



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
Σχολή Θετικών Επιστημών
Τμήμα Χημείας

Μεταπτυχιακή Διατριβή Ειδίκευσης με Τίτλο

**“Μελέτη του μηχανισμού αυτο-συσσώματωσης και
διαμορφωτικών αλλαγών σε διαλύματα πολυπεπτιδίων
με αντιμικροβιακή δράση χρησιμοποιώντας τεχνικές
αποκατάστασης υπερήχων, φασματοσκοπία Raman και
θεωρητικούς υπολογισμούς”**

Υποβληθείσα από
Αφροδίτη Τρύφων
Χημικός

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής:

Άγγελος Γ. Καλαμπούνιας, Αναπλ. Καθηγητής – Τμήμα Χημείας
Π. Ι. (Επιβλέπων)

Κωνσταντίνος Βλάχος, Καθηγητής – Τμήμα Χημείας Π. Ι.

Ιωάννης Σκαρμούτσος, Επίκουρος Καθηγητής – Τμήμα Χημείας Π. Ι.



University of Ioannina
Department of Chemistry

Master's Thesis with Title

**“Evidence of Self-Association and Conformational
Change in Nisin Antimicrobial Polypeptide Solutions: A
Combined Raman and Ultrasonic Relaxation
Spectroscopic and Theoretical Study”**

Submitted by

**Afrodite Tryfon
Chemist**

Members of the Three-member Committee:

A. G. Kalampounias, Associate Professor – Department of
Chemistry U.O.I. (Supervisor)

C. H. Vlahos, Professor – Department of Chemistry U.O.I.

I. Skarmoutsos, Assistant Professor – Department of Chemistry U.O.I.

Η εργασία αφιερώνεται στους γονείς μου, τα αδέρφια μου και τον Παναγιώτη για όλη τη στήριξή τους αυτά τα χρόνια.

Περιεχόμενα

Περίληψη	9
Abstract	10
Πρόλογος	11
Κεφάλαιο 1 : Εισαγωγή	12
1.1 Εισαγωγή	12
1.2 Βιβλιογραφία	14
Κεφάλαιο 2 : Θεωρητική Περιγραφή Ακουστικής Φασματοσκοπίας	16
2.1 Εισαγωγή στην Ακουστική Φασματοσκοπία	16
2.2 Ιδιότητες Υπερηχητικών Κυμάτων	17
2.2.1 Παραγωγή Υπερηχητικών Κυμάτων	20
2.2.2 Διάδοση Υπερηχητικών Κυμάτων	23
2.2.3 Διάδοση Υπερηχητικών Κυμάτων στη Διεπιφάνεια δύο Μέσων	25
2.2.4 Απόσβεση Υπερηχητικών Κυμάτων	26
2.2.5 Περίθλαση Υπερηχητικών Κυμάτων	27
2.3 Τεχνικές Ακουστικής Φασματοσκοπίας	28
2.3.1 Μέθοδος Συντονισμού – Resonance Method	29
2.3.2 Pulse echo	30
2.3.3 Transmission	33
2.4 Αντιδράσεις που μελετώνται με την Ακουστική Φασματοσκοπία	35
2.4.1 Αντιδράσεις Μεταφοράς Πρωτονίων	35
2.4.2 Διαμορφωτικές Αλλαγές	38
2.4.3 Σχηματισμός Υπερδομών	42
2.4.4 Σχηματισμός Συμπλόκων	43
2.5 Βιβλιογραφία	45
Κεφάλαιο 3 : Θεωρητική Περιγραφή Δονητικής Φασματοσκοπίας	51
3.1 Φασματοσκοπία Raman	51

3.1.1 Εισαγωγή	51
3.1.2 Αλληλεπίδραση Φωτός – Ύλης	51
3.1.3 Κανόνες Επιλογής	53
3.1.4 Κλασική Περιγραφή Φαινομένου Raman	55
3.1.5 Κβαντική Περιγραφή Φαινομένου Raman	57
3.2 Φασματοσκοπία Υπεριώδους – Ορατού	59
3.3 Βιβλιογραφία	63
Κεφάλαιο 4 : Θεωρία Κβαντομηχανικών Υπολογισμών	65
4.1 Εισαγωγή	65
4.2 Θεωρία Συναρτησιακής Πυκνότητας (DFT)	66
4.3 Σύνολα Βάσης	68
4.3.1 Σύνολα Ελάχιστης Βάσης	69
4.3.2 Εκτεταμένα Σύνολα Βάσης	69
4.4 Αρχεία Εισόδου και Εξόδου στο Υπολογιστικό Πρόγραμμα Gaussian ...	70
4.5 Θεωρητικό Υπόβαθρο Υπολογισμών Μοριακής Πρόσδεσης (Molecular Docking)	71
4.6 Υπολογισμοί Μοριακής Πρόσδεσης με τη Βοήθεια του Προγράμματος Schrödinger	75
4.7 Βιβλιογραφία	77
Κεφάλαιο 5 : Περιγραφή Παρασκευής Διαλυμάτων και Πειραματικών Διατάξεων	80
5.1 Παρασκευή Διαλυμάτων	80
5.2 Πειραματική Διάταξη Φασματοσκοπίας Υπερήχων	81
5.3 Όργανα και Συστήματα Διάταξης	81
5.3.1 Ψηφιακή Γεννήτρια Παλμών	81
5.3.2 Πιεζοηλεκτρικό Στοιχείο	82
5.3.3 Θερμοστατούμενη Κυψελίδα	82
5.3.4 Παλμογράφος	83
5.3.5 Gel Υπερήχων	83
5.4 Διάταξη Φασματοσκοπίας Raman	83

5.5 Διάταξη Μέτρησης Πυκνότητας	86
5.6 Διάταξη Μέτρησης Ιξώδους	86
5.7 Διάταξη Μέτρησης Υπεριώδους – Ορατού	87
5.8 Βιβλιογραφία	88
Κεφάλαιο 6 : Αποτελέσματα	90
6.1 Εισαγωγή	90
6.2 Αποτελέσματα Δονητικής Φασματοσκοπίας	91
6.3 Αποτελέσματα Φασματοσκοπίας Υπερήχων	94
6.4 Αποτελέσματα Κβαντομηχανικών Υπολογισμών	111
6.5 Βιβλιογραφία	113
Κεφάλαιο 7 : Συμπεράσματα και Προτάσεις για Μελλοντικές Εργασίες	114
7.1 Συμπεράσματα	114
7.2 Προτάσεις για Μελλοντική Εργασία	115
Παράρτημα	116
Π1 Πρωτόκολλο Μετρήσεων με την Τεχνική του Transmission	116
Π2 Πρωτόκολλο Μετρήσεων Υπεριώδους – Ορατού	122
Π3 Πρωτόκολλο Μετρήσεων Ιξώδους	123
Π4 Πρωτόκολλο Μετρήσεων Πυκνότητας	127
Π5 Πρωτόκολλο Εκτέλεσης Θεωρητικών Υπολογισμών με το Πρόγραμμα Gaussian	131
Βιογραφικό Σημείωμα	142

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται η μελέτη των διαλυμάτων της Νισίνης με αραιό διάλυμα υδροχλωρικού οξέος (HCl). Το σύστημα μελετήθηκε με τη χρήση των ακουστικών τεχνικών αποκατάστασης υπερήχων, και συγκεκριμένα με την τεχνική διέλευσης (*transmission*), για τον προσδιορισμό, τόσο των παραμέτρων των διαδικασιών αποκατάστασης, όσο και της ταχύτητας διάδοσης του ήχου στα διαλύματα, με σκοπό τη διερεύνηση των αντιδράσεων που πραγματοποιούνται σε αυτά. Επιπλέον, με τη χρήση της δονητικής φασματοσκοπίας *Raman* και της φασματοσκοπίας απορρόφησης $UV - Vis$ αποδείχθηκε πως ένας από τους μηχανισμούς που πραγματοποιούνται στα υδατικά διαλύματα της Νισίνης είναι ο μηχανισμός αυτοσυσσωμάτωσης, όπου σχηματίζονται διμερή του μορίου. Επιπλέον, η ανάλυση των δεδομένων της υπερηχητικής αποκατάστασης αποκάλυψε πως στα διαλύματα πραγματοποιούνται δύο διακριτές διαδικασίες αποκατάστασης, οι οποίες αποδίδονται στην αντίδραση διαμορφωτικής αλλαγής και στο μηχανισμό συσσωμάτωσης. Η υπόθεση πως ο πρώτος μηχανισμός αποδίδεται στη διαμορφωτική αλλαγή επιβεβαιώθηκε από το γεγονός πως η συχνότητα αποκατάστασης αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης της Νισίνης στα διαλύματα. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίχθηκαν από τους θεωρητικούς κβαντομηχανικούς υπολογισμούς τα οποία πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Η ενθαλπία ενεργοποίησης για τη διαμορφωτική αλλαγή και για το μηχανισμό αυτοσυσσωμάτωσης υπολογίστηκαν ίσες με $\Delta H_1^* = 0.354 \pm 0.028 \text{ kcal/mol}$ και $\Delta H_2^* = 0.261 \pm 0.004 \text{ kcal/mol}$, αντίστοιχα, ενώ η διαφορά ενθαλπίας για τους δύο μηχανισμούς βρέθηκε ίση με $\Delta H_1^0 = 3.008 \pm 0.367 \text{ kcal/mol}$ και $\Delta H_2^0 = 3.340 \pm 0.364 \text{ kcal/mol}$, αντίστοιχα. Από τα δεδομένα της ταχύτητας του ήχου, του κινηματικού ιξώδους και της πυκνότητας, γίνεται αντιληπτό πως η αύξηση της συγκέντρωσης της Νισίνης στο διάλυμα οδηγεί στο σχηματισμό διμερών, ενώ με αύξηση της θερμοκρασίας η αυτοσυσσωμάτωση πραγματοποιείται δυσκολότερα.

Ακόμη, υπολογίστηκε θεωρητικά η μεταβολή του όγκου για το μηχανισμό αυτοσυσσωμάτωσης και βρέθηκε ίση με $\Delta V_2 = 165.69 \text{ cm}^3/\text{mol}$, τιμή συγκρίσιμη με τα πειραματικά αποτελέσματα στην αραιή περιοχή συγκεντρώσεων. Η μεταβολή του όγκου για τον πρώτο μηχανισμό δεν ήταν εφικτό να υπολογιστεί θεωρητικά, καθώς υπάρχουν πολλά διαφορετικά ισομερή, και επίσης, ο πιθανός ισομερισμός που μπορεί να πραγματοποιείται σε κάθε ένα από τα ισομερή αυτά επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Τέλος, υπολογίστηκε το ελεύθερο διαμοριακό μήκος για τα διαλύματα της Νισίνης. Παρατηρήθηκε μονότονη μείωση του ελεύθερου μήκους με αύξηση της συγκέντρωσης, το οποίο αποδίδεται στη μείωση της απόστασης μεταξύ των γειτονικών μορίων με αποτέλεσμα σε υψηλές συγκεντρώσεις η μοριακή συσσωμάτωση να είναι άκαμπτη. Από την άλλη πλευρά, με αύξηση της θερμοκρασίας, το ελεύθερο διαμοριακό μήκος μειώθηκε, γεγονός που φανερώνει πως οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις γίνονται ασθενέστερες όσο αυξάνεται η θερμοκρασία.

Abstract

In this work, we present an ultrasonic study of aqueous solutions of Nisin by combining ultrasonic relaxation techniques and vibrational and absorption spectroscopy, in order to investigate the mechanisms that take place in the solutions. Ultrasonic transmission methodology was utilized to measure the sound attenuation and the velocity of the solutions. The experimental Raman and UV – Vis spectra have shown that one of the mechanisms that take place in the aqueous solutions is the self-aggregation of Nisin. Furthermore, the analysis of the ultrasonic relaxation data revealed that there are two distinct relaxation processes occurring in the solutions, which are attributed to the reaction of conformational change and the mechanism of self-aggregation. The hypothesis that the first mechanism is attributed to the conformational change, was confirmed by the fact that the relaxation frequency increases with the increase in the concentration of Nisin in the solutions. These results were supported by the theoretical quantum mechanical calculations. The activation enthalpy for the conformational change and for the self-assembly mechanism were calculated to be equal to $\Delta H_1^* = 0.354 \pm 0.028 \text{ kcal/mol}$ and $\Delta H_2^* = 0.261 \pm 0.004 \text{ kcal/mol}$, respectively, while the enthalpy difference for these two mechanisms was found equal to $\Delta H_1^0 = 3.008 \pm 0.367 \text{ kcal/mol}$ and $\Delta H_2^0 = 3.340 \pm 0.364 \text{ kcal/mol}$, respectively. From the data of the ultrasonic velocity, kinematic viscosity and density, it can be understood that the increase the concentration of Nisin in the solutions leads to the formation of dimers, while with the increase of temperature the self-aggregation is more difficult to take place.

Furthermore, the change of volume for the self-aggregation mechanism was theoretically calculated and found equal to $\Delta V_2 = 165.69 \text{ cm}^3/\text{mol}$, a value comparable to the experimental results. The change of volume for the first mechanism was not possible to calculate theoretically, since there are too many different isomers, and the possible isomerization in each of them is affected by many factors. Finally, the intermolecular free length was calculated for Nisin solutions and observed a monotonous decrease with increasing concentration, which is attributed to the reduction of the distance between neighboring molecules, resulting in the molecular aggregation. On the other hand, with increasing temperature, the intermolecular free length decreased, which shows that the intermolecular interactions become weaker as the temperature increases.

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών (ΠΜΣ) του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στην κατεύθυνση “Χημεία, Φυσικοχημεία και Τεχνολογία Υλικών – Επιστημολογία”. Υλοποιήθηκε κατά την περίοδο Οκτωβρίου 2021 – Οκτωβρίου 2023 υπό την επίβλεψη του αναπληρωτή καθηγητή κ. Άγγελου Καλαμπούνια.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή, κ. Άγγελο Καλαμπούνια, που μου έδωσε τη δυνατότητα να συνεργαστώ μαζί του και για όλη τη βοήθεια και τις συμβουλές που μου παρείχε καθ’ όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κωνσταντίνο Βλάχο, Καθηγητή, και τον κ. Ιωάννη Σκαρμούτσο, Επίκουρο Καθηγητή, οι οποίοι δέχθηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής του μεταπτυχιακού μου.

Κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού μου είχα επίσης την τύχη να συνεργαστώ και με τους υπόλοιπους συναδέλφους με τους οποίους ανταλλάξαμε ιδέες και γνώσεις, μοιραστήκαμε τους προβληματισμούς μας και αναπτύξαμε σχέσεις σεβασμού και αλληλοβοήθειας. Θα ήθελα, επομένως, να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Σιαφαρίκα Παναγιώτα, Κουδέρη Κωνσταντίνο, Τσιγκόια Στέφανο και Ρίσβα Μαρία για όλη τη στήριξη και τη βοήθειά τους.

Τέλος, οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για την ηθική συμπαράσταση και την υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια, προκειμένου να πραγματοποιήσω τους στόχους μου.

Κεφάλαιο 1 : Εισαγωγή

1.1 Εισαγωγή

Σε μία ερευνητική εργασία, ο κύριος στόχος είναι να επιτευχθεί μία ολοκληρωμένη κατανόηση των χημικών συστημάτων. Αυτό πραγματοποιείται με την ενοποίηση των πειραματικών μεθοδολογιών με τους θεωρητικούς υπολογισμούς. Για να επιτευχθεί η πλήρης κατανόηση ενός χημικού συστήματος, πρέπει πρώτα να ταυτοποιηθεί η δομή του υπό μελέτη συστήματος, καθώς και να εξεταστεί η σταθερότητά του. Αυτός ο συνδυασμός αποδεικνύεται εξαιρετικά αποτελεσματικός κατά τη μελέτη σύμπλοκων ενώσεων που βρίσκουν χρησιμότητα σε διάφορες πρακτικές εφαρμογές. Χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές για την κατανόηση ενός συστήματος, συμπεριλαμβανομένης της ακουστικής και δονητικής φασματοσκοπίας, καθώς και θεωρητικών κβαντομηχανικών υπολογισμών που εκτελούνται μέσω λογισμικών, όπως το Gaussian και το Schrödinger.

Οι πλειονότητα των πειραματικών τεχνικών που βασίζονται στην αρχή της χημικής αποκατάστασης, σχεδιάστηκαν αρχικά για τη διερεύνηση ταχέων αντιδράσεων, που συνήθως διαρκούν μόνο μερικά μs ή λιγότερο. Ωστόσο, αυτές οι τεχνικές μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη βραδύτερων αντιδράσεων. Σε γενικές γραμμές, ο όρος *χημική αποκατάσταση* χρησιμοποιείται για να περιγράψει τη διαδικασία επιστροφής ενός μοριακού συστήματος σε κατάσταση θερμικής ισορροπίας μετά από μία διαταραχή. Ο χρόνος που χρειάζεται για να πραγματοποιηθεί αυτή η αποκατάσταση είναι γνωστός ως *χρόνος αποκατάστασης* και είναι ενδεικτικός της συγκεκριμένης διαδικασίας που συμβαίνει μέσα στο σύστημα. Με τη διεξαγωγή πειραμάτων, τα οποία περιλαμβάνουν τη μέτρηση του *χρόνου αποκατάστασης*, καθίσταται δυνατό να προσδιοριστούν πρόσθετα μεγέθη ή ιδιότητες του συστήματος, όπως ο υδροδυναμικός όγκος, και τα θερμοδυναμικά του χαρακτηριστικά.

Η απλοποίηση περίπλοκων χημικών συστημάτων σε απλές μαθηματικές γραμμικές σχέσεις, είναι το κύριο πλεονέκτημα της χρήσης τεχνικών χημικής αποκατάστασης. Αυτή η απλούστευση επιτρέπει την ευκολότερη διερεύνηση και μελέτη αυτών των συστημάτων. Οι τεχνικές αυτές βρίσκουν εφαρμογή σε ένα ευρύ φάσμα τομέων, συμπεριλαμβανομένης της ενόργανης και οργανικής χημείας, όπου χρησιμοποιούνται στη δημιουργία μεταλλικών συμπλεγμάτων και στη μελέτη της μεταφοράς πρωτονίων. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται επίσης εκτενώς σε διάφορες βιοχημικές και βιοφυσικές διεργασίες, όπως η μελέτη πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων.

Οι τεχνικές υπερήχων ανήκουν στην κατηγορία των *στατικών τεχνικών αποκατάστασης* και μελετούν την αντίδραση ενός συστήματος μετά την επιβολή μιας διαταραχής. Η εφαρμογή αυτών των τεχνικών εξαρτάται από το εύρος συχνοτήτων που εξετάζεται. Πιο συγκεκριμένα, περιλαμβάνουν ένα εκτεταμένο εύρος συχνοτήτων που εκτείνεται από 10^4 έως 10^{10} Hz, διευκολύνοντας έτσι τη μέτρηση του *χρόνου αποκατάστασης* μέσα σε ένα χρονικό διάστημα

από 10^{-5} έως 10^{-11} δευτερόλεπτα. Οι τεχνικές υπερήχων χρησιμεύουν ως ένα εξαιρετικά ισχυρό μέσο για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών ενός μοριακού συστήματος, καθώς αυτά τα μικρά χρονικά διαστήματα αποδεικνύονται δύσκολο να μετρηθούν χρησιμοποιώντας άλλες τεχνικές.

Αντίθετα, η φασματοσκοπία δόνησης παρέχει πληροφορίες για μοριακές δονήσεις εντός ενός χρονικού πλαισίου 10^{-12} έως 10^{-14} δευτερολέπτων και, όταν συνδυάζεται με τις τεχνικές υπερήχων, παρέχει τη δυνατότητα μελέτης συστημάτων σε ένα ευρύ χρονικό φάσμα.

Τέλος, μία ολοκληρωμένη μελέτη ενός χημικού συστήματος περιλαμβάνει το συνδυασμό, τόσο θεωρητικών υπολογισμών, όσο και πειραματικών μεθόδων, όπως η ακουστική και η δονητική φασματοσκοπία. Χρησιμοποιώντας κατάλληλα θεωρητικά μοντέλα, αυτοί οι υπολογισμοί παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τη δομή του συστήματος, τις θερμοδυναμικές του ιδιότητες και τα θεωρητικά του φάσματα, συμπεριλαμβανομένων των φασμάτων υπερύθρου και Raman.

Στην παρούσα εργασία, μελετάται η συμπεριφορά της Νισίνης σε υδατικό διάλυμα υδροχλωρίου. Η Νισίνη είναι ένα αντιμικροβιακό, υδατοδιαλυτό και μη τοξικό πολυπεπτίδιο που ανήκει στην κατηγορία των λαντιβιοτικών. Αποτελείται από 34 αμινοξέα και σταθεροποιείται από 5 δακτυλίους θειοαιθέρα [1, 6]. Για περισσότερα από 30 χρόνια, η Νισίνη βρίσκει διάφορες εφαρμογές στη βιομηχανία των τροφίμων, κυρίως ως συντηρητικό το οποίο λαμβάνεται από την καλλιέργεια του *Lactococcus lactis* σε φυσικά υποστρώματα, λόγω του E234 [1, 2, 6]. Δρα αποτελεσματικά έναντι σε ένα ευρύ φάσμα παθογόνων, τροφιμογενών, θετικών κατά Gram βακτηρίων καθώς και βακτηρίων που παράγουν σπόρους [1, 2, 3, 6]. Ανάλογα με τον τύπο του τροφίμου και την έγκριση από τις αντίστοιχες κανονιστικές αρχές, η Νισίνη χρησιμοποιείται σε διάφορες συγκεντρώσεις, ενώ έχει αποδειχθεί πως παρουσιάζει αποτελεσματική δράση σε επίπεδα που πλησιάζουν τα μέρη στο δισεκατομμύριο [4, 6]. Εκτός από συντηρητικό τροφίμων, η Νισίνη, σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως συντηρητικό στη συσκευασία του τροφίμου, μέσω ελεγχόμενης απελευθέρωσης στην επιφάνεια των τροφίμων από τη συσκευασία [5, 6].

Το Κεφάλαιο 2 (Θεωρητική Περιγραφή Ακουστικής Φασματοσκοπίας) εμβαθύνει στο θεωρητικό υπόβαθρο της ακουστικής φασματοσκοπίας, και ειδικότερα στη *φασματοσκοπία αποκατάστασης υπερήχων*. Το κεφάλαιο ξεκινά με την παροχή μίας ολοκληρωμένης περιγραφής των θεμελιωδών αρχών που διέπουν τη δημιουργία, τη διάδοση και την απορρόφηση των υπερηχητικών κυμάτων. Στη συνέχεια, προχωρά στην εξέταση των διάφορων φασματοσκοπικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της ταχύτητας του ήχου και του συντελεστή απόσβεσης, πληροφορίες κρίσιμες για την κατανόηση της δομής και της δυναμικής ενός συστήματος. Το κεφάλαιο ολοκληρώνεται αναφέροντας τους διάφορους τύπους συστημάτων που μπορούν να μελετηθούν χρησιμοποιώντας τεχνικές υπερήχων, λαμβάνοντας υπόψη τις επιθυμητές πληροφορίες, τους τεχνικούς περιορισμούς και τη φύση του υλικού που μελετάται.

Το Κεφάλαιο 3 (Θεωρητική Περιγραφή Δονητικής Φασματοσκοπίας) παρέχει το θεωρητικό υπόβαθρο της φασματοσκοπίας Raman και Υπεριώδους – Ορατού (UV – Vis). Αρχικά, εισάγονται οι θεμελιώδεις αρχές της σκέδασης Raman (αλληλεπίδρασης φωτός –

ύλης) μαζί με τους κανόνες επιλογής με τους οποίους εμφανίζεται το φαινόμενο αυτό. Ακολουθεί η κλασική περιγραφή του φαινομένου, όπου αναφέρονται τα σημεία που αποτυγχάνει να ερμηνεύσει και να προβλέψει, και έπειτα η κβαντική περιγραφή του φαινομένου, όπου εξηγείται τα σημεία στα οποία επιτυγχάνει έναντι της κλασικής ερμηνείας. Τέλος, παρουσιάζεται συνοπτικά το θεωρητικό υπόβαθρο της φασματοσκοπίας Υπεριώδους – Ορατού (UV – Vis), όπου περιγράφονται οι βασικές αρχές που τη διέπουν, αναφέρονται ορισμένα χρωμοφόρα και γίνεται μία περιγραφή των μεταπτώσεων που είναι ορατές στο φάσμα ορατού – υπεριώδους.

Το Κεφάλαιο 4 (Θεωρία Κβαντομηχανικών Υπολογισμών) αναφέρει το θεωρητικό υπόβαθρο των κβαντομηχανικών υπολογισμών που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των πειραματικών δεδομένων. Παρέχεται μία σύντομη περιγραφή της θεωρίας συναρτησιακής πυκνότητας (Density Function Theory, DFT), και αναφέρονται κάποια από τα συνηθέστερα σύνολα βάσης. Έπειτα, ακολουθεί μία περιγραφή των αρχείων εισόδου και εξόδου που απαιτούνται για τους θεωρητικούς υπολογισμούς με τη χρήση του προγράμματος Gaussian. Τέλος, δίνεται ένα σύντομο θεωρητικό υπόβαθρο για την εκτέλεση των υπολογισμών μοριακής πρόσδεσης (Molecular Docking) και παρουσιάζεται μία γενική μέθοδος για την εκτέλεση των υπολογισμών μοριακής πρόσδεσης με τη βοήθεια του προγράμματος Schrödinger.

Το Κεφάλαιο 5 (Περιγραφή Παρασκευής Διαλυμάτων και Πειραματικών Διατάξεων) παρέχει μία λεπτομερή περιγραφή της παρασκευής των διαλυμάτων Νισίνης που χρησιμοποιήθηκαν, αναφέροντας όλες της απαραίτητες πληροφορίες. Επιπλέον, περιγράφονται διεξοδικά οι πειραματικές ρυθμίσεις και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τις προαναφερθείσες τεχνικές.

Το Κεφάλαιο 6 (Αποτελέσματα) παρουσιάζει τα αποτελέσματα της δονητικής φασματοσκοπίας Raman και της φασματοσκοπίας Υπεριώδους – Ορατού (UV – Vis) σε συνδυασμό με τους θεωρητικούς υπολογισμούς. Στη συνέχεια, αναφέρεται η μελέτη των ακουστικών μεθόδων, που συνέβαλαν στον υπολογισμό θερμοδυναμικών ιδιοτήτων και άλλων θεμελιωδών δομικών παραμέτρων, όπως η μεταβολή του όγκου. Τέλος, παρουσιάζονται οι μετρήσεις της πυκνότητας και του κινηματικού και δυναμικού ιξώδους.

Το Κεφάλαιο 7 (Συμπεράσματα και Προτάσεις για Μελλοντικές Εργασίες) παρέχει μία συνοπτική περίληψη των συμπερασμάτων που προέκυψαν από τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, καθώς και προτάσεις για μελλοντικές ερευνητικές εργασίες.

1.2 Βιβλιογραφία

- [1] Buchman, G. W., Banerjee, S. & Hansen, J. N. (1998). Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 263 (31), pp. 16260-16266.
- [2] Martinez-Rios, V., Pedersen, M., Pedrazzi, M., Gkogka, E., Smedsgaard, J. & Dalgaard, P. (2020). Antimicrobial effect of nisin in processed cheese – Quantification of residual nisin

by LC-MS/MS and development of new growth boundary model for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 338, pp. 108952-108962.

[3] Zhao, X., Chen, L., Zhao, L., Yun, He. & Yang, H. (2020). Antimicrobial kinetics of nisin and grape seed extract against inoculated *Listeria monocytogenes* on cooked shrimps: Survival and residual effects. *Food Control*, Vol. 115, pp. 107278-107290.

[4] Chandrasekar, V., Knabel, S.J. & Anantheswaran, R.C. (2018). Effects of Talinum triangulare leaf flavonoid extract on streptozotocin-induced hyperglycemia and associated complications in rats. *Food Science & Nutrition*, Vol. 7 (2), pp. 385-394.

[5] Chandrasekar, V., Coupland, J.N. & Anantheswaran, R.C. (2016). Functionalization of Crosslinked Sodium Alginate/Gelatin Wet-Spun Porous Fibers with Nisin Z for the Inhibition of *Staphylococcus aureus*-Induced Infections. *Food Eng. Mater. Sci.*, Vol. 81, E2503.

[6] Tryfon, A., Siafarika, P., Kouderis, K., Kaziannis, S., Boghosian, S., Kalampounias, A.G. (2023). Evidence of Sels-Association and Conformational Change in Nisin Antimicrobial Polypeptide Solutions: A Combined Raman and Ultrasonic Relaxation Spectroscopic and Theoretical Study. *Antibiotics*, Vol. 12 (2), pp. 221-240.

Κεφάλαιο 2 : Θεωρητική Περιγραφή Ακουστικής Φασματοσκοπίας

2.1 Εισαγωγή στην Ακουστική Φασματοσκοπία

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι όροι χημική ή κινητική αποκατάσταση είναι στενά συνδεδεμένες με τη μελέτη ταχέων αντιδράσεων. Ο όρος *χημική αποκατάσταση* χρησιμοποιείται για να περιγράψει την επαναφορά ενός συστήματος στη θερμική του ισορροπία μετά την εφαρμογή μίας περιοδικής διαταραχής. Ο απαιτούμενος χρόνος για αυτή την επαναφορά ονομάζεται *χρόνος αποκατάστασης*. Η μέτρηση αυτού του χρόνου καθώς και η μέτρηση της διαδικασίας σε συνάρτηση με τον *χρόνο αποκατάστασης* παρέχουν μία πληθώρα πληροφοριών σχετικά με την κινητική του υπό μελέτη συστήματος [1,2]. Λόγω της δυνατότητάς τους να μελετούν τόσο ταχείες αντιδράσεις, της τάξης των μs ή και γρηγορότερες, όσο και βραδύτερων αντιδράσεων, οι *τεχνικές αποκατάστασης* παρουσιάζουν μεγάλη επιτυχία για τη μελέτη διάφορων χημικών συστημάτων.

Υπάρχουν δύο τύποι πειραματικών προσεγγίσεων για τη μελέτη της χημικής αποκατάστασης ενός συστήματος. Η πρώτη προσέγγιση αναφέρεται στην απλή διαταραχή ενός χημικού συστήματος το οποίο βρίσκεται σε ισορροπία. Η ζητούμενη διαταραχή είναι αποτέλεσμα της μεταβολής μίας εξωτερικής μεταβλητής του χημικού συστήματος, όπως τη θερμοκρασία, την πίεση ή τη συγκέντρωση. Σε αυτή την περίπτωση, ο *χρόνος αποκατάστασης* προσδιορίζεται με τη μέτρηση του ρυθμού μεταβολής της συγκέντρωσης ακριβώς μετά την εφαρμογή της διαταραχής. Αυτές οι προσεγγίσεις είναι γνωστές ως *transient methods, jump methods*.

Η δεύτερη προσέγγιση περιλαμβάνει την περιοδική διαταραχή ενός χημικού συστήματος, όπως για παράδειγμα την επιβολή ενός ηχητικού κύματος, η οποία προκαλεί διακυμάνσεις, τόσο στη θερμοκρασία, όσο και στην πίεση του διαλύματος. Η σχέση μεταξύ της διαταραχής αυτής και του χημικού συστήματος οδηγεί σε περιοδική μετατόπιση του σημείου της χημικής ισορροπίας με καθυστέρηση φάσης. Η καθυστέρηση φάσης είναι ανάλογη της σχέσης μεταξύ του *χρόνου αποκατάστασης* τ και της συχνότητας της *περιοδικής διαταραχής* f . Οι τεχνικές αυτές είναι γνωστές ως *στατικές μέθοδοι (stationary methods)* [1, 2].

Οι ακουστικές τεχνικές ή τεχνικές φασματοσκοπίας υπερήχων ανήκουν στη δεύτερη κατηγορία και είναι μία από τις παλαιότερες τεχνικές μελέτης χημικών συστημάτων. Πρόκειται για *μη-καταστροφικές* μεθόδους που χρησιμοποιούν ως μέσο ανίχνευσης τα υπερηχητικά κύματα και στοχεύουν στον προσδιορισμό δύο βασικών μεγεθών, της ταχύτητας και της απόσβεσης του ηχητικού κύματος, που συμβάλλουν στον προσδιορισμό διάφορων πληροφοριών, με σημαντικότερη αυτή του χρόνου αποκατάστασης [2, 3, 4].

Οι τεχνικές υπερήχων είναι ένα σύνολο τεχνικών, οι οποίες διαφέρουν σε αρκετά σημαντικά σημεία. Ένα από αυτά τα σημεία είναι το εύρος συχνοτήτων στο οποίο μπορεί να είναι ακριβής η κάθε τεχνική και μπορεί να αποδώσει πληροφορίες για το υπό μελέτη σύστημα. Το εύρος συχνοτήτων που καλύπτουν συνολικά οι τεχνικές υπερήχων κυμαίνεται από τα 10 kHz έως περίπου τα 10 GHz, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα να μετρηθούν χρόνοι αποκατάστασης από τα 10 ms έως τα 10 ns [5]. Αυτό το μεγάλο εύρος συχνοτήτων και η δυνατότητα μέτρησης πολύ ταχέων χρόνων αποκατάστασης έχουν καταστήσει τις τεχνικές αυτές ως τη δεύτερη πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο μέτρησης χρόνων αποκατάστασης [2, 4].

Οι διαδικασίες που μπορούν να μελετηθούν με αυτές τις τεχνικές είναι οι ενδομοριακές και διαμοριακές αντιδράσεις μεταφοράς πρωτονίων, οι διαμορφωτικές αλλαγές και οι αντιδράσεις σχηματισμού συμπλόκων και υπερδομών [1, 2, 4].

2.2 Ιδιότητες Υπερηχητικών Κυμάτων

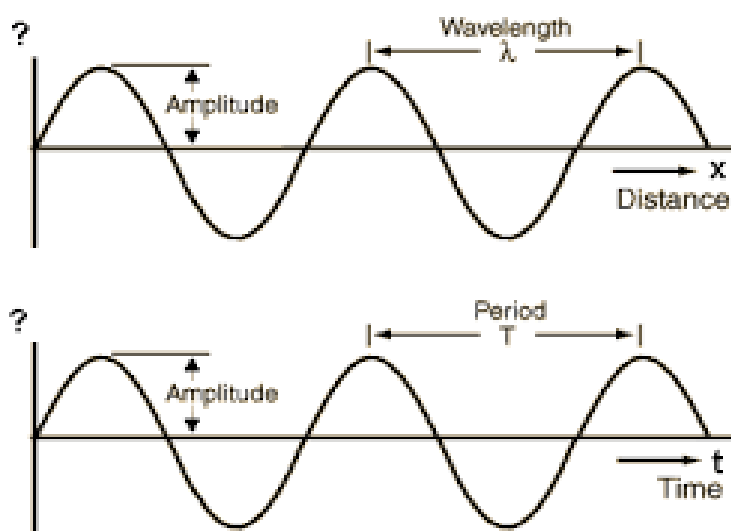
Τα ηχητικά κύματα, που ανήκουν στην κατηγορία των μηχανικών κυμάτων, παράγονται από σώματα που ταλαντώνονται. Ως μηχανικά κύματα, δε μεταφέρουν μάζα, αλλά μηχανική ενέργεια. Τα ηχητικά κύματα είναι ένα είδος διαμηκών κυμάτων, δηλαδή όταν ένα σύστημα υποβάλλεται σε μία διαταραχή, τα μόρια μέσα στο σύστημα κινούνται προς την ίδια διεύθυνση με τη διάδοση του κύματος, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται πυκνώματα και αραιώματα. Σε ένα ομογενές μέσο, η μεταφορά ενέργειας μέσω ελαστικών κυμάτων χαρακτηρίζεται ως ταλαντώσεις σταθερού πλάτους που διαδίδονται με σταθερή ταχύτητα [6]. Επομένως, η ταχύτητα διάδοσης κάθε ελαστικού κύματος καθορίζεται από τη σχέση:

$$c = \lambda * f \quad (2.1)$$

όπου λ είναι το μήκος κύματος, δηλαδή η απόσταση που διανύει το κύμα σε μία πλήρη ταλάντωση, και f είναι η συχνότητα, δηλαδή ο αριθμός των πλήρων ταλαντώσεων που εκτελούνται από ένα υλικό σημείο στη μονάδα του χρόνου. Υπάρχουν και πρόσθετα χαρακτηριστικά που περιγράφουν ένα ελαστικό κύμα, όπως το πλάτος ή εύρος κύματος (A), που περιγράφει τη μέγιστη και την ελάχιστη τιμή της διαταραχής, και η περίοδος (T), που αντιστοιχεί με το αντίστροφο της συχνότητας. Τα χαρακτηριστικά αυτά παρουσιάζονται παρακάτω στο Σχήμα 2.1.

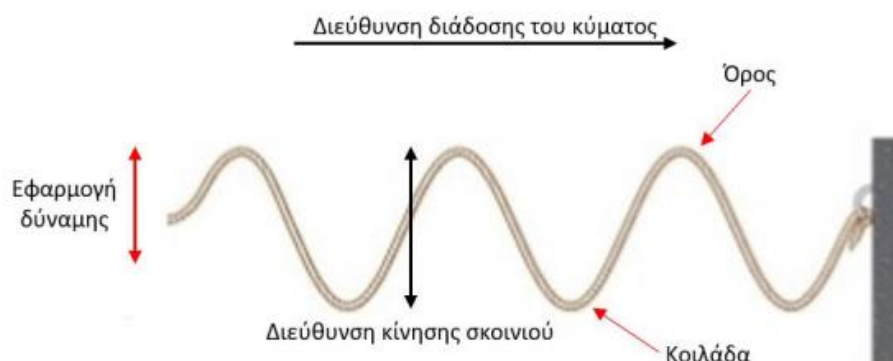
Τα ηχητικά κύματα ταξινομούνται σε τρεις διακριτές κατηγορίες με βάση τη συχνότητά τους: την υποηχητική περιοχή, για εύρος συχνοτήτων κάτω από τα 16 Hz, την ακουστική περιοχή, που καλύπτει συχνότητες από 16 Hz έως 20 kHz, οι οποίες ανιχνεύονται από το ανθρώπινο αυτί, και την υπερηχητική περιοχή, το οποίο περιλαμβάνει συχνότητες μεγαλύτερες των 20 kHz.

Για τη διάδοση των ηχητικών κυμάτων απαραίτητη είναι η ύπαρξη κάποιου υλικού μέσου, καθώς ο ήχος δε διαδίδεται στο απόλυτο κενό. Αυτό Το μέσο είναι δυνατό να βρίσκεται σε οποιαδήποτε κατάσταση της ύλης, δηλαδή στερεό, υγρό, αέριο ή πλάσμα. Όταν προκαλείται διαταραχή στο μέσο, τότε τα μόρια του μέσου ασκούν δυνάμεις στα γειτονικά τους μόρια, εκτρέποντάς τα έτσι από τη θέση ισορροπίας στην οποία βρίσκονται. Με αυτό τον τρόπο, ταξιδεύει η διαταραχή στο υλικό μέσο. Ανάλογα με τη διεύθυνση διάδοσης, τον τρόπο με τον οποίο διαταράσσουν το μέσο, καθώς και τα υλικά μέσα στα οποία είναι δυνατόν να διαδοθούν, τα ηχητικά κύματα διακρίνονται σε εγκάρσια και διαμήκη.



