετρου Bruker UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF.

Η φασματομετρία μάζας είναι μια αναλυτική τεχνική για την μελέτη της μάζας ατόμων, μορίων ή θραυσμάτων μορίων. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην παραγωγή ιόντων κατά τον ιονισμό του μόριο, την επιτάχυνσή τους από ένα ηλεκτρικό πεδίο και τον διαχωρισμό τους βάσει τον λόγο m/z, όπου m είναι η μάζα του ιόντος και z το φορτίο του ιόντος. Η προετοιμασία του δείγματος προς ανάλυση απαιτεί την ανάμειξη του με ένα διάλυμα μιας ενεργειακά απορροφητικής, οργανικής ένωσης που ονομάζεται μήτρα, σε κατάλληλο διαλύτη. Κατά την απομάκρυνση του διαλύτη, η μήτρα κρυσταλλώνεται οδηγώντας επίσης στην συν-κρυστάλλωση του δείγματος, το οποίο είναι παγιδευμένο μέσα σε αυτήν. Στη συνέχεια, το δείγμα εντός της μήτρας ιονίζεται μέσω UV ακτινοβολίας από μια δέσμη laser δημιουργώντας μεμονωμένα πρωτονιωμένα ιόντα. Τα πρωτονιωμένα ιόντα επιταχύνονται σε σταθερό δυναμικό, διαχωρίζονται με βάση την αναλογία μάζας προς φορτίο και ανιχνεύονται από ένα ανιχνευτή TOF-MS. Η αναλογία m/z ενός ιόντος μετράται προσδιορίζοντας τον χρόνο που χρειάζεται για να διανύσει το μήκος του σωλήνα πτήσης.



Εικόνα 2.7. Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του MALDI-TOF MS. Ελήφθη από την Παραπομπή 1.

Το MALDI-TOF MS έγινε ένα απαραίτητο εργαλείο στην ποιοτική και ποσοτική μελέτη μεγάλων βιομορίων όπως πεπτίδια, πρωτεΐνες, λιπίδια, πορφυρίνες κ.α με μεγάλο μοριακό βάρος (>200.000Da). Πολύ σημαντική είναι η χρήση μήτρας στην μέθοδο καθώς εξασφαλίζει την προστασία του δείγματος από τυχόν αποικοδόμηση λόγω της ακτινοβολίας του laser. Επίσης, η μήτρα έχει ισχυρή απορρόφηση στο μήκος κύματος εκπομπής του laser ώστε ο αναλύτης να μην απορροφά σημαντικά. Ακόμη, συμβάλλει στην δημιουργία των ιόντων και την ανίχνευση ενώσεων σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Γενικότερα, το MALDI-TOF MS αποτελεί μια μέθοδο υψηλής ευαισθησίας και σε συνδυασμό με τον ανιχνευτή TOF-MS ο χρόνος ανάλυσης είναι μικρός, το εύρος μαζών που μπορούν να μετρηθούν είναι αρκετά υψηλό και το φάσμα μάζας που προκύπτει έχει απλή ανάλυση σε σχέση με άλλες μεθόδους.

2.4 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) 11,12

Τα φάσματα NMR για τις πορφυρίνες H₂-TPP και TPP-NH₂ λήφθηκαν μέσω του φασματόμετρου Bruker AVANCE III-300MHz σε δευτεριωμένο διαλύτη χλωροφόρμιο και του πεπτιδίου Fmoc-F-L-OH λήφθηκε μέσω του φασματόμετρου Bruker AVANCE III-500MHz σε δευτεριωμένο διαλύτη DMSO.

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) είναι μια ποσοτική μέθοδος προσδιορισμού των μαγνητικών πυρήνων μιας ένωσης η οποία βρίσκεται υπό την επίδραση ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου με το οποίο προσανατολίζονται ανάλογα. Όλοι οι πυρήνες έχουν φορτίο καθώς περιέχουν πρωτόνια και ένα περιστρεφόμενο φορτίο παράγει ένα μικρό τοπικό μαγνητικό πεδίο (Η). Τέτοια πυρηνικά μαγνητικά δίπολα χαρακτηρίζονται από τον πυρηνικό μαγνητικό κβαντικό αριθμό spin (I) ο οποίος παίρνει τιμές 0, 1/2, 1, 3/2 κλπ. Οι δύο σημαντικότεροι πυρήνες στην φασματοσκοπία NMR, που είναι είναι το 1 H και το μη ραδιενεργό ισότοπο του άνθρακα ο 13 C, έχουν I=1/2 και επομένως έχουν μη μηδενική μαγνητική ροπή και έτσι μπορούν να παρατηρηθούν στο NMR. Όπως αναφέρθηκε, η τεχνική αυτή στηρίζεται στην εφαρμογή ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου στην ένωση που μελετάται, με αποτέλεσμα τα σπιν των μαγνητικών πυρήνων να προσανατολίζονται είτε παράλληλα είτε αντιπαράλληλα ως προς αυτό. Αυτοί οι δύο προσανατολισμοί θα έχουν διαφορετική ενέργεια και επομένως καθίσταται δυνατή η απορρόφηση ενέργειας (ΔΕ) κατάλληλης συχνότητας (ν) με αποτέλεσμα την «αναστροφή σπιν» σύμφωνα με την εξίσωση $\Delta E = v h$ (h: σταθερά Planck). Κάθε πυρήνας προασπίζεται ή αποπροασπίζεται από τα ηλεκτρόνια που τον περιβάλλουν, με βάση το πως αισθάνεται την επίδραση του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου και έτσι έχουν μια διαφορετική χημική μετατόπιση στο φάσμα. Το αριστερό τμήμα του φάσματος είναι περιοχή χαμηλού πεδίου και το δεξί είναι η περιοχή υψηλού πεδίου καθώς η ισχύ του εφαρμοζόμενου πεδίου αυξάνεται από αριστερά προς τα δεξιά.

Η φασματοσκοπία NMR εξετάζει την ταυτοποίηση της δομής διαφόρων απλών και περίπλοκων μορίων παρέχοντας πληροφορίες για (α) τον μοριακό τύπο της ένωσης από τον αριθμό των κορυφών στο φάσμα (β) την στερεοχημική διάταξη του ανθρακικού σκελετού με τα υδρογόνα από

την χημική μετατόπιση των κορυφών (γ) το πλήθος των πρωτονίων και τυχόν ομάδες (π.χ -CH₃ κ.α) από την ολοκλήρωση των κορυφών και (δ) γειτονικά υδρογόνα ή άνθρακες λόγω σχάσης του σήματος.

2.5 Βιβλιογραφία

- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Virdi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Frontiers in Microbiology, 6.
- 2. Φασματοσκοπία Μάζας MS-TOF, Γιάννης Μαργαρός
- Smolira, Anna; Wessely-Szponder, Joanna (2015). Importance of the Matrix and the Matrix_Sample Ratio in MALDI-TOF-MS Analysis of Cathelicidins Obtained from Porcine Neutrophils _ 10.1007_s12010-014-1405-1
- Φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), Εργαστηριακές ασκήσεις ενόργανης ανάλυσης τροφήμων (Εξάμηνο ΣΤ').
- Αθανάσιος Ζαρκαδουλας (2013), Σύνθεση και μελέτη χρωμοφόρων. Εφαρμογή τους στη φωτοκαταλυτική διάσπαση του νερού. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης.
- Rita Giovannetti, "Use of Sectrophotometry UV-Vis for the study of Porphyrins", University of Camerino, Chemistry Section of School of Environmental Sciences, Camerino, Italy, Book "Macro To Nano Spectroscopy", Jamal Uddin, InTechOpen Publishing, Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia, 2012.
- Εργαστηριακές ασκήσεις Αναλυτικής Χημείας, Εισήγηση για το Φασματοφωτόμετρο, OpenEclass,
- Clark J.M., Switzer R.L., "Πειραματική Βιοχημεία", 1^η έκδοση, 2007, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, ISBN:960-7309-25-1
- Coskun, Ozlem (2016). Separation Tecniques: CHROMATOGRAPHY. Northern Clinics of Istanbul. doi:10.14744/nci.2016.32757
- 10. "Adsorption Chromatography", ChemBAM-Bringing chemistry to life, University of Birmingham, UK.

- L.D. Field, S. Sternhell, J.R. Kalman, H.L. Li, A.M. Magill, "Προσδιορισμός της Δομής Οργανικών Ενώσεων με Φασματοσκοπικές Μεθόδους", Εκδόσεις Utopia (2017), ISBN:978-618-5173-19-7
- 12. Jhon McMurry, "Οργανική Χημεία", Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (2015)

3. ΣΥΝΘΕΣΗ

3.1 Σύνθεση τετραφαίνυλο-πορφυρίνης (H2-TPP)



Σχήμα 1. Αντίδραση σχηματισμού της Η2-ΤΡΡ

Πίνακας 1. Δεδομένο	ι αντίδρασης	σχηματισμού	της H_2 -TPP
----------------------------	--------------	-------------	----------------

Substance	M (g/mol)	m (gr)	n (moles)	V (ml)	eq	d (g/mol)
Benzaldehyde	106.12	11.46	0.108	10.97	4	1.044
Pyrrole	67.09	7.25	0.108	7.49	4	0.967
Propionic acid	74.08			400		0.993
H ₂ -TPP					1	

Σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη των 1000 ml προστίθενται 11 ml βενζαλδεϋδης και 400 ml προπιονικό οξύ. Το σύστημα βυθίζεται σε ελαιόλουτρο και αφήνεται υπό ανάδευση σε συνθήκες reflux εως ότου η θερμοκρασία φτάσει στους 110°C . Έπειτα, η σφαιρική περιτυλίγεται με αλουμινόχαρτο και προστίθενται στάγδην 7,5ml πυρρολίου στο μίγμα και αφήνεται υπό ανάδευση σε συνθήκες reflux (>150°C) για περίπου 3 ώρες. Στη συνέχεια, το μίγμα αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθενται 400 ml απιονισμένο H₂O, 10 ml μεθανόλης και η σφαιρική τοποθετείται στο ψυγείο για όλο το βράδυ ώστε να καταβυθιστεί η πορφυρίνη. Πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό στο μίγμα και κρατείται το ίζημα στο οποίο πραγματοποιούνται 7 εκπλύσεις με H₂O καθώς

και 4-5 εκπλύσεις με μεθανόλη προς απομάκρυνση όσο το δυνατόν περισσότερων πυρρολικών. Το ίζημα στον ηθμό αφήνεται για ξήρανση στον φούρνο ξήρανσης για όλο το βράδυ σε θερμοκρασία 60°C. Για 2,5 gr ιζήματος πραγματοποιείται κολώνα φιλτραρίσματος με στατική φάση silica και διαλύτη CH₂Cl₂. Στη συνέχεια, γίνονται εκπλύσεις υπό κενό με μεθανόλη του στερεού προς περαιτέρω απομάκρυνση των πυρρολικών και ξήρανση του ιζήματος στον φούρνο ξήρανσης για όλο το βράδυ σε θερμοκρασία 30°C.