Σχήμα 2.1 : Γραφική απεικόνιση των χαρακτηριστικών μεγεθών που περιγράφουν ένα αρμονικό κύμα.

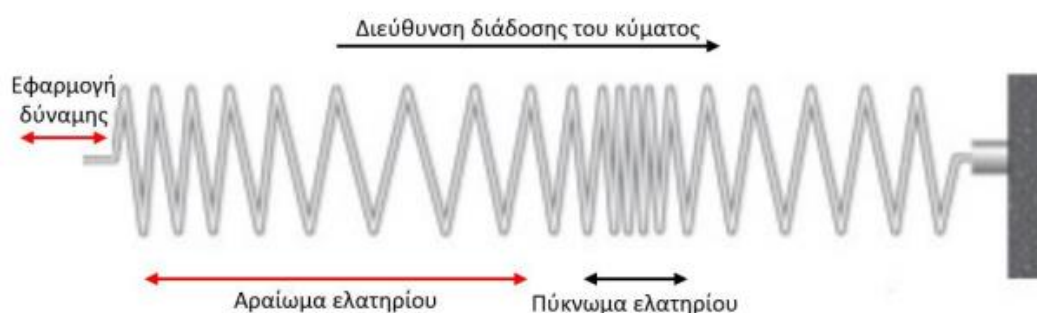
Τα *εγκάρσια* ή *διατμητικά* (shear) κύματα δημιουργούνται όταν η διεύθυνση ταλάντωσης των μορίων του μέσου είναι κάθετη προς από αυτή της διεύθυνσης διάδοσης του κύματος. Ένα παράδειγμα, για την κατανόηση του τρόπου διάδοσης των εγκάρσιων κυμάτων, μπορεί να θεωρηθεί ένα σκοινί με το ένα άκρο του στερεωμένο σε μια επιφάνεια και το άλλο άκρο του ελαφρώς τεντωμένο. Κατά τη διαταραχή του ελεύθερου άκρου του από μία ταλαντευόμενη πηγή, σχηματίζονται κατά μήκος του μέγιστα, τα οποία ονομάζονται «όρη», και ελάχιστα, τα οποία ονομάζονται «κοιλιάδες», που διαδίδονται με ταχύτητα εξαρτώμενη από τις ιδιότητες του υλικού.



Σχήμα 2.2 : Περιγραφή διάδοσης της κίνησης ενός σκοινιού με την εφαρμογή δύναμης κάθετης στον άξονά του.

Για τη διάδοση αυτών των κυμάτων, είναι απαραίτητη η ύπαρξη ισχυρών ελκτικών δυνάμεων μεταξύ των σωματιδίων του μέσου. Αυτό επιτρέπει σε ένα σωματίδιο να έλκεται και να συμπαρασύρει τα γειτονικά του μόρια κατά τη διάρκεια μίας ταλάντωσης. Ως αποτέλεσμα, η διάδοση των εγκάρσιων κυμάτων περιορίζεται σε στερεά μέσα ή σε υγρά με πολύ μεγάλο ιξώδες,. Αυτός ο περιορισμός προκύπτει λόγω της παρουσίας ασθενέστερων δεσμών σε αέρια και υγρά σώματα χαμηλού ιξώδους [7].

Η δεύτερη κατηγορία των ηχητικών κυμάτων είναι τα *διαμήκη* (longitudinal) κύματα, τα οποία δημιουργούνται όταν η διεύθυνση ταλάντωσης των μορίων του υλικού μέσου είναι η ίδια με τη διεύθυνση διάδοσης του κύματος. Κατά τη διάδοση ενός διαμήκους κύματος, παρατηρούνται στο μέσο διαδοχικά πυκνώματα και αραιώματα, τα οποία είναι αποτέλεσμα της περιοδικής μεταβολής του όγκου του ελαστικού μέσου. Για την καλύτερη κατανόηση της διάδοσης αυτών των κυμάτων, μπορεί να θεωρηθεί ως παράδειγμα ένα ελατήριο με στερεωμένο το ένα άκρο του.



Σχήμα 2.3 : Περιγραφή ταλάντωσης ελατηρίου μετά την εφαρμογή μιας δύναμης παράλληλης στον άξονά του.

Όταν ασκείται δύναμη στο ελεύθερο άκρο του ελατηρίου προς την ίδια διεύθυνση με τον άξονά του, προκαλείται μία αρμονική ταλάντωση, η οποία διαδίδεται σε όλο το μήκος του ελατηρίου. Κατά συνέπεια, τα διαδοχικά πυκνώματα και αραιώματα, που δημιουργούνται, να κινούνται παράλληλα στον άξονα του ελατηρίου.

Τα δύο είδη κυμάτων που αναφέρθηκαν παραπάνω, τα εγκάρσια και τα διαμήκη, αποτελούν τις πιο διαδεδομένες μορφές κυμάτων που χρησιμοποιούνται στις μελέτες με υπερήχους. Ωστόσο, κατά την πρόσπτωση ενός ηχητικού κύματος στη διεπιφάνεια δύο υλικών μέσων, παρατηρείται μετάδοση κυμάτων διαφορετικής μορφής. Τέτοια κύματα είναι τα *επιφανειακά κύματα* (surface waves) ή *κύματα Rayleigh* και τα *κύματα πλακών* (plate waves) ή *κύματα Lamb*, τα οποία χρησιμοποιούνται εξίσου στους υπερήχους [8, 9].

Τα *επιφανειακά κύματα* διαδίδονται κυρίως στην επιφάνεια των στερεών και μέχρι ένα πεπερασμένο βάθος μέσα στο υπό εξέταση υλικό, λόγω τόσο της διαμήκους όσο και της εγκάρσιας ταλάντωσης. Αυτά τα κύματα ανήκουν στις μη-καταστροφικές μεθόδους και χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση επιφανειακών φθορών, οι οποίες δεν μπορούν να ανιχνευθούν με άλλες τεχνικές [8].

Τα *κύματα πλακών* είναι παρόμοια με τα επιφανειακά κύματα, με κύρια διαφορά τη διάδοσή τους σε όλο το βάθος των στερεών μέσων, ως αποτέλεσμα των διαφορετικών δονήσεων των μορίων του μέσου. Οι κύριες δονήσεις που παρατηρούνται κατά τη διάδοση αυτών των κυμάτων, είναι οι συμμετρικές και ασύμμετρες δονήσεις. Ακόμα μία ιδιότητα των κυμάτων πλακών είναι η διάδοσή τους και σε ελαστικά στερεά μικρού βάθους, όπως για παράδειγμα σε ελάσματα και σε λεπτές σωληνώσεις [10].

2.2.1 Παραγωγή Υπερηχητικών Κυμάτων

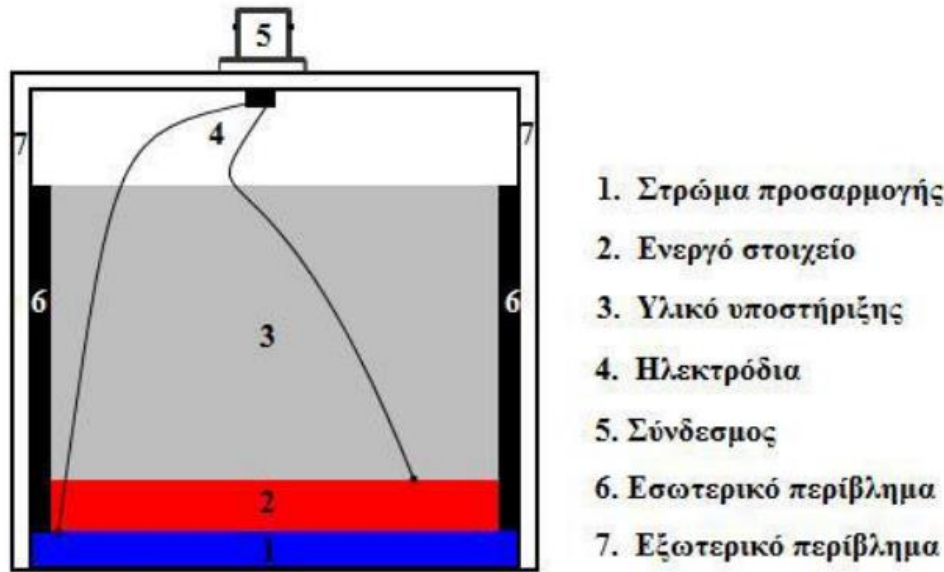
Η φασματοσκοπία υπερήχων χρησιμοποιεί διαφορετικές διατάξεις μετατροπών για την παραγωγή υπερηχητικών κυμάτων. Αυτές οι διατάξεις περιλαμβάνουν μηχανικές μεθόδους, το φαινόμενο της μαγνητοσυστολής και το πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο. Αρχικά, οι *μηχανικές μέθοδοι* χρησιμοποιούνται για την παραγωγή υπερηχητικών κυμάτων χαμηλών συχνοτήτων, χαμηλής διακριτικής ικανότητας και ευαισθησίας. Για αυτό το λόγο, η χρήση αυτών των μεθόδων είναι περιορισμένη.

Επιπλέον, υπάρχουν ορισμένα υλικά στα οποία εμφανίζεται το φαινόμενο της *μαγνητοσυστολής*. Τα υλικά αυτά έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν τη μηχανική ενέργεια σε μαγνητική και το αντίστροφο. Συγκεκριμένα, όταν ένα τέτοιο υλικό μαγνητιστεί, αλλάζει τις διαστάσεις του, με αποτέλεσμα να δημιουργείται πίεση στο σημείο επαφής του μετατροπέα και του υπό εξέταση υλικού. Με αντίστροφο τρόπο, όταν δημιουργείται πίεση στην επιφάνεια ενός μετατροπέα, αλλάζει η μαγνητική του κατάσταση. Οι μετατροπείς που λειτουργούν με το φαινόμενο της μαγνητοσυστολής μπορούν να παράγουν ηχητικά κύματα υψηλής ενέργειας, τα οποία δεν ξεπερνούν τα 100 kHz , και χρησιμοποιούνται, κυρίως, σε δείγματα που παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό απορρόφησης και εξασθένησης του σήματος [11].

Η τελευταία και πιο διαδεδομένη κατηγορία μετατροπών για την παραγωγή ακουστικών κυμάτων είναι οι μετατροπείς που βασίζονται στο *πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο*. Οι μετατροπείς αυτοί είναι υλικά τα οποία, όταν δεχθούν πίεση, έχουν την ιδιότητα να εμφανίζουν στην επιφάνειά τους ηλεκτρικά φορτία. Η διαδικασία αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί και αντίστροφα. Δηλαδή, όταν εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο σε έναν τέτοιο μετατροπέα, τα πολωμένα ιόντα ευθυγραμμίζονται στη διεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου παραμορφώνοντας, έτσι, το υλικό. Συνεπώς, το πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο οδηγεί, αρχικά, στη μετατροπή της ηλεκτρικής ενέργειας σε μηχανική (πομπός) και, στη συνέχεια, είτε με τον ίδιο είτε με διαφορετικό κρύσταλλο, στη μετατροπή της μηχανικής ενέργειας σε ηλεκτρική (δέκτης).

Για την κατασκευή τέτοιων υλικών, χρησιμοποιούνται είτε κρύσταλλοι που απαντώνται στη φύση είτε τεχνητά πολωμένα κεραμικά. Στα φυσικά υλικά ανήκουν ο κρύσταλλος χαλαζία και ο τουρμαλίνης, και τα δύο γνωστά για την εξαιρετική τους χημική, ηλεκτρική και θερμική σταθερότητα καθώς και υψηλή τους ανθεκτικότητα [12]. Από την άλλη πλευρά, τα τεχνητά υλικά περιλαμβάνονται τα σιδηροηλεκτρικά υλικά, τα οποία αποκτούν πιεζοηλεκτρικές ιδιότητες μέσω κατάλληλης επεξεργασίας πόλωσης. Μεταξύ των κοινώς χρησιμοποιούμενων κεραμικών υλικών για τη δημιουργία πιεζοηλεκτρικών μετατροπών είναι το τιτανικό βάριο και ο ζirkονιοτιτανικός μόλυβδος. Αυτά τα υλικά, λόγω της καλύτερης απόδοσής τους στη μετατροπή της ηλεκτρικής ενέργειας σε μηχανική και αντίστροφα, αντικαθιστούν όλο και περισσότερο τους φυσικούς κρυστάλλους χαλαζία [12].

Γενικά, οι πιεζοηλεκτρικοί μετατροπείς, ανεξάρτητα από τον τρόπο κατασκευής τους, παρουσιάζουν τεράστια πλεονεκτήματα έναντι των άλλων μεθόδων παραγωγής υπερήχων. Στα πλεονεκτήματα αυτά ανήκουν η μεγάλη ευαισθησία, η υψηλή απόδοση ηλεκτρομηχανικής μετατροπής ενέργειας και η αντοχή τους σε περιπτώσεις που τα υπό εξέταση υλικά μελετώνται σε υψηλές θερμοκρασίες [12]. Σχετικά με την κατασκευή τους, εκτός από τον πιεζοηλεκτρικό κρύσταλλο, σημαντικό ρόλο έχουν και τα υπόλοιπα μέρη που τον απαρτίζουν. Για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης του κρυστάλλου, πρωταρχικής σημασίας είναι η σωστή επιλογή των υλικών κατασκευής, τόσο του εσωτερικού και εξωτερικού προστατευτικού, όσο και των στρωμάτων υποστήριξης και προσαρμογής. Μια συνήθης διάταξη ενός πιεζοηλεκτρικού μετατροπέα φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 2.4 : Τυπική διάταξη πιεζοηλεκτρικού μετατροπέα.

Όπως φαίνεται και στο [Σχήμα 2.4](#), το ενεργό στοιχείο είναι μία πλάκα ενός πιεζοηλεκτρικού υλικού, η οποία είναι συνδεδεμένη με τα ηλεκτρόδια, μέσω των οποίων εφαρμόζεται κάποιο ηλεκτρικό πεδίο. Αυτό έχει ως συνέπεια, τη μηχανική παραμόρφωση της πλάκας, αλλάζοντας τις διαστάσεις του κρυστάλλου, με αποτέλεσμα την παραγωγή ηχητικού κύματος. Το βασικό χαρακτηριστικό του ενεργού στοιχείου είναι ότι η συχνότητα εκπομπής των υπερηχητικών κυμάτων είναι αντιστρόφως ανάλογη του πάχους του, σύμφωνα με τη σχέση:

$$z = \frac{c}{2f} \quad (2.2)$$

όπου z είναι το πάχος του κρυστάλλου, c η ταχύτητα διάδοσης του κύματος και f η συχνότητά του.

Εκτός από το ενεργό στοιχείο, σημαντικό ρόλο έχει και το *προστατευτικό υλικό* (wear material) ή *στρώμα προσαρμογής* (matching layer). Βασική λειτουργία του είναι η προστασία του ευαίσθητου ενεργού στοιχείου από τυχόν φθορές. Επιπλέον, μία άλλη σημαντική λειτουργία του στρώματος προσαρμογής, το οποίο χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένη ακουστική εμπίδηση που κυμαίνεται μεταξύ αυτών του ενεργού στοιχείου και την μελετώμενης επιφάνειας, είναι η μείωση των ανεπιθύμητων ανακλάσεων που θα μπορούσαν να δημιουργηθούν από την απευθείας επαφή του κρυστάλλου με το υπό εξέταση υλικό.

Τέλος, αυτό που χαρακτηρίζει την απόδοση του πιεζοηλεκτρικού μετατροπέα είναι το *στρώμα υποστήριξης* (backing material). Η σωστή επιλογή του υλικού υποστήριξης είναι καίριας σημασίας, καθώς αυτή η διαστρωμάτωση έχει σκοπό τη μείωση, τόσο των

ταλαντώσεων από την πάνω πλευρά του ενεργού στοιχείου, όσο και της οπίσθιας διάδοσης του κύματος. Βασικό κριτήριο για τη σωστή επιλογή του υλικού υποστήριξης είναι η ακουστική εμπέδηση. Από τη μία πλευρά, εάν το στρώμα υποστήριξης έχει παρόμοια ακουστική εμπέδηση με το ενεργό στοιχείο, τότε θα οδηγήσει σε απορρόφηση του ηχητικού κύματος, ενώ εάν υπάρχει μεγάλη διαφορά στην ακουστική εμπέδηση μεταξύ των δύο υλικών, θα οδηγήσει σε ανάκλαση του κύματος.

2.2.2 Διάδοση Υπερηχητικών Κυμάτων

Όπως έχει αναφερθεί, τα υπερηχητικά κύματα αποτελούν περιοδικά φαινόμενα και, ως εκ τούτου, περιγράφονται από κάποια χαρακτηριστικά τους, όπως η συχνότητα f , η περίοδος T , το μήκος κύματος λ , το πλάτος του κύματος A και η ταχύτητα διάδοσης του κύματος c . Από τα χαρακτηριστικά αυτά, η συχνότητα, η περίοδος και το πλάτος του κύματος επηρεάζονται από την πηγή των υπερήχων, ενώ η ταχύτητα καθορίζεται από τις ελαστικές ιδιότητες του μέσου. Τέλος, το μήκος κύματος εξαρτάται από τις ελαστικές ιδιότητες του μέσου, την ταχύτητα διάδοσης καθώς και από τη συχνότητα εκπομπής του υπερηχητικού κύματος. Από τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτό ότι η ταχύτητα διάδοσης του κύματος και η συχνότητά του έχουν μεγάλη επίδραση στη λήψη αποτελεσμάτων.

Πιο αναλυτικά, όταν η συχνότητα μεταβάλλεται με σταθερή ταχύτητα διάδοσης, οδηγεί σε αλλαγή του μήκους κύματος. Συνεπώς, τα ηχητικά κύματα με υψηλότερες συχνότητες έχουν μικρότερα μήκη κύματος και μικρή διεισδυτικότητα, αλλά παρέχουν αποτελέσματα υψηλής ευαισθησίας και διακριτικής ικανότητας. Από την άλλη, τα κύματα μικρότερης συχνότητας χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερα μήκη κύματος και μεγαλύτερη διεισδυτική ικανότητα καθώς παρέχουν και μικρότερη ευαισθησία και διακριτική ικανότητα. Επομένως, είναι προφανές ότι κατά την επιλογή της βέλτιστης συχνότητας, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη διάφοροι παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του επιθυμητού βάθους διερεύνησης, της σύνθεσης του υλικού και των ειδικών χαρακτηριστικών της μελετώμενης περιοχής [13].

Επιπλέον, η ταχύτητα διάδοσης των ακουστικών κυμάτων σε ένα δεδομένο μέσο, είναι χαρακτηριστική του ιδιότητα. Συγκεκριμένα, τα ηχητικά κύματα μεταδίδονται με διαφορετική ταχύτητα σε κάθε υλικό μέσο. Αυτό οφείλεται στη διαφορά των πυκνοτήτων που χαρακτηρίζουν τα δύο μέσα καθώς και στη διαφορά των ελαστικών τους δυνάμεων. Ο ήχος διαδίδεται σε ένα υλικό μέσο χάρη στους ελαστικούς δεσμούς μεταξύ των μορίων του, με αποτέλεσμα η διάδοση του κύματος να εξαρτάται από την ισχύ της ένωσης των σωματιδίων του μέσου. Η σχέση που περιγράφει την ταχύτητα διάδοσης του κύματος σε συνάρτηση με τις ιδιότητες του μέσου είναι:

$$c_i = \sqrt{\frac{K}{\rho}} \quad (2.3)$$

όπου c_i είναι η ταχύτητα του ηχητικού κύματος, K είναι η ελαστική σταθερά και ρ είναι η πυκνότητα του υλικού μέσου. Ο δείκτης i χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει τη μορφή του κύματος. Η σχέση (2.3) μπορεί να τροποποιηθεί ανάλογα με το είδος του κύματος στο οποίο αναφέρεται, δηλαδή εάν εφαρμόζεται για εγκάρσιο ή διαμήκες κύμα. Η διάδοση μίας ελαστικής διαταραχής καθορίζεται από ορισμένες σταθερές. Αυτές περιλαμβάνουν το μέτρο ελαστικότητας *Young* (E), το οποίο εκφράζει την αντίσταση του υλικού όταν αυτό υποβάλλεται σε μία γραμμική παραμόρφωση, το μέτρο διάτμησης (G), το οποίο εκφράζει την αντίσταση του υλικού σε παραμόρφωση που προκαλείται από διατμητική τάση, και το λόγο *Poisson* (ν), ο οποίος εκφράζει την αναλογία των εγκάρσιων παραμορφώσεων ως προς την αξονική παραμόρφωση. Συμπεραίνεται άρα, πως ενώ για τον υπολογισμό της ταχύτητας διάδοσης ενός διαμήκους κύματος χρησιμοποιείται το μέτρο ελαστικότητας E , για τον υπολογισμό της ταχύτητας διάδοσης ενός εγκάρσιου κύματος χρησιμοποιείται το μέτρο διάτμησης G [11]. Επομένως, ο τύπος της ταχύτητας (2.3) για τα διαμήκη κύματα είναι ο ακόλουθος:

$$c_l = \sqrt{\frac{E}{\rho}} \quad (2.4)$$

ενώ για τα εγκάρσια κύματα:

$$c_t = \sqrt{\frac{G}{\rho}} \quad (2.5)$$

Στην περίπτωση των επιφανειακών κυμάτων, όπου η ταχύτητα διάδοσής τους σε ένα μέσο ισοδυναμεί με το 90% της ταχύτητας διάδοσης ενός εγκάρσιου κύματος στο ίδιο μέσο, ο τύπος της ταχύτητας μετατρέπεται σε:

$$c_s = 0.9c_t = 0.9\sqrt{\frac{G}{\rho}} \quad (2.6)$$

Τέλος, η ταχύτητα διάδοσης των κυμάτων πλακών εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου του υλικού διάδοσης, της γωνίας πρόσπτωσης του κύματος στο μέσο, της συχνότητας του κύματος και του τρόπου δόνησης των σωματιδίων.

2.2.3 Διάδοση Υπερηχητικών Κυμάτων στη Διεπιφάνεια δύο Μέσων

Όταν ένα ηχητικό κύμα, το οποίο διαδίδεται σε ένα μέσο, προσπίπτει σε ένα δεύτερο μέσο, με διαφορετικές ακουστικές ιδιότητες, τότε ένα μέρος της ηχητικής ενέργειας διαδίδεται μέσα στο υλικό και το υπόλοιπο ανακλάται πίσω στο πρώτο. Ο όρος που περιγράφει την αντίσταση ενός υλικού μέσου στη διάδοση ενός ηχητικού κύματος, ονομάζεται *ακουστική εμπίεση* (Z) και ορίζεται ως:

$$Z = \rho * c \quad (2.7)$$

όπου ρ είναι η πυκνότητα του μέσου και c είναι η ταχύτητα διάδοσης του ηχητικού κύματος [11].

Συνεπώς, όταν ένα ηχητικό κύμα που διαδίδεται σε ένα υλικό μέσο με ακουστική εμπίεση Z_1 , προσπίπτει κάθετα σε ένα διαφορετικό μέσο με ακουστική εμπίεση Z_2 , το ποσοστό που ανακλάται δίνεται από το *συντελεστή ανάκλασης* R , σύμφωνα με τη σχέση [11]:

$$R = \frac{Z_2 - Z_1}{Z_2 + Z_1} \quad (2.8)$$

Το ποσοστό του κύματος που δεν ανακλάται πίσω στο πρώτο μέσο, αλλά διέρχεται στο δεύτερο, δίνεται από το *συντελεστή διάδοσης* T , ο οποίος δίνεται από τη σχέση:

$$T = 1 + R \quad (2.9)$$

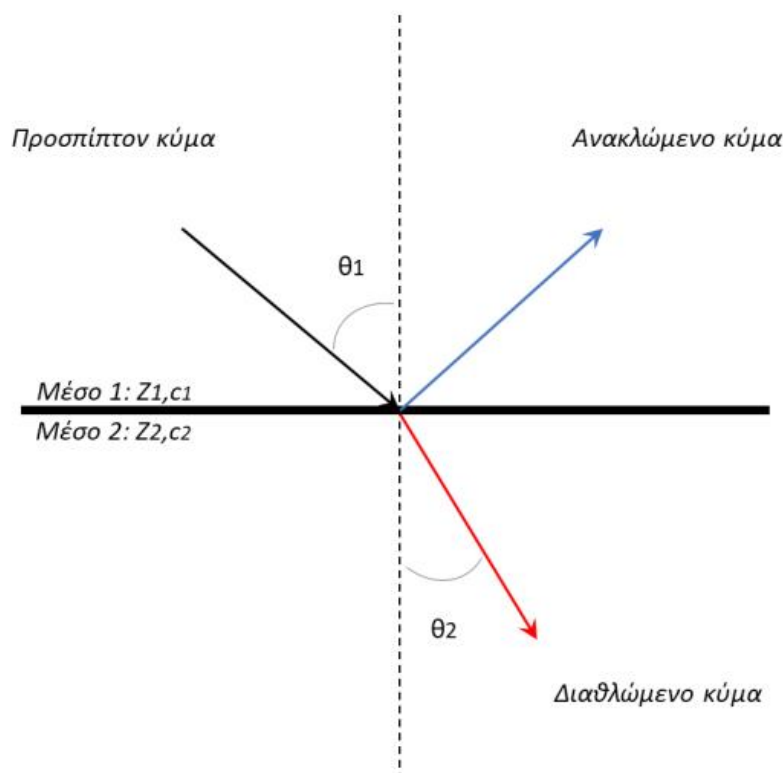
Από τα παραπάνω, είναι προφανές πως, όταν δύο υλικά μέσα έχουν τα ίδια ακουστικά χαρακτηριστικά, ο συντελεστής ανάκλασης γίνεται ίσος με το μηδέν, ενώ ο συντελεστής διάδοσης ισοδυναμεί με τη μονάδα. Κατά συνέπεια, υπάρχει πλήρης μεταφορά της ηχητικής ενέργειας μεταξύ των δύο μέσων. Επομένως, συμπεραίνεται ότι η περιγραφή της διάδοσης ενός ηχητικού κύματος μέσω της ακουστικής εμπίεσης, παρέχει πολύτιμες πληροφορίες τόσο για την ανάπτυξη αισθητήρων υπερηχητικών κυμάτων, όσο και για την ευκολία διάδοσης ενός κύματος μέσα σε ένα υλικό μέσο.

Φυσικά, η κάθετη πρόσπτωση αποτελεί μία ιδανική περίπτωση και, για αυτό, θα πρέπει να οριστεί μία γενική περίπτωση πρόσπτωσης ενός υπερηχητικού κύματος στη διεπιφάνεια δύο υλικών μέσων υπό γωνία. Όταν ένα κύμα προσπίπτει στη διεπιφάνεια των δύο μέσων υπό κάποια γωνία, τότε ένα μέρος της δέσμης ανακλάται και το υπόλοιπο διαπερνά το δεύτερο μέσο, με διαφορετική κατεύθυνση από την αρχική δέσμη, όπως φαίνεται στο [Σχήμα 2.5](#).

Δηλαδή, παρουσιάζεται το φαινόμενο της διάθλασης. Η γωνία της διαθλώμενης δέσμης προσδιορίζεται από το νόμο του *Snell* [14]:

$$\frac{\sin\theta_1}{\sin\theta_2} = \frac{c_1}{c_2} \quad (2.10)$$

όπου θ_1 είναι η γωνία πρόσπτωσης της υπερηχητικής δέσμης στη διεπιφάνεια των μέσων, θ_2 είναι η γωνία διάθλασης στο εσωτερικό του υλικού 2 και c_1, c_2 είναι οι ταχύτητες διάδοσης του ήχου στα μέσα 1 και 2, αντίστοιχα.



Σχήμα 2.5 : Ανάκλαση και διάθλαση ενός προσπίπτοντος κύματος διερχόμενου από το Μέσο 1, με ακουστική εμπίεση Z_1 και ταχύτητα c_1 , προς το Μέσο 2, με ακουστική εμπίεση Z_2 και ταχύτητα c_2 .

2.2.4 Απόσβεση Υπερηχητικών Κυμάτων

Ως *απόσβεση* ή *εξασθένηση* ενός ηχητικού κύματος (attenuation) ορίζεται η απώλεια της έντασης της υπερηχητικής δέσμης, καθώς αυτή ταξιδεύει σε ένα μέσο. Σε υλικά που διαθέτουν ιδανικές ακουστικές ιδιότητες, η εξασθένηση του ήχου είναι ανάλογη της απόστασης που

διανύει. Ωστόσο, αυτό το ιδανικό σενάριο δεν ισχύει για τα περισσότερα μέσα, καθώς υπάρχουν πρόσθετοι παράγοντες που συμβάλλουν στη μείωση της έντασης της δέσμης. Δύο σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την εξασθένηση των ακουστικών κυμάτων είναι η σκέδαση και η απορρόφηση.

Σκέδαση είναι η ανάκλαση του κύματος σε διαφορετική κατεύθυνση από την αρχική. Απορρόφηση είναι η μετατροπή της μηχανικής ενέργειας σε θερμότητα. Όταν ένα κύμα διέρχεται από ετερογενή μέσα, η σκέδαση εμφανίζεται ως η κύρια αιτία της απόσβεσης του κύματος. Αντίθετα, η απορρόφηση προκαλείται όταν η μηχανική ενέργεια του κύματος καταναλώνεται από τη μοριακή δόνηση και στη συνέχεια μετατρέπεται σε θερμότητα λόγω της τριβής. Το αποτέλεσμα της συνεισφοράς αυτών των δύο παραγόντων, αποτελεί το φαινόμενο της απόσβεσης των ηχητικών κυμάτων και περιγράφεται από τη σχέση:

$$A = A_0 e^{-\alpha z} \quad (2.11)$$

όπου A_0 είναι η ένταση της αρχικής ηχητικής δέσμης, A είναι η ένταση της εξασθενημένης, z είναι η απόσταση που διανύει η δέσμη και α είναι ο συντελεστής απόσβεσης του κύματος. Ο συντελεστής α αντιπροσωπεύει την απόσβεση της ηχητικής δέσμης ανά μονάδα απόστασης, εξαρτάται από τη συχνότητα διάδοσης του κύματος και μετράται σε μονάδες (dB/cm) ή (Np/cm) [15, 16].

Ένας επιπλέον παράγοντας που επηρεάζει την απόσβεση του ηχητικού κύματος είναι η απορρόφηση λόγω χημικών ή φυσικών διαδικασιών αποκατάστασης, που οφείλεται στην επίδραση που ασκεί η μεταβολή της πίεσης ή της θερμοκρασίας στη θέση ισορροπίας. Ο παράγοντας αυτός ονομάζεται απορρόφηση αποκατάστασης και χρησιμοποιείται στις μελέτες υλικών με υπερήχους [10, 17].

2.2.5 Περίθλαση Υπερηχητικών Κυμάτων

Περίθλαση ονομάζεται η ιδιότητα ενός κύματος να περνά μέσα από ένα εμπόδιο ή να το διαπερνά μέσω κάποιου ανοίγματος. Το φαινόμενο της περίθλασης ποικίλει ανάλογα με τη συχνότητα του κύματος. Τα κύματα χαμηλότερης συχνότητας εμφανίζουν πιο έντονα το φαινόμενο αυτό από ότι τα κύματα υψηλότερων συχνοτήτων. Οπότε, μπορεί να γίνει λόγος για διπλή φύση του κύματος, όπου εκτός από την ικανότητά του να κάμπτεται γύρω από τα διάφορα εμπόδια, έχει επίσης την ικανότητα να εξαπλώνεται μέσα από μικρές οπές. Είναι σημαντικό αυτή η ικανότητα να ληφθεί υπόψη στις μελέτες με υπερήχους, ειδικά θα εμφανιστούν σφάλματα στις μετρήσεις λόγω του φαινομένου της περίθλασης.

Τέλος, τα υλικά μέσα με μικρή υπερηχητική απόσβεση, εμφανίζουν εντονότερα το φαινόμενο της περίθλασης συγκριτικά με τα υλικά υψηλότερης απόσβεσης. Οι πληροφορίες που λαμβάνονται κατά τη διάρκεια της μέτρησης της απόσβεσης ενός υλικού, αφορούν κυρίως

την πραγματική απόσβεση του υλικού και σε μικρότερο βαθμό την απόσβεση λόγω του φαινομένου περίθλασης [4, 18].

2.3 Τεχνικές Ακουστικής Φασματοσκοπίας

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ακουστική φασματοσκοπία, με κύρια διαφορά της οργανολογίας τους να είναι οι συσκευές και τα όργανα παραγωγής και ανίχνευσης των ηχητικών κυμάτων. Οι μετατροπείς που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν την ηλεκτρική ενέργεια σε μηχανική και το αντίστροφο. Αυτός είναι ο λόγος που χρησιμοποιούνται μετατροπείς, οι οποίοι βασίζονται στο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο.

Συγκεκριμένα, οι ακουστικές τεχνικές διαφοροποιούνται ανάλογα με την ακουστική απόσβεση του κύματος και, επομένως, με το εύρος των συχνοτήτων που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν. Οι τεχνικές που προκύπτουν, σύμφωνα με τα παραπάνω, είναι η μέθοδος συντονισμού (resonance method), η μέθοδος διέλευσης (transmission method) και η μέθοδος παλμού-ηχούς (pulse-echo method).

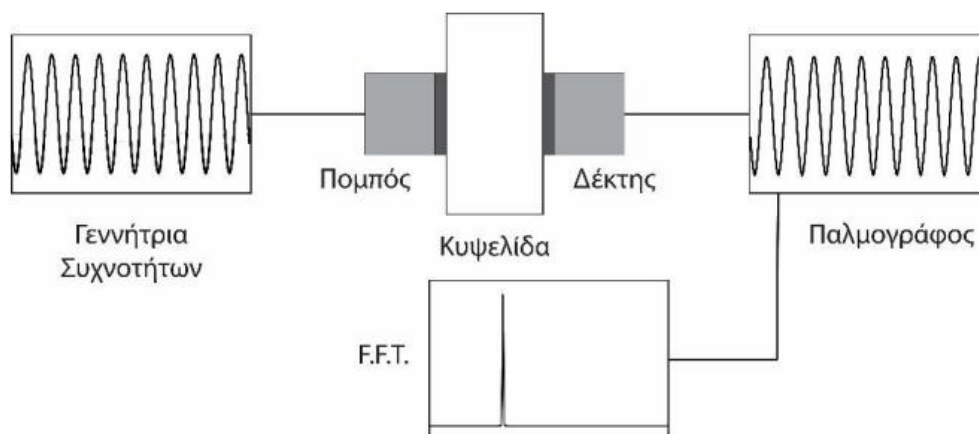
Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι πιο διαδεδομένες τεχνικές της ακουστικής φασματοσκοπίας.

Πίνακας 2.1 : Τεχνικές ακουστικής φασματοσκοπίας και το εύρος λειτουργίας τους.

Εύρος Συχνοτήτων	Μέθοδος	Παρατηρήσεις
10 – 100 kHz	Μέθοδος αντήχησης	Πολύ μεγάλοι όγκοι
100 kHz – 1 MHz	Μέθοδος αντήχησης Μέθοδος διέλευσης	Μεγάλοι όγκοι
1 – 10 MHz	Μέθοδος αντήχησης Μέθοδος διέλευσης	Μικροί όγκοι (<40 ml) Υψηλή ακρίβεια
10 – 100 MHz	Μέθοδος αντήχησης Μέθοδος διέλευσης	Ευκολία και υψηλή ακρίβεια
100 MHz – 1 GHz	Μέθοδος αντήχησης Μέθοδος διέλευσης	Δυσκολία στην οργανολογία
1 – 10 GHz	Φασματοσκοπία Brillouin	Πολύπλοκη και ακριβή οργανολογία

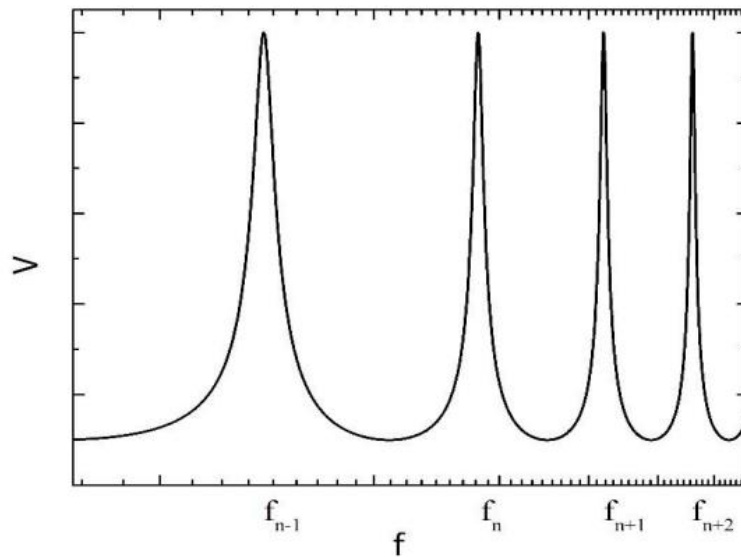
2.3.1 Μέθοδος Συντονισμού – Resonance Method

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται συνήθως σε ιδιαίτερα χαμηλές συχνότητες είναι η *μέθοδος συντονισμού* (resonance method). Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τη μελέτη, τόσο μεγάλων όγκων υγρών, έως και 40 ml , σε εύρος συχνοτήτων από 0.2 έως 10 MHz , όσο και μικρών όγκων υγρών σε εύρος συχνοτήτων από 1 MHz έως και 20 MHz . Η διάταξη της τεχνικής αυτής αποτελείται από μία κυλινδρική κυψελίδα με δύο πιεζοηλεκτρικά στοιχεία αντιδιαμετρικά τοποθετημένα στις δύο επίπεδες άκρες του κυλίνδρου, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.6 [19 – 21]. Το κάθε πιεζοηλεκτρικό στοιχείο διαθέτει τη δική του μοναδική λειτουργία. Ένα στοιχείο χρησιμεύει ως πομπός, δημιουργώντας συνεχή ημιτονοειδή κύματα τα οποία διαδίδονται μέσα στο υλικό. Τα κύματα αυτά, στη συνέχεια, λαμβάνονται από το δεύτερο πιεζοηλεκτρικό στοιχείο, το οποίο λειτουργεί σαν δέκτης. Για να υπάρχει σήμα συντονισμού, το υπό μελέτη υλικό πρέπει να πληροί συνθήκες συμβολής του κύματος [22].