3.2 Σύνθεση Μονοάμινο-τετραφαινυλοπορφυρίνης (TPP-NH₂)



Σχήμα 2. Αντίδραση σχηματισμού της TPP-NH₂

Πί	νακας 2.	Δεδομένα	αντίδρασης	σχηματισμού	ο της ΤΡΡ-ΝΗ ₂
----	----------	----------	------------	-------------	---------------------------

Substance	M (g/mol)	m (gr)	n (moles)	V (ml)	eq	d (g/mol)
TPP	614.74	1.4837	2.4135		1	
HNO3	63.01	9.211	146.18	6.1	60.6	1.51
SnCl ₂	189.60	4.0064	21.131			
HCl (36%)	36.46	82.60	2265.5	70		1.18
NH ₃ (25%)	17.031	75.53	4434.9	83		0.91
CH ₂ Cl ₂	84.93			260		1.33

Σε σφαιρική φιάλη των 1000ml προστίθενται 1,4837g H₂-TPP και 260ml CH₂Cl₂ και τοποθετείται σε παγόλουτρο. Στη συνέχεια, προστίθενται στάγδην 6,1ml HNO₃ και παρατηρείται χρωματική

μεταβολή του διαλύματος από μωβ σε πράσινο. Το παγόλουτρο αφαιρείται και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για 3 ώρες. Κατά την διάρκεια της αντίδρασης πραγματοποιούνται τεστ με silica-TLC σε διαλύτη CH₂Cl₂/Hexane 6:4 για την παρακολούθηση της αντίδρασης, τα spots εξουδετερώνονται κάθε φορά πριν το τεστ με ατμούς αμμωνίας. Μετά το τέλος της αντίδρασης ακολουθεί εξουδετέρωση του διαλύματος με 250ml NaHCO3 και ρύθμιση του pH περίπου στο 8. Ακολούθως, προστίθενται περίπου 60ml H₂O. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται εκχυλίσεις με CH₂Cl₂ και H₂O σε διαχωριστική χράνη των 1000ml με σκοπό την απομάκρυνση της υδατικής φάσης. Η οργανική φάση συλλέγεται και αποστάζεται μέχρι ξηρού. Μετά την απόσταξη προστίθενται στη σφαιρική 4,0064g SnCl2 και 70ml HCl (36%), εμβαπτίζεται σε ελαιόλουτρο και το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση σε συνθήκες reflux στους 80°C για όλο το βράδυ. Στη συνέγεια εξουδετερώνεται το διάλυμα με 83ml NH₃ (25%) και ρύθμιση του pH σε ελαφρώς βασικό. Το μίγμα αφήνεται και πάλι υπό ανάδευση σε συνθήκες reflux στους 60°C για όλο το βράδυ. Το μίγμα αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση και μεταφέρεται σε κωνική φιάλη των 1000ml στην οποία προστίθενται επίσης 180ml CH₂Cl₂ και 120ml H₂O και αφήνεται υπό ανάδευση για περίπου 3 μέρες. Πραγματοποιούνται εκχυλίσεις με CH2Cl2 και H2O σε διαχωριστική χοάνη των 1000ml με σκοπό την απομάκρυνση της υδατικής φάσης. Η οργανική φάση συλλέγεται και αποστάζεται μέχρι ξηρού. Έπειτα, πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης-φιλτραρίσματος με διαλύτη CH2Cl2 και στατική φάση silica προς απομάκρυνση των αλάτων. Ακολούθως, πραγματοποιείται μία δεύτερη γρωματογραφία στήλης με διαλύτη CH2Cl2/Hexane 6:4 με μικρή πολικότητα προς απομάκρυνση της H2-TPP και έπειτα της TPP-NO2. Στη συνέχεια, χρησιμοποιείται διαλύτης μεγαλύτερης πολικότητας CH2Cl2/Hexane 8:2 προς απομάκρυνση της TPP-NH₂. Τα κλάσματα που συλλέγονται αποστάζουν μέχρι ξηρού.

3.3 Σύνθεση διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH



Σχήμα 3. Αντίδραση σχηματισμού διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH

Substance	M (g/mol)	m (gr)	n (moles)	V (ml)	eq	d (g/mol)
H-Leu-OH	131.2	80	1.287		1.5	
NaHCO ₃	84.01	110	2.574		3	
Fmoc-Phe-OSu	484.51	207	0.858		1	
THF	72.11			5		0.8876
H ₂ O	18.015			5		0.997

Πίνακας 3. Δεδομένα αντίδρασης σχηματισμού του Fmoc-Phe-Leu-OH

Διαλύονται 80mg αμινοξέος H-Leu-OH σε 5ml υδατικό διάλυμα που περιέχει 110g NaHCO₃. Αντίστοιχα, διαλύονται 207mg Fmoc-Phe-OSu σε 5ml THF. Τα δύο αυτά διαλύματα αναμειγνύονται μεταξύ τους και αφήνονται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται εκχυλίσεις με 50ml ethyl acetate και 50ml HCl, η οργανική φάση συλλέγεται και η υδατική εκπλένεται περαιτέρω με άλλα 50ml ethyl acetate. Έπειτα, η οργανική φάση εκπλένεται με 50ml υδατικό διάλυμα NaCl, συλλέγεται η οργανική φάση και το προϊόν απομονώνεται μετά την απομάκρυνση του του ethyl acetate. Στη συνέχεια, πραγματοποείται ανακρυστάλλωση με CH₂Cl₂/Heptane. Το ίζημα απομονώνεται με διήθηση υπό κενό και ο ηθμός μεταφέρεται στον φούρνο ξήρανσης overnight. Το προϊόν λειοτριβείται σε γουδί ώστε να μετατραπείσε σκόνη και φυλάσσεται σε προζυγισμένο vial.

3.4 Χαρακτηρισμός Ενώσεων

3.4.1 Τετραφαίνυλο-πορφυρίνη (H2-TPP)



Σχήμα 1. Φάσμα μάζας (MALDI) της τετραφαίνυλο-πορφυρίνης (TPP-H₂) με μοριακό βάρος 614,74g/mol, εμφάνιση κορυφής του μοριακού ιόντος με μάζα 613,88g/mol.



Σχήμα 2. Φάσμα ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) της τετραφαίνυλο-πορφυρίνης (TPP-H₂), διακρίνονται με χρώματα τα διαφορετικά υδρογόνα της ένωσης και οι αντίστοιχες κορυφές τους.



Σχήμα 3. Φάσμα απορρόφησης UV-Vis της H₂-TPP. Διακρίνεται η μεγάλης έντασης Sorret-band στην περιοχή 380-500 nm και οι 4 χαμηλότερης έντασης Q-bands στην περιοχή 500-700.



3.4.2 Μονοάμινο-τετραφαινυλοπορφυρίνη (TPP-NH2)

Σχήμα 4. Φάσμα μάζας (MALDI) της μονοάμινο-πορφυρίνης (TPP-NH₂), κορυφή μοριακού ιόντος με μάζα 628,88g/mol.



Σχήμα 5. Φάσμα ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) της μονοάμινο-πορφυρίνης (TPP-NH₂), φαίνονται με χρώμα τα διαφορετικά υδρογόνα της ένωσης και οι αντίστοιχες κορυφές τους.



Σχήμα 6. Φάσμα απορρόφησης UV-Vis της TPP-NH₂. Διακρίνεται η μεγάλης έντασης Sorretband στην περιοχή 380-500 nm και οι 4 χαμηλότερης έντασης Q-bands στην περιοχή 500-700.

3.4.3 Διπεπτίδιο Fmoc-Phe-Leu-OH



Σχήμα 7. Φάσμα ¹H-NMR (300MHz, $(CD_3)_2SO$) του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH, φαίνονται με χρώμα τα διαφορετικά υδρογόνα της ένωσης και οι αντίστοιχες κορυφές τους.



Σχήμα 8. Φάσμα απορρόφησης UV-Vis του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH, εμφανίζει κορυφές στην περιοχή 200-350nm.

4. ΑΥΤΟΟΡΓΑΝΩΣΗ ΔΙΠΕΠΤΙΔΙΟΥ Fmoc-Phe-Leu-OH

4.1 Σχηματισμός υδρογελών

Το διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH έχει την ικανότητα να σχηματίζει αυτοοργανωμένες δομές υδρογέλης με την τεχνική του «καλού-κακού» διαλύτη. Συγκεκριμένα, τον "καλό" διαλύτη αποτελεί το αποτελεί η αιθανόλη στην οποία διαλύεται το διπεπτίδιο, ενώ τον "κακό" διαλύτη αποτελεί το νερό στο οποίο δεν διαλύεται το διπεπτίδιο και έτσι επάγεται η αυτοοργάνωση του πεπτιδίου σε δίκτυο ινιδίων στο οποίο εγκλωβίζεται νερό φτιάχνοντας την υδρογέλη. Οι βέλτιστες παραμέτροι για τον σχηματισμό της υδρογέλης είναι η συγκέντρωση 2mg/ml διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH σε αναλογία 3:7 αιθανόλη/νερό. Ωστόσο, για την διάλυση του διπεπτιδίου στην αιθανόλη χρειάστηκε χρήση υπερήχων για 2 λεπτά. Επίσης, οι βέλτιστες συνθήκες για τον σχηματισμό των gel είναι σε θερμοκρασία δωματίου και σε scaffolds των 10ml στα οποία αφήνονται για 24 ώρες ώστε να ολοκληρωθεί πλήρως η διαδικασία του gelation.



Σχήμα 4.1.1. Διαδικασία σχηματισμού υδρογελών του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH συγκέντρωσης 2mg/ml και όγκου 1ml σε αναλογία διαλυτών 3:7 αιθανόλη/νερό.

5. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

5.1 Δέσμευση μεταλλικών ιόντων από τις υδρογέλες Fmoc-Phe-Leu-OH

Παρασκευάστηκαν stock υδατικά διαλύματα μεταλλικών ιόντων Νικελίου (Ni²⁺) και Κοβαλτίου (Co²⁺) σε falcon των 50ml σε διάφορες συγκεντρώσεις οι οποίες μελετήθηκαν για την εύρεση της βέλτιστης. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής stock διαλύματα:

- i. NiCl₂.6H₂O 0,1M
- ii. NiCl₂.6H₂O 0,05M
- iii. NiCl₂.6H₂O 0,15M
- iv. CoCl₂.6H₂O 0,1M
- v. CoCl₂.6H₂O 0,05M
- vi. CoCl₂.6H₂O 0,2M

Έπειτα, παρασκευάστηκαν σε scaffolds των 10ml δύο υδρογέλες (x3) Fmoc-Phe-Leu-OH συγκέντρωσης 2mg/ml και όγκου 1ml σε αναλογία διαλυτών 3:7 αιθανόλη/νερό. Στα scaffolds παρέμειναν για 24 ώρες ώστε να ολοκληρωθεί πλήρως η διαδικασία του gelation. Στη συνέχεια, τα gels τοποθετήθηκαν σε well-plates 4x3 και προστέθηκε σε αυτά 1ml από το κάθε stock διάλυμα ως υπερκείμενο. Η επιλογή της τοποθέτησης των gels σε well-plates έγινε για την καλύτερη επαφή της υδρογέλης με το υπερκείμενο υγρό από όλες τις πλευρές της ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή προσρόφηση των μεταλλικών ιόντων.

Έπειτα, υποβλήθηκαν σε ήπια ανάδευση (120rpm) καθ'όλη την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, η οποία έχει διάρκεια μέχρι και 72 ώρες. Οπτικά, παρατηρείται η προσρόφηση των μεταλλικών ιόντων από την υδρογέλη από την πρώτη κιόλας ώρα. Προς επιβεβαίωση του φαινομένου αυτού λήφθηκαν φάσματα UV-Vis των υπερκείμενων διαλυμάτων στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες. Μέσω των φασμάτων παρακολουθείται η απορρόφηση των υπερκείμενων διαλυμάτων η οποία πρέπει να μειώνεται με την πάροδο του χρόνου καθώς όλο και περισσότερα ιόντα μετάλλων δεσμεύονται από την υδρογέλη. Τα φάσματα UV-Vis λήφθηκαν σε κυψελίδες χαλαζία και σε εύρος μήκους κύματος 300-800nm. Η χαρακτηριστική κορυφή μέγιστης απορρόφησης του νικελίου βρίσκεται σε λ_{max}= 394nm και του κοβαλτίου σε λ_{max}= 511nm.