Σχήμα 2.6 : Πειραματική διάταξη της τεχνικής συντονισμού. Μία γεννήτρια παράγει ημιτονοειδή κύματα τα οποία διαδίδονται στο υλικό μέσω του πιεζοηλεκτρικού στοιχείου-πομπού. Μόλις το σήμα ληφθεί από το πιεζοηλεκτρικό στοιχείο-δέκτη, εφαρμόζεται ανάλυση Fast Fourier Transform και, τέλος, υπολογίζεται το εύρος συχνοτήτων.

Με τη χρήση της μεθόδου συντονισμού, καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός της ταχύτητας με την οποία διαδίδεται ο ήχος μέσα στο υλικό καθώς και της απορρόφησης του ακουστικού κύματος σε σχέση με τη συχνότητά του. Για τον υπολογισμό του *συντελεστή απόσβεσης* α , μετράται το εύρος συχνοτήτων (Δf) που αντιστοιχεί στην ημίσεια ισχύ των κορυφών συντονισμού.

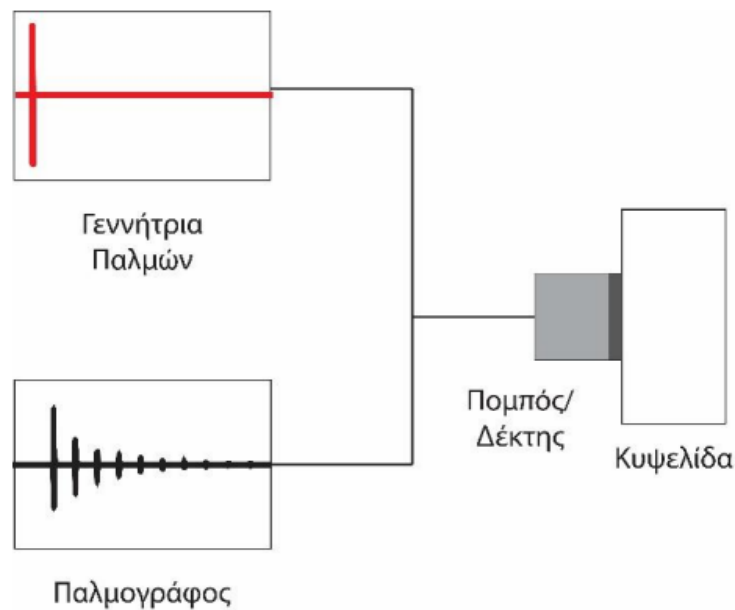


Σχήμα 2.7 : Γραφική παράσταση συχνοτήτων συντονισμού σε διάταξη resonance. Οι συχνότητες στις οποίες αντιστοιχούν οι κορυφές είναι οι συχνότητες συντονισμού του συστήματος και από αυτές εξάγεται το εύρος Δf .

2.3.2 Pulse echo

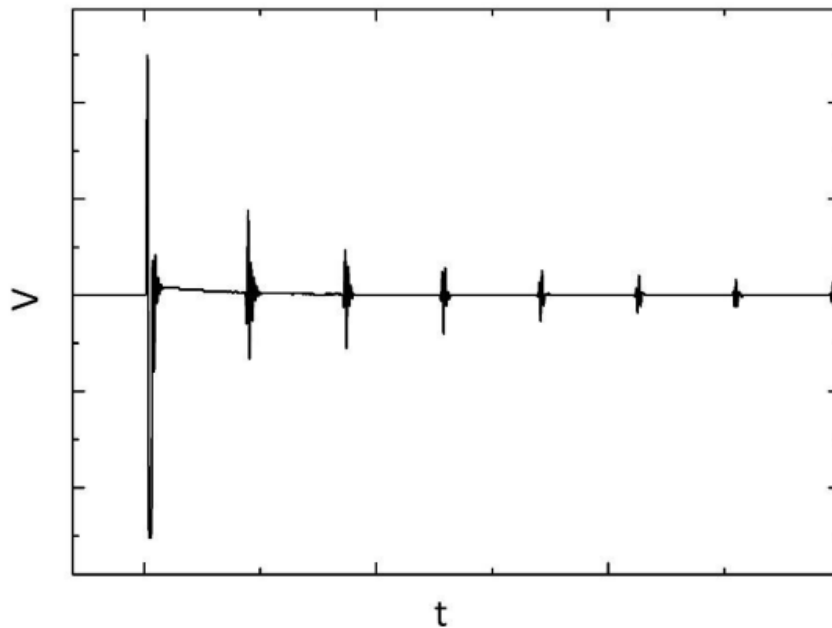
Για μεγαλύτερες συχνότητες, στο εύρος από 10 MHz έως 100 MHz , ο συντελεστής απορρόφησης α δεν είναι πολύ μικρός, ώστε να απαιτούνται μεγάλοι όγκοι υγρού, αλλά ούτε και πολύ μεγάλος, όπως συμβαίνει σε υψηλότερες συχνότητες [23]. Οι μετρήσεις σε αυτό το εύρος συχνοτήτων είναι σχετικά απλές, απαιτώντας προσβάσιμο και μη περίπλοκο εξοπλισμό. Η τεχνική παλμού-ηχούς (pulse-echo method) είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη τεχνική σε αυτό το εύρος [21, 24, 25]. Η οργανολογία της τεχνικής αυτής αποτελείται από ένα πιεζοηλεκτρικό στοιχείο, το οποίο χρησιμεύει τόσο ως πομπός, όσο και ως δέκτης. Σε αντίθεση με τη μέθοδο συντονισμού, η τεχνική παλμού-ηχούς χρησιμοποιεί σύντομους παλμούς (*burst*), συνήθως της τάξης των μs , αντί για συνεχή κύματα [26].

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2.8, το ηχητικό κύμα ταξιδεύει μέσα στο υγρό, ανακλάται στην κυψελίδα και λαμβάνεται από το πιεζοηλεκτρικό στοιχείο. Ο υπολογισμός της απόσβεση του κύματος πραγματοποιείται από τη σύγκριση των εντάσεων μεταξύ δύο διαδοχικών σημάτων για κάποιο συγκεκριμένο μήκος διαδρομής. Επιπλέον, είναι δυνατός και ο υπολογισμός της ταχύτητας του ήχου στο μελετώμενο υγρό μετρώντας τη χρονική διαφορά μεταξύ της στιγμής που παράγεται ο παλμός και της στιγμής που λαμβάνεται από το πιεζοηλεκτρικό στοιχείο για μία δεδομένη απόσταση [24].



Σχήμα 2.8 : Πειραματική διάταξη της τεχνικής παλμού-ηχούς. Φαίνεται η χρήση του ίδιου πιεζοηλεκτρικού στοιχείου ως πομπός και ως δέκτης για τη μέτρηση της απορρόφησης και της ταχύτητας του ήχου σε ένα υγρό.

Είναι δυνατή η λήψη περισσότερων ανακλάσεων, εκτός της πρώτης, οι οποίες παρουσιάζουν μία εκθετική μείωση. Συνήθως, για τον υπολογισμό του συντελεστή απορρόφησης, αλλά και της ταχύτητας διάδοσης του ήχου, λαμβάνονται υπόψη μόνο η πρώτη και η δεύτερη ανάκλαση. Για ακριβή αποτελέσματα, πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη σημασία στην παραλληλότητα της επιφάνειας του πιεζοηλεκτρικού στοιχείου, κατά την επαφή του με την κυψελίδα, και στην περίοδο επανάληψης μεταξύ των παλμών, ώστε να μην υπάρχει επικάλυψη των εκπεμπόμενων και ανακλώμενων παλμών. Τέλος, σημαντική είναι και η κατάλληλη επιλογή του πάχους της κυψελίδας, καθώς συμβάλλει στην απόσβεση του ηχητικού κύματος.



Σχήμα 2.9 : Τυπικό σήμα τεχνικής παλμού-ηχούς. Διακρίνεται το αρχικό σήμα και οι μετέπειτα ανακλάσεις αυτού μέσα στο υλικό.

Ένα πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι ο εύκολος υπολογισμός της ταχύτητας του υπερηχητικού κύματος με τη μέτρηση της χρονικής διαφοράς μεταξύ δύο διαδοχικών σημάτων. Για τον υπολογισμό την ταχύτητας του κύματος, μέσα στο μελετώμενο υλικό, εφαρμόζεται η σχέση:

$$c = \frac{d}{\Delta t} \quad (2.12)$$

όπου d είναι το μήκος της διαδρομής του κύματος και Δt η χρονική διαφορά μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης ανάκλασης [24, 27].

Ο συντελεστής απόσβεσης α του ηχητικού κύματος, όπως έχει ήδη αναφερθεί, προκύπτει συγκρίνοντας τις εντάσεις μεταξύ δύο διαδοχικών σημάτων, και συγκεκριμένα των δύο πρώτων ανακλάσεων, για ένα συγκεκριμένο μήκος διαδρομής. Είναι σαφές πως, καθώς αυξάνεται ο αριθμός των ανακλάσεων, μειώνεται η έντασή τους λόγω της απόσβεσης του ηχητικού κύματος μέσα στην κυψελίδα.

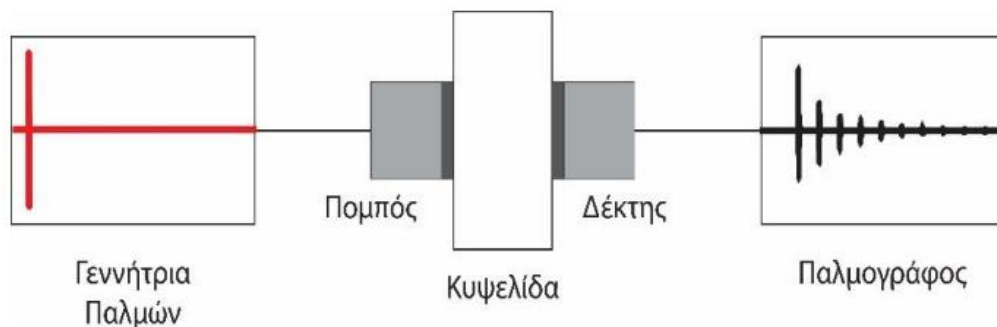
Ο υπολογισμός του συντελεστή απόσβεσης α πραγματοποιείται με τη χρήση τη Σχέσης (2.13) και των εντάσεων δύο διαδοχικών ανακλάσεων για ένα δεδομένο μήκος διαδρομής.

$$\alpha = \frac{\ln \frac{V_1(x_1)}{V_2(x_2)}}{d} \quad (2.13)$$

όπου V_1 και V_2 είναι οι εντάσεις των λαμβανόμενων παλμών και d το μήκος διαδρομής.

2.3.3 Transmission

Εκτός από τις προαναφερθείσες μεθόδους, υπάρχει και μία πρόσθετη τεχνική, γνωστή ως *μέθοδος διέλευσης* (transmission method). Η διάταξη αυτής της μεθόδου, σε αντίθεση με την τεχνική παλμού-ηχούς, περιλαμβάνει δύο πιεζοηλεκτρικά στοιχεία. Το ένα πιεζοηλεκτρικό στοιχείο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή των υπερηχητικών παλμών, ενώ το δεύτερο για την καταγραφή των λαμβανόμενων σημάτων. Αυτοί οι δύο μετατροπείς τοποθετούνται αντιδιαμετρικά, με το υπό εξέταση υλικό να βρίσκεται ανάμεσά τους, όπως φαίνεται στο [Σχήμα 2.10](#).



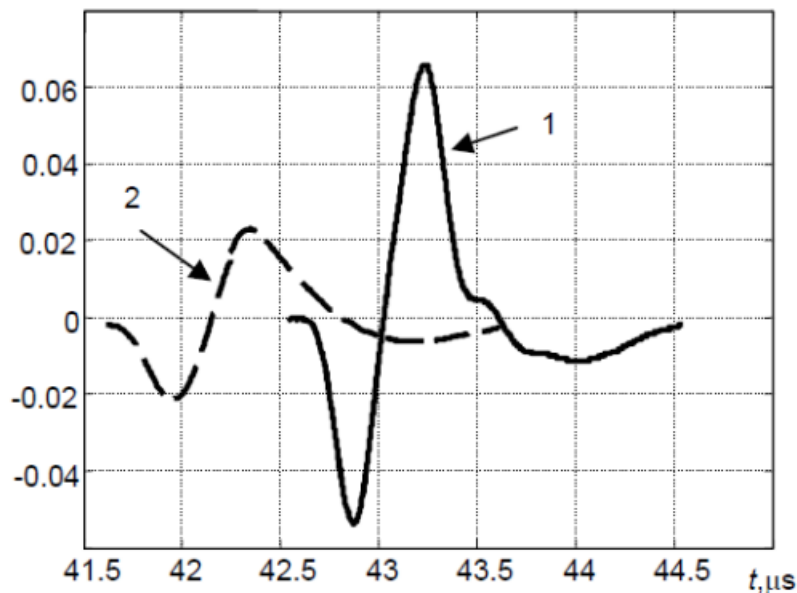
Σχήμα 2.10 : Πειραματική διάταξη της τεχνικής διέλευσης. Στη διάταξη χρησιμοποιούνται δύο πιεζοηλεκτρικά στοιχεία, με το ένα να αποτελεί τον πομπό του παλμού του υπερήχου και το άλλο τον δέκτη.

Εφόσον η οργανολογία της είναι παρόμοια με αυτή της τεχνικής παλμού-ηχούς, θα εμφανίζει όλα τα πλεονεκτήματα της τελευταίας. Επιπλέον, προσφέρει το πρόσθετο πλεονέκτημα της παροχής αξιόπιστων πληροφοριών ακόμα και αν το εξεταζόμενο υλικό έχει υψηλό συντελεστή απορρόφησης, καθώς ο υπέρηχος ταξιδεύει μέσω του δείγματος μόνο προς μία κατεύθυνση [28]. Επίσης, η *μέθοδος διέλευσης* διαθέτει ένα ευρύτερο εύρος συχνοτήτων, επιτρέποντας έτσι μετρήσεις από μερικά kHz έως και GHz , γεγονός που προσδίδει μεγαλύτερη πειραματική ευελιξία. Ωστόσο, ένα σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου, είναι η ανάγκη για απόλυτη ευθυγράμμιση των πιεζοηλεκτρικών στοιχείων στις δύο πλευρές της κυψελίδας, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η εγκυρότητα των εξαγόμενων πληροφοριών.

Στην τεχνική αυτή, ο συντελεστής απόσβεσης α του ηχητικού κύματος υπολογίζεται εύκολα από τη διαφορά της έντασης του σήματος του διαλύτη και του διαλύματος. Ειδικότερα, μετά τη μέτρηση της έντασης, σε μία συγκεκριμένη συχνότητα και για κάποιο συγκεκριμένο μήκος διαδρομής, τόσο για το διαλύτη όσο, και για το διάλυμα, μπορεί να υπολογιστεί ο συντελεστής απόσβεσης α αφαιρώντας τις δύο αυτές τιμές, σύμφωνα με τη σχέση [29, 30]:

$$\alpha(f) = \ln \frac{A_r}{A_s} \quad (2.14)$$

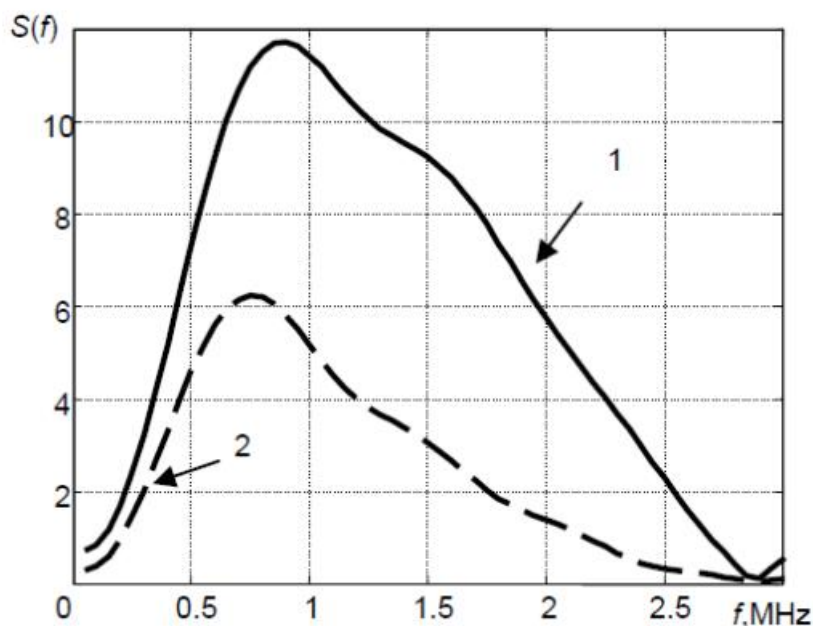
όπου A_r και A_s είναι η ολοκληρωμένη ένταση του σήματος, μετά από μετασχηματισμό Fourier, του διαλύματος και του διαλύτη, αντίστοιχα.



Σχήμα 2.11 : Τυπικό σήμα που λαμβάνεται με τη χρήση της τεχνικής διέλευσης. Με διακεκομμένη γραμμή (2) εμφανίζεται ο διαλύτης (σε αυτή την περίπτωση το νερό) και με συνεχόμενη γραμμή (1) εμφανίζεται το διάλυμα.

Από το Σχήμα 2.11 γίνεται αντιληπτό, πως ο διαλύτης παρουσιάζει μία μικρή καθυστέρηση. Αυτή η καθυστέρηση αποδίδεται στη διαφορετική ακουστική εμπέδηση των δύο υλικών και εκδηλώνεται με αυτή τη διαφορά στο χρόνο που χρειάζεται για να ταξιδέψει το κύμα από τη μία άκρη της κυψελίδας στην άλλη.

Σχετικά με την ταχύτητα διάδοσης του υπερηχητικού κύματος, ο υπολογισμός της βασίζεται στις ανακλάσεις του κύματος, με την προϋπόθεση ότι είναι γνωστό το μήκος της κυψελίδας [30].



Σχήμα 2.12 : Οι εντάσεις των σημάτων μετά την εφαρμογή FFT. Παρατηρείται διαφορετική ένταση ανάμεσα στα δύο σήματα, που οφείλεται στον διαφορετικό συντελεστή απόσβεσης του κάθε υλικού.

2.4 Αντιδράσεις που μελετώνται με την Ακουστική Φασματοσκοπία

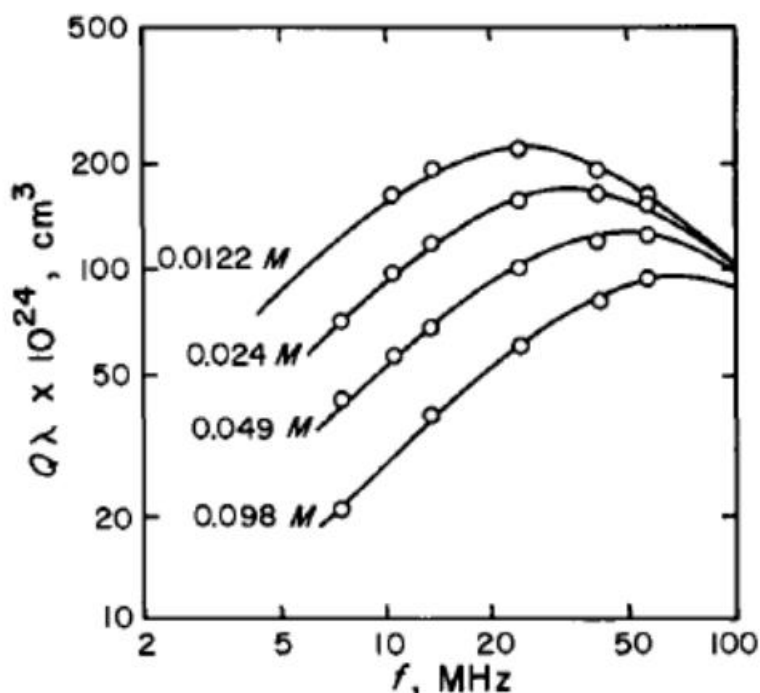
Η φασματοσκοπία αποκατάστασης υπερήχων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη διαφόρων διαδικασιών αποκατάστασης, όπως χημικές αντιδράσεις και διαμορφωτικές αλλαγές, λόγω του μεγάλου εύρους συχνοτήτων, που μπορούν να χρησιμοποιηθεί, και της ικανότητάς τους να μελετούν πολύ ταχείες αντιδράσεις.

2.4.1 Αντιδράσεις Μεταφοράς Πρωτονίων

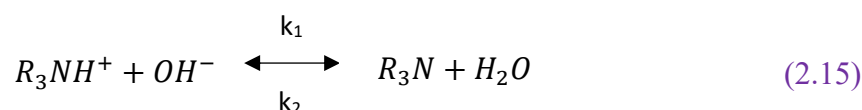
Η ακουστική φασματοσκοπία διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην εξέταση των αντιδράσεων μεταφοράς πρωτονίων λόγω της ταχείας φύσης τους. Συνήθως, για να διευκολυνθεί η μελέτη, επιλέγονται οργανικές ενώσεις, εξαιτίας της ικανότητάς τους να δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου, γεγονός που επιβραδύνει αποτελεσματικά την αντίδραση και επιτρέπει τη μελέτη χρησιμοποιώντας τεχνικές υπερήχων. Σε αντίθεση με τις οργανικές

ενώσεις, οι αντιδράσεις πρωτονίωσης ανόργανων μορίων παραμένουν πολύ γρήγορες ακόμα για τους υπερήχους [31].

Ένα επεξηγηματικό παράδειγμα είναι οι αντιδράσεις μεταφοράς πρωτονίων που πραγματοποιούνται σε υδατικά διαλύματα αλειφατικών αμινών. Οι καμπύλες απορρόφησης των διαλυμάτων αιθυλαμίνης σε σχέση με τη συγκέντρωση του κάθε διαλύματος απεικονίζονται στο Σχήμα 2.13. Η μορφή αυτών των καμπυλών βρίσκεται σε συμφωνία με τη μορφή των θεωρητικών τιμών για μία μόνο διαδικασία αποκατάστασης. Τέλος, η εξάρτηση του χρόνου αποκατάστασης από τη συγκέντρωση είναι αναμενόμενη για τη συγκεκριμένη αντίδραση.



Σχήμα 2.13 : Εξάρτηση της ακουστικής απορρόφησης από τη συγκέντρωση σε υδατικά διαλύματα αιθυλαμίνης στους 20°C.

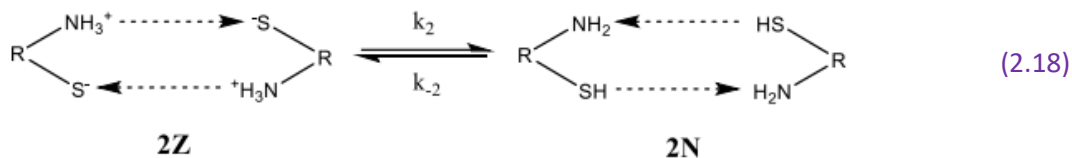
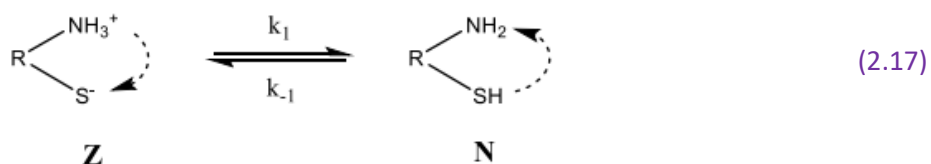


$$\tau_2^{-1} = k_1(C_{OH} + C_{R_3NH}) + k_2 \quad (2.16)$$

Η αντίδραση (2.15) συνιστά το μηχανισμό της αντίδρασης, σε μία απλούστερη μορφή, χωρίς να υπάρχει, ωστόσο, κάποια μεγάλη διαφορά ως προς την τελική τιμή. Αυτού του είδους οι αντιδράσεις εμφανίζουν δύο χρόνους αποκατάστασης. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη περίπτωση, μόνο ο δεύτερος έχει μετρήσιμο πλάτος. Οι έρευνες σχετικά με την υπερηχητική μελέτη αντιδράσεων μεταφοράς πρωτονίων αυξάνονται ολοένα και περισσότερο. Οι έρευνες

αυτές αποδεικνύουν την ισχύ της θεωρίας του Eigen και επιτρέπουν, επίσης, τη μελέτη περιπλοκότερων αντιδράσεων με ανάλογη μεθοδολογία [20, 21, 24, 30, 32 – 34].

Μία τέτοια αντίδραση, η οποία παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, είναι η μετατροπή της κυστεΐνης από την αμφιτερονική μορφή (Zwitterionic – Z) στην ουδέτερη μορφή (Neutral – N), η οποία μπορεί να συμβεί, είτε με ενδομοριακή, είτε με διαμοριακή μεταφορά πρωτονίων. Παρακάτω φαίνεται ο μηχανισμός των αντιδράσεων. Η αντίδραση (2.17) παρουσιάζει τον ενδομοριακό μηχανισμό, ενώ η αντίδραση (2.18) το διαμοριακό μηχανισμό της αντίδρασης [35, 36].

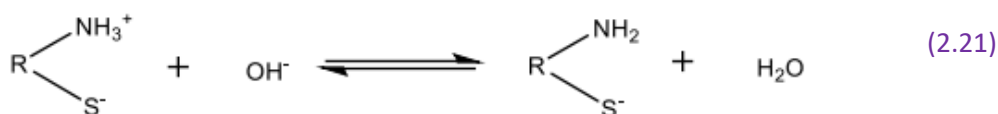


Οι χρόνοι αποκατάστασης για τις παραπάνω αντιδράσεις δίνονται από τις σχέσεις:

$$1/\tau = k_1 + k_{-1} \quad (2.19)$$

$$1/\tau = 2k_2c_Z + 2k_{-2}c_N \quad (2.20)$$

Παρατηρήθηκε, για την περίπτωση της κυστεΐνης, ότι σε pH ίσο με 9.5 εμφανίζονται δύο διαδικασίες αποκατάστασης. Η πρώτη παρατηρείται σε εύρος συχνοτήτων από 10^5 έως 10^6 Hz και η δεύτερη περίπου στα 10^8 Hz. Η πρώτη διαδικασία, η οποία παρουσίαζε εξάρτηση από τη συγκέντρωση, αποδόθηκε στην παρακάτω αντίδραση [37, 38]:



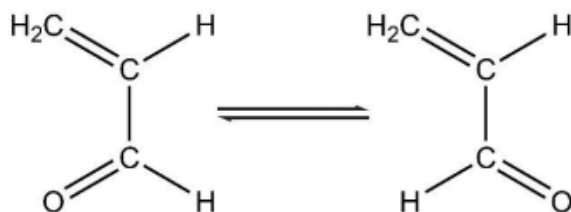
Η δεύτερη διαδικασία, η οποία ήταν ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση, αποδόθηκε στον ενδομοριακό μηχανισμό της αντίδρασης (2.17), με χρόνο αποκατάστασης $\tau^{-1} = 3.6 \cdot 10^8 \text{ sec}^{-1}$.

Από τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι ο χρόνος αποκατάστασης τ εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της συγκέντρωσης του διαλύματος, του pH και του διαλύτη. Επιπλέον, μέσω των υπερήχων παρέχεται η δυνατότητα να μετρηθεί και να εξακριβωθεί η επίδραση των παραπάνω παραγόντων στους μηχανισμούς των αντιδράσεων [39].

2.4.2 Διαμορφωτικές Αλλαγές

Ανάλογα με το μέγεθος των μορίων, οι διαμορφωτικές αλλαγές μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία αφορά τα μικρά μόρια και η δεύτερη τα μεγάλα. Αυτή η ταξινόμηση βασίζεται σε μία διαφορετική θεωρία και προσέγγιση που έχει αναπτυχθεί γύρω από το αντικείμενο και δεν είναι τυχαία [40].

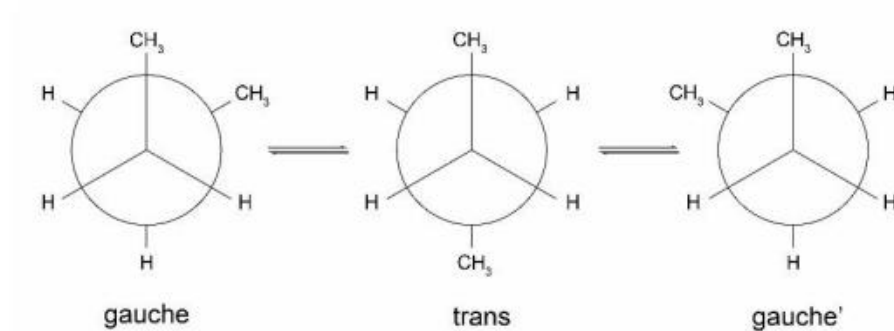
Αρχικά, οι διαμορφωτικές αλλαγές που αφορούν τα μικρά μόρια είναι αποτέλεσμα της περιστροφής κάποιου απλού δεσμού. Οι αλλαγές αυτές έχουν μελετηθεί για αρκετά συστήματα και πολλά από αυτά αφορούν τις αλδεΐδες.



Σχήμα 2.14 : Διαμορφωτική αλλαγή της ακεταλδεΐδης.

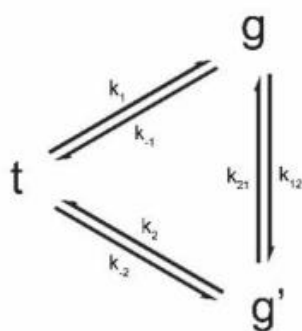
Γενικά, οι διαμορφωτικές αλλαγές μπορούν να περιγραφούν με την απλή μορφή μίας αντίδρασης, όπου το A δίνει B, με σταθερά ταχύτητας k_1 , και αντίστροφα, με σταθερά ταχύτητας k_{-1} , ($A \leftrightarrow B$). Επομένως, για τον προσδιορισμό των δύο αυτών σταθερών ταχύτητας, θα πρέπει οι μετρήσεις του χρόνου αποκατάστασης να συμπληρωθούν από μία προσδιορισμένη σταθερά ταχύτητας ($\tau^{-1} = k_1 + k_{-1}$) [41 – 43].

Μία άλλη διαδικασία, η οποία παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, είναι αυτή του περιστροφικού ισομερισμού των αλκανίων, η οποία παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.15.



Σχήμα 2.15 : Περιστροφικοί ισομερισμοί n-αλκανίων.

Τα αλκάνια εμφανίζουν δύο διαφορετικούς χρόνους αποκατάστασης, με αποτέλεσμα η αντίδραση να μπορεί να περιγραφεί με το **Σχήμα 2.16** [43 – 46]:



Σχήμα 2.16 : Μορφές ισομερισμού και οι σταθερές τους.

Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα, τα g και g' είναι εναντιομερή, γεγονός που συνεπάγεται, από άποψη δραστηκότητας, ότι: $k_2 = k_1$, $k_{-1} = k_{-2}$ και $k_{12} = k_{21}$. Αντίστοιχα, για τους χρόνους αποκατάστασης ισχύει: $1/\tau_1 = 2k_1 + k_{-1}$ και $1/\tau_2 = k_{-1} + 2k_{12}$.

Οπότε, οι δύο αντιδράσεις θα είναι:



με $\vec{k} = \tilde{k} = 0.5k_{-1}$.

Εφόσον οι καταστάσεις g και g' είναι ίσες μεταξύ τους, τόσο η ενθαλπία, όσο και ο όγκος της αντίδρασης δε θα παρουσιάζουν κάποια μεταβολή, με αποτέλεσμα το πλάτος της αποκατάστασης να είναι μηδενικό.

Στα μεγάλα μόρια εφαρμόζεται η θεωρία του *Schwarz* για να ερμηνευτούν οι διαμορφωτικές αλλαγές που πραγματοποιούνται. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, ο μέσος χρόνος αποκατάστασης σε ένα πολυπεπτίδιο δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$1/\tau^* = k_F[(s - 1^2) + 4\sigma] \quad (2.24)$$

Ο όρος k_F αντιστοιχεί στο ρυθμό μετατροπής ή δημιουργίας ελικοειδών μονάδων, το s αντιστοιχεί στο στατιστικό βάρος για κάθε μία ελικοειδή μονάδα ακολουθούμενη από άλλη ελικοειδή μονάδα και τέλος, το σ είναι το αντίστοιχο στατιστικό βάρος για κάθε σπειροειδή μονάδα ακολουθούμενη από ελικοειδή μονάδα. Από τη σχέση (2.24) συμπεραίνεται πως ο χρόνος αποκατάστασης παίρνει τη μέγιστη τιμή, $\tau^* = (4\sigma k_F)^{-1}$, στο μέσο της μετάβασης, δηλαδή για $s = 1$.

Πειραματικά, ο χρόνος αποκατάστασης μπορεί να προσδιοριστεί με την τεχνική *transient*. Με άλλα λόγια, ο προσδιορισμός του βασίζεται στη μέτρηση της εφαπτομένης της κλίσης της ευθείας πάνω στην καμπύλη αποκατάστασης για χρόνο ίσο με το μηδέν και διαθέτει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να γίνει, τόσο σε ένα ευρύ, όσο και σε ένα περιορισμένο φάσμα αποκατάστασης. Ωστόσο, σε ένα ευρύ φάσμα αποκατάστασης, η καμπύλη γίνεται αρκετά περίπλοκη, με αποτέλεσμα να καθίσταται δύσκολος ο υπολογισμός του χρόνου τ^* . Από την άλλη πλευρά, ο υπολογισμός του χρόνου τ^* σε ένα περιορισμένο φάσμα αποκατάστασης είναι μία απλή διαδικασία.

Στην περίπτωση μορίων με ελικοειδείς ομάδες, η συνεισφορά λόγω αποκατάστασης στην απορρόφηση δίνεται από τη σχέση:

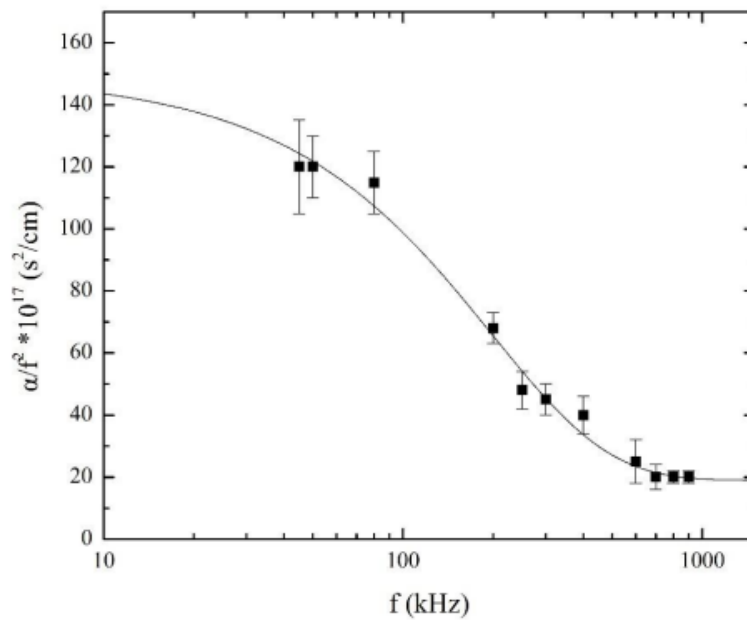
$$\mu = \alpha \cdot \lambda \quad (2.25)$$

και για τη διαδικασία μετάβασης ισχύει:

$$\mu^{ch} = \pi \frac{\rho \cdot v^2 (\Delta V)^2}{RT} S \frac{\partial \theta}{\partial s} c_0 \frac{2\omega\tau^*}{1+\omega^2\tau^{*2}} \quad (2.26)$$

όπου ρ είναι η πυκνότητα, v είναι η ταχύτητα του ηχητικού κύματος μέσα στο δείγμα, ΔV είναι η μεταβολή του όγκου, R είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων, T είναι η απόλυτη θερμοκρασία, θ είναι η γωνία στροφής της έλικας και ω είναι η γωνιακή συχνότητα [46, 47].

Στο Σχήμα 2.17 παρουσιάζεται η καμπύλη αποκατάστασης του πολυ-L-γλουταμινικού οξέος, η οποία φαίνεται να είναι σχετικά κοντά με την αντίστοιχη καμπύλη μίας διαδικασίας αποκατάστασης [48]:



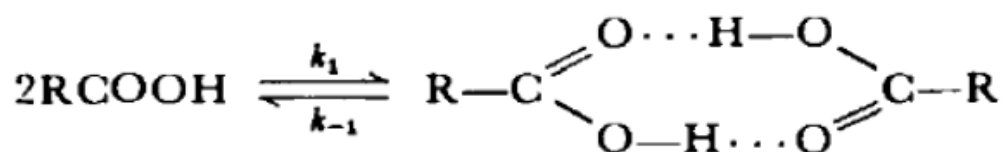
Σχήμα 2.17 : Η καμπύλη αποκατάστασης του πολυ-L-γλουταμινικού οξέος, όπως αυτή προκύπτει από το διάγραμμα $\alpha/f^2 = f(f)$.

Η ελικοειδής μορφή ενός πολυπεπτιδίου οφείλεται κυρίως στην ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου μεταξύ των πρωτονιωμένων καρβοξυλικών ομάδων και των ομάδων αζώτου. Ένας εύκολος έλεγχος της μορφής, είναι η μεταβολή του pH . Με αύξηση του pH , μειώνεται η ελικοειδής μορφή του πεπτιδίου, ενώ, σύμφωνα με μελέτες, ο χρόνος αποκατάστασης εμφανίζει μέγιστο όταν το pH πάρει την τιμή που αντιστοιχεί στο μέγιστο της μετάβασης.

Από τη σχέση $\tau^* = (4\sigma k_F)^{-1}$ και γνωρίζοντας τον παράγοντα σ από τις μελέτες ισορροπίας, μπορεί να υπολογιστεί η σταθερά k_F . Διάφορες δημοσιεύσεις δείχνουν τις τιμές της σταθεράς στα $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ή και ακόμα υψηλότερα, ωστόσο μετρήσεις με διαφορετικές τεχνικές δίνουν διαφορετικά αποτελέσματα [49].