Το διάλυμα μεταλλικών ιόντων που λαμβάνεται για την λήψη του φάσματος απορρόφησης στην συνέχεια επιστρέφει πίσω στο well-plate ως υπερκείμενο. Για τον υπολογισμό της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων έγινε χρήση πρότυπων καμπύλων απορρόφησης ως προς συγκέντρωση σε

mg/ml (Παραρτήματα, Σχήμα 1 και 2). Η ικανότητα της υδρογέλης να απορροφά τα μεταλλικά ιόντα υπολογίζεται από την σχέση:

```
Loading efficiency = \frac{initial \ metal \ ions \ -unabsorbed \ metal \ ions}{initial \ metal \ ions} \ x \ 100\%
```

Φάσματα UV-Vis για τα διάφορα stock διαλύματα:

Stock υδατικά διαλύματα μεταλλικών ιόντων συγκέντρωσης 0,1M:



Γράφημα 1. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για το υδατικό διάλυμα NiCl₂ 0,1M στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες.



Γράφημα 2. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για το υδατικό διάλυμα CoCl₂ 0,1M στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες.

Stock υδατικά διαλύματα μεταλλικών ιόντων συγκέντρωσης 0,05M:



Γράφημα 3. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για το υδατικό διάλυμα NiCl₂ 0,05M στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες.



Γράφημα 4. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για το υδατικό διάλυμα CoCl₂ 0,05M στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες.



Stock υδατικού διαλύματος μεταλλικών ιόντων Ni²⁺ συγκέντρωσης 0,15M:

Γράφημα 5. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για το υδατικό διάλυμα NiCl₂ 0,15M στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες.

Stock υδατικού διαλύματος μεταλλικών ιόντων Co²⁺ συγκέντρωσης 0,2M:



Γράφημα 6. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για το υδατικό διάλυμα CoCl₂ 0,2M στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες.

5.2 ΕΠΑΝΑΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΥΔΡΟΓΕΛΩΝ

5.2.1 Χρήση διαιθυλαιθέρα (Et₂O)

Παρασκευάστηκαν σε scaffolds των 10ml δύο υδρογέλες (x3) Fmoc-Phe-Leu-OH συγκέντρωσης 2mg/ml και όγκου 1ml σε αναλογία διαλυτών 3:7 αιθανόλη/νερό. Χρειάστηκαν 24 ώρες ώστε να ολοκληρωθεί πλήρως η διαδικασία του gelation. Στη συνέχεια, τα gels τοποθετήθηκαν σε wellplates 4x3 και προστέθηκε σε τρία από αυτά 1ml από το διάλυμα NiCl₂ 0.1M και στα άλλα τρία 1ml από το διάλυμα CoCl₂ 0.1M ως υπερκείμενο. Έπειτα, υποβλήθηκαν σε ήπια ανάδευση (120rpm) καθ'όλη την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, η οποία έχει διάρκεια μέχρι και 72 ώρες.

Λήφθηκαν φάσματα UV-Vis ώστε να προσδιοριστεί η ποσότητα μεταλλικών ιόντων που απορροφήθηκε από τις υδρογέλες στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες. Μετά το πέρας των 72 ωρών τα gels μεταφέρθηκαν σε προζυγισμένα eppendorfs μαζί με το υπερκείμενο διάλυμα μεταλλικών ιόντων. Προστέθηκε μικρή ποσότητα κρύου Et₂O προς διάλυση του gel με την χρήση vortex και υπερήχων (sonication). Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των δύο φάσεων και η διαλυτοποίηση του gel, με το διπεπτίδιο να περνά στην πάνω οργανική φάση του Et₂O ενώ τα μεταλλικά ιόντα να μένουν στην κάτω υδατική φάση. Έπειτα, συλλέχθηκε η κάτω υδατική φάση από το κάθε eppendorf και μεταφέρθηκε σε ένα άλλο eppendorf. Στα eppendorfs με την οργανική φάση εξατμίστηκε ο διαλύτης Et₂O και τοποθετήθηκαν στον φούρνο ξήρανσης overnight προς ξήρανση των πεπτιδίων. Μετά την ξήρανση ζυγίστηκαν και πάλι τα eppendorfs και υπολογίστηκε η μάζα (σε mg) του κάθε διπεπτιδίου. Στην συνέχεια, έγινε εκ νέου η διαδικασία του gelation για το κάθε ανακτώμενο πεπτίδιο με τον ίδιο τρόπο (σε αναλογία διαλυτών 3:7 αιθανόλη/νερό, 24h για ολοκλήρωση του gelation) και η διαδικασία επαναλήφθηκε με την προσθήκη νέων διαλυμάτων μεταλλικών ιόντων NiCl₂ 0.1M και CoCl₂ 0.1M.

Στόχος της συγκεκριμένης διαδικασίας ήταν η μελέτη της ικανότητας των υδρογελών του Fmoc-Phe-Leu-OH (α) να επαναχρησιμοποιούνται, (β) να δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα και πόση ποσότητα μπορούν να δεσμεύουν σε κάθε κύκλο χρήσης και (γ) μέχρι πόσες φορές μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν και να είναι λειτουργικές. Για τον υπολογισμό της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων έγινε χρήση πρότυπων καμπύλων απορρόφησης ως προς συγκέντρωση σε mg/ml.