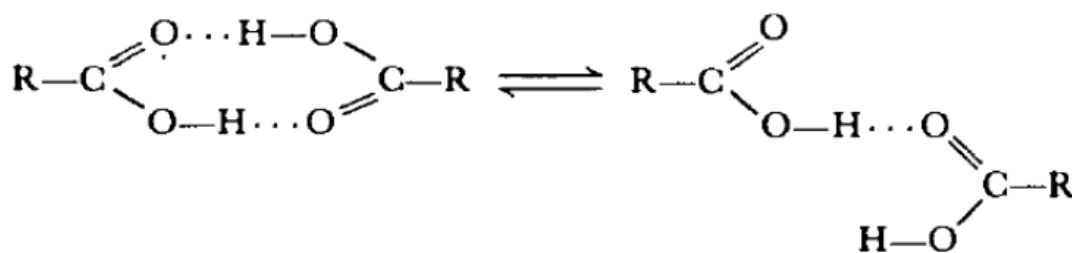
2.4.3 Σχηματισμός Υπερδομών

Ο ταχύς σχηματισμός μοριακών δεσμών, μέσω της δημιουργίας δεσμών οξυγόνου, χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένες σταθερές αντίδρασης, οι οποίες οδηγούνται προς στις θερμοδυναμικά ευνοούμενες κατευθύνσεις. Η μελέτη αυτών των δομών διευκολύνεται από τη χρήση των υπερήχων, οι οποίοι επιτρέπουν τη μελέτη τους, καθώς επηρεάζονται από το μέγεθος του μορίου, διμερές, τριμερές, κ.α. Ένα ενδεικτικό παράδειγμα είναι ο διμερισμός των καρβοξυλικών οξέων, τα οποία εμφανίζουν την παρακάτω δομή [50, 51]:



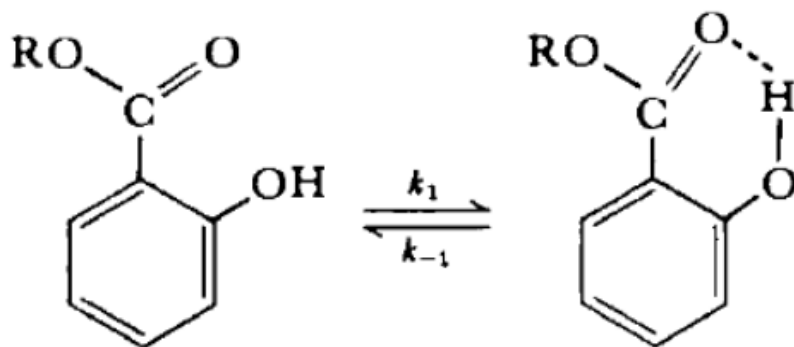
Σχήμα 2.18 : Διμερές καρβοξυλικών οξέων.

Ωστόσο, πειραματικές μελέτες με υπερήχους φανέρωσαν την ύπαρξη μίας σύζευξης ανάμεσα σε ένα κυκλικό διμερές και σε ένα ανοιχτό [52, 53].



Σχήμα 2.19 : Μηχανισμός που παρατηρήθηκε μετά τον έλεγχο με υπερήχους.

Επιπλέον μελέτες διμερισμού περιλαμβάνουν την α-πυριδόνη διαλυμένη σε διαλύτη, ο οποίος μπορεί να αναπτύξει δεσμούς υδρογόνου, και την καπρολακτάμη σε κυκλοεξάνιο. Στο Σχήμα 2.20 δίνεται ένα παράδειγμα ενδομοριακής αντίδρασης σχηματισμού δεσμού υδρογόνου [54, 55]:



Σχήμα 2.20 : Αντίδραση σχηματισμού ενδομοριακού δεσμού υδρογόνου όπου $R = CH_3$, $k_1 = 9.5 * 10^5 s^{-1}$ και $k_{-1} = 2.6 * 10^7 s^{-1}$ στους $25^\circ C$.

Έχουν διεξαχθεί, επίσης, έρευνες σχετικά με την ένωση των πουρινών μεταξύ τους (*base stacking*). Η συγκεκριμένη ένωση φαίνεται να έχει σημαντικό αντίκτυπο στο σχηματισμό καθώς και στη σταθερότητα των αλυσίδων, αν και η έκταση της επιρροής της παραμένει αβέβαιη. Η αρχική υπόθεση ανέφερε ότι η συγκράτηση της δομής διπλής έλικας οφείλεται στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Ωστόσο, η υπόθεση αυτή απορρίφθηκε γρήγορα λόγω των θερμοδυναμικών και κινητικών δεδομένων για την αυτό-ένωση N^6 , N^9 -διμεθυλαδερίνη [56 – 59].

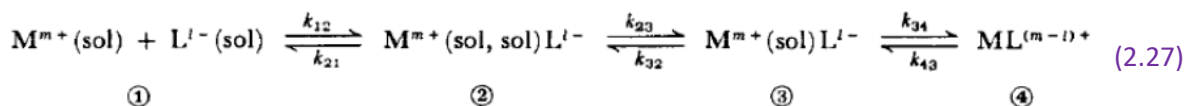
Γενικά, η δημιουργία υπερδομών περιλαμβάνει μία διαφορά στην πυκνότητα του υλικού, ως αποτέλεσμα της διαφορετικής πυκνότητας του μονομερούς σε σύγκριση με αυτή του πολυμερούς. Οι αλλαγές στους πληθυσμούς μεταξύ των μονομερών, των διμερών και γενικότερα των πολυμερών πραγματοποιούνται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση της μελετώμενης ένωσης, οδηγώντας σε αλλαγές στη συχνότητα αποκατάστασης.

2.4.4 Σχηματισμός Συμπλόκων

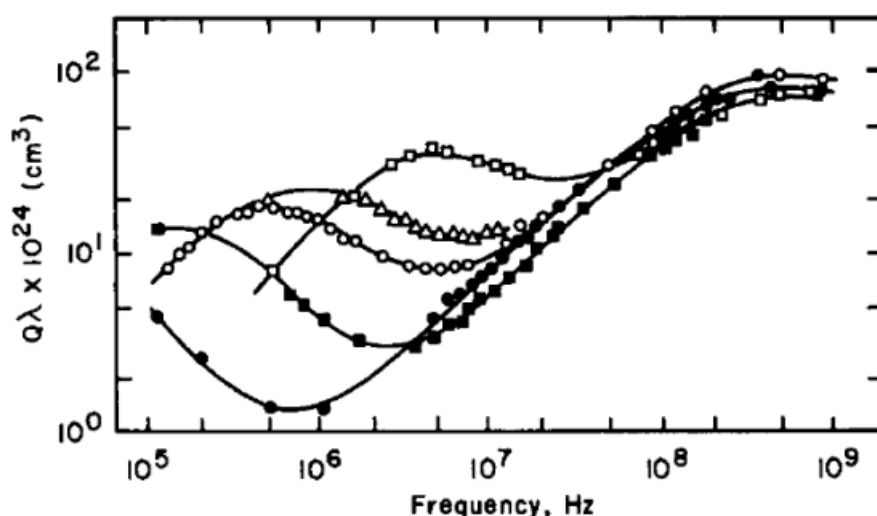
Ένας τομέας όπου η ακουστική φασματοσκοπία αποκατάστασης βρίσκει την πιο εκτεταμένη εφαρμογή της είναι η μελέτη σχηματισμού συμπλόκων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως τα δύο αρχικά στάδια της αντίδρασης συμπλοκοποίησης συμβαίνουν πολύ γρήγορα, καθιστώντας αναγκαία τη χρήση υπερήχων για τη μελέτη τους. Ακόμη και για αντιδράσεις οι οποίες πραγματοποιούνται στην εσωτερική σφαίρα του συμπλόκου, όπως η μετάβαση από το τρίτο στο τέταρτο στάδιο, υπάρχουν περιπτώσεις όπου οι ρυθμοί αποκατάστασης είναι τόσο γρήγοροι που δεν είναι δυνατό να εξεταστούν με οποιαδήποτε άλλη μέθοδο [58].

Σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, στις αντιδράσεις μεταξύ δισθενών κατιόντων και δισθενών ανιόντων, θα έπρεπε να εμφανίζονται τρεις διαδικασίες αποκατάστασης. Ωστόσο, μελέτες έδειξαν ότι παρατηρούνται μόνο δύο μηχανισμοί αποκατάστασης [59]. Ο πρώτος

χρόνος βρίσκεται σε χαμηλές συχνότητες και έχει ισχυρή σύνδεση με τη φύση του κατιόντος και ο δεύτερος χρόνος βρίσκεται γύρω στα 200 MHz και είναι ανεξάρτητος από το κατιόν.

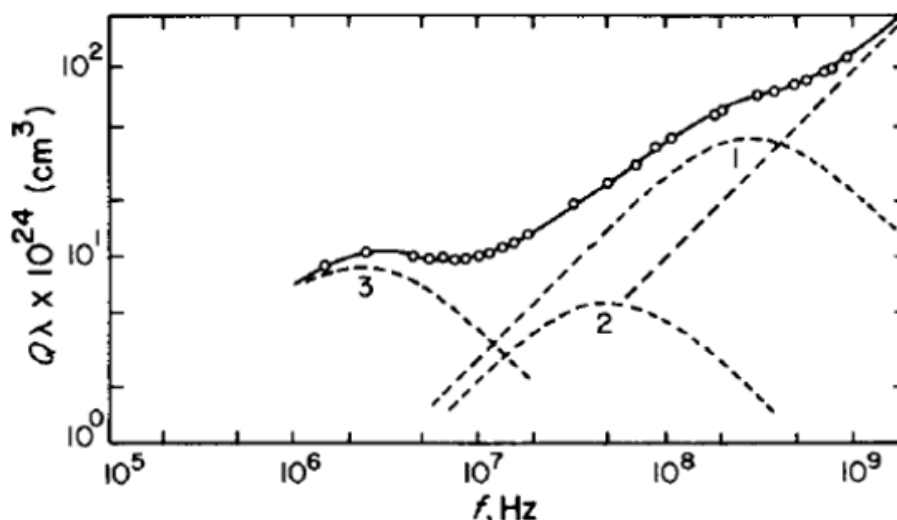


Σύμφωνα με τα δεδομένα που απεικονίζονται στο Σχήμα 2.21, η απορρόφηση στην υψηλή περιοχή συχνοτήτων μπορεί να αποδοθεί σε μία τροποποίηση που πραγματοποιείται στην εξωτερική σφαίρα του συμπλόκου $1 \leftrightarrow 3$. Αυτή η αλλαγή οδηγεί στο σχηματισμό του προϊόντος 2, αν και σε μικρές συγκεντρώσεις κατά την ισορροπία. Επομένως, η απορρόφηση χαμηλής συχνότητας είναι άμεση συνέπεια της δημιουργίας του συμπλόκου $3 \leftrightarrow 4$ στην εσωτερική σφαίρα. Είναι επίσης εύλογο ότι ο σύντομος χρόνος αποκατάστασης αναφέρεται στην αντίδραση $2 \leftrightarrow 3$, ενώ η αντίδραση $1 \leftrightarrow 2$ δεν είναι ευδιάκριτη λόγω της αμελητέας μεταβολής του όγκου. Ως αποτέλεσμα, το πλάτος του σήματος παραμένει σταθερό [60].



Σχήμα 2.21 : Διαδικασίες αποκατάστασης που μελετώνται με υπερήχους σε κάποια δισθενή σουλφιδικά σύμπλοκα.

Σε μεταγενέστερες μελέτες, βρέθηκε και η ύπαρξη μίας τρίτης διαδικασίας αποκατάστασης, η οποία εμφάνιζε ένα μικρό πλάτος σε συχνότητα κοντά στα 35 MHz. Αυτή η συγκεκριμένη διαδικασία αποδόθηκε στην ταχύτερη διαδικασία $1 \leftrightarrow 2$. Ωστόσο, θεωρήθηκε πως αυτή η απόδοση της κορυφής στα 35 MHz μπορεί να προέρχεται είτε από προσμίξεις, είτε από πιθανά πειραματικά σφάλματα [61]. Ωστόσο, αυτά τα φαινόμενα ερμηνεύτηκαν ως τρεις διαδικασίες αποκατάστασης, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2.22.



Σχήμα 2.22 : Ανάλυση της ακουστικής απορρόφησης του MnSO_4 σε διάλυμα στους 5°C υποθέτοντας τρεις διαδικασίες αποκατάστασης.

Τα πειράματα αυτά διεξάχθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις, 0.5 έως 3 M . Κατά συνέπεια, η απορρόφηση του διαλύτη γίνεται σημαντική, καθώς σημαντική είναι και η απορρόφηση από ορισμένα ιόντα λόγω των δομικών αλληλεπιδράσεών του με το διαλύτη [62] και για αυτό δέχθηκαν κάποια κριτική. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές, μπορεί επίσης να εξηγήσουν τη μετατόπιση της χαρακτηριστικής απορρόφησης στα 200 MHz στο εύρος των $400 - 600\text{ MHz}$.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η συμπλοκοποίηση των λανθανιδικών ιόντων με θειούχα και νιτρούχα ιόντα ή με ιόντα murexide, καθώς και η κινητική συσχέτιση των ηλεκτρολυτών σε μη-υδατικούς διαλύτες, όπως είναι τα αλκυλοαμμωνιακά άλατα και τα δισθενή θειικά άλατα.

Τέλος, μελέτες για τον σχηματισμό του συμπλόκου Li^+ με NO_3^- σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο έδειξαν ότι η διαδικασία διαχωρισμού του ζεύγους των ιόντων του διαλύτη, εξωτερική σφαίρα του συμπλόκου (3), σε σχηματισμό του ιοντικού συμπλόκου (4) αντιστοιχεί στη διαλυτοποίηση του ανιόντος και όχι στην ισορροπία της συμπλοκοποίησης του κατιόντος, που θεωρήθηκε αρχικά.

2.5 Βιβλιογραφία

[1] Στογιαννίδης, Γ. (2019). *Δονητική και Δυναμική Σύζευξη Μορίων σε Διαλύματα Οξικού Μεθυλεστέρα-Αιθανόλης Μέσω Δονητικών και Ακουστικών Φασματοσκοπιών και Προσομοιώσεων* (Μεταπτυχιακή Διατριβή). Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Ιωάννινα).

- [2] Τσιγκόλιας, Σ. (2020). *Μελέτη του μηχανισμού μεταφοράς πρωτονίων της 1,1,3,3-Tetramethyl guanidine σε υδατικά διαλύματα χρησιμοποιώντας τεχνικές αποκατάστασης υπερήχων, φασματοσκοπία Raman και προσομοιώσεις* (Μεταπτυχιακή Διατριβή). Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Ιωάννινα).
- [3] Σιαφαρίκα, Π. (2021). *Μελέτη της δυναμικής ισορροπίας μεταξύ μονο-πυρηνικών και δι-πυρηνικών οργανομεταλλικών συμπλόκων του Νικελίου (II) σε διαλύματα με χλωροφόρμιο χρησιμοποιώντας τεχνικές ακουστικής φασματοσκοπίας, δονητική φασματοσκοπία και κβαντομηχανικούς υπολογισμούς* (Μεταπτυχιακή Διατριβή). Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Ιωάννινα).
- [4] Ρίσβα, Μ. (2022). *Επίδραση της προσθήκης ουρίας στο μηχανισμό μεταφοράς πρωτονίων σε υδατικά διαλύματα αμινών χρησιμοποιώντας τεχνικές αποκατάστασης υπερήχων, δονητική φασματοσκοπία και κβαντομηχανικούς υπολογισμούς* (Μεταπτυχιακή Διατριβή). Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Ιωάννινα).
- [5] David, J. & Cheeke, N. (2002). *Fundamentals and Applications of Ultrasonic Waves*, New York: CRC Press.
- [6] French, A. P. (1971). *Vibrations and Waves* (MIT Introductory Physics Series). New York: W. W. Norton & Company Inc.
- [7] Greenwood, M. S. & Bumberger, J. A. (2002). Measurement of viscosity and shear wave velocity of a liquid or slurry for on-line process control. *Ultrasonics*, Vol. 39 (9), pp. 623-630. doi: 10.1016/S0041-624X(02)00372-4.
- [8] Kenderian, S., Djordjevic, B. B. & Green Jr., R. E. (2001). Point and Line Source Laser Generation of Ultrasound for Inspection of Internal and Surface Flaws in Rail and Structural Materials. *Research in Nondestructive Evaluation*, Vol. 13 (4), pp. 189-200. doi: [10.1080/09349840109409697](https://doi.org/10.1080/09349840109409697).
- [9] Alleyne, D. N. & Cawley, P. (1992). Optimization of lamb wave inspection techniques. *NDT & E International*, Vol. 25 (1), pp. 11-22. doi: 10.1016/0963-8695(92)90003-Y.
- [10] Kundu, T., Maji, A., Ghosh, T. & Maslov, K. (1998). Detection of kissing bonds by Lamb waves. *Ultrasonics*, Vol. 35 (8), pp. 573-580. doi: 10.1016/S0041-624X(97)00095-4.
- [11] Shull, P. J. & Tittmann, B. R. (2002). Ultrasound. In P. J. Shull (Ed.), *Nondestructive Evaluation: Theory, Techniques, and Applications*. New York: CRC Press.
- [12] *Έλεγχος με υπερήχους. Τεχνικές σημειώσεις*, Acucert NDT Training & Certification, Αθήνα, 2010.
- [13] Carino, N. (2001), The Impact-Echo Method: An Overview. *Proceedings 2001 World Structural Engineering Congress, ASCE*, Washington, DC, pp. 1-18.
- [14] NDT Education Resource Center. *Introduction to Ultrasonic Testing*.
- [15] Ensminger, D. (1998). *Ultrasonics, Fundamentals, Technology, Applications*. 2nd ed., New York: Marcel Dekker Inc.

- [16] Kutze, G. & Tamm, K. (1953). Measurements of sound absorption in water and in aqueous solutions of electrolytes. *Acustica*, Vol. 3 (1), pp. 33-48.
- [17] Kuttruff, H. (1991). *Ultrasonics: Fundamentals and Applications*. Elsevier Applied Science.
- [18] Κουδέρης, Κ. (2020). *Μελέτη των Μηχανισμών Υπερηχητικής Αποκατάστασης και Επαγόμενης Διπλοθλαστικότητας σε Υδατικά Διαλύματα Πολυβινυλικής Αλκοόλης (PVA)* (Μεταπτυχιακή Διατριβή). Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Ιωάννινα).
- [19] Eggers, F. & Funk, T. (1973). Ultrasonic Measurements with Milliliter Liquid Samples in the 0.5 – 100 MHz Range. *Review of Scientific Instruments*, Vol. 44 (8), pp. 969-977.
- [20] Kato, S., Nomura, H. & Miyahara, Y. (1979). Cylindrical Resonator Technique for Ultrasonic Absorption Measurement and Its Application to Cellulose Acetate-Cyclohexanone System. *Polymer Journal*, Vol. 11 (6), pp. 455-461.
- [21] McClements, D. J. & Fairley, P. (1991). Ultrasonic pulse echo reflectometer. *Ultrasonics*, Vol. 29 (1), pp. 58-62.
- [22] Wyn-Jones, E. (1974). *Chemical and Biological Applications of Relaxation Spectrometry*. D. Reidel Publishing Company.
- [23] Bae, J. R., Choi, P. K. & Takagi, K. (1988). Ultrasonic relaxation study in methylcyclohexane and methyl acetate by plano-concave resonator method. *The Journal of the Acoustical Society of Japan*, Vol. 9 (5), pp. 241-245.
- [24] Afaneh, A., Alzebda, S., Ivchenko, V. & Kalshnikov, A. N. (2011). Ultrasonic Measurements of Temperature in Aqueous Solutions: Why and How. *Hindawi*, Vol. 2011, pp. 1-10.
- [25] Webster, J. G. (1999). *Wiley Encyclopedia of Electrical and Electronics Engineering*.
- [26] Herzfeld, K. F. & Litovitz, T. A. (1959). *Absorption and Dispersion of Ultrasonic Waves*, Academic Press.
- [27] Stogiannidis, G., Tsigoiias, S. & Kalampounias, A. G. (2020). Conformational energy barriers in methyl acetate – Ethanol solutions: A temperature-dependent ultrasonic relaxation study and molecular orbital calculations. *Journal of Molecular Liquids*, Vol. 302, 112519.
- [28] Ploix, M. A., Guy, P., Chassignole, B., Moysan, J., Corneloup, G. & Guerjouma, R. (2014). Measurement of ultrasonic scattering attenuation in austenitic stainless steel welds: Realistic input data for NDT numerical modeling. *Ultrasonics*, Vol. 54 (7), pp. 1729-1736.
- [29] Hoche, S., Hussein, M. A. & Becker, T. (2013). *Ultrasound-based density determination via buffer rod. A review*.
- [30] Yasuda, K., Matsuoka, T., Koda, S. & Nomura, H. (1996). Frequency Dependence of Ultrasonically Induced Birefringence of Rodlike Particles. *The Journal of Physical Chemistry*, Vol. 100 (14), pp. 5892-5897.

- [31] Eigen, M., Maass, G. & Schwarz, G. (1971). Schallabsorptionsmessungen zum Studium des Einflusses sterischer Faktoren und hydrophober Wechselwirkungen auf die Geschwindigkeit protolytischer Reaktionen. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, Vol. 74 (3-6), 319-330.
- [32] Yasunaga, T., Tanoura, M. & Mioura, J. (1965). Ultrasonic Absorption in Sodium Metaborate Solution. *The Journal of Chemical Physics*, Vol. 43 (8), pp. 2735-2738.
- [33] Sano, T., Miyazaki, M., Tatsumoto, N. & Yasunaga, T. (1973). Kinetic Studies of the Dissociation and the Recombination Reaction in Aqueous Solutions of Monocarboxylic Acids by Means of Ultrasonic Absorption Measurements. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, Vol. 46 (1), pp. 43-47.
- [34] Jackopin, L. & Yeager, E. B. (1972). Ultrasonic Relaxation in Aqueous Acetic Acid Solution. *The Journal of the Acoustical Society of America*, Vol. 52 (3B), pp. 831-836.
- [35] Emara, M. M., Atkinson, G. & Baumgartner, E. (1972). Ultrasonic Absorption in Aqueous Solutions of Low-Molecular-Weight Polyamines. *The Journal of Physical Chemistry*, Vol. 76 (3), pp. 334-338.
- [36] Blandamer, M. J., Clarke, D. E., Hidden, N. J. & Symons, M. C. (1967). Ultrasonic absorption properties of solutions. Part 1.-Dilute solutions of diethyamine in water. *Transactions of the Faraday Society*, Vol. 63, pp. 66-71.
- [37] Applegate, K. R., Slutsky, L. J. & Parker, R. C. (1968). Kinetics of proton-transfer reactions of amino acids and simple polypeptides. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 90 (25), pp. 6909-6913.
- [38] Maass, G. & Peters, F. (1972). Studies of Intramolecular Proton Transfer to Cysteine and Related Compounds by Relaxation Kinetics. *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 11 (5), pp. 428-429.
- [39] White, R. D. & Slutsky, L. J. (1972). Proton-transfer kinetics in the aminobenzoic acids. *The Journal of Physical Chemistry*, Vol. 76 (9), pp. 1327-1333.
- [40] de Groot, M. S. & Lamb, J. (1957). Ultrasonic relaxation in the study of rotational isomers. *Proceedings of the Royal Society A*, 242, pp. 36-56.
- [41] Wyn-Jones, E. & Orville-Thomas, W. J. (1968). Molecular acoustic and spectroscopy studies. Part 1.-Rotational isomerism in some halogenated hydrocarbons. *Transactions of the Faraday Society*, 64, pp. 2907-2918.
- [42] Piercy, J. E & Seshagiri Rao, M. G. (1967). Ultrasonic Relaxation Due to trans-gauche Rotational Isomerism in the Liquid Normal Paraffins. *The Journal of Chemical Physics*, 46 (10), pp. 3951-3959.
- [43] Pethrick, R. A. & Wyn-Jones, E. (1968). Molecular Acoustic and Spectroscopy Studies on the Internal Rotation in 1-Fluoro-1,1,2,2-tetrachloroethane. *The Journal of Chemical Physics*, 49 (12), pp. 5349-5353.

- [44] Heasell, E. L. & Lamb, J. (1956). Ultrasonic relaxation processes in liquid triethylamine. *Proceedings of the Royal Society A*, 237, pp. 233-244.
- [45] Lamb, J. & Sherwood, J. (1955). Ultrasonic absorption and relaxation in some cyclohexane derivatives in the liquid state. *Transactions of the Faraday Society*, 51, pp. 1674-1676.
- [46] Schwarz, G. (1965). On the kinetics of the helix-coil transition of polypeptides in solution. *Journal of Molecular Biology*, 11 (1), pp. 64-77.
- [47] Barksdale, A. D. & Stuehr, J. E. (1972). Kinetics of the helix-coil transition in aqueous poly(L-glutamic acid). *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 94 (10), pp. 3334-3338.
- [48] Hammes, G. G. & Roberts, P. B. (1969). Dynamics of the helix-coil transition in poly-L-ornithine. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 91 (7), pp. 1812-1816.
- [49] Piercy, J. E. & Lamb, L. (1956). Ultrasonic absorption in solutions containing acetic acid. *Transactions of the Faraday Society*, Vol. 52, pp. 930-940.
- [50] Rassing, J., Osterberg, O. & Bak, T. A. (1967). Rates of Dimerisation of Substituted Benzoic Acids. *Acta Chemica Scandinavica*, Vol. 21 (6), pp. 1443-1448.
- [51] Rassing, J. (1972). Hydrogen bond kinetics and relaxation spectrometry. *Advances in Molecular Relaxation Processes*, Vol. 4 (1), pp. 55-86.
- [52] Sano, T., Tatsumoto, N., Niwa, T. & Yasunaga, T. (1972). Kinetic Studies of Intermolecular Hydrogen Bonding in Carboxylic Acids by Means of Ultrasonic Absorption Measurement. I. Fatty Acids. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, Vol. 45 (9), pp. 2669-2673.
- [53] Tatsumoto, N., Sano, T. & Yasunaga, T. (1972). A Kinetic Study of the Monomer-dimer Reaction in Propionic Acid by Means of Ultrasonic Absorption Measurements. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, Vol. 45 (10), pp. 3096-3100.
- [54] Nishikawa, S., Yasunaga, T. & Takahashi, K. (1973). Kinetic Studies of Fast Reactions in Aqueous Solutions of Amylamine by Means of Ultrasonic Absorption. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, Vol. 46 (10), pp. 2992-2997.
- [55] Eigen, M. & Tamm, K. (1962). Schallabsorption in Elektrolytlösungen als Folge chemischer Relaxation I. Relaxationstheorie der mehrstufigen Dissoziation. *Zeitschrift für Elektrochemie*, Vol. 66 (2), pp. 93-107.
- [56] Atkinson, G. & Kor, S. K. (1965). The Kinetics of Ion Association in Manganese Sulfate Solutions. I. Results in Water, Dioxane-Water Mixtures, and Methanol-Water Mixtures at 25°. *The Journal of Physical Chemistry*, Vol. 69 (1), pp. 128-133.
- [57] Atkinson, G. & Kor, S. K. (1967). The Kinetics of Ion Association in Manganese Sulfate Solutions. II. Thermodynamics of Stepwise Association in Water. *The Journal of Physical Chemistry*, Vol. 71 (3), pp. 673-677.
- [58] Smithson, J. R. & Litovitz, T. A. (1956). Absorption of Sound in Manganous Sulfate Solutions. *The Journal of the Acoustical Society of America*, Vol. 28 (3), pp. 462-468.

- [59] Jackopin, L. G. & Yeager, E. (1966). Ultrasonic Absorption on Manganese Sulfate Solutions. *The Journal of Physical Chemistry*, Vol. 70 (1), pp. 313.
- [60] Petrucci, S. (1971). *Ionic Interactions, Voll. II, p. 95*. Academic Press: New York.
- [61] Fritsch, K., Hunter, J. L., Dill, J. F., Montrose, G. J. & Litovitz, T. A. (1968). *Meeting Acoustical Society of America, 76th*, Cleveland, Ohio.
- [62] Fritsch, K., Montrose, C. J., Hunter, J. L. & Dill, J. F. (1969). Relaxation Phenomena in Electrolytic Solutions. *The Journal of Physical Chemistry*, Vol. 52 (5), pp. 2242-2252.

Κεφάλαιο 3 : Θεωρητική Περιγραφή Δονητικής Φασματοσκοπίας

3.1 Φασματοσκοπία Raman

3.1.1 Εισαγωγή

Η πειραματική παρατήρηση του φαινομένου της σκέδασης του φωτός, γνωστή πλέον ως σκέδαση *Raman*, διεξήχθη από τους Raman και Krishnam το 1928 [1]. Αρχικά, το ηλιακό φως συγκεντρώθηκε στο δείγμα για να χρησιμεύσει ως πηγή φωτός. Στη συνέχεια, μέσω της χρήσης φακών και φίλτρων, συγκεντρώθηκε το σκεδαζόμενο φως και μελετώντας το, αποκαλύφθηκε η παρουσία της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, που χαρακτηρίζεται από μία διαφορετική συχνότητα από αυτή της προσπίπτουσας δέσμης [2].

Η φασματοσκοπία *Raman* είναι μία σημαντική τεχνική που προσφέρει ένα πλήθος πληροφοριών, συμπεριλαμβανομένης της μοριακής δομής, του ποσοτικού προσδιορισμού μίας ουσίας σε κάποιο δείγμα και της ταυτοποίησης των ουσιών με βάση το χαρακτηριστικό τους φάσμα. Για την αντιμετώπιση των περιορισμών και των μειονεκτημάτων της φασματοσκοπίας *Raman*, η φασματοσκοπία απορρόφησης υπερύθρου χρησιμοποιείται συνήθως ως συμπληρωματική τεχνική.

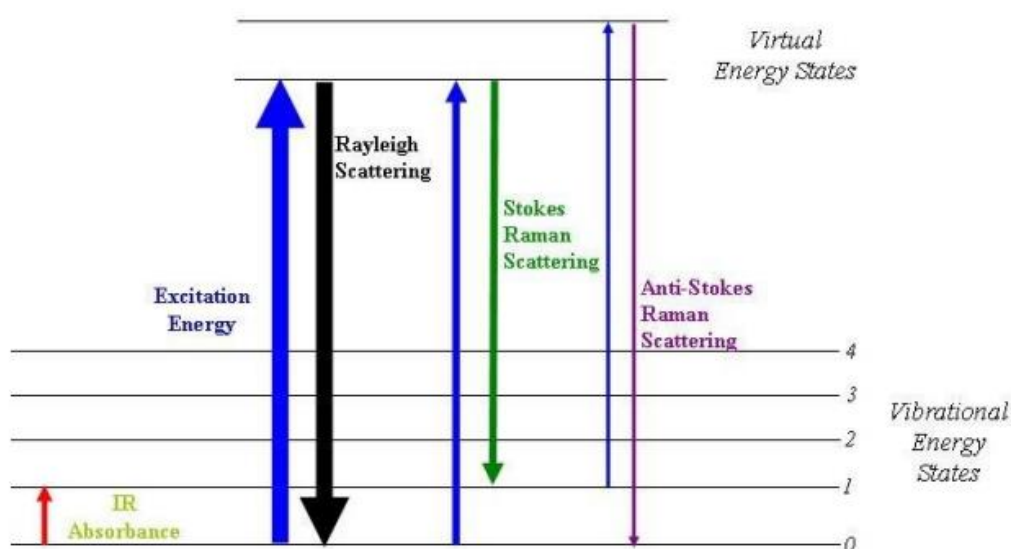
3.1.2 Αλληλεπίδραση Φωτός – Ύλης

Όταν αλληλεπιδρά η δέσμης φωτός με την ύλη, τα φωτόνια, από τα οποία αποτελείται η δέσμη, μπορούν είτε να απορροφηθούν, είτε να σκεδαστούν, είτε να μην αλληλεπιδράσουν καθόλου με την ύλη διαπερνώντας την [3]. Όταν η ενέργεια του προσπίπτοντος φωτονίου ισούται με την τιμή της ενέργειας του ενεργειακού χάσματος μεταξύ της θεμελιώδους και της διεγερμένης κατάστασης, τότε το φωτόνιο μπορεί να απορροφηθεί, διεγείροντας έτσι το μόριο. Στην περίπτωση όπου το φωτόνιο αλληλεπιδρά με το μόριο και σκεδαάζεται, δεν υπάρχει περιορισμός της ενέργειάς του και τα σκεδαζόμενα φωτόνια μπορούν να παρατηρηθούν υπό γωνία σε σχέση με την προσπίπτουσα δέσμη.

Στη φασματοσκοπία *Raman* χρησιμοποιείται μία μονοχρωματική δέσμη φωτός συγκεκριμένης συχνότητας για την αλληλεπίδραση με το δείγμα. Αυτή αλληλεπιδρά και παραμορφώνει (πολώνει) το νέφος ηλεκτρονίων που καλύπτει τον πυρήνα σχηματίζοντας, έτσι, μία κατάσταση, η οποία ονομάζεται *εικονική*. Η κατάσταση αυτή είναι ασταθής, με

τυπικό χρόνο ζωής μικρότερο από 1 fs, με αποτέλεσμα το φωτόνιο να επανεκπέμπεται γρήγορα [4].

Όταν η σκέδαση των φωτονίων συμβαίνει αποκλειστικά από την παραμόρφωση του νέφους ηλεκτρονίων, η συχνότητά τους παραμένει σε μεγάλο βαθμό αμετάβλητη. Αυτός ο τύπος σκέδασης ονομάζεται *ελαστική σκέδαση* ή *σκέδαση Rayleigh*. Ωστόσο, εάν υπάρχει πυρηνική κίνηση κατά τη διάρκεια της σκέδασης, η ενέργεια μπορεί να μεταφερθεί μεταξύ του προσπίπτοντος φωτονίου και του μορίου. Καθώς η διαφορά ενέργειας μεταξύ των προσπίπτοντων και των σκεδαζόμενων φωτονίων είναι ίση με μία μονάδα δόνησης, η σκέδαση αυτή είναι *ανελαστική* και ονομάζεται *σκέδαση Raman*. Η *σκέδαση Raman* θεωρείται ένα ασθενές φαινόμενο, καθώς σκεδάζεται μόνο ένα φωτόνιο για κάθε $10^6 - 10^8$ προσπίπτοντα στο δείγμα φωτόνια [5]. Χάρη στις εξελίξεις στην τεχνολογία των σύγχρονων *laser* και την υψηλή ευαισθησία των ψηφιακών αισθητήρων, είναι πλέον δυνατή η αποτελεσματική καταγραφή και μέτρηση αυτού του φαινομένου.



Σχήμα 3.1 : Ενεργειακό διάγραμμα της ελαστικής σκέδασης Rayleigh και της ανελαστικής σκέδασης Raman (Stokes, anti-Stokes). Παρουσιάζεται συγκριτικά και η ενέργεια απορρόφησης στο υπέρυθρο.

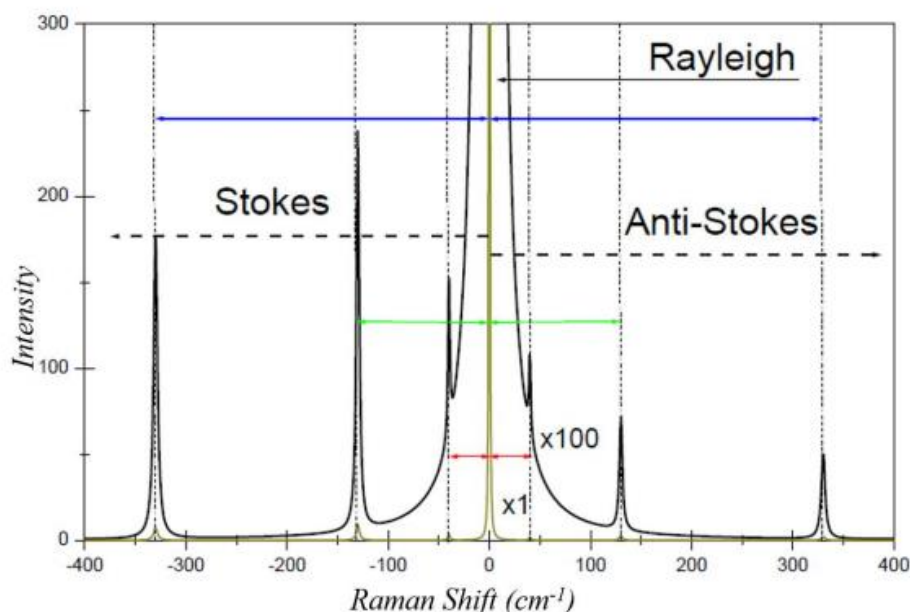
Στο **Σχήμα 3.1** παρουσιάζεται το ενεργειακό διάγραμμα για μία δόνηση. Τα περισσότερα μόρια βρίσκονται στο χαμηλότερο ενεργειακά δονητικό επίπεδο σε θερμοκρασία δωματίου. Η ενέργεια των εικονικών καταστάσεων καθορίζεται από τη συχνότητα της πηγής *laser* που χρησιμοποιείται, καθώς οι καταστάσεις αυτές δεν είναι πραγματικές, αλλά δημιουργούνται από την αλληλεπίδραση της δέσμης με τα ηλεκτρόνια [6]. Επομένως, η *σκέδαση Rayleigh* είναι πιο συχνή και πιο έντονη. Αντίθετα, η *σκέδαση Raman*, η οποία περιλαμβάνει μεταφορά ενέργειας, ως μη ελαστική σκέδαση, έχει πολύ μικρότερες πιθανότητες να συμβεί και άρα χαρακτηρίζεται από μικρότερη ένταση. Η *σκέδαση Raman* αποτελείται από τη *σκέδαση Stokes*

και τη σκέδαση *anti-Stokes*. Σε θερμοκρασία δωματίου είναι πιθανότερο να παρατηρηθεί η σκέδαση Stokes, ενώ οι πιθανότητες των σκεδάσεων Stokes και *anti-Stokes* πλησιάζουν καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία. Αυτό συμβαίνει επειδή υπάρχει μεγαλύτερος πληθυσμός σε διεγερμένες δονητικές καταστάσεις από ότι στη θεμελιώδη. Συνήθως, πειραματικά προτιμάται η καταγραφή της σκέδασης Stokes λόγω της διαφοράς στην έντασή τους [7].

3.1.3 Κανόνες Επιλογής

Για την κατανόηση και τη σωστή ερμηνεία των φασμάτων Raman, απαραίτητη προϋπόθεση είναι να γίνει αντιληπτό ότι η έντονη σκέδαση Raman προέρχεται από δονήσεις, που προκαλούν μεταβολή στην πολωσιμότητα του νέφους ηλεκτρονίων που περικλείει το μόριο. Γενικά, μεγαλύτερες μεταβολές προκαλούνται από συμμετρικές δονήσεις, οι οποίες οδηγούν σε ισχυρότερη σκέδαση και άρα σε μεγαλύτερη παρατηρούμενη ένταση. Αντίθετα, στη φασματοσκοπία απορρόφησης υπερίθρου παρατηρείται το αντίθετο φαινόμενο, όπου παρατηρείται πιο ισχυρή απορρόφηση από τις ασύμμετρες δονήσεις [7]. Αυτός είναι ο λόγος που οι δύο αυτές φασματοσκοπικές τεχνικές χαρακτηρίζονται ως συμπληρωματικές.

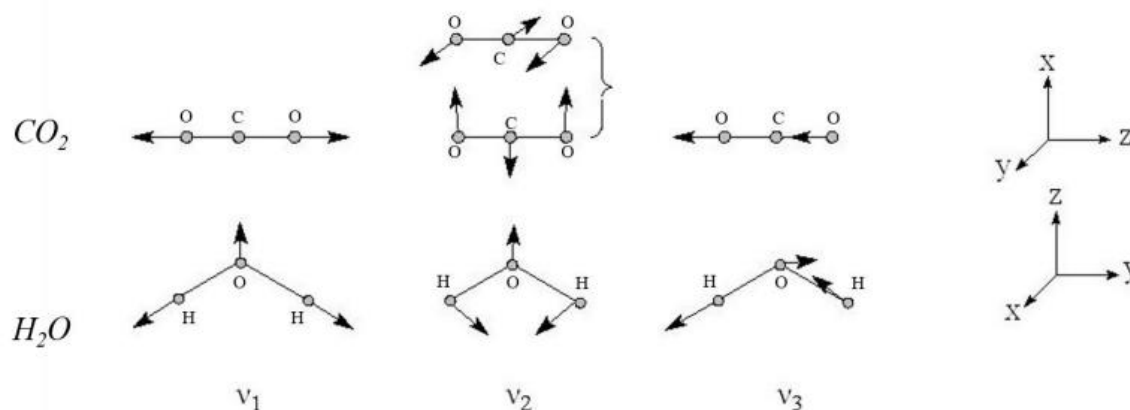
Σε ένα τυπικό φάσμα Raman, όπως αυτό στο Σχήμα 3.2, καταγράφεται η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας συναρτήσει της συχνότητας. Αναλυτικότερα, ο άξονας x αντιπροσωπεύει τη διαφορά της συχνότητας του *laser* από τη σκεδαζόμενη συχνότητα και δίνεται σε κυματάρια cm^{-1} . Παρόλο που η χρήση των κυματάρια δεν είναι μονάδα μέτρησης στο $S.I.$, η χρήση τους είναι ευρέως διαδεδομένη. Ο άξονας y εκφράζει την ένταση της κάθε σκέδασης. Η περιοχή ενδιαφέροντος, όπου παρουσιάζονται τα περισσότερα χαρακτηριστικά των μορίων, είναι περίπου στα $3600 - 200 cm^{-1}$. Ανάλογα με τις ζητούμενες πληροφορίες, η περιοχή αυτή μπορεί να αλλάξει, καθώς κάθε χημικό είδος δίνει το δικό του χαρακτηριστικό δονητικό φάσμα Raman, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποιοτικό του προσδιορισμό.



Σχήμα 3.2 : Τυπικό φάσμα Raman, στο οποίο φαίνονται η ζώνη ελαστικής σκέδασης (Rayleigh) και οι ζώνες μη-ελαστικής σκέδασης (Stokes και Anti-Stokes).

Σχετικά με τους βαθμούς ελευθερίας, ένα μόριο N ατόμων διαθέτει $3N$ βαθμούς ελευθερίας στο καρτεσιανό σύστημα συντεταγμένων x, y, z . Αν θεωρηθεί, αρχικά, το μόριο “παγωμένο”, τότε απαιτούνται 3 βαθμοί ελευθερίας για την κίνησή του στο χώρο, οι οποίοι περιγράφουν την κίνηση του κέντρου μάζας του. Επιπλέον, λόγω της περιστροφής του μορίου γύρω από τους 3 άξονες, υπάρχουν ακόμα 3 περιστροφικοί βαθμοί ελευθερίας. Στην περίπτωση ενός γραμμικού μορίου, η περιστροφή γύρω από τον άξονά του δεν προκαλεί αλλαγές, με αποτέλεσμα οι περιστροφικοί βαθμοί ελευθερίας του να είναι 2. Επιπλέον, λόγω της ικανότητας μεταφοράς του μορίου στους τρεις άξονες, υπάρχουν άλλοι 3 μεταφορικοί βαθμοί ελευθερίας. Επομένως, μένουν $3N - 6$ (ή $3N - 5$ για γραμμικά μόρια) βαθμοί ελευθερίας αποκλειστικά για δονήσεις του μορίου. Για ένα απλό διατομικό μόριο, όπως αυτό το O_2 , υπάρχουν 6 βαθμοί ελευθερίας, από τους οποίους ο ένας είναι δονητικός. Στο μόριο αυτό, παρατηρείται μία δόνηση τάσης, η οποία είναι συμμετρική και μεταβάλλει την πολωσιμότητα του μορίου, παρουσιάζοντας έτσι κορυφή στο φάσμα Raman.

Σε ένα τριατομικό μόριο, όπως το μόριο του διοξειδίου το άνθρακα CO_2 ή του νερού H_2O , υπάρχουν διαφορές στους βαθμούς ελευθερίας από ότι σε ένα διατομικό. Στην περίπτωση αυτή, οι δονητικοί βαθμοί ελευθερίας είναι 3 (ή 4 για γραμμικά μόρια). Υποθέτοντας πως τα άτομα είναι σφαίρες και οι μεταξύ τους δεσμοί ελατήρια, μπορούν να παρασταθούν οι τρόποι δόνησης των μορίων. Ο νόμος του *Hooke* συνδέει τη συχνότητα δόνησης με τα χαρακτηριστικά των μορίων. Ισχυρότεροι δεσμοί και ελαφρύτερα άτομα αποδίδουν υψηλότερη συχνότητα δόνησης, ενώ ασθενέστεροι δεσμοί και πιο βαριά άτομα χαμηλώνουν τη συχνότητα δόνησης [8].



Σχήμα 3.3 : Σχηματική αναπαράσταση των τρόπων δόνησης των μορίων του διοξειδίου του άνθρακα και του νερού, αντίστοιχα, με τα τοπικά συστήματα συντεταγμένων τους. Στην περίπτωση του διοξειδίου του άνθρακα, η δόνηση κάμψης v_2 είναι διπλά εκφυλισμένη (σύνολο 4 δονήσεις).

Ενώ το μοντέλο των σφαιρών και των ελατηρίων, που αναφέρθηκε παραπάνω, είναι ευρέως διαδεδομένο, απέχει αρκετά από την τρισδιάστατη δομή των μορίων. Στην πραγματικότητα, τα μόρια περιβάλλονται από ένα νέφος ηλεκτρονίων που τα καλύπτει. Αυτό το νέφος υφίσταται παραμόρφωση με κάθε δόνηση του μορίου, οδηγώντας σε αλλοιώσεις στη διπολική ροπή του μορίου και στην πολωσιμότητα. Συγκεκριμένα, στα τριατομικά μόρια, οι συμμετρικές δονήσεις τάσης προκαλούν σημαντικές μεταβολές στην πολωσιμότητα του μορίου, με αποτέλεσμα την έντονη σκέδαση *Raman*. Από την άλλη πλευρά, οι δονήσεις κάμψης εμφανίζουν ασθενή σκέδαση *Raman*, καθώς δεν προκαλούν μεγάλη μεταβολή στην πολωσιμότητά του.

Σε μεγαλύτερα και πολυπλοκότερα μόρια, αυτού του είδους η ανάλυση είναι αρκετά δύσκολο να εφαρμοστεί. Σε αυτή την περίπτωση, χρησιμοποιούνται θεωρητικοί υπολογισμοί όπως προκύπτουν από τη Θεωρία Ηλεκτρονιακής Πυκνότητας (Density Functional Theory, DFT). Αυτό που συμβαίνει σε αυτούς τους υπολογισμούς είναι η απλοποίηση του προβλήματος χωρίζοντας το μόριο σε έναν αριθμό “θραυσμάτων” με κοινά χαρακτηριστικά, τα οποία μπορούν στη συνέχεια να συσχετισθούν με περισσότερα μόρια [9].

3.1.4 Κλασική Περιγραφή του Φαινομένου Raman

Η κλασική περιγραφή του φαινομένου *Raman* βασίζεται στη θεμελιώδη έννοια της πολωσιμότητας των υλικών. Η περιγραφή αυτή παρουσιάζει σημαντικές αναλογίες με γνωστά φαινόμενα της κυματικής και του ηλεκτρομαγνητισμού. Επομένως, η περιγραφή αυτή, αν και δεν είναι η πλησιέστερη δυνατή, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Εάν προσπίπτει ακτινοβολία

υψηλής συχνότητας ν_0 στο δείγμα, τότε το ηλεκτρικό πεδίο της διεγείρουσας ακτινοβολίας στην “περιοχή” ενός μορίου ορίζεται ως:

$$E = E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (3.1)$$

όπου E_0 είναι το πλάτος του κύματος.

Τα πρωτόνια και τα ηλεκτρόνια του μορίου δέχονται χρονικά εξαρτώμενες και αντίθετης διεύθυνσης δυνάμεις από το εξωτερικό ηλεκτρομαγνητικό πεδίο, με αποτέλεσμα οι θετικά φορτισμένοι πυρήνες να έλκονται προς τον αρνητικό πόλο και τα αρνητικά φορτισμένα ηλεκτρόνια προς το θετικό πόλο, οδηγώντας σε μετατόπιση του “κέντρου βάρους” των αρνητικών φορτίων σε σχέση με αυτό των θετικών. Η μετατόπιση αυτή προκαλεί μία επαγωγική διπολική ροπή (induced electric dipole moment, μ_{ind}). Το μόριο, τότε, χαρακτηρίζεται ως πολωμένο. Η παραγόμενη επαγόμενη διπολική ροπή δίνεται από τη σχέση:

$$\mu_{ind} = \alpha E = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (3.2)$$

όπου ν_0 είναι η συχνότητα του *laser* και α είναι ένας τανυστής δεύτερης τάξης. Στην περίπτωση των ισότροπων υλικών, ο τανυστής α εκφυλίζεται σε ένα βαθμωτό μέγεθος.

Η μετατόπιση των πυρήνων Q_ν ενός διατομικού μορίου, κατά τη δόνησή του με συχνότητα ν_ν , μεταβάλλεται σύμφωνα με τη σχέση:

$$Q_\nu = r - r_{eq} = Q_0 \cos(2\pi\nu_\nu t) \quad (3.3)$$

όπου Q_0 είναι η μέγιστη διαπυρηνική απόσταση σε σχέση με τη θέση ισορροπίας.

Όταν η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου της διεγείρουσας ακτινοβολίας δεν είναι πολύ μεγάλη, η πολωσιμότητα δίνεται από τη σχέση:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_\nu} \right)_0 Q_\nu \quad (3.4)$$

όπου α_0 είναι η πολωσιμότητα στη θέση ισορροπίας, για μία μη-διαταραγμένη κατάσταση και $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_\nu} \right)_0$ είναι ο ρυθμός μεταβολής της πολωσιμότητας α , καθώς μεταβάλλεται η κανονική συντεταγμένη Q_ν επίσης στη θέση ισορροπίας.

Συνδυάζοντας τις σχέσεις (3.2), (3.3) και (3.4), προκύπτει για την επαγόμενη διπολική ροπή η εξίσωση:

$$\mu_{ind} = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_\nu} \right)_0 Q_0 E_0 [\cos(2\pi(\nu_0 + \nu_\nu)t) + \cos(2\pi(\nu_0 - \nu_\nu)t)] \quad (3.5)$$

Από τη σχέση (3.5) γίνεται αντιληπτό πως η επαγόμενη διπολική ροπή ενός μορίου, και κατά συνέπεια η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, αποτελείται από τρεις συνιστώσες. Ο πρώτος όρος αυτής της εξίσωσης αναφέρεται σε ένα ταλαντούμενο δίπολο, το οποίο εκπέμπει ακτινοβολία συχνότητας ν_0 , ίδια με τη συχνότητα του διεγείροντος φωτός (σκέδαση *Rayleigh*). Οι άλλοι δύο όροι αντιστοιχούν σε σκέδαση *Raman* με συχνότητες $\nu_0 + \nu_\nu$ (συχνότητες *Anti-Stokes*) και $\nu_0 - \nu_\nu$ (συχνότητες *Stokes*). Γίνεται επομένως κατανοητό ότι, για να είναι μία δόνηση ενεργή στο Raman, θα πρέπει η μεταβολή της πολωσιμότητας στη θέση ισορροπίας να είναι διάφορη του μηδενός, δηλαδή $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_\nu} \right)_0 \neq 0$.

3.1.5 Κβαντική Περιγραφή Φαινομένου Raman

Στην κβαντική περιγραφή του φαινομένου *Raman*, όταν ένα γραμμικά πολωμένο φως συχνότητας ν_0 και έντασης I_0 , το οποίο βρίσκεται αρχικά σε μία δονητική κατάσταση m , έρθει σε μία νέα δονητική ηλεκτρονιακή κατάσταση n , τότε συμβαίνει ταυτόχρονη σκέδαση φωτός συχνότητας $\nu_0 - \nu_{mn}$ ($\nu_{mn} = \nu_n - \nu_m$). Η ολική ένταση του σκεδαζόμενου φωτός προσδιορίζεται μετά τον υπολογισμό του μέσου όρου για όλους τους προσανατολισμούς του μορίου, υπό στερεά γωνία 4π . Επομένως, η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας μπορεί να γραφεί ως:

$$I_{mn} = \frac{2^7 \pi^5}{3^2 c^4} I_0 (\nu_0 - \nu_{mn})^4 \sum_{J,K} \left| (\alpha_{JK})_{mn} \right|^2 \quad (3.6)$$

όπου c είναι η ταχύτητα του φωτός στο κενό και $(\alpha_{JK})_{mn}$ είναι η JK συνιστώσα του τανυστή πολωσιμότητας ($J, K = x, y, z$) για τη μετάβαση του συστήματος από την κατάσταση m στην κατάσταση n ($m \rightarrow n$). Από την εξίσωση (3.6) γίνεται αντιληπτό ότι, οι εντάσεις των γραμμών Raman καθορίζονται από την τέταρτη δύναμη της συχνότητας της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας και από το τετράγωνο της μεταβολής της πολωσιμότητας κατά τη διάρκεια της μετάπτωσης.

Ο *Placzek* απέδειξε ότι, το στοιχείο JK της μήτρας του τανυστή πολωσιμότητας για τη μετάπτωση $m \rightarrow n$ έχει τη μορφή:

$$(\alpha_{JK})_{mn} = \int \Psi_n^* \alpha_{JK} \Psi_m d\tau = \frac{1}{h} \sum_e \left[\frac{M(K)_{em} M(J)_{ne}}{\nu_e - \nu_m - \nu_0} + \frac{M(J)_{em} M(K)_{ne}}{\nu_e - \nu_m + \nu_0} \right] \quad (3.7)$$

όπου Ψ_m και Ψ_n είναι οι δονητικές ηλεκτρονικές κυματοσυναρτήσεις των καταστάσεων m και n και e είναι μία ενδιάμεση κατάσταση του μορίου [5, 6, 9]. Ως M ορίζεται η ηλεκτρική διπολική ροπή της μετάπτωσης $e \rightarrow m$ κατά τη διεύθυνση K και δίνεται από τη σχέση:

$$M(K)_{em} = \langle m | \mu_K | e \rangle \quad (3.8)$$

όπου μ_K είναι η συνιστώσα του τελεστή της διπολικής ροπής στη διεύθυνση K .

Η σχέση (3.7) δε διευκρινίζει τη φύση της αρχικής και τελικής κατάστασης του μορίου και δε δίνει πληροφορίες σχετικά με το ποιες δονήσεις αυξάνονται λόγω του φαινομένου του συντονισμού. Η πολωσιμότητα του μορίου εξαρτάται από τη συχνότητα της διεγείρουσας ακτινοβολίας ν_0 , λόγω των παρονομαστών της εξίσωσης (3.7). Στο φαινόμενο Raman, όπου $\nu_0 \ll \nu_e$, το α_{JK} είναι ανεξάρτητο του ν_e , και η σκεδαζόμενη ένταση εξαρτάται μόνο από τις αρχικές και τελικές καταστάσεις.

Ο παρονομαστής $(\nu_e - \nu_m - \nu_0)$ δεν απειρίζεται κατόπιν εισαγωγής του όρου απόσβεσης Γ_e :

$$(\alpha_{JK})_{mn} = \frac{1}{h} \sum_e \left[\frac{M(K)_{em} M(J)_{ne}}{\nu_e - \nu_m - \nu_0 + i\Gamma_e} + \frac{M(J)_{em} M(K)_{ne}}{\nu_e - \nu_m + \nu_0 + i\Gamma_e} \right] \quad (3.9)$$

Η σταθερά απόσβεσης Γ_e είναι ένα μέτρο του εύρους ζώνης της ηλεκτρονικής μετάπτωσης και αντιπροσωπεύει τον πεπερασμένο χρόνο ζωής και την “οξεία μορφή” της ενδιάμεσης κατάστασης [10].

Τέλος, η κβαντομηχανική ερμηνεία του φαινομένου Raman, σύμφωνα με τον *Placzek*, δίνει τη σχέση (3.10), σχετικά με τον λόγο των εντάσεων των κορυφών *Raman Stokes* και *Raman Anti-Stokes*:

$$\frac{I_{aS}}{I_S} = \frac{(\tilde{\nu}_0 + \tilde{\nu}_K)^4}{(\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu}_K)^4} \exp\left(-\frac{hc\tilde{\nu}_K}{k_B T}\right) \quad (3.10)$$

όπου οι συχνότητες εκφράζονται σε κυματάριθμους, cm^{-1} . Γίνεται εύκολα αντιληπτό πως ο λόγος των δύο εντάσεων είναι ανάλογος της απόλυτης θερμοκρασίας T . Το γεγονός αυτό εξηγεί το λόγο για τον οποίο αύξηση της θερμοκρασίας του συστήματος οδηγεί σε αύξηση της πιθανότητας παρατήρησης σκέδασης *Raman Anti-Stokes*.

3.2 Φασματοσκοπία Υπεριώδους – Ορατού

Η φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού ($UV - Vis$) είναι μία από τις χρησιμότερες ενόργανες τεχνικές ανάλυσης ανήκει στις φασματοφωτομετρικές τεχνικές, οι οποίες βασίζονται στην αλληλεπίδραση μεταξύ της ύλης και της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Η απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή του *υπεριώδους* (Ultra Violet, UV) και του *ορατού* (Visible, Vis) τμήματος του φάσματος είναι αποτέλεσμα ενεργειακών μεταβολών στην ηλεκτρονιακή δομή των μορίων. Συγκεκριμένα, στη φασματοσκοπία $UV - Vis$, τα εξωτερικά ηλεκτρόνια είναι αυτά που, με τη μετάβασή τους από ένα τροχιακό σε κάποιο άλλο, προκαλούν απορρόφηση ενέργειας, η οποία είναι κβαντισμένη. Οι αλλαγές της ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας του μορίου μιας χημικής ένωσης, προκαλούν μεταβολές της διπολικής του ροπής, η οποίες είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδρασή του με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία [11].

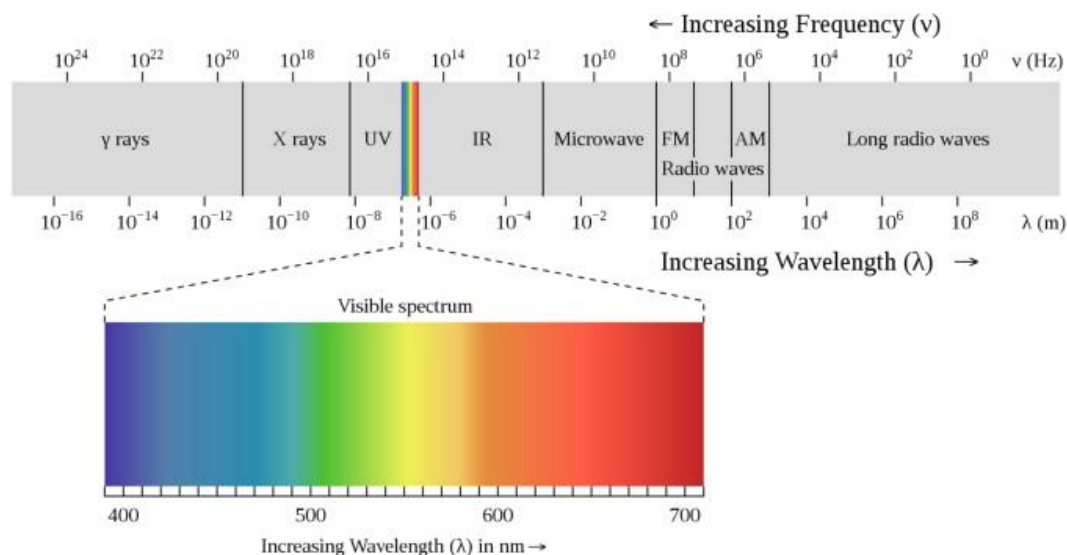
Η ενέργεια της ακτινοβολίας είναι αντιστρόφως ανάλογη με το μήκος κύματός της, σύμφωνα με τη σχέση:

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda} = h \cdot \nu \quad (3.11)$$

όπου λ είναι το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, ν η συχνότητά της, c η ταχύτητα του φωτός στο κενό και h η σταθερά του Planck. Από την εξίσωση (3.11) γίνεται αντιληπτό ότι, ακτινοβολίες με μικρό μήκος κύματος έχουν μεγαλύτερη ενέργεια σε σχέση με ακτινοβολίες με μεγαλύτερο μήκος κύματος. Για τη συχνότητα ισχύει το αντίθετο, δηλαδή ακτινοβολίες με μεγαλύτερη συχνότητα, χαρακτηρίζονται και από μεγαλύτερη ενέργεια [12].

Στις φασματοσκοπικές τεχνικές $UV - Vis$, οι θέσεις των ταινιών απορρόφησης δίνονται ως *μήκος κύματος* στο σημείο της μέγιστης απορρόφησης, λ_{max} , είτε σε μονάδες *Angstrom* ($1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$), είτε σε νανόμετρα ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). Αυτό το μήκος κύματος χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό μίας ουσίας.

Το φάσμα χωρίζεται, για πρακτικούς λόγους, σε τρεις περιοχές, στην *ορατή περιοχή* (Vis), με μήκος κύματος από 400 έως 750 nm, στην *κυρίως υπεριώδη περιοχή* (near UV), με μήκος κύματος μεταξύ 200 και 400 nm, και στην *άπω υπεριώδη περιοχή*, με μήκος κύματος κάτω των 200 nm. Η τελευταία είναι περιοχή απορρόφησης του ατμοσφαιρικού οξυγόνου και τα φάσματα είναι δυνατόν να ληφθούν μόνο με τη χρήση αντλίας κενού και κατάλληλων οπτικών [11].



Σχήμα 3.4 : Σχηματική αναπαράσταση του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Φαίνεται, σε μεγέθυνση, η μικρή περιοχή του φάσματος που αντιστοιχεί στο ορατό φως.

Όταν μία ουσία απορροφά ακτινοβολία με μήκος κύματος μέσα στο ορατό φως, τότε αυτό που παρατηρείται ως χρώμα της ουσίας είναι το συμπληρωματικό χρώμα του ορατού φωτός, το οποίο δεν απορροφάται και ανακλάται. Η απορρόφηση της ακτινοβολίας μίας ουσίας σε ένα διάλυμα είναι ανάλογη της συγκέντρωσής της και περιγράφεται από την εξίσωση του νόμου Lambert – Beer:

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon * c * l \quad (3.12)$$

όπου A είναι η απορρόφηση της ακτινοβολίας, T είναι η διαπερατότητα, I_0 και I είναι η ισχύς της προσπίπτουσας και εξερχόμενης ακτινοβολίας αντίστοιχα, ϵ είναι ο συντελεστής απόσβεσης, c η συγκέντρωση του διαλύματος και l είναι το μήκος διαδρομής της ακτινοβολίας εντός του διαλύματος [13].

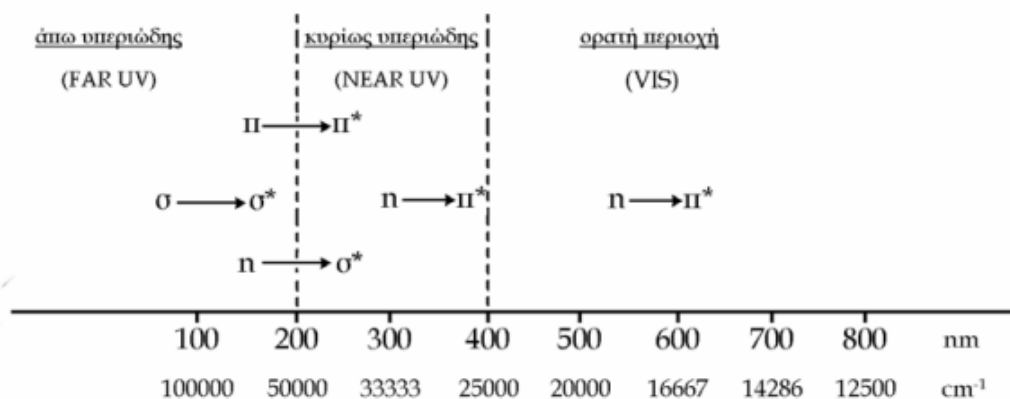
Ο νόμος Lambert – Beer δεν ισχύει πάντα, αλλά μπορεί να εφαρμοστεί μόνο όταν ισχύουν κάποιες προϋποθέσεις. Αρχικά, θα πρέπει ο μόνος μηχανισμός αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με τη διαλυμένη ουσία να είναι η απορρόφηση. Επιπλέον, η προσπίπτουσα ακτινοβολία πρέπει να είναι μονοχρωματική και η απορρόφηση να γίνεται σε έναν όγκο διαλύματος ομοιόμορφης διατομής. Τέλος, τα σωματίδια που απορροφούν θα πρέπει να δουν ανεξάρτητα το ένα από το άλλο και άσχετα από τον αριθμό και το είδος τους.

Σε πολλές όμως περιπτώσεις, παρατηρείται απόκλιση από τη γραμμική σχέση μεταξύ απορρόφησης και συγκέντρωσης, οι οποίες περιορίζουν τη δυναμική περιοχή συγκεντρώσεων όπου μπορεί να εφαρμοστεί ο νόμος του Beer. Ο νόμος του Beer δεν ισχύει για πυκνά διαλύματα, με συγκέντρωση μεγαλύτερη από 0.01 M, διότι σε αυτά οι αποστάσεις μεταξύ των

σωματιδίων που απορροφούν γίνονται τόσο μικρές, ώστε καθένα από αυτά να επηρεάζει την κατανομή φορτίου στα γειτονικά σωματίδια. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, να επηρεάζεται η ικανότητά τους να απορροφούν ακτινοβολία ορισμένου μήκους κύματος. Επίσης, σε πυκνά διαλύματα, δεν παραμένει σταθερή και η μοριακή απορροφητικότητα ϵ .

Ανάλογα με τα ηλεκτρόνια και τις μεταβάσεις του στα διάφορα ενεργειακά επίπεδα, υπάρχουν διαφορές στο φάσμα UV – Vis. Στα περισσότερα οργανικά μόρια, τα ηλεκτρόνια κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες, τα σ -ηλεκτρόνια, τα π -ηλεκτρόνια και τα n -ηλεκτρόνια ή αλλιώς *μη-δεσμικά*, τα οποία δε συμμετέχουν σε δεσμούς και συγκρατούνται ασθενέστερα, με αποτέλεσμα να μπορούν να υποστούν μεταβάσεις. Τα σ -ηλεκτρόνια είναι πιο σταθερά, προσκολλημένα στους πυρήνες και απαιτούν μεγάλη ενέργεια, ώστε να μεταβούν σε άλλα ενεργειακά επίπεδα. Σε αντίθεση με τα σ -ηλεκτρόνια, τα π - και n -ηλεκτρόνια απαιτούν μικρότερη ενέργεια για μία τέτοια μετάβαση και συνήθως τα n - απαιτούν τη μικρότερη ενέργεια.

Η ποσότητα της ενέργειας που απαιτείται για τη διέγερση των ηλεκτρονίων ανταποκρίνεται στην εμφάνιση απορροφήσεων στην περιοχή UV και Vis. Επομένως, η μετάβαση από ένα δεσμικό σ -ηλεκτρόνιο σε ένα μη δεσμικό σ -ηλεκτρόνιο, $\sigma \rightarrow \sigma^*$, απαιτεί ενέργεια της οποίας το μήκος κύματος ανήκει στην άπω υπεριώδη περιοχή, οι μεταβάσεις $\pi \rightarrow \pi^*$ και $n \rightarrow n^*$ εμφανίζονται στη διαχωριστική γραμμή της άπω UV και κυρίως UV και, τέλος, η μετάβαση $n \rightarrow \pi^*$ στην υπεριώδη και ορατή περιοχή.



Σχήμα 3.5 : Ηλεκτρονιακές μεταβάσεις στη UV-Vis φασματοσκοπία.

Οι περιπτώσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω είναι οι γενικοί κανόνες για τις ηλεκτρονιακές μεταβάσεις. Όπως φαίνεται στο [Σχήμα 3.5](#), οι πιο ενδιαφέρουσες απορροφήσεις είναι για μεταβάσεις $n \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ και $n \rightarrow \pi^*$. Επιπλέον, οι μεταβάσεις $\sigma \rightarrow \sigma^*$ εμφανίζουν απορροφήσεις στην άπω UV περιοχή, οι οποίες είναι μικρής πρακτικής σημασίας από αναλυτικής πλευράς. Τέλος, η εισαγωγή ομάδας που περιέχει μη-δεσμικά ηλεκτρόνια επιτρέπει επιπλέον τη μετάβαση $n \rightarrow \sigma^*$, με αποτέλεσμα να αυξηθεί το μήκος κύματος της μετάβασης $\sigma \rightarrow \sigma^*$ [14].

Παρά το γεγονός πως οι απορροφήσεις της υπεριώδους ακτινοβολίας προκαλούνται από τη διέγερση των ηλεκτρονίων από τη θεμελιώδη σε διεγερμένες καταστάσεις, σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό του μήκους κύματος της ακτινοβολίας που απορροφάται διαδραματίζουν και οι πυρήνες, οι οποίοι συγκρατούν τα ηλεκτρόνια των δεσμών. Η ποσότητα της ενέργειας μίας μετάβασης καθώς και το μήκος κύματος της απορροφώμενης ακτινοβολίας είναι χαρακτηριστικές ιδιότητες των ατόμων μιας ομάδας και όχι των ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στους δεσμούς. Η ομάδα των ατόμων που συμβάλλει σε μία τέτοια απορρόφηση ονομάζεται *χρωμοφόρος ομάδα*. Αλλαγές στη δομή των ατόμων της χρωμοφόρου ομάδας προκαλούν μεταβολή της ενέργειας που απορροφάται και συνεπώς και της έντασης της απορρόφησης. Μπορούν να εφαρμοστούν κάποιοι απλοί κανόνες, χρησιμοποιώντας μία μεγάλη ποικιλία πειραματικών φασμάτων, έτσι ώστε να προβλεφθούν οι μεταβολές στην απορρόφηση από τις αλλαγές των ατόμων [15].

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι απορροφήσεις των πιο συνηθισμένων χρωμοφόρων ομάδων.

Πίνακας 3.1 : Απορροφήσεις απλών απομονωμένων χρωμοφόρων ομάδων.

Χρωμοφόρος Ομάδα	Μετάβαση	$\lambda_{\max}$ (nm)	Χρωμοφόρος Ομάδα	Μετάβαση	$\lambda_{\max}$ (nm)
R – OH	$n \rightarrow \sigma^*$	180	R – NO ₂	$n \rightarrow \pi^*$	271
R – O – R	$n \rightarrow \sigma^*$	180	R – CHO	$\pi \rightarrow \pi^*$	190
R – NH ₂	$n \rightarrow \sigma^*$	190	R – CHO	$n \rightarrow \pi^*$	290
R – SH	$n \rightarrow \sigma^*$	210	R ₂ C = O	$\pi \rightarrow \pi^*$	180
R ₂ C = CR ₂	$\pi \rightarrow \pi^*$	175	R ₂ C = O	$n \rightarrow \pi^*$	280
R – C $\equiv$ C – R	$\pi \rightarrow \pi^*$	170	RCOOH	$n \rightarrow \pi^*$	205
R – C $\equiv$ N	$n \rightarrow \pi^*$	160	RCOOR'	$n \rightarrow \pi^*$	205
R – N $\equiv$ N – R	$n \rightarrow \pi^*$	340	RCONH ₂	$n \rightarrow \pi^*$	210

Τέλος, επίδραση στο μήκος κύματος της απορρόφησης υπάρχει και από το διαλύτη. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος λήψης φασμάτων UV – Vis είναι η παρασκευή διαλύματος της μελετώμενης ουσίας σε κατάλληλο διαλύτη, ο οποίος δεν απορροφά στην ίδια θέση με την ουσία. Ωστόσο, η παρουσία του διαλύτη επηρεάζει ελαφρά τη θέση της μέγιστης απορρόφησης. Σύμφωνα με την αρχή *Franck – Condon*, μία ηλεκτρονιακή μετάβαση γίνεται τόσο γρήγορα, ώστε η ενδοατομική απόσταση σε ένα μόριο να παραμένει σχεδόν σταθερή κατά τη διάρκεια της μετάβασης. Μπορούν, όμως, τα ηλεκτρόνια της διαλυμένης ουσίας και του διαλύτη να αναδιοργανωθούν, με αποτέλεσμα να υπάρχουν περισσότερες μεταβάσεις, οι

οποίες είναι δυνατόν να είναι πιο πολικές από τη θεμελιώδη. Από την αλληλεπίδραση του διαλύτη με τη διαλυμένη ουσία, δηλαδή από την επίδραση του διαλύτη στο μήκος κύματος, μπορούν να παρατηρηθούν δύο περιπτώσεις. Η πρώτη περίπτωση αναφέρεται στην μετατόπιση του μήκους κύματος μέγιστης απορρόφησης σε μεγαλύτερες τιμές και είναι γνωστή ως *ερυθρή μετατόπιση* (red shift) και η δεύτερη περίπτωση αφορά μετατόπιση του λ_{max} σε μικρότερα μήκη κύματος και ονομάζεται *κυανή μετατόπιση* (blue shift) [16, 17].

Με τη φασματοσκοπία UV – Vis επιτυγχάνεται, τόσο *ποιοτική ανάλυση* του μελετώμενου συστήματος με βάση το φάσμα απορρόφησης, εφόσον τα φάσματα παρέχουν πληροφορίες για ορισμένες μόνο ομάδες και δεν χαρακτηρίζουν το μόριο ως σύνολο, όσο και *ποσοτική ανάλυση* σύμφωνα με την απορρόφηση του δείγματος, συνήθως στο λ_{max} , με βάση των νόμο Lambert – Beer και τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων.

3.3 Βιβλιογραφία

- [1] Raman, C. V. (1928). A new radiation. *Indian Journal of Physics*, Vol. 2, pp. 387-398.
- [2] Harris, D. C. & Bertolucci, M. D. (1989). *Symmetry and Spectroscopy: An Introduction to Vibrational and Electronic Spectroscopy*. New York: Dover Publications
- [3] Skoog, D. A., Crouch, S. R. & Holler, F. J. (2006). *Principles of Instrumental Analysis*. Belmont: Thomson Brooks Cole.
- [4] Larkin, P. (2011). *Infrared and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation*. Elsevier.
- [5] Long, D. A. (1977). *Raman Spectroscopy*. New York: McGraw-Hill.
- [6] Smith, E. & Dent, G. (2005). *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*. United States: John Wiley & Sons.
- [7] Banwell, C. N. (1983). *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*. New York: McGraw-Hill.
- [8] Ferraro, J. R., Nakamoto, K. & Brown, C. W. (2003). *Introductory Raman Spectroscopy (Second Edition)*. Amsterdam: Elsevier.
- [9] Parr, R. G. & Weitao, Y. (1989). *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*. Great Britain: Oxford University Press.
- [10] Atkins, P. & Paula, J. (2009). *Elements of Physical Chemistry* (Fifth Edition). Great Britain: Oxford University Press.
- [11] Gillam, A. E. & Stern, E. S. (1958). *An Introduction to Electronic Absorption Spectroscopy in Organic Chemistry*. London: E. Arnold.

- [12] Picollo, M., Aceto, M. & Vitorino, T. (2018). UV-Vis spectroscopy. *Physical Sciences Reviews*, Vol. 4 (4), pp. 20180008.
- [13] Perkampus, H. H. (2013). *UV-VIS Spectroscopy and Its Applications*. Berlin: Springer Science & Business Media.
- [14] Drago, R. S. (1997). *Physical Methods for Chemists (Second Edition)*. W. B. Saunders.
- [15] Harris, D. C. & Bertolucci, M. D (1978). *Symmetry and Spectroscopy: An Introduction to Vibrational and Electronic Spectroscopy*. New York: Oxford University Press.
- [16] Metha, A. (2011) . Ultraviolet-Visible (UV-Vis) Spectroscopy – Principle. *Analytical Chemistry*.
- [17] Douglas, B. E., & Hollingsworth, C. A. (1985). *Symmetry in Bonding and Spectra: An Introduction*. New York: Academic Press.

Κεφάλαιο 4 : Θεωρία Κβαντομηχανικών Υπολογισμών

4.1 Εισαγωγή

Η υπολογιστική χημεία είναι ένας κλάδος της χημείας που περιλαμβάνει τη χρήση, τόσο αριθμητικών, όσο και αναλυτικών υπολογισμών για την αντιμετώπιση διαφόρων χημικών προβλημάτων. Χρησιμοποιώντας τεχνικές από τη θεωρητική χημεία, οι οποίες είναι ενσωματωμένες σε προγράμματα υπολογιστών διαθέσιμα σε εμπορικούς καθώς και σε μη εμπορικούς τομείς, η υπολογιστική χημεία παρέχει ένα μέσο για τη διερεύνηση χημικών συστημάτων που δεν μπορούν να επιλυθούν αναλυτικά λόγω της πολύπλοκης κβαντικής τους φύσης.

Το πεδίο της υπολογιστικής χημείας, ιδιαίτερα μέσω της χρήσης των κβαντομηχανικών υπολογισμών, είναι σε θέση να αναπαράγει χημικές ιδιότητες και αντιδράσεις τηρώντας τις θεμελιώδεις αρχές της φυσικής. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην υπολογιστική χημεία δεν περιορίζονται στη μοντελοποίηση μόνο σταθερών μορίων, αλλά επεκτείνονται επίσης στη μελέτη μορίων μικρού χρόνου ζωής, ασταθών ενδιάμεσων και μεταβατικών καταστάσεων. Οι κβαντομηχανικοί υπολογισμοί προσφέρουν πληροφορίες για διάφορες ιδιότητες, όπως η διαμόρφωση σε κατάσταση ισορροπίας, οι απόλυτες και οι σχετικές ενέργειες, οι συχνότητες δόνησης, η αντιδραστικότητα και άλλες φασματοσκοπικές ποσότητες. Επιπλέον, αυτοί οι υπολογισμοί επιτρέπουν την εξέταση των κατανομών πυκνότητας φορτίου και των διπόλων.