Εικόνα 5.2.1 Gels και υπερκείμενα διαλύματα μέσα στα eppendorfs. Φαίνονται κομμάτια της υδρογέλης που ακόμη δεν έχει διαλυθεί. Διάλυμα ιόντων Ni²⁺ (αριστερά) και διάλυμα ιόντων Co²⁺ (δεξιά).



Εικόνα 5.2.2 Μετά την προσθήκη του Et₂O και την διαδικασία διάλυσης της υδρογέλης. Φαίνεται ο διαχωρισμός των δύο φάσεων (πάνω οργανική και κάτω υδατική φάση). Διάλυμα ιόντων Ni²⁺ (αριστερά) και διάλυμα ιόντων Co²⁺ (δεξιά).



Εικόνα 5.2.3. Απομάκρυνση και μεταφορά της υδατικής φάσης (χρωματισμένη) σε νέο eppendorf Διάλυμα ιόντων Ni^{2+} (αριστερά) και διάλυμα ιόντων Co^{2+} (δεξιά).



Εικόνα 5.2.4. Ανακτώμενο διπεπτίδιο μετά την εξάτμιση του Et2O και την ξήρανση του διπεπτιδίου.

5.2.2 Χρήση EDTA

Παρασκευάστηκαν σε scaffolds των 10ml δύο υδρογέλες (x3) Fmoc-Phe-Leu-OH συγκέντρωσης 2mg/ml και όγκου 1ml σε αναλογία διαλυτών 3:7 αιθανόλη/νερό. Χρειάστηκαν 24 ώρες ώστε να ολοκληρωθεί πλήρως η διαδικασία του gelation. Στη συνέχεια, τα gels τοποθετήθηκαν σε wellplates 4x3 και προστέθηκε σε τρία από αυτά 1ml από το διάλυμα NiCl₂ 0.1M και στα άλλα τρία 1ml από το διάλυμα CoCl₂ 0.1M ως υπερκείμενο. Έπειτα, υποβλήθηκαν σε ήπια ανάδευση (120rpm) καθ'όλη την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, η οποία έχει διάρκεια μέχρι και 72 ώρες.

Λήφθηκαν φάσματα UV-Vis ώστε να προσδιοριστεί η ποσότητα μεταλλικών ιόντων που απορροφήθηκε από τις υδρογέλες στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες. Μετά το πέρας των 72 ωρών τα υπερκείμενα των μεταλλικών ιόντων απομακρύνθηκαν και ακολούθησαν πλύσεις με διάλυμα EDTA 0.05M για 48 ώρες. Σκοπός της προσθήκης του διαλύματος EDTA ήταν η δέσμευση των μεταλλικών ιόντων που έχει απορροφήσει η υδρογέλη χωρίς την καταστροφή της, όπως δηλαδή συνέβαινε στην διαδικασία του Et₂O κατά την οποία είχαμε πλήρη διάλυση του gel. Έπειτα, ακολούθησαν πλύσεις με H₂O για 48 ώρες προς την πλήρη απομάκρυνση του EDTA. Στη συνέχεια, προστέθηκαν στα πηγάδια νέα διαλύματα μεταλλικών ιόντων NiCl₂ 0.1M και CoCl₂ 0.1M και η διαδικασία επαναλήφθηκε.

Στόχος της συγκεκριμένης διαδικασίας ήταν η μελέτη της ικανότητας των υδρογελών του Fmoc-Phe-Leu-OH (α) να επαναχρησιμοποιούνται, (β) να δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα και πόση ποσότητα μπορούν να δεσμεύουν σε κάθε κύκλο επαναχρησιμοποίησης και (γ) μέχρι πόσες φορές μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν μέχρι να αποδομηθούν. Για τον υπολογισμό της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων έγινε χρήση πρότυπων καμπύλων απορρόφησης ως προς συγκέντρωση σε mg/ml.



Εικόνα 5.2.5. (a) Οι υδρογέλες μετά το πέρας των 72 ωρών στα υδατικά διαλύματα των μεταλλικών ιόντων. Διάλυμα ιόντων Ni²⁺ (αριστερά) και διάλυμα ιόντων Co²⁺ (δεξιά) (b) Οι υδρογέλες μόλις προστέθηκε το διάλυμα EDTA 0.05M (c) Οι υδρογέλες μετά το περας λίγων ωρών από όταν προστέθηκε το EDTA. Φαίνεται ο χρωματισμός του διαλύματος EDTA που σημαίνει την απομάκρυνση των μεταλλικών ιόντων από τις υδρογέλες (d) Οι υδρογέλες μετά το H₂O, εμφανής απομάκρυνση όλων των μεταλλικών ιόντων από τις υδρογέλες οι οποίες και αποχρωματίστηκαν σχεδόν εντελώς.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:

ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕ ΤΟΝ Et₂O: A' ΣΕΙΡΑ:



Σχήμα 1. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για τα υδατικά διαλύματα NiCl₂ 0.1M (αριστερά) και CoCl₂ 0.1M (δεξιά) στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες για τον 1° κύκλο χρήσης των υδρογελών του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH.



Σχήμα 2. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για τα υδατικά διαλύματα NiCl₂ 0.1M (αριστερά) και CoCl₂ 0.1M (δεξιά) στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες για τον 2° κύκλο χρήσης των υδρογελών του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH.

Β' ΣΕΙΡΑ:



Σχήμα 3. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για τα υδατικά διαλύματα NiCl₂ 0.1M (αριστερά) και CoCl₂ 0.1M (δεξιά) στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες για τον 1° κύκλο χρήσης των υδρογελών του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH.



Σχήμα 4. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για τα υδατικά διαλύματα NiCl₂ 0.1M (αριστερά) και CoCl₂ 0.1M (δεξιά) στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες για τον 2° κύκλο χρήσης των υδρογελών του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH.