Δύο ευρέως αναγνωρισμένα και ευρέως χρησιμοποιούμενα υπολογιστικά εργαλεία στον τομέα των κβαντικών υπολογισμών είναι η σειρά προγραμμάτων *Gaussian* και το πρόγραμμα *μοριακής πρόσδεσης* (molecular docking) *Schrödinger*. Αυτά τα προγράμματα προσφέρουν τη δυνατότητα βελτιστοποίησης της γεωμετρικής δομής του υπό μελέτη συστήματος, είτε σε κενό, είτε παρουσία κάποιου διαλύτη. Επιπλέον, επιτρέπουν τον υπολογισμό διαφόρων ιδιοτήτων όπως η ενέργεια μηδενικού σημείου, οι συχνότητες δόνησης, η θερμοχημεία, τα μοριακά τροχιακά, η ανάλυση των πληθυσμών και η αξιολόγηση της σταθερότητας του συστήματος. Μπορούν επίσης να διερευνηθούν οι φασματοσκοπικές παράμετροι, οι ηλεκτρονικές μεταβάσεις και η επιφάνεια δυναμικής ενέργειας. Τέλος, τόσο το *Gaussian* όσο και το *Schrödinger* έχουν την ικανότητα να αξιολογούν άλλα μοριακά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένης της πόλωσης, του μοριακού όγκου και της πυκνότητας του συστήματος. Ωστόσο, σε αντίθεση με το *Gaussian*, το *Schrödinger* μπορεί, μεταξύ άλλων, να προβλέψει τη μοριακή δομή δύο ίδιων ή διαφορετικών χημικών οντοτήτων, όταν αυτά συνδέονται μεταξύ τους. Οι δυνατότητες του προγράμματος *Schrödinger* είναι αμέτρητες και, στην περίπτωση των βιολογικών μορίων, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για τη θεωρητική πρόβλεψη πολλών ιδιοτήτων, με σκοπό τόσο την εξοικονόμηση χρόνου όσο και πόρων.

Υπάρχουν τρεις κύριες ταξινομήσεις για τις υπολογιστικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στους μοριακούς κβαντομηχανικούς υπολογισμούς. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τις *ab initio* μεθόδους, ενώ η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τις ημειμπειρικές μεθόδους. Τέλος, η τρίτη κατηγορία περιλαμβάνει τις μεθόδους που βασίζονται στη θεωρία συναρτησιακής πυκνότητας.

4.2 Θεωρία Συναρτησιακής Πυκνότητας (DFT)

Οι μέθοδοι οι οποίες βασίζονται στη Θεωρία Συναρτησιακής Πυκνότητας (Density Functional Theory, *DFT*) αντιπροσωπεύουν μία εξέλιξη των υπολογιστικών μεθόδων και χρησιμοποιούνται στη μελέτη διαφόρων ενώσεων. Επιπλέον, αυτές οι μέθοδοι απαιτούν συνήθως λιγότερο χρόνο για να ολοκληρωθούν σε σύγκριση με εναλλακτικές μεθόδους. Η *DFT* χαρακτηρίζει τις ηλεκτρονιακές καταστάσεις των ατόμων και των μορίων με αναφορά στην τρισδιάστατη ηλεκτρονιακή πυκνότητα του συστήματος. [1]. Αν και η *DFT* είναι μία σχετικά πρόσφατη θεωρία, η σύγχρονη διατύπωσή του έχει χρησιμοποιηθεί για πολλά χρόνια [2] και εντοπίζει τις ρίζες της [3, 4] παλιά όσο και η εξίσωση Schrödinger. Η διατύπωση *DFT* των Kohn και Sham [5], η οποία ενσωματώνει την επέκταση πόλωσης spin, είναι η κυρίαρχη προσέγγιση που χρησιμοποιείται [6, 7]. Η διατύπωση αυτή περιλαμβάνει έναν παράγοντα που προκύπτει από ένα σύνολο N τροχιακών, που αντιπροσωπεύει ένα μη-δραστικό σύστημα ηλεκτρονίων με τις ίδιες πυκνότητες spin, ρ_α και ρ_β , με το πραγματικό σύστημα. Οι πυκνότητες spin ρ_α και ρ_β είναι η τρισδιάστατη ηλεκτρονιακή πυκνότητα όλων των ηλεκτρονίων με αριστερόστροφο και δεξιόστροφο spin, αντίστοιχα. Η πολυηλεκτρονιακή πυκνότητα spin ρ ισούται με το άθροισμα των ρ_α και ρ_β και είναι η κύρια ποσότητα στην *DFT*.

Η *DFT* αποτελεί την πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδο της Θεωρίας Ηλεκτρονιακής Δομής, καθώς είναι αρκετά εύχρηστη και ανταγωνίζεται με επιτυχία πολλές άλλες μεθόδους, σχετικά με την ακρίβεια των αποτελεσμάτων, με εξαίρεση τα πολύ μικρά συστήματα. Επίσης, η *DFT* προσφέρει μία σταθερή βάση για την ανάπτυξη άλλων υπολογιστικών στρατηγικών, οι οποίες προσφέρουν πληροφορίες αναφορικά με τη δομή, την ενέργεια και τις ιδιότητες των μορίων.

Για μεγάλη ακρίβεια στους υπολογισμούς της ηλεκτρονιακής δομής, είναι σημαντικό να συμπεριληφθεί σε αυτούς και η συσχέτιση ηλεκτρονίων. Υπάρχουν δύο τύποι συσχέτισης ηλεκτρονίων. Ο πρώτος ονομάζεται *δυναμική συσχέτιση* και είναι ένα φαινόμενο μικρού εύρους, όπου τα ηλεκτρόνια αποφεύγουν το ένα το άλλο, με σκοπό τη μείωση των ηλεκτρονιακών απώσεων. Η συσχέτιση αυτή σε μία κυματοσυνάρτηση αλληλεπίδρασης διαμόρφωσης απαιτεί έναν μεγάλο αριθμό διαμορφώσεων ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα η σύγκλιση να καθίσταται αρκετά αργή. Ο δεύτερος τύπος ονομάζεται *στατιστική ή μη-δυναμική συσχέτιση*, η οποία είναι ένα μεσαίου ή μεγάλου εύρους φαινόμενο. Η στατιστική συσχέτιση χρησιμοποιεί έναν μικρό αριθμό ηλεκτρονιακών διαμορφώσεων, που σχεδόν εκφυλίζονται [8, 9]. Η προσθήκη φαινομένων συσχέτισης σε υπολογισμούς *DFT*, με ισορροπημένο τρόπο, είναι

απλή και προσφέρει αποτελέσματα μεγάλης ακρίβειας, με αποτέλεσμα την αύξηση της υπολογιστικής απόδοσης της DFT.

Η πιο δημοφιλής προσεγγιστική μέθοδος που χρησιμοποιεί η DFT είναι η *Becke 3-term with Lee, Yang, Parr exchange (B3LYP)*, η οποία είναι ένα υβριδικό μοντέλο καθώς χρησιμοποιεί διορθώσεις για συσχετίσεις κλίσης και ανταλλαγής. Η B3LYP έχει γίνει αποδεκτή από ένα μεγάλο μέρος της επιστημονικής κοινότητας, επειδή παρέχει ικανοποιητικά αποτελέσματα για διαφορετικά μοριακά συστήματα. Ωστόσο, η B3LYP εμφανίζει και ορισμένα μειονεκτήματα. Δύο από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα είναι η λανθασμένη περιγραφή των δεσμών *van der Waals* και των δεσμών υδρογόνου καθώς και η αδυναμία πρόβλεψης του δεσμού σε διμερή μόρια πολλών ευγενών αερίων. Ένα νέο υβριδικό μοντέλο, το *X3LYP*, δημιουργήθηκε με σκοπό να δώσει λύση σε αυτά τα μειονεκτήματα. Τέλος, δύο σημαντικές επίσης μέθοδοι της Σ είναι αυτή της *VWN* (Vosko-Wilks-Nusair, local density approximation), η οποία βασίζεται στην Προσέγγιση Τοπικής Πυκνότητας (LDA), και αυτή της διορθωμένης κλίσης *PW91* (Perdew-Wang 1991, gradient corrected method). Στον Πίνακα 4.1 αναφέρονται συνοπτικά οι κύριες μέθοδοι DFT με μία σύντομη περιγραφή του τύπου τους καθώς και των προσεγγίσεων που χρησιμοποιούν.

Πίνακας 4.1 : Περιγραφή μεθόδων DFT με σύντομη περιγραφή του τύπου και των προσεγγίσεων που χρησιμοποιούν.

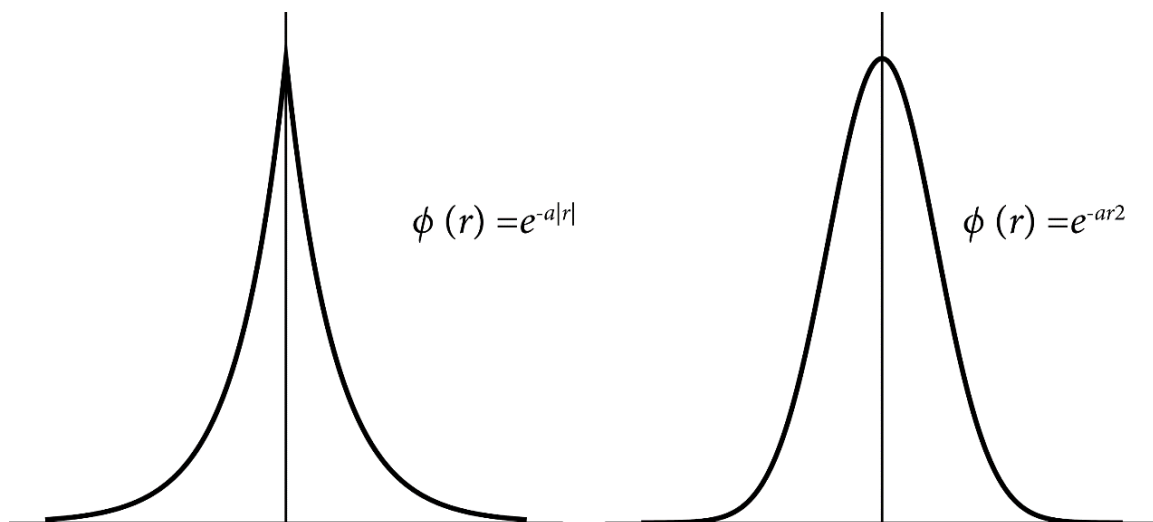
Όνομα και Ακρωνύμιο Μεθόδου	Τύπος
X alpha (Xa)	Περιλαμβάνει την ανταλλαγή ηλεκτρονίων
Hartree-Fock Slater (HFS)	HF με προσέγγιση τοπικής πυκνότητας για την ανταλλαγή
Vosko, Wilks, and Nusair (VWN)	Μέθοδος LDA
Becke correlation functional with Lee, Yang, Parr exchange (BLYP)	Μέθοδος διορθωμένης κλίσης πυκνότητας
Becke 3 term with Lee, Yang, Parr exchange (B3LYP)	Υβριδική μέθοδος
Becke exchange, Perdew and Wang correlation (B3PW91)	Υβριδική μέθοδος

4.3 Σύνολα Βάσης

Κατά τη διάρκεια ενός κβαντομηχανικού υπολογισμού, εκτός από την κατάλληλη βάση, πρέπει να επιλεγεί και το απαιτούμενο σύνολο βάσης (*basis set*). Σύμφωνα με τους Hall και Roothaan, μία κυματοσυνάρτηση ενός συστήματος μπορεί να γραφεί ως γραμμικός συνδυασμός ενός συνόλου μονοηλεκτρονιακών συναρτήσεων. Αυτό το σύνολο είναι προκαθορισμένο και ονομάζεται σύνολο βάσης. Τέλος, οι συναρτήσεις βάσης χρησιμοποιούνται για να δημιουργήσουν τροχιακά και να περιγράψουν το σχήμα τους.

Οι συναρτήσεις βάσης που χρησιμοποιούνται στους κβαντομηχανικούς υπολογισμούς είναι αποτέλεσμα γραμμικού συνδυασμού γκαουσιανών συναρτήσεων, οι οποίες ονομάζονται *πρωταρχικές*. Οι συναρτήσεις αυτές μπορούν να διακριθούν σε τροχιακά τύπου *Slater* (STO) και τύπου *Gauss* (GTO). Τα τροχιακά τύπου *Slater* είναι εκθετικές συναρτήσεις και περιγράφουν σωστά τη συμπεριφορά των κυματοσυναρτήσεων, τόσο κοντά, όσο και μακριά από τον πυρήνα. Για κβαντομηχανικούς υπολογισμούς σε ατομικό επίπεδο, θεωρούνται από τις καλύτερες συναρτήσεις βάσης, αλλά δε χρησιμοποιούνται για υπολογισμούς σε μοριακό επίπεδο λόγω μεγάλου υπολογιστικού χρόνου.

Από την άλλη, τα τροχιακά τύπου *Gauss* αποτελούν εκθετικές συναρτήσεις, οι οποίες δεν περιγράφουν ορθά τη συμπεριφορά της κυματοσυνάρτησης, ούτε κοντά, ούτε μακριά από τον πυρήνα. Ωστόσο, αντικαθιστούν τα τροχιακά τύπου *Slater*, λόγω των υπολογιστικών πλεονεκτημάτων που διαθέτουν. Όσο περισσότερα τροχιακά τύπου *Gauss* αντικαθιστούν ένα τροχιακό τύπου *Slater*, τόσο καλύτερο το τελικό αποτέλεσμα.



Σχήμα 4.1 : Γραφική αναπαράσταση των συναρτήσεων Slater (αριστερά) και Gaussian (δεξιά) για το τροχιακό 1s [10].

4.3.1 Σύνολα Ελάχιστης Βάσης

Τα πιο απλά σύνολα βάσης είναι τα σύνολα ελάχιστης βάσης (*minimal basis sets*) ή αλλιώς σύνολα απλού ζήτα. Στα σύνολα αυτά, μία συνάρτηση βάσης χρησιμοποιείται για να περιγράψει κάθε τροχιακό κατειλημμένο από ηλεκτρόνια που βρίσκεται σε κάθε άτομο. Τα σύνολα ελάχιστης βάσης μπορεί να είναι είτε *STO*, όταν η συνάρτηση αποτελείται από ένα τροχιακό *Slater*, είτε *GTO*, όταν αποτελείται από ένα γραμμικό άθροισμα ενός αριθμού τροχιακών *Gauss*. Τα σύνολα ελάχιστης βάσης ονομάζονται και απλού ζήτα επειδή κάθε μία από τις συναρτήσεις βάσης που χρησιμοποιούνται, βελτιστοποιείται με τη χρήση μόνο μίας παραμέτρου ζ . Η χρήση αυτών των συνόλων είναι αρκετά διαδεδομένη για ποιοτικούς κβαντομηχανικούς υπολογισμούς σε μεγάλα συστήματα.

4.3.2 Εκτεταμένα Σύνολα Βάσης

Τα σύνολα βάσης μπορούν επίσης να είναι και *εκτεταμένα*. Στα σύνολα αυτά ανήκουν όλα τα σύνολα βάσης στα οποία το κάθε κατειλημμένο ατομικό τροχιακό (*AO*) εκφράζεται με περισσότερες από δύο συναρτήσεις βάσης. Ένα σύνολο βάσης μπορεί να χαρακτηριστεί από μεγάλη ευκαμψία, εάν επιτραπεί στα εσωτερικά και εξωτερικά ηλεκτρόνια της εξωτερικής στιβάδας να μεταβάλλονται ανεξάρτητα. Τα σύνολα αυτά ονομάζονται *σύνολα βάσης “διαχωρισμένης” στιβάδας σθένους* (*Split Valence Basis Sets, SV*).

Τα σύνολα βάσης διαχωρισμένης στιβάδας σθένους περιγράφονται με τη μορφή $l-mnG$, όπου τα l , m , και n αναφέρονται στο σύνολο των *GTO* τροχιακών που χρησιμοποιούνται για την περιγραφή των τροχιακών. Για παράδειγμα το σύνολο βάσης $6-21G$ σημαίνει πως όλα τα *AO* των εσωτερικών στιβάδων προκύπτουν ως γραμμικός συνδυασμός έξι πρωτογενών συναρτήσεων *Gauss*. Το σύνολο αυτό είναι διπλού ζ , διότι περιέχει δύο ακέραιους δείκτες (τον ακέραιο 2 και τον ακέραιο 1). Το κάθε ένα από τροχιακά σθένους αποτελείται από δύο συναρτήσεις, εκ των οποίων, η πρώτη συνάρτηση αποτελείται από γραμμικό συνδυασμό δύο πρωτογενών *AO Gauss* και η δεύτερη από ένα πρωτογενές *AO Gauss*. Τα πρωτογενή τροχιακά αυτά έχουν διαφορετικό ζ . Τέλος, το γράμμα *G* συμβολίζει τη χρήση συναρτήσεων τύπου *Gaussian* για την κατάστροψη των *AO*.

Τα σύνολα βάσης διαχωρισμένης στιβάδας σθένους μπορούν να τροποποιηθούν επιπλέον, έτσι ώστε να αποκτήσουν μία καλύτερη προσέγγιση του μελετώμενου συστήματος, αφήνοντας τα *AO* να πολωθούν υπό την επίδραση του περιβάλλοντα χώρου. Εάν πρόκειται για *d-τύπου* συναρτήσεις, όπου εφαρμόζονται σε όλα τα άτομα εκτός του υδρογόνου και του ηλίου, η πόλωση μπορεί να γραφεί ως $*$ ή (*d*). Εάν πρόκειται για *p-τύπου* συναρτήσεις, οι οποίες προστίθενται και στο υδρογόνο και στο ήλιο, η πόλωση μπορεί να γραφεί ως $**$ ή (*d,p*).

Τέλος, σε περιπτώσεις μορίων, όπου η ηλεκτρονιακή τους πυκνότητα δεν είναι εντοπισμένη αλλά διαχέεται σε μεγάλη έκταση, όπως είναι τα ιόντα, είναι απαραίτητες οι συναρτήσεις διάχυσης. Οι συναρτήσεις διάχυσης συμβολίζονται με $+$ για όλα τα άτομα εκτός

του υδρογόνου και με ++ για το άτομο του υδρογόνου. Οι συναρτήσεις αυτές για το άτομο του υδρογόνου είναι απαραίτητες για συστήματα με δεσμούς υδρογόνου, όπως για παράδειγμα για τη μελέτη υπερδομών σχηματιζόμενων από δεσμούς υδρογόνου. Αξίζει να σημειωθεί πως, η επίδραση των συναρτήσεων πόλωσης και των συναρτήσεων διάχυσης μπορεί να θεωρηθεί εν μέρει και συμπληρωματική.

4.4 Αρχεία Εισόδου και Εξόδου στο Υπολογιστικό Πρόγραμμα Gaussian

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ένα από τα προγράμματα που χρησιμοποιούνται για τη διεξαγωγή κβαντομηχανικών υπολογισμών είναι το *Gaussian*. Για να ξεκινήσει η εκτέλεση των υπολογισμών, το *Gaussian* θα πρέπει να λάβει τις απαραίτητες πληροφορίες και εντολές, οι οποίες περιλαμβάνονται σε ένα αρχείο, που ονομάζεται *αρχείο εισόδου (input file)*. Στο Παράρτημα Π5 δίνονται αναλυτικές πληροφορίες για τη δημιουργία του αρχείου αυτού μέσω του προγράμματος *Gaussian*.

Αρχικά, στο αρχείο εισόδου θα πρέπει να καθοριστεί η μνήμη καθώς και το σύνολο των επεξεργαστών που θα δεσμευτούν από το πρόγραμμα κατά τη διάρκεια του υπολογισμού. Οι επιλογές αυτές επηρεάζουν σημαντικά την ταχύτητα με την οποία θα ολοκληρωθεί ο υπολογισμός. Επιπλέον, θα πρέπει να υπάρχουν σε μία κοινή σειρά γραμμένες οι εντολές που αφορούν τα δεδομένα που πρόκειται να υπολογιστούν, η μέθοδος και το σύνολο βάσης καθώς και άλλα στοιχεία που καθορίζονται στον υπολογισμό, όπως για παράδειγμα η επίδραση κάποιου διαλύτη. Εκτός από τα παραπάνω, σε μία άλλη σειρά θα πρέπει να αναφέρεται το όνομα του αρχείου. Τέλος, συμπληρώνεται το φορτίο, η πολλαπλότητα της ένωσης και η μοριακή γεωμετρία. Στον **Πίνακα 4.1** αναφέρονται οι βασικότερες λέξεις-κλειδιά που χρησιμοποιούνται σε έναν υπολογισμό.

Σχετικά με τη μοριακή γεωμετρία, παρουσιάζεται γραμμένη σε τέσσερις στήλες και αυτή η μορφή ονομάζεται *Z-matrix*. Στην πρώτη στήλη αναφέρεται το είδος του ατόμου, στη δεύτερη η απόστασή του από το προηγούμενο γραμμένο άτομο, στην τρίτη η γωνία που σχηματίζει με τα προηγούμενα δύο άτομα και στην τέταρτη η διέδρη γωνία αυτού με τα προηγούμενα τρία άτομα. Όπως γίνεται αντιληπτό, για το αρχικό άτομο είναι συμπληρωμένη μόνο η πρώτη στήλη, για το δεύτερο άτομο είναι συμπληρωμένες η πρώτη και η δεύτερη στήλη και ούτω καθεξής.

Τέλος, μετά το τέλος του υπολογισμού λαμβάνεται το *αρχείο εξόδου (output file)*. Το αρχείο αυτό περιλαμβάνει τις πληροφορίες που δόθηκαν πριν τον υπολογισμό καθώς και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτόν. Το αρχείο εξόδου μπορεί να διαβασθεί με ένα απλό πρόγραμμα επεξεργασίας κειμένου και να ληφθούν οι απαραίτητες πληροφορίες. Μπορεί επίσης να ανοιχθεί και με βοηθητικά προγράμματα και να ληφθούν πληροφορίες, όπως η εικόνα της δομής μετά τη βελτιστοποίηση και η τα φάσματα IR και Raman. Για τα φάσματα

αυτά, εκτός από την μορφή τους, μπορεί να ληφθούν και επιπλέον πληροφορίες, όπως για παράδειγμα ο τύπος δόνησης που αντιστοιχεί κάθε κορυφή.

Πίνακας 4.1 : Οι βασικότερες λέξεις-κλειδιά που δίνονται στο πρόγραμμα Gaussian και οι υπολογισμοί που εκτελούν κατά την προσθήκη τους.

Λέξεις – κλειδιά/ Εντολές	Υπολογισμός που εκτελείται
Opt	Βελτιστοποίηση της γεωμετρίας
Freq	Υπολογισμός δονητικών συχνοτήτων και εξαγωγή φάσματος IR
Freq=raman	Υπολογισμός δονητικών συχνοτήτων και εξαγωγή φάσματος IR και Raman
Volume	Υπολογισμός μοριακού όγκου
Polar	Υπολογισμός πολωσιμοτήτων
NMR=giao	Εξαγωγή φάσματος NMR

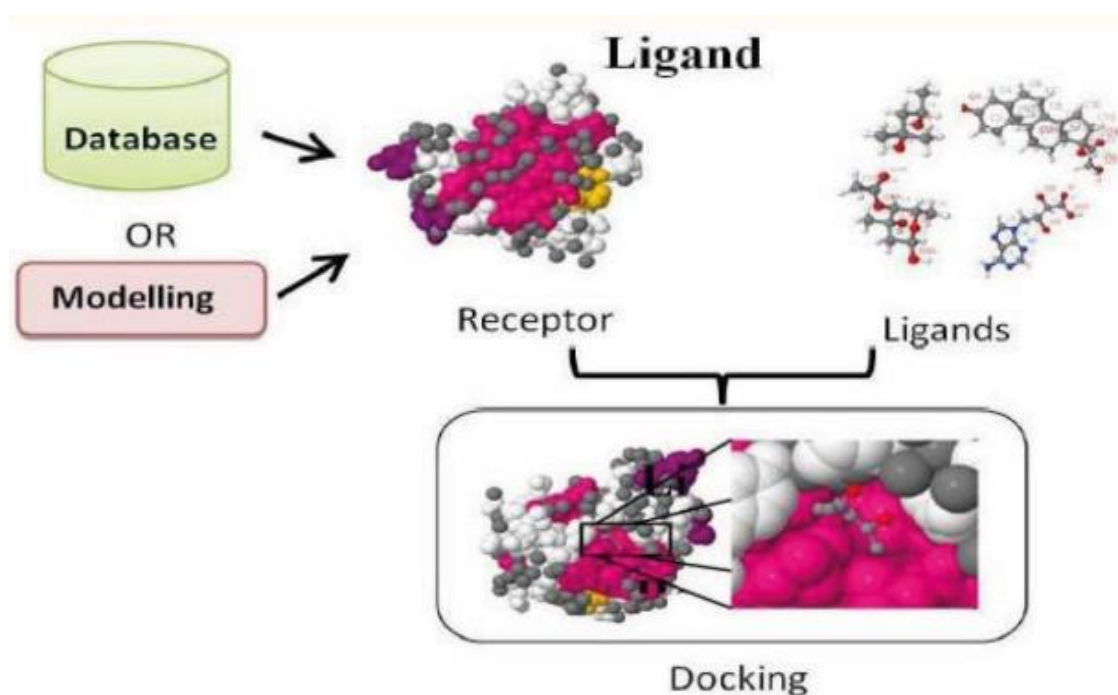
4.5 Θεωρητικό Υπόβαθρο Υπολογισμών Μοριακής Πρόσδεσης (Molecular Docking)

Η Μοριακή Πρόσδεση (*Molecular Docking*) είναι μία υπολογιστική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη της αλληλεπίδρασης δύο μοντέλων δημιουργώντας ένα μοντέλο πρόσδεσης. Σε πολλές εφαρμογές μελέτης νέων φαρμάκων, η πρόσδεση γίνεται μεταξύ ενός μικρού μορίου/συνδέτη (*ligand*) και ενός μακρομορίου, για παράδειγμα, η πρόσδεση πρωτεΐνης – συνδέτη. Η Μοριακή Πρόσδεση μικρών μορίων σε ένα βιολογικό στόχο περιλαμβάνει τη δειγματοληψία πιθανών θέσεων του συνδέτη στην καθορισμένη θέση του υποδοχέα – στόχου, προκειμένου να καθοριστεί η βέλτιστη γεωμετρία πρόσδεσης. Η γνώση του προτιμώμενου προσανατολισμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της ισχύος του συσχετισμού (*association*) ή της συγγένειας σύνδεσης (*binding affinity*) μεταξύ δύο μορίων χρησιμοποιώντας συναρτήσεις βαθμολόγησης (*scoring functions*). Στόχος της μοριακής πρόσδεσης είναι η επίτευξη μίας βελτιστοποιημένης διαμόρφωσης, τόσο για τον υποδοχέα, όσο και για το συνδέτη καθώς και του σχετικού προσανατολισμού μεταξύ του υποδοχέα και του συνδέτη, έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται η ελεύθερη ενέργεια του συνολικού συστήματος [11, 12, 13].

Η βοήθεια του υπολογιστή έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη φαρμακευτική έρευνα για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της ανακάλυψης και της ανάπτυξης φαρμάκων. Για τον εντοπισμό και το σχεδιασμό μικρών μορίων ως κλινικά αποτελεσματικών θεραπευτικών ουσιών, έχουν αξιολογηθεί ως υποσχόμενες στρατηγικές διάφορες υπολογιστικές μέθοδοι, ανάλογα με τον σκοπό και τα μελετώμενα συστήματα.

Ιδιαίτερα δημοφιλείς στη μοριακή πρόσδεση είναι δύο προσεγγίσεις. Η πρώτη προσέγγιση χρησιμοποιεί μία τεχνική αντιστοίχισης που περιγράφει την πρωτεΐνη και τον συνδέτη ως *συμπληρωματικές επιφάνειες* [14]. Στην περίπτωση αυτή, η μοριακή επιφάνεια του υποδοχέα περιγράφεται ως προς το εμβαδόν της επιφάνειάς του που είναι προσβάσιμο από διαλύτες και η μοριακή επιφάνεια του συνδέτη περιγράφεται ως προς το χαρακτηρισμό της αντίστοιχης επιφάνειάς του [15]. Παρόλο που αυτές οι προσεγγίσεις είναι συνήθως γρήγορες και ισχυρές, συχνά δεν μπορούν να μοντελοποιήσουν με ακρίβεια τις κινήσεις ή τις δυναμικές αλλαγές στις διαμορφώσεις του υποδοχέα.

Η δεύτερη προσέγγιση προσομοιώνει την πραγματική διαδικασία πρόσδεσης κατά την οποία υπολογίζονται οι ενέργειες αλληλεπίδρασης κατά ζεύγη συνδέτη-υποδοχέα [16]. Η προσέγγιση αυτή είναι πολύ πιο περίπλοκη. Σε αυτή την περίπτωση, ο υποδοχέας και ο συνδέτης χωρίζονται με κάποια φυσική απόσταση και ο συνδέτης βρίσκει την ενεργό θέση της πρωτεΐνης μετά από έναν ορισμένο αριθμό “κινήσεων” στο διαμορφωτικό του χώρο. Κάθε μία από αυτές τις κινήσεις στο χώρο διαμόρφωσης του συνδέτη, προκαλεί ένα συνολικό ενεργειακό κόστος στο σύστημα, με αποτέλεσμα μετά από κάθε κίνηση να υπολογίζεται η συνολική ενέργεια του συστήματος. Το πλεονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι η εύκολη ενσωμάτωση της ευελιξίας του συνδέτη και η ακριβής μοντελοποίηση της πραγματικότητας. Ωστόσο, η προσομοίωση χαρακτηρίζεται από αρκετά μεγάλο υπολογιστικό κόστος.



Σχήμα 4.2 : Διαδικασία μοριακής πρόσδεσης.

Υπάρχουν δύο κύριες διαδικασίες προσομοιώσεων μοριακής πρόσδεσης. Η πρώτη αναφέρεται στην *άκαμπτη πρόσδεση* (*rigid docking*), η οποία αντιμετωπίζει, τόσο το συνδέτη, όσο και τον υποδοχέα ως άκαμπτα και διερευνά μόνο έξι βαθμούς μεταφορικής και περιστροφικής ελευθερίας. Επομένως, αποκλείεται κάθε είδους ευελιξία. Η δεύτερη αναφέρεται στην *ευέλικτη πρόσδεση* (*flexible docking*) και είναι μία πιο κοινή προσέγγιση. Σε αυτή την περίπτωση, μοντελοποιείται η ευελιξία του συνδέτη, ενώ διατηρείται άκαμπτος ο υποδοχέας, λαμβάνοντας υπόψη μόνο το διαμορφωτικό χώρο του συνδέτη [17, 18].

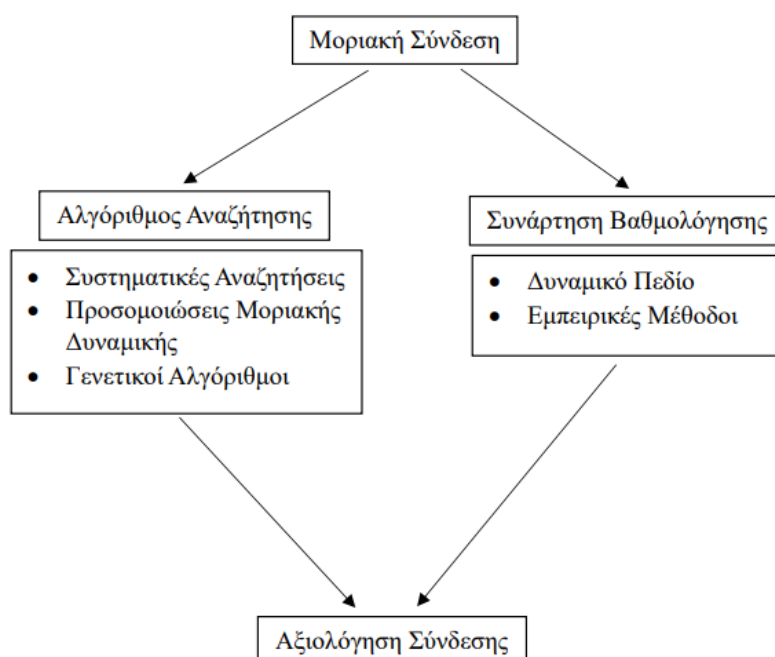
Για την εκτέλεση μίας διαδικασίας μοριακής πρόσδεσης, απαιτούνται αρχικά οι δομές του υποδοχέα και του συνδέτη. Συνήθως οι δομές αυτές έχουν προσδιοριστεί με τη χρήση της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X ή της φασματοσκοπίας NMR και αποτελούν τα δεδομένα εισόδου για ένα πρόγραμμα μοριακής πρόσδεσης. Η επιτυχία ενός τέτοιου προγράμματος εξαρτάται από δύο στοιχεία, από τον *αλγόριθμο αναζήτησης* (*search algorithm*) και τη *συνάρτηση βαθμολόγησης* (*scoring function*) [19].

Ο *χώρος αναζήτησης*, στη θεωρία, αποτελείται από όλους τους πιθανούς προσανατολισμούς και διαμορφώσεις του υποδοχέα που συνδέεται με το συνδέτη. Ωστόσο, στην πράξη, είναι αδύνατο να διερευνηθεί εξαντλητικά ο χώρος αναζήτησης καθώς αυτό συνεπάγεται την απαρίθμηση όλων των πιθανών παραμορφώσεων κάθε μορίου και όλων των πιθανών περιστροφικών και μεταφραστικών προσανατολισμών του συνδέτη σε σχέση με τον υποδοχέα. Τα περισσότερα προγράμματα που χρησιμοποιούνται για μοριακή πρόσδεση βασίζονται σε έναν ευλύγιστο συνδέτη και προσπαθούν να μοντελοποιήσουν έναν ευλύγιστο υποδοχέα. Κάθε “στιγμιότυπο” που δημιουργείται αναφέρεται ως *πόζα* [20]. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για την εύρεση του χώρου διαμορφώσεων. Αυτές περιλαμβάνουν τις *συστηματικές αναζητήσεις* (*systematic searches*), τις *προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής* (*molecular dynamics simulations*) και τους *γενετικούς αλγορίθμους* (*genetic algorithms*).

Οι αλγόριθμοι *συστηματικής αναζήτησης* χρησιμοποιούνται κανονικά για σύνδεση ευέλικτων συνδετών, οι οποίοι παράγουν όλες τις πιθανές διαμορφώσεις δέσμευσης του συνδέτη ερευνώντας όλους τους βαθμούς ελευθερίας του. Δύο από τους τύπους μεθόδων συστηματικής αναζήτησης είναι η διεξοδική αναζήτηση, η οποία εκτελείται περιστρέφοντας συστηματικά όλους τους πιθανούς περιστρεφόμενους δεσμούς του συνδέτη, και ο τεμαχισμός, όπου αρχικά ο συνδέτης διατηρείται σε άκαμπτα μέρη και έπειτα η διαμόρφωση δέσμευσής του δομείται με την τοποθέτηση ενός μέρους τη φορά στην περιοχή δέσμευσης ή με την πρόσδεση όλων των μερών στην περιοχή αυτή συνδέοντάς τα με ομοιοπολικούς δεσμούς [21].

Η *μοριακή δυναμική* είναι μία τεχνική προσομοίωσης που παρουσιάζει την κίνηση των ατόμων και των μορίων σε ένα φυσικό σύστημα. Σε αυτή την περίπτωση, ο υποδοχέας παραμένει σταθερός και ο συνδέτης είναι ελεύθερος να εξερευνήσει τη διαμόρφωσή του. Οι θέσεις και οι προσανατολισμοί του συνδέτη που παράγονται, τοποθετούνται διαδοχικά στον υποδοχέα και εκτελείται μία προσομοίωση μοριακής δυναμικής αποτελούμενη από ένα πρωτόκολλο προσομοιωμένης ανόπτησης (*simulated annealing*). Έπειτα, πραγματοποιούνται μικρά βήματα ελαχιστοποίησης ενέργειας και οι ενέργειες που καθορίζονται από τις επαναλήψεις των προσομοιώσεων χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της συνολικής απόδοσης.

Τέλος, ο γενετικός αλγόριθμος (GA) είναι μία προσαρμοστική ευρετική τεχνική αναζήτησης που βασίζεται στις εξελικτικές ιδέες της φυσικής επιλογής και της γενετικής. Σε έναν γενετικό αλγόριθμο, υπάρχει ένας πληθυσμός λύσεων που υποβάλλονται σε μετασχηματισμούς μεταλλάξεων και διασταυρώσεων. Οι προκύπτουσες νέες λύσεις υποβάλλονται σε επιλογή, με βάση τη μεταξύ τους συμβατότητα. Ο αλγόριθμος διατηρεί μία εκλεκτική πίεση προς μία βέλτιστη λύση, με τυχαία ανταλλαγή πληροφοριών που επιτρέπει την εξερεύνηση του χώρου αναζήτησης.



Σχήμα 4.3 : Διαγραμματική απεικόνιση των στοιχείων που αποτελούν τη μοριακή πρόσδεση.

Οι πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις με συνδέτες, με άλλους υποδοχείς ή με διάφορες επιφάνειες ελέγχονται από μία σύνθετη σειρά διαμοριακών αλληλεπιδράσεων. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις εξαρτώνται, τόσο από τις ειδικές αλληλεπιδράσεις στη θέση δέσμευσης, όσο και από τις μη-ειδικές δυνάμεις έξω από τη θέση αυτή. Αυτή η σχέση των ειδικών και μη αλληλεπιδράσεων ελέγχει όλες τις αλληλεπιδράσεις των υποδοχέων που δημιουργούνται από τις διαμοριακές συγκρούσεις στα διαλύματά τους. Η πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ υποδοχέα και εύκαμπτων μορίων – στόχων συχνά καθορίζεται από την ευελιξία των θέσεων δέσμευσης του υποδοχέα και από τις δομικές αναδιατάξεις που συμβαίνουν κατά την πρόσδεση του σχετικού μορίου.

Η ελεύθερη ενέργεια *Gibbs* (ΔG), που χαρακτηρίζει την αλληλεπίδραση ενός συνδέτη με έναν υποδοχέα, είναι το άθροισμα των ηλεκτροστατικών (Electrostatic Interactions, *EI*), των επαγωγικών (Inductive Interactions, *II*), των μη-πολικών (Non Polar Interactions, *NPI*) και των υδροφοβικών (Hydrophobic Interactions, *HI*) αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο μορίων,

ελαττωμένο κατά τον όρο που εκφράζει την απώλεια της ενέργειας ή της εντροπίας κατά τη σύνδεση των μορίων (ΔG^*) [22 – 24].

$$\Delta G_{total} = \Delta G_{EI} + \Delta G_{II} + \Delta G_{NPI} + \Delta G_{HI} - \Delta G^* \quad (4.1)$$

Οι δυνάμεις που ελέγχουν τη συμπεριφορά των υποδοχέων υπολογίζονται με διάφορα μοριακά μοντέλα. Οι υπολογισμένες ενέργειες χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του ρόλου των φυσικών και χημικών αλληλεπιδράσεων στη λειτουργία και τη συμπεριφορά των υποδοχέων. Αν και για μικρά μόρια είναι δυνατοί οι λεπτομερείς υπολογισμοί, είναι σχεδόν απαγορευτικοί καθώς αυξάνεται το μέγεθος και η πολυπλοκότητα των βιολογικών μακρομορίων. Τα προγράμματα μοριακής πρόσδεσης δημιουργούν έναν μεγάλο αριθμό πιθανών θέσεων του συνδέτη, από τις οποίες ορισμένες μπορούν να απορριφθούν αμέσως λόγω συγκρούσεων με τον υποδοχέα. Οι υπόλοιπες αξιολογούνται χρησιμοποιώντας κάποια *συνάρτηση βαθμολόγησης*, η οποία χρησιμοποιεί μία πόζα ως είσοδο και επιστρέφει έναν αριθμό που υποδεικνύει την πιθανότητα αυτή η θέση να αντιπροσωπεύει μία ευνοϊκή αλληλεπίδραση δέσμευσης και κατατάσσει έναν συνδέτη σε σχέση με έναν άλλον.

Υπάρχουν πολλοί αλγόριθμοι διαθέσιμοι για την αξιολόγηση και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του υποδοχέα και του συνδέτη και ο αριθμός τους συνεχώς αυξάνεται. Η ταχύτητα και η ακρίβεια είναι δύο βασικά χαρακτηριστικά για την επίτευξη ορθών αποτελεσμάτων στις μελέτες πρόσδεσης. Αρκετοί αλγόριθμοι μοιράζονται κοινές μεθοδολογίες με νέες επεκτάσεις που επικεντρώνονται στην απόκτηση μίας γρήγορης μεθόδου με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια. Τα πιο κοινά προγράμματα μοριακής πρόσδεσης περιλαμβάνουν το AutoDock, DOCK, FlexX, GOLD, GLIDE, ADAM, DARWIN, DIVALI [25].

4.6 Υπολογισμοί Μοριακής Πρόσδεσης με τη Βοήθεια του Προγράμματος Schrödinger

Το *Schrödinger* είναι ένα πρόγραμμα προσομοίωσης μοριακής πρόσδεσης, το οποίο είναι ευρέως διαδεδομένο, ιδιαίτερα στο σχεδιασμό νέων φαρμάκων. Σκοπός είναι η χρήση νέων μορίων, που σχεδιάζονται σε υπολογιστή, για τη βελτίωση της ανθρώπινης υγείας είτε δημιουργώντας νέα φάρμακα, είτε δημιουργώντας νέα υλικά, τα οποία διευκολύνουν την καθημερινότητα.

Προκειμένου να σχεδιαστούν τα μόρια σε έναν υπολογιστή, χρησιμοποιούνται οι εξισώσεις του Schrödinger για να αποκτήσουν αυτά τα μόρια τις ιδιότητες που θα είχαν εάν βρισκόταν σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα. Αξιοποιώντας τη χρονικά εξαρτώμενη εξίσωση του Schrödinger (4.2), μπορούν να περιγραφούν κινήσεις, όπως η δόνηση και η περιστροφή, κινήσεις δηλαδή που θα μπορούσαν να έχουν τα ηλεκτρόνια γύρω από ένα άτομο. Εάν

αναλογιστεί κανείς όλα αυτά τα άτομα μαζί, τότε είναι δυνατόν να περιγράψει τις κινήσεις, τις αλληλεπιδράσεις και τις ιδιότητες των μορίων.

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} \Psi(\mathbf{r}, t) = \left[-\frac{\hbar^2}{2\mu} \nabla^2 + V(\mathbf{r}, t) \right] \Psi(\mathbf{r}, t) \quad (4.2)$$

Για να σχεδιαστεί μία χημική ουσία στον υπολογιστή, αρχικά, σχεδιάζεται η δομή της σε ένα πρόγραμμα μοριακής πρόσδεσης και έπειτα αυτή η δομική αναπαράσταση ενώνεται με κάποιες εξισώσεις (Erwin, Schrödinger, κ.α.). Τελικά, προκύπτει μία προσομοίωση μορίων, η οποία βασίζεται στη φυσική, δηλαδή στα μαθηματικά τα οποία εξηγούν τον τρόπο με τον οποίο τα μόρια και τα άτομα συμπεριφέρονται και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Στην περίπτωση του σχεδιασμού φαρμάκων, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο η πρωτεΐνη που συμμετέχει. Είναι αντιληπτό, επομένως, πως για τη σχεδίαση νέων φαρμάκων είναι απαραίτητη η γνώση της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών.

Το υπολογιστικό πρόγραμμα Schrödinger χρησιμοποιεί τρισδιάστατα ατομικά μοντέλα, τόσο των πρωτεϊνών, όσο και μικρότερων μορίων καθώς και μεγάλων συστημάτων, σχεδιάζει εικονικά συστήματα με τη χρήση των εξισώσεων Schrödinger και κάνει σε αυτά θεωρητικούς υπολογισμούς με σκοπό την κατανόηση της συμπεριφοράς τους σε κάποιο διάλυμα.

Για να εκτελεστεί ένας κβαντομηχανικός υπολογισμός με τη βοήθεια αυτού του προγράμματος, πρέπει να εισαχθούν οι δομές του υπό μελέτη υποδοχέα και του συνδέτη στο πρόγραμμα, σε μορφή *.pdb και *.sdf, αντίστοιχα, για να μπορούν να αναγνωριστούν. Οι δομές αυτές δεν είναι κατάλληλες για απευθείας μοριακή πρόσδεση (molecular docking) και θα πρέπει να υποστούν κάποια επεξεργασία προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία.

Το πρώτο βήμα είναι η προετοιμασία της δομής της πρωτεΐνης χρησιμοποιώντας το *Protein Preparation Wizard*. Η καρτέλα αυτή αποτελείται από μία σειρά εργαλείων που βοηθά στην προετοιμασία της πρωτεΐνης σε μία μορφή κατάλληλη για υπολογισμούς μοντελοποίησης, με τα προϊόντα του Schrödinger, όπως το glide, το desmond κ.α. Εκτός από τις βασικές εργασίες για την επιδιόρθωση της δομής της πρωτεΐνης, μπορούν επίσης να διαγραφούν κάποιες ανεπιθύμητες αλυσίδες και τα μόρια του νερού και να διορθωθούν οι ετερομάδες (het groups). Τέλος, μπορεί να πραγματοποιηθεί βελτιστοποίηση των περιστροφών των ομάδων, οι οποίες είναι συνδεδεμένες με δεσμούς υδρογόνου, και της τελικής δομής.

Επόμενο βήμα είναι η επεξεργασία της δομής του συνδέτη με τη βοήθεια του *LigPrep*, η οποία περιλαμβάνει τη λήψη δισδιάστατων ή τρισδιάστατων δομών και την παραγωγή αντίστοιχων τρισδιάστατων δομών χαμηλής ενέργειας, είτε σε μορφή *.sdf, είτε σε μορφή *.maestro, και την επιλογή επέκτασης κάθε δομής εισόδου (input structure) δημιουργώντας, έτσι, παραλλαγές στην κατάσταση ιονισμού, στα ταυτομερή, στη στερεοχημεία και στις διαμορφώσεις δακτυλίου.

Ακολουθεί η δημιουργία ενός “κουτιού” (grid), η οποία μπορεί να θεωρηθεί ως το πρώτο στάδιο της προετοιμασίας της πρόσδεσης του συνδέτη (Ligand Docking), πράγμα ανέφικτο μέχρι τη δημιουργία grid των υποδοχέων. Τα αρχεία grid αναπαριστούν φυσικές ιδιότητες ενός

όγκου του υποδοχέα, και συγκεκριμένα της ενεργούς θέσης που ερευνάται κατά την πρόσδεση του συνδέτη.

Εφόσον ολοκληρωθούν όλα τα προηγούμενα στάδια, οι δομές είναι έτοιμες για πρόσδεση του συνδέτη. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με τη χρήση του *Ligand Docking* του προγράμματος Schrödinger. Σε αυτή την καρτέλα δίνεται η δυνατότητα επιλογής της ακρίβειας (*precision*) του docking. Το *HTVS* (High Throughput Virtual Screening) είναι μία μέθοδος που προορίζεται για τον ταχύ έλεγχο ενός μεγάλου αριθμού συνδετών. Το *SP* (Standard Precision) είναι μία μέθοδος κατάλληλη για τον έλεγχο συνδετών άγνωστης ποιότητας σε μεγάλους αριθμούς. Το *XP* (Extra Precision) έχει σχεδιαστεί για μία πιο ισχυρή και διακριτική διαδικασία στην οποία ξεκινά με *SP*, αλλά καταλήγει σε μία προσέγγιση σύνδεσης και ανάπτυξης πιο εκτεταμένης δειγματοληψίας. Τέλος, το *SP-Peptide* (Standard Precision docking for Peptide ligands) χρησιμοποιεί τις ίδιες ρυθμίσεις με το *SP*, αλλά με αλλαγές σε ορισμένες από αυτές για τη βελτίωση της διατήρησης της πόζας, προκειμένου να είναι βελτιστοποιημένη για πρόσδεση πεπτιδίων.

Επιπλέον, στην καρτέλα αυτή, δίνεται η δυνατότητα επιλογής της ευελιξίας των συνδετών. Μπορεί να είναι συνδεδεμένοι με ευελιξία (*flexibly*), να είναι άκαμπτοι (*rigidly*), να είναι απλά βελτιστοποιημένοι (*refine only*) ή να βαθμολογούνται μόνο στη θέση τους (*score in place only*). Εκτός από τα παραπάνω, ανάλογα με το μελετώμενο σύστημα, μπορούν να δοθούν κάποιες ποινές (*penalties*) ή κάποιες ανταμοιβές (*rewards*), κατά τη διάρκεια του docking, σχετικά με τη βαθμολογία, τη δομή και τους διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται. Υπάρχει, επίσης η δυνατότητα να εφαρμοστούν και κάποιοι περιορισμοί, είτε στον πυρήνα, είτε οπουδήποτε αλλού στο σύστημα, συμπεριλαμβανομένων των περιορισμών που μπορεί να ορίστηκαν κατά τη δημιουργία του grid. Τέλος, καθορίζεται ο τύπος του αρχείου που θα δημιουργηθεί για τις θέσεις πρόσδεσης εξόδου (*output ligand poses*). Περισσότερες λεπτομέρειες αναφέρονται στο Παράρτημα Π6.

4.7 Βιβλιογραφία

- [1] Kohn, W., Becke, D. & Parr, R. G. (1996). Density Functional Theory of Electronic Structure. *Journal of Physical Chemistry*, Vol. 100 (31), pp. 12974-12980.
- [2] Hohenberg, P. & Kohn, W. (1964). Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review Journals Archive*, 136, B864.
- [3] Thomas, L. H. (1927). The calculation of atomic fields. *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, Vol. 23 (5), pp. 542-548.
- [4] Fermi, E. (1928). Eine statistische Methode zur Bestimmung einiger Eigenschaften des Atoms und ihre Anwendung auf die Theorie des periodischen Systems der Elemente. *Zeitschrift für Physik*, Vol. 48, pp. 73-79.

- [5] Kohn, W. & Sham, L. J. (1965). Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Review Journals Archive*, 140, A1133.
- [6] von Barth, U. & Hedin, L. (1972). A local exchange-correlation potential for the spin polarized case. *Journal of Physics C: Solid State Physics*, Vol. 5 (13), pp. 1629-1642.
- [7] Rajagopal, A. K. & Callaway, J. (1973). Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review B*, Vol. 7 (5), pp. 1912-1919.
- [8] Hartree, D. R., Hartree, W. & Swirles, B. (1939). Self-consistent field, including exchange and superposition of configurations, with some results for oxygen. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, Vol. 238, pp. 229-247.
- [9] Sinanoglu, O. & Tuan, D. F. (1963). Many-Electron Theory of Atoms and Molecules. III. Effect of Correlation on Orbitals. *The Journal of Chemical Physics*, Vol. 38, pp. 1740-1748.
- [10] Li, H., Gao, P., Zhang, J., Liu, Z., Wei, H., Wei, K., Wei, S. & Long, G. L. (2022). BQ-Chem: A Quantum Software Program for Chemistry Simulation Based on the Full Quantum Eigensolver Algorithm. *Quantum Engineering*, Vol. 2022, pages 5872283-5872296.
- [11] Prieto-Martinez, F. D., Arciniega, M. & Medina-Franco, J. L. (2018). Molecular docking: current advances and challenges. *TIP. Revista especializada en ciencias ruimico-biologicas*, Vol. 21 (1), pp. 65-87.
- [12] Afroukh, S. & Kherachi, R. (2020). Contribution à la modélisation des biomolécules et leurs interactions: Cas des inhibiteurs de la monoamine oxydase B dans la maladie de Parkinson.
- [13] Djihene, Y. Master's Thesis, Department of Material Sciences, University of Biskra, Algeria (2022).
- [14] Goldman, B. B. & Wipke, W. T. (2000). QSD quadratic shape descriptors. 2. Molecular docking using quadratic shape descriptors (QSDock). *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Vol. 38 (1), pp. 79-94.
- [15] Kahraman, A., Morris, R. J., Laskowski, R. A. & Thornton, J. M. (2007). Shape Variation in Protein Binding Pockets and their Ligands. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 368 (1), pp. 283-301.
- [16] Feig, M., Onufriev, A., Lee, M. S., Im, W., Case, D. A. & Brooks III, C. L. (2003). Performance comparison of generalized born and Poisson methods in the calculation of electrostatic solvation energies for protein structures. *Journal of Computational Chemistry*, Vol. 25 (2), pp. 265-284.
- [17] Kuntz, I. D., Blaney, J. M., Oatley, S. J., Langridge, R. & Ferrin, T. E. (1982). A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *Journal of molecular biology*, Vol. 161 (2), pp. 269-288.
- [18] Sousa, S. F., Fernandes, P. A. & Ramos, M. J. (2006). Protein-ligand docking: current status and future challenges. *Proteins*, Vol. 65 (1), pp. 15-26.

- [19] Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H. & Nussinov, R. (2002). Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins*, Vol. 47 (4), pp. 409-443.
- [20] Torres, P. H. M., Sodero, A. C. R., Jofily, P. & Silva-Jr, F. P. (2019). Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 20 (18), pp. 4574.
- [21] Huang, S. Y. & Zou, X. (2010). Advances and challenges in protein-ligand docking. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 11 (8), pp. 3016-3034.
- [22] Ajay & Murcko, M. A. (1995). Computational methods to predict binding free energy in ligand-receptor complexes. *Journal of Medical Chemistry*, Vol. 38 (26), pp. 4953-4967.
- [23] Arcon, J. P., Turjanski, A. G., Martí, M. A. & Forli, S. (2021). Biased Docking for Protein-Ligand Pose Prediction. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 2266, pp. 39-72.
- [24] Gohlke, H., Hendlich, M. & Klebe, G. (2000). Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 295 (2), pp. 337-356.
- [25] Hernandez-Santoyo, A., Tenorio-Barajas, A. Y., Altuzar, V., Vivanco-Cid, H. & Mendoza-Barrera, C. (2013). Protein-Protein and Protein-Ligand Docking. *Protein Engineering Technology and Application*.

Κεφάλαιο 5 : Περιγραφή Παρασκευής Διαλυμάτων και Πειραματικών Διατάξεων

5.1 Παρασκευή Διαλυμάτων

Η Νισίνη που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων είναι η στερεή *Nisin A* με χημικό τύπο $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$, μοριακό βάρος 3354.07 g/mol και λήφθηκε από την εταιρία “Sigma – Aldrich”. Για τη μελέτη της συμπεριφοράς της Νισίνης, παρασκευάστηκαν 10 διαλύματα συγκεντρώσεων από 0.1 έως 10 mM , όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.1. Η στερεή Νισίνη διαλύθηκε σε διάλυμα αραιού HCl 0.02 M σε τελικό όγκο 10 ml . Ο όγκος που επιλέχθηκε είναι ο απαιτούμενος για τη διεξαγωγή όλων των πειραματικών μετρήσεων. Για τη ζύγιση της ποσότητας της στερεής Νισίνης, χρησιμοποιήθηκε ζυγός με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Μετά την πλήρη διάλυση της νισίνης, δεν παρατηρούνται στα διαλύματα αιωρούμενα σωματίδια και η αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος οδηγεί σε μεταβολή του χρώματος, από άχρωμο σε ανοιχτό κίτρινο.

Πίνακας 5.1 : Ποσότητες στερεή νισίνης που διαλύθηκαν σε διαλύτη HCl για την παρασκευή των συγκεντρώσεων που μελετήθηκαν.

Συγκέντρωση διαλύματος (mM)	Μάζα Νισίνης (gr)	Όγκος HCl (ml)
0.1	0.0033	10
0.25	0.0084	10
0.5	0.0168	10
1	0.0335	10
2	0.0671	10
3	0.1006	10
4	0.1342	10
5	0.1677	10

7.5	0.2515	10
10	0.3354	10

5.2 Πειραματική Διάταξη Φασματοσκοπίας Υπερήχων

Η μελέτη του χρόνου αποκατάσταση με υπερήχους σε υδατικά διαλύματα απαιτεί έναν μικρό αριθμό επιμέρους διατάξεων, οι οποίες χαρακτηρίζονται από ένα σχετικά χαμηλό κόστος και είναι εύκολα προσβάσιμες. Αυτό καθιστά τις τεχνικές αυτές από τις πιο δημοφιλείς για μελέτες αποκατάστασης. Μία τέτοια τεχνική είναι η τεχνική διέλευσης (*transmission technique*), η οποία αποτελείται από μία γεννήτρια παλμών, ένα πιεζοηλεκτρικό στοιχείο για τη μετατροπή του ηλεκτρικού σήματος σε μηχανικό, την κυψελίδα ή το δείγμα, ένα δεύτερο πιεζοηλεκτρικό για την αντίστροφη διαδικασία και έναν παλμογράφο για την ανάγνωση του αποσβένοντος σήματος.

5.3 Όργανα και Συστήματα Διάταξης

5.3.1 Ψηφιακή Γεννήτρια Παλμών

Η γεννήτρια παλμών αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τις μετρήσεις και για αυτόν τον λόγο είναι απαραίτητο να έχει υψηλή ακρίβεια στη συχνότητα που εκπέμπει καθώς και να έχει τη δυνατότητα παραγωγής διαφορετικών κυματομορφών, όπως ημιτονοειδών, τριγωνικών, τετραγωνικών και gaussian – τύπου. Χρήσιμες ιδιότητες για μία ψηφιακή γεννήτρια παλμών είναι, επίσης, η ικανότητα μετατροπής των παραπάνω μορφών σε παλμούς, η ακριβής ρύθμιση της περιόδου επανάληψης των παλμών και η εύκολη ρύθμιση της διάρκειας του παλμού, ανάλογα με το υπό μελέτη σύστημα. Μικρότερα σε διαστάσεις και σφαιρικά μόρια απαιτούν παλμούς μικρής διάρκειας, σε αντίθεση με τα μόρια “αλυσίδες” μεγαλύτερων διαστάσεων που χρειάζονται μεγαλύτερη διάρκεια παλμών για να υπάρχει αξιοπιστία στη μελέτη τους. Η γεννήτρια που χρησιμοποιήθηκε ήταν από την εταιρία *TTi*, μοντέλο *TGP3151* με κανάλι εξόδου και συχνότητας έως 50 MHz.

5.3.2 Πιεζοηλεκτρικό Στοιχείο

Το πιεζοηλεκτρικό στοιχείο, ή αλλιώς υπερηχητικός μετατροπέας (*ultrasonic transducer*), είναι ακόμη ένα σημαντικό στοιχείο στην παραγωγή και τη λήψη του ακουστικού κύματος και ο ρόλος του είναι η μετατροπή του ηλεκτρικού σήματος σε ηχητικό κύμα. Η λειτουργία ενός πιεζοηλεκτρικού μετατροπέα είναι αμφίδρομη, δηλαδή έχει τη δυνατότητα, χωρίς κάποια μετατροπή, το ίδιο πιεζοηλεκτρικό στοιχείο να μετατρέπει κάθε ηχητικό κύμα που λαμβάνει στο αντίστοιχο ηλεκτρικό σήμα και το αντίστροφο. Στην απλούστερη τεχνική *pulse-echo*, απαιτείται μόνο ένα πιεζοηλεκτρικό στοιχείο το οποίο λειτουργεί, τόσο ως πομπός, όσο και ως δέκτης. Στις τεχνικές διέλευσης, χρησιμοποιούνται δύο πιεζοηλεκτρικά στοιχεία, το ένα πιεζοηλεκτρικό χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την εκπομπή του ακουστικού κύματος ενώ το άλλο χρησιμοποιείται αποκλειστικά για τη λήψη του. Ανάλογα με την εφαρμογή και το προς μελέτη σύστημα, το πιεζοηλεκτρικό στοιχείο θα πρέπει να είναι ικανό να ανταποκριθεί σε ένα διαφορετικό εύρος συχνοτήτων με ικανοποιητική απόκριση. Σε περίπτωση μεγάλου εύρους συχνοτήτων μελέτης, τότε δεν είναι απίθανο να χρησιμοποιηθούν περισσότερα από ένα πιεζοηλεκτρικά στοιχεία, όπου το καθένα από αυτά θα λειτουργεί σε ένα διαφορετικό εύρος συχνοτήτων. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στο γεγονός ότι τα πιεζοηλεκτρικά στοιχεία, τόσο της εκπομπής, όσο και της λήψης, θα πρέπει να βρίσκονται στο ίδιο εύρος συχνοτήτων αναφορικά με τη μέγιστη ικανότητα λειτουργίας τους για ακριβή αποτελέσματα. Στα πλαίσια των πειραματικών μετρήσεων της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν πιεζοηλεκτρικά στοιχεία *Olympus*, μοντέλο *VIII-RB* κεντρικής συχνότητας *10 MHz*.

5.3.3 Θερμοστατούμενη Κυψελίδα

Για τις πειραματικές μετρήσεις της παρούσας εργασίας επιλέχθηκε η υπερηχητική μελέτη υγρών δειγμάτων με τοποθέτηση του δείγματος μέσα σε κυψελίδα και επαφή του πιεζοηλεκτρικού στοιχείου με αυτή. Τα πλεονεκτήματα αυτής της τεχνικής είναι η απαίτηση μικρού όγκου δείγματος (μερικά *ml*), ο περιορισμός του κινδύνου κατά τη χρήση τοξικών δειγμάτων (όπως οξέα, βάσεις ή οργανικοί διαλύτες), η όσο το δυνατόν μικρότερη επίδραση στις μετρήσεις (λεπτά τοιχώματα) καθώς και ότι τα πιεζοηλεκτρικά δεν έρχονται σε άμεση επαφή με το δείγμα και υπάρχει η δυνατότητα θερμοστάτησης στο επιθυμητό θερμοκρασιακό εύρος. Για τους παραπάνω λόγους επιλέχθηκε κυψελίδα χαλαζία (*quartz*) όγκου *1.5ml*. Η θερμοστάτηση πραγματοποιείται με τη χρήση εξωτερικού συστήματος κυκλοφορίας με ακρίβεια στη ρύθμιση της θερμοκρασία $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$.

5.3.4 Παλμογράφος

Ο παλμογράφος αποτελεί ίσως και το πιο σημαντικό όργανο της πειραματικής διάταξης. Είναι ένα είδος “κέντρο ελέγχου” απαραίτητος για τη ρύθμιση και την ακριβή μέτρηση των επιθυμητών ιδιοτήτων του παραγόμενου ηλεκτρικού παλμού. Είναι απαραίτητος για την ανάγνωση και μετατροπή των σημάτων που διέρχονται από το δείγμα σε ψηφιακά αρχεία για την μετέπειτα επεξεργασία τους σε H/Y . Η τελευταία λειτουργία του παλμογράφου είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς επιτρέπει την αύξηση των δυνατοτήτων του χειρισμού των δεδομένων σε σχέση με έναν αναλογικό παλμογράφο. Τέλος, πολύ σημαντική είναι, επίσης, η δυνατότητα υψηλής δειγματοληψίας (*128 sampling*) και ο μετασχηματισμός Fourier (*Fast Fourier Transform, F.F.T.*), χωρίς να είναι απαραίτητη η χρήση εξωτερικών συστημάτων. Ο ψηφιακός παλμογράφος που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρίας *Tektronix*, μοντέλο *TBS 1201B-EDU* με δυνατότητα υποστήριξης 2 καναλιών και μέγιστης συχνότητας *200 MHz*.

5.3.5 Gel Υπερήχων

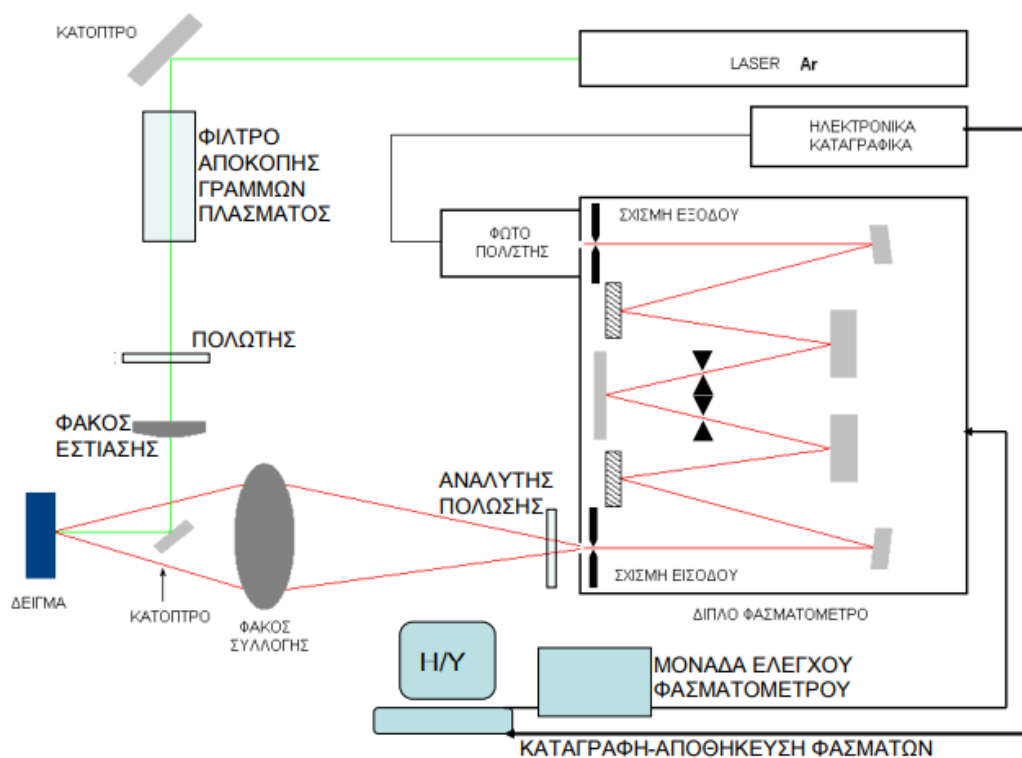
Είναι απαραίτητο να διασφαλιστεί η διάδοση του ακουστικού κύματος από τον πομπό στο δέκτη χωρίς κάποια παρεμβολή, όπως για παράδειγμα παρουσία φυσαλίδας μέσα στο δείγμα ή στην επιφάνεια επαφής του πιεζοηλεκτρικού στοιχείου με την κυψελίδα, έτσι ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή μετάδοση του ηχητικού κύματος. Για το λόγο αυτό, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένα μέσο διάδοσης μεταξύ του πιεζοηλεκτρικού στοιχείου και της κυψελίδας. Έχουν αναπτυχθεί κάποιες εμπορικές λύσεις, ενώ έχουν αναφερθεί και κάποια κοινά υλικά, όπως το γράσο, η γλυκερίνη και το μέλι, για την αντιμετώπιση προβλημάτων σε υψηλές θερμοκρασίες. Για το επιθυμητό εύρος θερμοκρασιών ($10-35^{\circ}C$), κρίθηκε αξιόπιστη και επαρκής και χρησιμοποιήθηκε κοινή ιατρική υπερηχογραφική γέλη (*gel*).

5.4 Διάταξη Φασματοσκοπίας Raman

Αναφορικά με την πειραματική διάταξη της φασματοσκοπίας *Raman*, είναι απαραίτητη η επιλογή κατάλληλου *laser* με στενό φασματικό εύρος για τη διέγερση του δείγματος, καθώς απαιτείται μονοχρωματική δέσμη ακτινοβολίας. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία σκεδάζεται πάνω στο δείγμα και η σκεδαζόμενη ακτινοβολία συλλέγεται, είτε σε γωνία 90° , είτε σε γωνία 180° σε σχέση με την προσπίπτουσα. Έτσι, προκύπτουν δύο διαφορετικές διατάξεις εξίσου αποτελεσματικές. Ανάλογα με την εφαρμογή, χρησιμοποιούνται διαφορετικοί φακοί, οι οποίοι συλλέγουν το σκεδαζόμενο φως και το εισάγουν στο μονοχρωμάτορα για ανάλυση. Καθώς το σκεδαζόμενο φως σκεδάζεται προς όλες τις κατευθύνσεις, συλλέγεται περισσότερο φως όταν χρησιμοποιείται μεγαλύτερη επιφάνεια και, για το λόγο αυτό, είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται μεγαλύτεροι φακοί.

Περισσότερο από το 99% της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας αντιστοιχεί στην ελαστική σκέδαση, ή αλλιώς σκέδαση *Rayleigh*. Επομένως, η σωστή μελέτη της ανελαστικής σκέδασης, ή σκέδαση *Raman*, απαιτεί τον αποκλεισμό της. Η πολύ ισχυρή ένταση της σκέδασης *Rayleigh* μπορεί να επιφέρει κορεσμό στον ψηφιακό αισθητήρα *CCD* (*Charge-Coupled Device*), έχοντας ως αποτέλεσμα την αδυναμία ανίχνευσης της ασθενέστερης σκέδασης *Raman*. Οι συσκευές που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό αυτών των συχνοτήτων ονομάζονται μονοχρωμάτορες. Ρόλος τους είναι η απομόνωση του εύρους της σκέδασης *Raman* από τις υπόλοιπες ελαστικές συνεισφορές που λαμβάνονται. Πειραματικά, χρησιμοποιούνται ένας, δύο ή και τρεις μονοχρωμάτορες για τον επιτυχή διαχωρισμό του φάσματος. Ο πρώτος μονοχρωμάτορας χρησιμοποιείται κυρίως για το διαχωρισμό του εύρους της σκέδασης *Raman* από την ελαστική συνεισφορά, ενώ ο δεύτερος για την ανάλυση και το διαχωρισμό των επιμέρους κορυφών. Εκτός από τον μονοχρωμάτορα, χρησιμοποιούνται, επίσης, και ειδικά φίλτρα, τα φίλτρα *notch*, με σκοπό την αποκοπή ενός τμήματος του φάσματος σε πολύ χαμηλές συχνότητες. Τα τελευταία χρόνια, τα φίλτρα αυτά είναι ευρέως διαδεδομένα καθώς προσφέρουν μεγάλη ευελιξία, διότι είναι δυνατή η προσθήκη ή η αφαίρεσή τους από την πειραματική διάταξη οποιαδήποτε στιγμή. Ένα τέτοιο φίλτρο θεωρείται ικανοποιητικό όταν κόβει συχνότητες κάτω από 30 cm^{-1} .

Το σκεδαζόμενο φως που εστιάζεται και αναλύεται με βάση την ενέργεια στο μονοχρωμάτορα, ανιχνεύεται τελικά από τον έναν αισθητήρα *CCD*, ώστε να καταγραφεί. Οι αισθητήρες *CCD* αποτελούνται από ένα φωτοευαίσθητο σημείο, το οποίο έχει παράλληλες και κάθετες όψεις, είναι δηλαδή διαχωρισμένοι σε *pixels*. Οι αισθητήρες αυτοί διαθέτουν υψηλή ευαισθησία, ταχύ χρόνο ανίχνευσης και λειτουργία σε μια ευρεία περιοχή συχνοτήτων. Τέλος, έχουν τη δυνατότητα σωρευτικής καταγραφής για μεγάλο χρονικό διάστημα, γεγονός που επιτρέπει την ικανοποιητική ανίχνευση των ασθενών εντάσεων σκέδασης που μελετώνται με βελτιωμένο λόγο σήματος προς θόρυβο (*signal-to-noise ratio*).



Σχήμα 5.1 : Σχηματική αναπαράσταση μίας τυπικής διάταξης σκέδασης *Raman*.

Τα *φάσματα Raman* λήφθηκαν με τη χρήση γραμμικά πολωμένου συνεχούς *laser* διόδου (*Excelsior series, Spectra Physics*) στα 532 nm . Πριν τη λήψη, το *laser* έχει περάσει από ένα φίλτρο *notch*, έτσι ώστε να αποκοπεί η ισχυρή σκέδαση *Rayleigh*. Το φίλτρο αυτό επιλέχθηκε για να μπορούν να επιτραπούν οι μετρήσεις κοντά στη γραμμή διέγερσης. Για την αποφυγή της θέρμανσης των δειγμάτων κατά τη διάρκεια της μέτρησης, ρυθμίστηκε η ισχύς του *laser* κάτω από τα 50 mW . Η καταγραφή των φασμάτων πραγματοποιήθηκε σε γωνία σκέδασης 90° με τη χρήση φακών 90 nm και 150 nm και μονοχρωμάτορα (*1HR-320 JY, ISA-Horiba group*). Ο αισθητήρας *CCD* ψύχθηκε στους -70°C και η ανάλυση διατηρήθηκε σε όλη τη διάρκεια των μετρήσεων σταθερή στα 1.5 cm^{-1} . Καταγράφηκαν, τόσο οι πολωμένες, όσο και οι αποπολωμένες γεωμετρίες και οι πολώσεις επιτεύχθηκαν με χρησιμοποιώντας πολωτές *Glan* και *Glan-Thompson* με συντελεστές αποκοπής καλύτερους από 10^{-6} και 10^{-7} , αντίστοιχα. Η θερμοκρασία του δείγματος διατηρήθηκε σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος με ακρίβεια μεγαλύτερη από $\pm 1^\circ\text{C}$. Επαναλήφθηκε πολλές φορές η διαδικασία βαθμονόμησης, με τη χρήση δείγματος CCl_4 , για να ελεγχθούν οι πολώσεις και να διορθωθούν τυχόν αποκλίσεις του μονοχρωμάτορα. Για την επίτευξη υψηλού λόγου σήματος-θορύβου χρησιμοποιήθηκε ένας μεγάλος αριθμός δειγματοληψίας σε χρόνο μερικών λεπτών, ανάλογα με το δείγμα. Τέλος, οι μετρήσεις των εντάσεων του *φάσματος Raman* χαρακτηρίζονται από σφάλματα μικρότερα του 2%.

5.5 Διάταξη Μέτρησης Πυκνότητας

Η μέτρηση για τον υπολογισμό των πυκνοτήτων πραγματοποιείται με τη χρήση ενός πυκνόμετρου. Το πυκνόμετρο δε διαθέτει τη δυνατότητα της απ' ευθείας μέτρησης του ζητούμενου μεγέθους, αλλά καταγράφει το βάρος του δείγματος όταν αυτό βρίσκεται μέσα στο σωλήνα μέτρησης. Για τον υπολογισμό της πυκνότητας του δείγματος, θα πρέπει αρχικά να καταγραφούν τα βάρη του αέρα και του νερού. Για τις ανάγκες του πειράματος, χρησιμοποιήθηκε το πυκνόμετρο *Mettler/Paar DMA 40*. Το σύστημα αυτό διαθέτει έναν εσωτερικό σωλήνα τύπου U, στον οποίο τοποθετείται το δείγμα, και γύρω από αυτόν υπάρχει η δυνατότητα ροής υγρού με στόχο τη θερμοστάτηση του μελετώμενου δείγματος. Η θερμοστάτηση πραγματοποιείται με τη σύνδεσή του με εξωτερικό υδατόλουτρο.

5.6 Διάταξη Μέτρησης Ιξώδους

Για την μέτρηση του κινηματικού ιξώδους των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε το αυτόματο ιξωδόμετρο τύπου *Ubbelohde της Schott Geräte (AVS 310)*. Το ιξωδόμετρο αποτελείται από ένα σύστημα θερμοστάτησης (λουτρό χωρητικότητας 20L με εξωτερικό σύστημα ψύξης), τον αυτόματο καταγραφέα χρόνου ροής, τη βάση στήριξης και τον ιξωδομετρικό σωλήνα, ο οποίος εμβαπτίζεται μέσα στο λουτρό. Η θερμοστάτηση που επιτυγχάνεται χαρακτηρίζεται από ακρίβεια $\pm 0.1^\circ\text{C}$. Ανάλογα με το υγρό που χρησιμοποιείται στο σύστημα θέρμανσης ή ψύξης, το εύρος των θερμοκρασιών κυμαίνεται από περίπου -25°C έως $+50^\circ\text{C}$. Ο σωλήνας που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις ήταν ο *Micro Ubbelohde* χωρητικότητας 3ml και σταθεράς $K = 0.01$.

Σύμφωνα με τον κατασκευαστή, για να επιτευχθούν ακριβείς μετρήσεις του κινηματικού ιξώδους με αβεβαιότητα μικρότερη του 1%, απαραίτητη είναι η ακρίβεια στη θερμοστάτηση, στη μέτρηση της θερμοκρασίας, στην απόκλιση του συστήματος από την κάθετη θέση, πρέπει να πραγματοποιηθούν πολλαπλές μετρήσεις και να υπάρχει επαρκής χρόνος αναμονής ώστε το σύστημα να επέλθει σε θερμική ισορροπία. Το δυναμικό ιξώδες (η) των μελετώμενων δειγμάτων προσδιορίζεται από το γινόμενο του μετρούμενου κινηματικού ιξώδους (ν) με την πυκνότητα του διαλύματος (ρ):

$$\eta = \rho \cdot \nu$$

5.7 Διάταξη Μέτρησης Υπεριώδους – Ορατού

Οι βασικές δομικές μονάδες ενός φασματοφωρομέτρου $UV - Vis$ είναι μία πηγή ακτινοβολίας σταθερής ισχύος, ένας μονοχρωμάτορας για την απομόνωση της επιθυμητής ακτινοβολίας, μία κυψελίδα για την τοποθέτηση του δείγματος, ένας ανιχνευτής ακτινοβολίας που μετατρέπει το οπτικό σήμα σε ηλεκτρικό και ένα σύστημα μέτρησης που περιλαμβάνει έναν ενισχυτή του σήματος και ένα όργανο ανάγνωσης.

Ως πηγή ακτινοβολίας στην υπεριώδη περιοχή χρησιμοποιούνται συνήθως λυχνίες εκκένωσης υδρογόνου ή δευτερίου με περίβλημα χαλαζία ή γυάλινο παράθυρο χαλαζία που εκπέμπει συνεχή και γραμμική ακτινοβολία, ενώ στην περιοχή του ορατού συνήθως χρησιμοποιούνται λυχνίες πυράκτωσης με νήμα βολφραμίου σε γυάλινο υπό κενό περίβλημα με μικρή ποσότητα ιωδίου.