Σχήμα 5. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για τα υδατικά διαλύματα NiCl₂ 0.1M (αριστερά) και CoCl₂ 0.1M (δεξιά) στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες για τον 1° κύκλο χρήσης των υδρογελών του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH.



Σχήμα 6. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για τα υδατικά διαλύματα NiCl₂ 0.1M (αριστερά) και CoCl₂ 0.1M (δεξιά) στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες για τον 2° κύκλο χρήσης των υδρογελών του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕ ΤΟ ΕDTA:



Σχήμα 7. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για τα υδατικά διαλύματα NiCl₂ 0.1M (αριστερά) και CoCl₂ 0.1M (δεξιά) στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες για τον 1° κύκλο χρήσης των υδρογελών του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH.



Σχήμα 8. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για τα υδατικά διαλύματα NiCl₂ 0.1M (αριστερά) και CoCl₂ 0.1M (δεξιά) στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες για τον 2° κύκλο χρήσης των υδρογελών του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH.



Σχήμα 9. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για τα υδατικά διαλύματα NiCl₂ 0.1M (αριστερά) και CoCl₂ 0.1M (δεξιά) στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες για τον 3° κύκλο χρήσης των υδρογελών του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH.



Σχήμα 10. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για τα υδατικά διαλύματα NiCl₂ 0.1M (αριστερά) και CoCl₂ 0.1M (δεξιά) στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες για τον 4° κύκλο χρήσης των υδρογελών του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH.



Σχήμα 11. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για τα υδατικά διαλύματα NiCl₂ 0.1M (αριστερά) και CoCl₂ 0.1M (δεξιά) στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες για τον 1° κύκλο χρήσης των υδρογελών του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH.



Σχήμα 12. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για τα υδατικά διαλύματα NiCl₂ 0.1M (αριστερά) και CoCl₂ 0.1M (δεξιά) στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες για τον 2° κύκλο χρήσης των υδρογελών του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH.



Σχήμα 13. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για τα υδατικά διαλύματα NiCl₂ 0.1M (αριστερά) και CoCl₂ 0.1M (δεξιά) στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες για τον 3° κύκλο χρήσης των υδρογελών του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH.



Σχήμα 14. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για τα υδατικά διαλύματα NiCl₂ 0.1M (αριστερά) και CoCl₂ 0.1M (δεξιά) στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες για τον 4° κύκλο χρήσης των υδρογελών του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH.





Σχήμα 15. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για τα υδατικά διαλύματα NiCl₂ 0.1M (αριστερά) και CoCl₂ 0.1M (δεξιά) στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες για τον 1° κύκλο χρήσης των υδρογελών του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH.



Σχήμα 16. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για τα υδατικά διαλύματα NiCl₂ 0.1M (αριστερά) και CoCl₂ 0.1M (δεξιά) στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες για τον 2° κύκλο χρήσης των υδρογελών του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH.



Σχήμα 17. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για τα υδατικά διαλύματα NiCl₂ 0.1M (αριστερά) και CoCl₂ 0.1M (δεξιά) στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες για τον 3° κύκλο χρήσης των υδρογελών του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH.



Σχήμα 18. Φάσματα απορρόφησης UV-Vis για τα υδατικά διαλύματα NiCl₂ 0.1M (αριστερά) και CoCl₂ 0.1M (δεξιά) στις 0, 1, 5, 10, 24, 48 και 72 ώρες για τον 4° κύκλο χρήσης των υδρογελών του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH.



Γράφημα 1. Γραφική απεικόνιση του ποσοστού των ιόντων Ni^{2+} (αριστερά) και Co^{2+} (δεξιά) που απορροφήθηκε από την υδρογέλη, σε κάθε κύκλο επαναχρησιμοποίησης για την A, B και Γ σειρά πειραμάτων με την μέθοδο του Et₂O.



Γράφημα 2. Γραφική απεικόνιση του ποσοστού των ιόντων Ni²⁺ που απορροφήθηκε από την υδρογέλη, σε κάθε κύκλο επαναχρησιμοποίησης με την μέθοδο του Et₂O.



Γράφημα 3. Γραφική απεικόνιση του ποσοστού των ιόντων Co²⁺ που απορροφήθηκε από την υδρογέλη, σε κάθε κύκλο επαναχρησιμοποίησης με την μέθοδο του Et₂O.



Γράφημα 4. Γραφική απεικόνιση του ποσοστού των ιόντων Ni^{2+} (αριστερά) και Co^{2+} (δεξιά) που απορροφήθηκε από την υδρογέλη, σε κάθε κύκλο επαναχρησιμοποίησης για την A, B και Γ σειρά πειραμάτων με την μέθοδο του EDTA.



Γράφημα 5. Γραφική απεικόνιση του ποσοστού των ιόντων Ni²⁺ που απορροφήθηκε από την υδρογέλη, σε κάθε κύκλο επαναχρησιμοποίησης με την μέθοδο του EDTA.



Γράφημα 6. Γραφική απεικόνιση του ποσοστού των ιόντων Co²⁺ που απορροφήθηκε από την υδρογέλη, σε κάθε κύκλο επαναχρησιμοποίησης με την μέθοδο του EDTA.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η υδρογέλη που σχηματίζει το διπεπτίδιο Fmoc-Phe-Leu-OH συγκέντρωσης 2 mg/ml και όγκου 1ml σε αναλογία διαλυτών 3:7 αιθανόλη/νερό αξιοποιήθηκε για την δέσμευση τοξικών βαρεών μετάλλων όπως το Νικέλιο (Ni²⁺) και το Κοβάλτιο (Co²⁺). Μελετήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις των stock διαλυμάτων των μεταλλικών ιόντων και ως βέλτιστη ορίστηκε η 0.1M καθώς τα φάσματα UV-Vis είναι πιο ευδιάκριτα και ακολουθείται το μοτίβο απορρόφησης της μέγιστης ποσότητας των μεταλλικών ιόντων από την υδρογέλη μέχρι τις 10 ώρες και έπειτα η απορρόφηση του υπερκείμενου διαλύματος αρχίζει να αυξάνεται.

Η μέθοδος με τον Et₂O επιβεβαιώνει την δυνατότητα χρήσης του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH σε μορφή υδρογέλης για την δέσμευση τοξικών μετάλλων όπως το Ni²⁺ και Co²⁺ με την δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης της υδρογέλης μέχρι 2 φορές με αρκετά υψηλά ποσοστά απορρόφησης. Συγκεκριμένα, στον πρώτο κύκλο χρήσης η υδρογέλη μπορεί να απορροφήσει 43,33% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Ni²⁺,0.1M και όγκου 1ml και 39,75% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Co²⁺,0.1M και όγκου 1ml και 39,75% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Co²⁺,0.1M και όγκου 1ml. Στον δεύτερο κύκλο χρήσης η υδρογέλη μπορεί να απορροφήσει 39,26% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Ni²⁺,0.1M και όγκου 1ml. Στον δεύτερο κύκλο χρήσης η υδρογέλη μπορεί να απορροφήσει 39,26% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Co²⁺,0.1M και όγκου 1ml και 35,85% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Co²⁺,0.1M και όγκου 1ml και όγκου 1ml. Ωστόσο, με αυτή την μέθοδο δεν επιτυγχάνεται πλήρης διαχωρισμός της υδατικής φάσης, στην οποία βρίσκονται τα μεταλλικά ιόντα, από την οργανική φάση, που βρίσκεται το διπεπτίδιο,με αποτέλεσμα να χάνεται ποσότητα του διπεπτιδίου σε κάθε κύκλο απομόνωσης και ανάκτησής του και έτσι να μπορεί να σχηματίσει εκ νέου υδρογέλη μόνο 2 φορές.

Η μέθοδος με το EDTA θεωρείται καλύτερη και πιο αποτελεσματική ως προς την επαναχρησιμοποίηση του διπεπτιδίου Fmoc-Phe-Leu-OH σε μορφή υδρογέλης για την δέσμευση τοξικών μετάλλων όπως το Ni²⁺ και Co²⁺. Συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι η υδρογέλη μπορεί να χρησιμοποιηθεί μέχρι και 4 φορές με την ικανότητά της να απορροφά μεταλλικά ιόντα να μειώνεται σταδιακά σε κάθε κύκλο.

Στον πρώτο κύκλο χρήσης η υδρογέλη μπορεί να απορροφήσει 44,23% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Ni²⁺,0.1M και όγκου 1ml και 40,67% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Co²⁺,0.1M και όγκου 1ml. Στον δεύτερο κύκλο χρήσης η υδρογέλη μπορεί να απορροφήσει 38,94% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Ni²⁺,0.1M και όγκου 1ml και 29,51% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Co²⁺,0.1M και όγκου 1ml και 29,51% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Ni²⁺,0.1M και όγκου 1ml και 29,51% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Co²⁺,0.1M και όγκου 1ml και 29,51% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Co²⁺,0.1M και όγκου 1ml. Στον τρίτο κύκλο χρήσης η υδρογέλη μπορεί να απορροφήσει 35,41% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Ni²⁺,0.1M και

όγκου 1ml και 26,00% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Co²⁺,0.1M και όγκου 1ml. Στον τέταρτο κύκλο χρήσης η υδρογέλη μπορεί να απορροφήσει 29,00% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Ni²⁺,0.1M και όγκου 1ml και 20,46% της ποσότητας των μεταλλικών ιόντων Co²⁺,0.1M και όγκου 1ml.

Με αυτή την μέθοδο τα μεταλλικά ιόντα απομακρύνονται από την υδρογέλη μέσω εκπλύσεων με τον χηλικό παράγοντα EDTA καθώς η υδρογέλη παραμένει άθικτη σε αντίθεση με την μέθοδο του Et₂O στην οποία απαιτείται η πλήρης διάλυση της. Αυτός ο τρόπος παρέχει την δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης της υδρογέλης περισσότερες φορές και συγκεκριμένα διπλάσιες.

Σημειώνεται ότι όλα τα πειράματα έχουν επαναληφθεί σε τριπλέτες και έχουν επαναλήψιμα αποτελέσματα όπως φαίνεται και από τα error bars στα τελικά διαγράμματα.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ:

Fmoc: fluorenylmethyloxycarbonyl
Phe: phenylalanine
Leu: leucine
Fmoc-F-L-OH: fluorenylmethoxycarbonyl- phenylalanine- leucine
THF: Tetrahydrofuran
NMR: Nuclear Magnetic Resonance
MALDI: Matrix Assisted Laser Desroption/Ionization
DMSO: Dimethyl Sulfoxide
Et2O: Diethylether
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

ПАРАРТНМАТА:

Τα παρακάτω διαγράμματα λήφθηκαν αυτούσια από την μεταπτυχιακή εργασία της Κωνσταντίνας Μητροπούλου με τίτλο "Σύνθεση, χαρακτηρισμός και αυτοοργάνωση διπεπτιδίων με δυνητικές περιβαλλοντικές εφαρμογές".



Σχήμα 1. Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης προς συγκέντρωση μεταλλικών ιόντων Νικελίου (Ni²⁺) σε mg/ml. Κατασκευάστηκε με την μέτρηση της απορρόφησης υδατικών διαλυμάτων Ni²⁺ γνωστής συγκέντρωσης.



Σχήμα 2. Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης προς συγκέντρωση μεταλλικών ιόντων Νικελίου (Co²⁺) σε mg/ml. Κατασκευάστηκε με την μέτρηση της απορρόφησης υδατικών διαλυμάτων Co²⁺ γνωστής συγκέντρωσης.