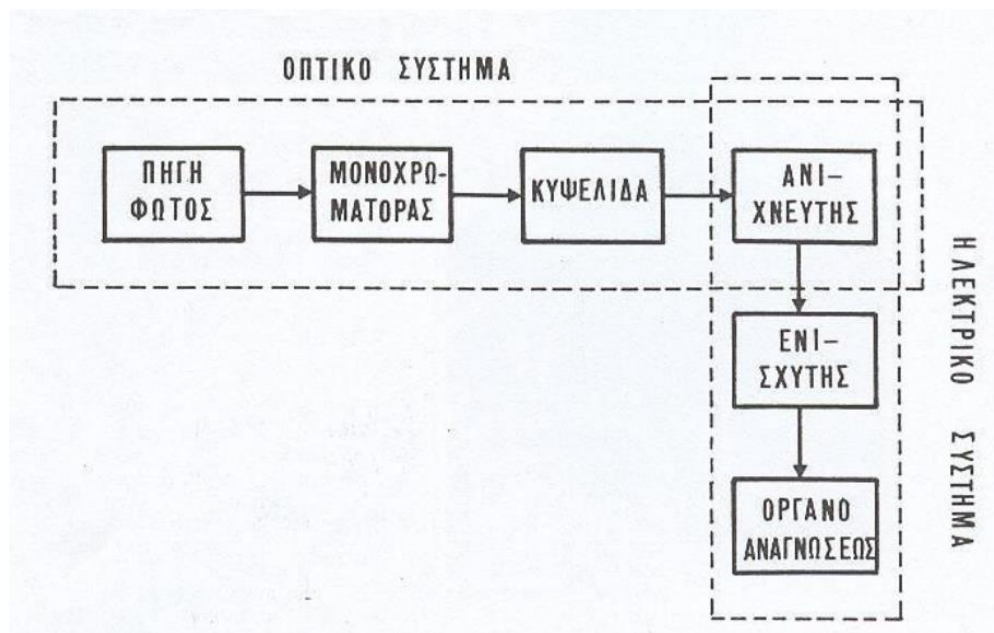
Η απομόνωση της επιθυμητής στενής περιοχής μηκών κύματος από τη συνεχή πολυχρωματική ακτινοβολία που εκπέμπεται από την πηγή, επιτυγχάνεται είτε με φίλτρα, τα οποία απομονώνουν περιοχές από 20 έως 50 nm, είτε, ακριβέστερα, με μονοχρωμάτορες πρίσματος ή φράγματος. Τα φίλτρα είναι γυάλινα πλακίδια τα οποία περιέχουν έγχρωμες ουσίες, συνήθως οξείδια μετάλλων. Οι μονοχρωμάτορες επιλέγουν τη δέσμη μονοχρωματικής ακτινοβολίας σε μία ευρεία περιοχή μηκών κύματος, με τη δυνατότητα συνεχούς μεταβολής του μήκους κύματος, δηλαδή έχουν τη δυνατότητα σάρωσης του φάσματος.

Οι μονοχρωμάτορες αποτελούνται από μία σχισμή εισόδου, η οποία καθορίζει την ισχύ της ακτινοβολίας που εισέρχεται σε αυτόν καθώς και από έναν κατευθυντήρα, με τον οποίο η εισερχόμενη δέσμη γίνεται παράλληλη και είναι είτε ένας φακός είτε ένα κάτοπτρο. Επιπλέον, υπάρχει ένα στοιχείο διασποράς, πρίσμα ή φράγμα περίθλασης, με την περιστροφή του οποίου επιλέγεται το επιθυμητό μήκος κύματος. Τέλος, έχουν έναν συγκεντρωτικό φακό, ή κάτοπτρο, και μία σχισμή εξόδου, που επιτρέπει την έξοδο στενής ταινίας δέσμης.

Στη συνέχεια, η δέσμη διχάζεται διέρχεται από μία κυψελίδα, η οποία περιέχει το δείγμα, και λαμβάνει χώρα η απορρόφηση. Οι κυψελίδες έχουν συνήθως ορθογώνιο σχήμα και είναι κατασκευασμένες από χαλαζία, για μετρήσεις στην περιοχή του υπεριώδους, ή από γυαλί, για μετρήσεις στο ορατό.

Μετά τη διέλευσή του από την κυψελίδα, η δέσμη κατευθύνεται προς τον ανιχνευτή για τη μετατροπή του οπτικού σήματος σε ηλεκτρικό και την ενίσχυσή του. Ως ανιχνευτές χρησιμοποιούνται φωτολυχνίες, φωτοπολλαπλασιαστές και φωτοδιόδοι. Οι ανιχνευτές θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από υψηλή ευαισθησία, δηλαδή μεγάλη μεταβολή στην έξοδο για μία ορισμένη μεταβολή στην είσοδο και ισχυρή ανίχνευση των ασθενών ακτινοβολιών, και από μικρό χρόνο απόκρισης, ειδικά όταν η ισχύς της ακτινοβολίας μεταβάλλεται γρήγορα. Επιπλέον, πρέπει να παρέχουν μικρό και σταθερό σήμα θορύβου καθώς και μία μεγάλη περιοχή γραμμικότητας μεταξύ του παραγόμενου σήματος και της ισχύος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

Τέλος, το ηλεκτρικό σήμα στην έξοδο του ενισχυτή, ο καταγραφέας λαμβάνει το σήμα και εμφανίζει το αποτέλεσμα της μέτρησης. Το όργανο μπορεί να είναι συνδεδεμένο με H/Y στον οποίο να εμφανίζονται και να καταγράφονται οι ενδείξεις των μετρήσεων. Ωστόσο, πολλά φασματοφωτόμετρα φέρουν ενσωματωμένα ηλεκτρονικά ταμπλό στα οποία εμφανίζεται η ένδειξη.



Σχήμα 5.2 : Τυπική διάταξη φασματοφωτομέτρου $UV - Vis$ μόνης δέσμης.

Στην παρούσα εργασία, το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το φασματοφωτόμετρο $UV-1600PC$ της εταιρίας VWR με εύρος μήκους κύματος από 190 έως 1100 nm και ακρίβεια ± 0.5 nm.

5.8 Βιβλιογραφία

- [1] Τσιγκόλιας, Σ. (2020). *Μελέτη του μηχανισμού μεταφοράς πρωτονίων της 1,1,3,3-Tetramethyl guanidine σε υδατικά διαλύματα χρησιμοποιώντας τεχνικές αποκατάστασης υπερήχων, φασματοσκοπία Raman και προσομοιώσεις* (Μεταπτυχιακή Διατριβή). Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Ιωάννινα).
- [2] Κουδέρης, Κ. (2020). *Μελέτη των Μηχανισμών Υπερηχητικής Αποκατάστασης και Επαγόμενης Διπλοθλαστικότητας σε Υδατικά Διαλύματα Πολυβινυλικής Αλκοόλης (PVA)* (Μεταπτυχιακή Διατριβή). Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Ιωάννινα).
- [3] Σιαφαρίκα, Π. (2021). *Μελέτη της δυναμικής ισορροπίας μεταξύ μονο-πυρηνικών και δι-πυρηνικών οργανομεταλλικών συμπλόκων του Νικελίου (II) σε διαλύματα με χλωροφόρμιο*

χρησιμοποιώντας τεχνικές ακουστικής φασματοσκοπίας, δονητική φασματοσκοπία και κβαντομηχανικούς υπολογισμούς (Μεταπτυχιακή Διατριβή). Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Ιωάννινα).

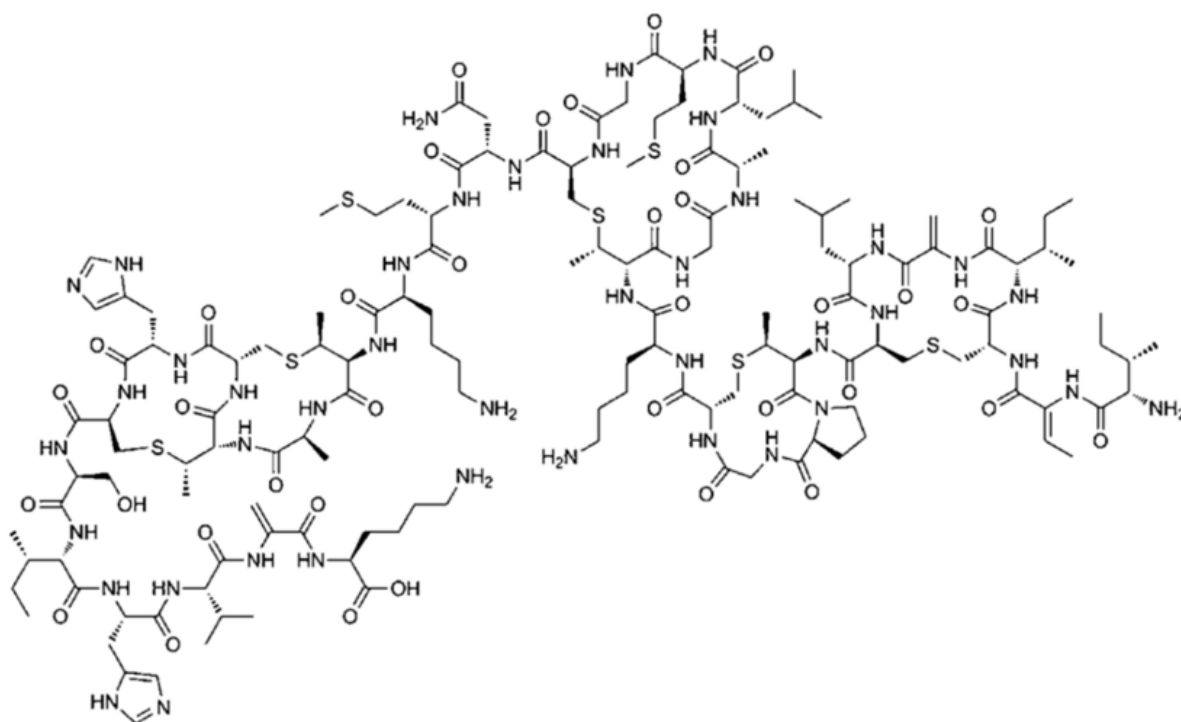
[4] Ρίσβα, Μ. (2022). *Επίδραση της προσθήκης ουρίας στο μηχανισμό μεταφοράς πρωτονίων σε υδατικά διαλύματα αμινών χρησιμοποιώντας τεχνικές αποκατάστασης υπερήχων, δονητική φασματοσκοπία και κβαντομηχανικούς υπολογισμούς* (Μεταπτυχιακή Διατριβή). Τμήμα Χημείας Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων (Ιωάννινα).

Κεφάλαιο 6 : Αποτελέσματα

6.1 Εισαγωγή

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στην παρούσα εργασία μελετώνται τα υδατικά διαλύματα της Νισίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η Νισίνη είναι ένα υδατοδιαλυτό πολυκυκλικό αντιβακτηριδιακό πεπτίδιο, το οποίο παράγεται από το βακτήριο *Lactococcus lactis*, και χρησιμοποιείται στη βιομηχανία των τροφίμων ως συντηρητικό.

Στη φύση απαντώνται δύο διακριτές μοριακές δομές του πεπτιδίου της Νισίνης, η Νισίνη Α και η Νισίνη Ζ. Η δομή της Νισίνης Α αποτελείται από 34 αμινοξέα, συμπεριλαμβανομένων των ασυνήθιστων αμινοξέων λανθειονίνη (*Lan*), μεθυλλανθειονίνη (*MeLan*), διδεϋδροαλανίνη (*Dha*) και διδεϋδροαμινοβουτυρικό οξύ (*Dhb*), με αμινο και καρβοξυλικές τελικές ομάδες. Η λανθειονίνη είναι κοινό αμινοξύ σε πολλές βακτηριοσίνες, γνωστές ως λαντιοβιοτικά. Η δομή της Νισίνης Α σταθεροποιείται από πέντε εσωτερικές δομές δακτυλίου που περιλαμβάνουν δισουλφισικές γέφυρες [1] και παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.1. Η διαφορά μεταξύ της Νισίνης Ζ και της Νισίνης Α είναι η υποκατάσταση της ασπαραγίνης με την ιστιδίνη στη μοριακή δομή του πεπτιδίου. Παρόλου που η Νισίνη Ζ εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση παρόμοια με αυτή της Νισίνης Α, παρουσιάζει επίσης και μεγαλύτερη ικανότητα διάχυσης σε πηκτώματα άγαρ [2, 3].



Σχήμα 6.1 : Μοριακή δομή του πολυπεπτιδίου της Νισίνης.

Το μόριο της Νισίνης κυριαρχείται από την παρουσία αμιδικών, αμινών, καρβοξυλικών και υδροξυλικών ομάδων. Ως εκ τούτου, εμπλέκεται σε διάφορους δομικούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των διαμορφωτικών αλλαγών, των αντιδράσεων μοριακής αυτοσυσσωμάτωσης και των αντιδράσεων μεταφοράς πρωτονίων.

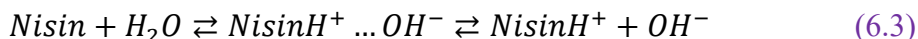
Η διαμορφωτικές αλλαγές μεταξύ των πιθανών διαμορφομερών περιγράφονται ως εξής



όπου το $(Nisin)^*$ αντιπροσωπεύει το πιθανό διαμορφομερές. Αν ο μηχανισμός της σταδιακής αυτοσυσσωμάτωσης θεωρηθεί ως μία μέση αντίδραση, τότε αυτός μπορεί να γραφεί ως



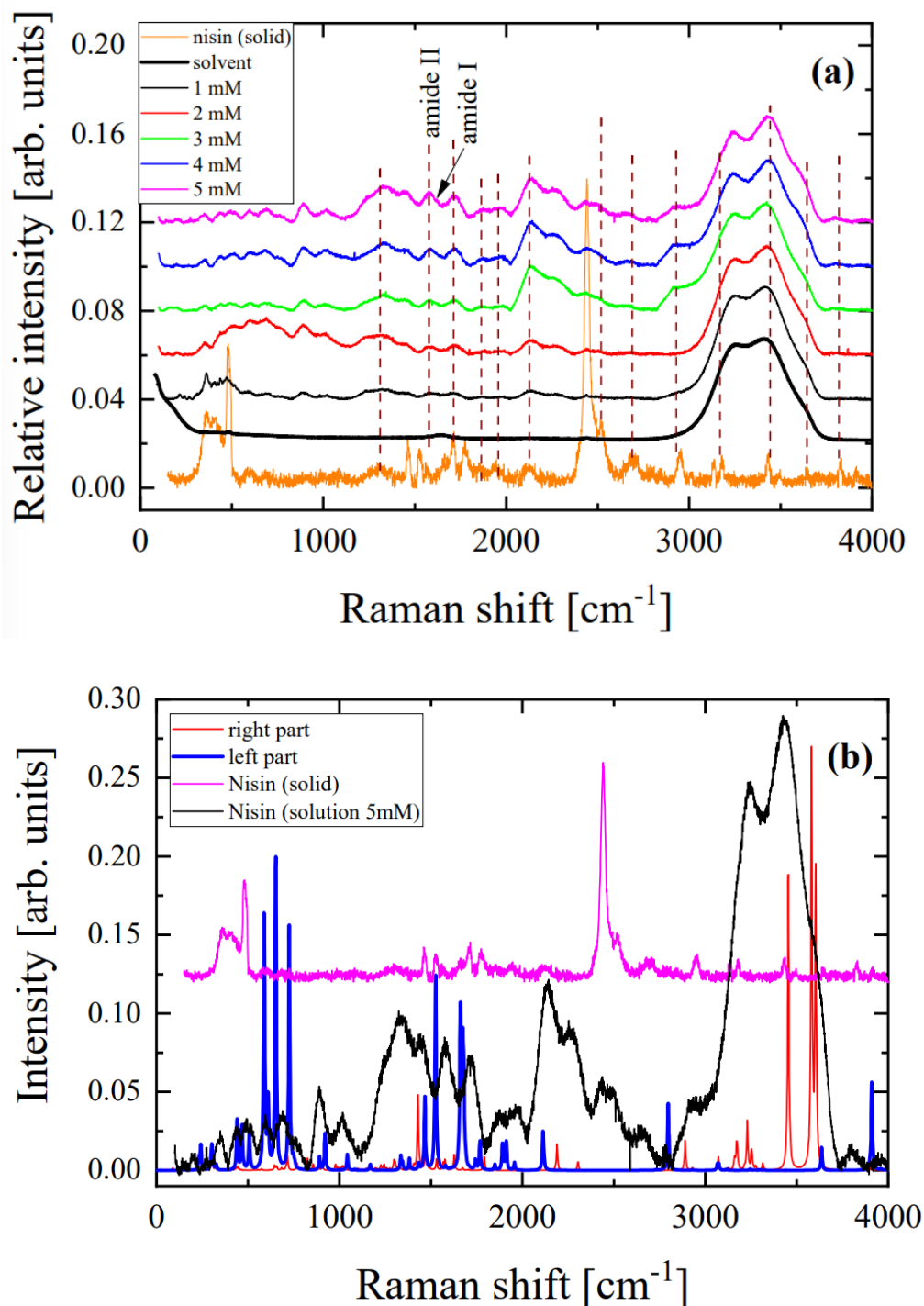
όπου το n αντιπροσωπεύει το χαμηλό αριθμό συσσωμάτωσης και το $(Nisin)_n$ είναι το συσσωμάτωμα. Ο παραπάνω μηχανισμός πραγματοποιείται σε σχετικά αραιά διαλύματα, ενώ με αύξηση της συγκέντρωσης είναι πιθανό να εμφανιστούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαλυμένης ουσίας και διαλύτη. Τέλος, η αντίδραση μεταφοράς πρωτονίων μπορεί να περιγραφεί από το μηχανισμό



Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η πλήρης κατανόηση της συμπεριφοράς της Νισίνης σε υδατικά διαλύματα, όπου πραγματοποιούνται διάφορες δομικές και δυναμικές αλλαγές, με τη χρήση δονητικών και ακουστικών φασματοσκοπιών. Τα αποτελέσματα αναλύονται και συγκρίνονται με τους θεωρητικούς υπολογισμούς για το σύστημα της Νισίνης.

6.2 Αποτελέσματα Δονητικής Φασματοσκοπίας

Για τον προσδιορισμό των μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα, καταγράφηκαν για το μελετώμενο σύστημα τα φάσματα *Raman* και *UV – Vis*. Συγκεκριμένα, λήφθηκαν τα φάσματα *Raman* για την κρυσταλλική Νισίνη, για τον καθαρό διαλύτη, δηλαδή για το *HCl*, καθώς και για τα διαλύματα της Νισίνης για συγκεντρώσεις $1 - 5 \text{ mM}$, όπως φαίνεται στο [Σχήμα 6.2](#).

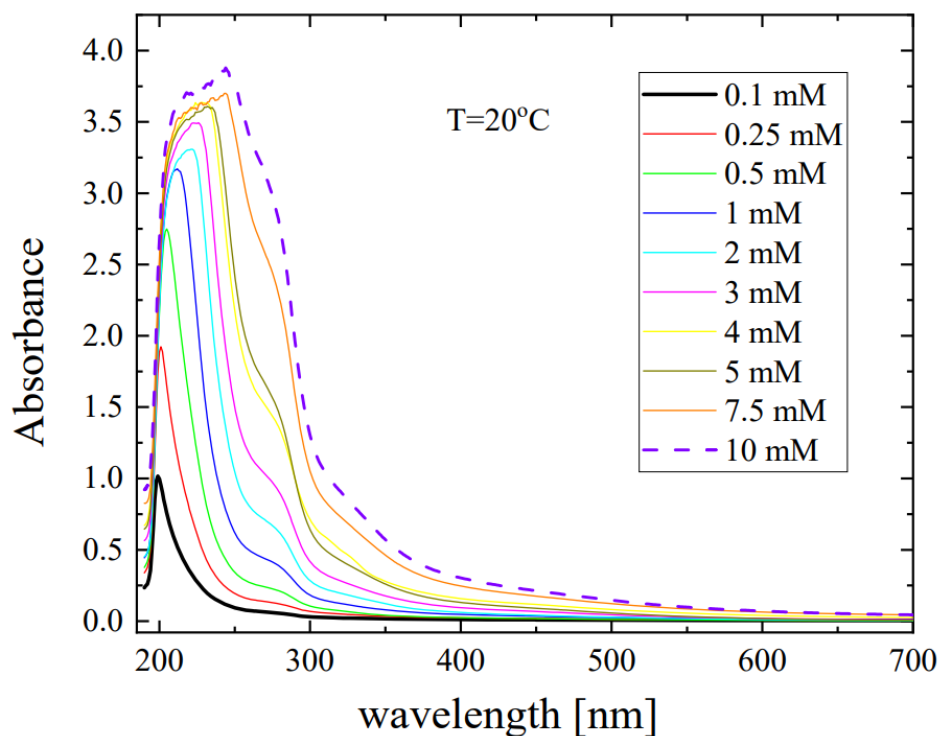


Σχήμα 6.2 : (α) Εξάρτηση από τη συγκέντρωση των πολωμένων (VV) φασμάτων *Raman* της περιοχής *Stokes* των υδατικών διαλυμάτων Νισίνης για συγκεντρώσεις από 0 (διαλύτης) έως 5 *mM* με βήμα 1 *mM*. Φαίνεται επίσης και το φάσμα της στερεής Νισίνης. (β) Θεωρητικά προβλεπόμενα φάσματα *Raman* που αντιστοιχούν στις περιοχές δέσμευσης των δύο μονομερών τα οποία αποτελούν το διμερές. Παρουσιάζονται, επίσης, και τα φάσματα *Raman* της στερεής Νισίνης και του διαλύματος συγκέντρωσης 5 *mM* για σύγκριση.

Το φάσμα της κρυσταλλικής Νισίνης καταγράφηκε για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί σύγκριση με τα διαλύματα. Στο παραπάνω σχήμα, φαίνεται ότι στην περιοχή άνω των 3000 cm^{-1} κυριαρχούν οι ισχυρές ζώνες, οι οποίες αποδίδονται στις ομάδες υδροξυλίου που υπάρχουν στο διαλύτη και στην ίδια τη Νισίνη. Η ζώνη τάνυσης του δεσμού $N-H$ παρατηρείται κοντά στα 3270 cm^{-1} , πράγμα χαρακτηριστικό της αμιδικής ομάδας. Σε συχνότητες κοντά στα 1656 cm^{-1} και στα 1537 cm^{-1} , εμφανίζονται οι κορυφές των Αμιδίου Ι και Αμιδίου ΙΙ, αντίστοιχα, τα οποία σχετίζονται με δύο πεπτιδικούς δεσμούς. Για να αξιολογηθεί η παρουσία του διμερούς στο διάλυμα, πραγματοποιήθηκε απευθείας σύγκριση των θεωρητικά προβλεπόμενων φασμάτων, τα οποία αντιστοιχούν στις περιοχές δέσμευσης των δύο μονομερών που αποτελούν τα διμερή, με τα πειραματικά φάσματα της στερεής Νισίνης και του διαλύματος συγκέντρωσης 5 mM , όπως φαίνεται στο [Σχήμα 6.2](#).

Η σύγκριση αυτή έδειξε μία σημαντική ταύτιση των θεωρητικών φασμάτων *Raman* με αυτών των πειραματικών, αν και ο υπολογισμός που πραγματοποιήθηκε ήταν απλά μία πρόχειρη εκτίμηση στην κατάσταση ατμού (*vapor state*). Οι κορυφές που παρατηρούνται στα θεωρητικά υπολογισμένα φάσματα για τα δύο μέρη του διμερούς, εμφανίζονται επίσης και στο πειραματικό φάσμα του υδατικού διαλύματος της Νισίνης, κυρίως στην περιοχή από 1500 έως 1700 cm^{-1} .

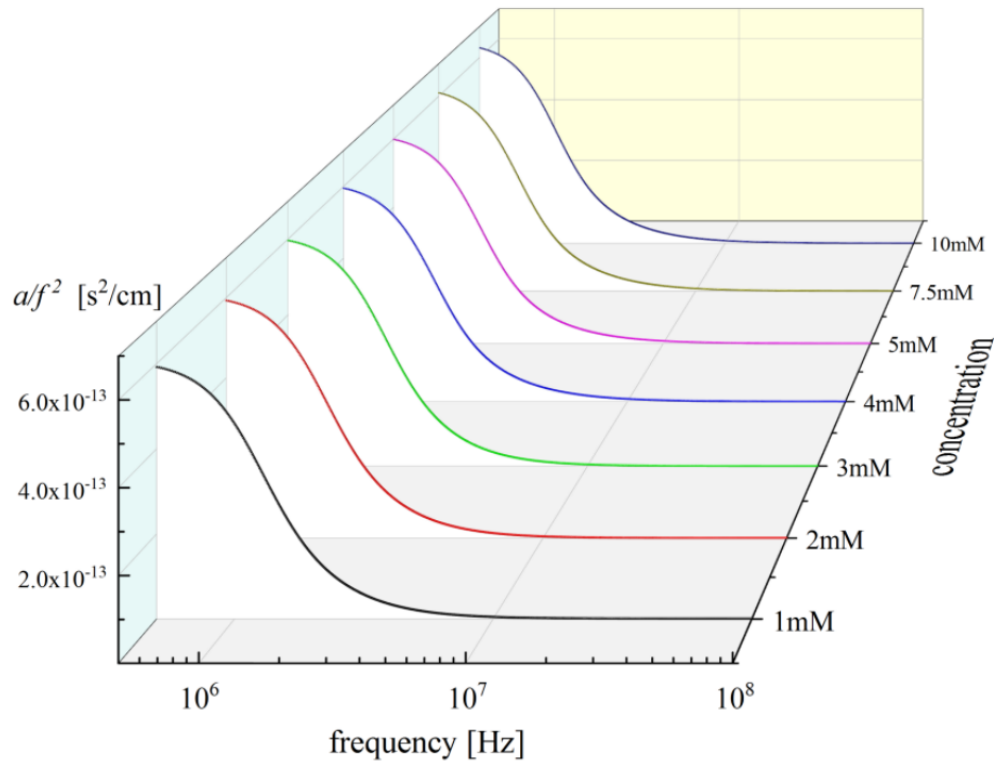
Επίσης, καταγράφηκαν και τα φάσματα απορρόφησης Υπεριώδους – Ορατού των διαλυμάτων της Νισίνης από 190 έως 700 nm και παρουσιάζονται στο [Σχήμα 6.3](#). Τα φάσματα αυτά κυριαρχούνται κυρίως από την παρουσία $\pi \rightarrow \pi^*$ μεταπτώσεων μεταξύ των πεπτιδικών δεσμών στην περιοχή $180 - 230\text{ nm}$ [4]. Συγκεκριμένα, η περιοχή από 190 έως 210 nm αποδίδεται σε δευτερεύοντα δομικά στοιχεία, συμπεριλαμβανομένων της α -έλικας (α -helix), της β -πτυχωτής επιφάνειας (β -sheet) και τυχαίων πηνίων. Οι περιοχές $210 - 230\text{ nm}$ και $270 - 280\text{ nm}$ είναι χαρακτηριστικά πρότυπα απορρόφησης των περισσότερων πεπτιδικών αντιβιοτικών [4]. Η μονότονη διακύμανση των φασμάτων απορρόφησης στην περιοχή χαμηλού μήκους κύματος είναι ενδεικτική της διαδικασίας σταδιακής συσσωμάτωσης, η οποία πραγματοποιείται στο μελετώμενο σύστημα.



Σχήμα 6.3 : Φάσματα απορρόφησης Υπεριώδους – Ορατού των διαλυμάτων Νισίνης συναρτήσει της συγκέντρωσης στους 20°C.

6.3 Αποτελέσματα Φασματοσκοπίας Υπερήχων

Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενα κεφάλαια, η ακουστική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των διαλυμάτων της Νισίνης είναι η τεχνική *Transmission*, διάταξη και η πειραματική της διαδικασία αναφέρεται στο Παράρτημα Π1. Οι πειραματικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε ένα εύρος συχνοτήτων από 400 kHz έως 50 MHz, με βήμα αρχικά 100 kHz έως το 1 MHz και έπειτα με βήμα 1 MHz έως τα 50 MHz. Τα δύο βασικά μεγέθη που υπολογίζονται με τη χρήση της τεχνικής *transmission* είναι η ταχύτητα του υπερήχου καθώς και ο ανηγμένος συντελεστής απόσβεσης (α/f^2). Ο τελευταίος χρησιμοποιείται για την κατασκευή των διαγραμμάτων του συντελεστή απόσβεσης συναρτήσει της συχνότητας του υπερήχου. Τα φάσματα αποκατάστασης υπερήχων λήφθηκαν για ένα εύρος συγκέντρωσης της Νισίνης από 1 έως 10 mM σε υδατικό διάλυμα HCl 0.02 M και παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.4.



Σχήμα 6.4 : Γράφημα του ανηγμένου συντελεστή απόσβεσης συναρτήσει της συχνότητας για τα διαλύματα της Νισίνης στους 20°C. Οι συμπαγείς γραμμές αντιπροσωπεύουν τις καμπύλες προσαρμογής, όπως λαμβάνονται από τη διαδικασία *fitting*.

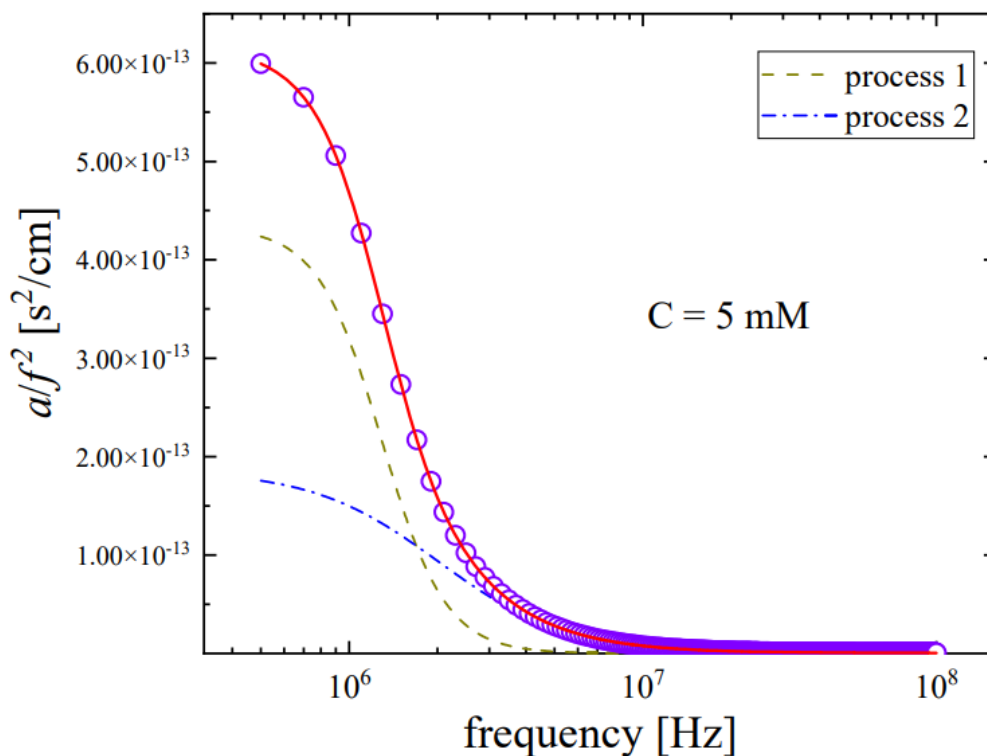
Η διαδικασία *fitting* δεν ήταν εφικτό να πραγματοποιηθεί επαρκώς χρησιμοποιώντας την εξίσωση τύπου *Debye*, αλλά προσαρμόστηκαν καλύτερα με τη χρήση του πραγματικού μέρους της συνάρτησης κατανομής *Cole – Davidson* [5, 6]:

$$\left(\frac{\alpha}{f^2}\right)_{\text{experimental}} = \sum \{A_i (\cos \varphi_i)^{\beta_i} \cos(\beta_i \varphi_i)\} + B \quad (6.4)$$

όπου $\varphi_i = \tan^{-1}(\omega \tau_i)$ με $\omega = 2\pi f$ και $\tau_i = 2\pi/f_{\tau i}$ είναι ο αντίστοιχος χρόνος αποκατάστασης. Η παράμετρος β_i είναι σχετική με το πλάτος της κατανομής της i -ης διαδικασίας και βρίσκεται μεταξύ του 0 και του 1. Όταν το β_i ισούται με το 1, τότε η συνάρτηση κατανομής παίρνει τη μορφή *Debye*. Γενικά, η παράμετρος αυτή επιτρέπει την επαρκή περιγραφή διαφορετικών φασματικών σχημάτων, τα οποία εκτείνονται σε μία ευρύτερη περιοχή συχνοτήτων σε λογαριθμική κλίμακα από την απλή αποκατάσταση *Debye*.

Ένα παράδειγμα της διαδικασίας προσαρμογής που χρησιμοποιήθηκε για την περιγραφή των δεδομένων απορρόφησης των υπερήχων συναρτήσει της συχνότητας στα διαλύματα της Νισίνης σε συγκέντρωση 5 mM και θερμοκρασία 20°C παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα. Γίνεται αντιληπτό πως η συνάρτηση κατανομής *Cole – Davidson* προσαρμόζεται επαρκώς στις

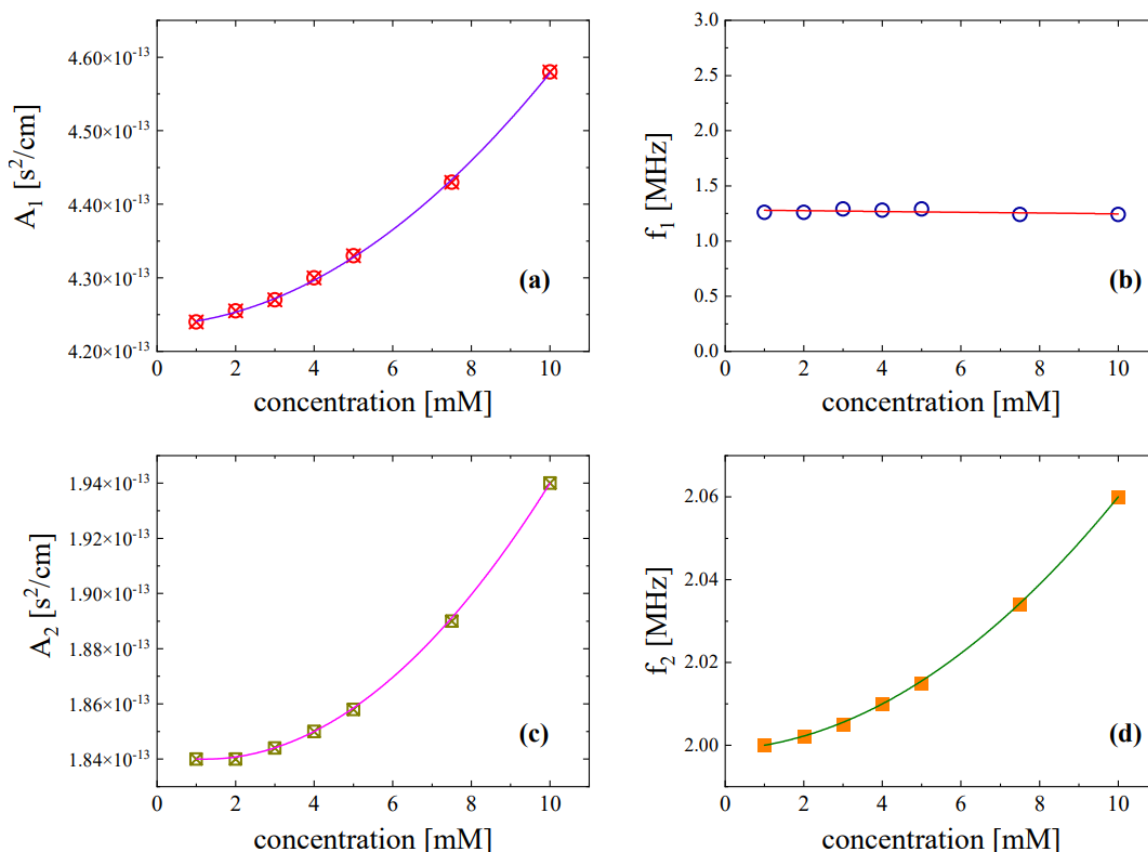
πειραματικές τιμές του a/f^2 . Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, τα ακουστικά φάσματα των πολυπεπτιδίων εμφανίζουν κυρίως τρεις κύριους μηχανισμούς, τις διαμορφωτικές αλλαγές μεταξύ πιθανών διαμορφωμερών, το μηχανισμό αυτοσυσσωμάτωσης και την αντίδραση μεταφοράς πρωτονίων. Ο μηχανισμός αυτοσυσσωμάτωσης πραγματοποιείται σε μετρίως αραιά διαλύματα, ενώ η μεταφορά πρωτονίων αναμένεται να λάβει χώρα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Ενώ αναμένεται να υπάρχουν και οι τρεις μηχανισμοί στα φάσματα των διαλυμάτων της Νισίνης, πειραματικά παρατηρήθηκαν μόνο δύο διακριτοί μηχανισμοί αποκατάστασης στη σχετικά χαμηλή περιοχή συχνοτήτων MHz . Η πρώτη διεργασία που παρατηρείται σε χαμηλότερες συχνότητες μπορεί να αποδοθεί σε διαμορφωτικές αλλαγές, ενώ η δεύτερη που παρατηρείται σε υψηλότερες συχνότητες αποδίδεται στην αυτοσυσσωμάτωση της Νισίνης, καθώς η πρώτη διεργασία αναμένεται να πραγματοποιηθεί σε χαμηλότερες ενέργειες [7].



Σχήμα 6.5 : Παράδειγμα της διαδικασίας προσαρμογής των δεδομένων απορρόφησης υπερήχων σε διάλυμα Νισίνης με συγκέντρωση 5 mM στους 20°C . Η κόκκινη γραμμή αντιπροσωπεύει τη συνολική καμπύλη αποκατάστασης, ενώ οι δύο διακεκομμένες αντιστοιχούν στις δύο διακριτές διαδικασίες αποκατάστασης που περιγράφηκαν παραπάνω. Τέλος, οι κύκλοι δηλώνουν τα πειραματικά δεδομένα.

Η διαδικασία προσαρμογής επέτρεψε την εκτίμηση πολλών παραμέτρων, μεταξύ των οποίων η χαρακτηριστική συχνότητα αποκατάστασης (f_*) και το πλάτος της αποκατάστασης (A). Τα δύο αυτά μεγέθη είναι μεγάλης σημασίας καθώς επιτρέπουν τον ποσοτικό

χαρακτηρισμό των επιδράσεων αποκατάστασης. Η εξάρτηση της χαρακτηριστικής συχνότητας αποκατάστασης (f_{ri}) και του πλάτους αποκατάστασης (A_i) με $i = 1$ και 2 στους 20°C για τους δύο μηχανισμούς που συζητήθηκαν φαίνεται στο Σχήμα 6.6. Ο δείκτης 1 υποδηλώνει τις ακουστικές παραμέτρους που σχετίζονται με τις διαμορφωτικές αλλαγές και ο δείκτης 2 τις ακουστικές παραμέτρους που σχετίζονται με την αυτοσυσσωμάτωση της Νισίνης.

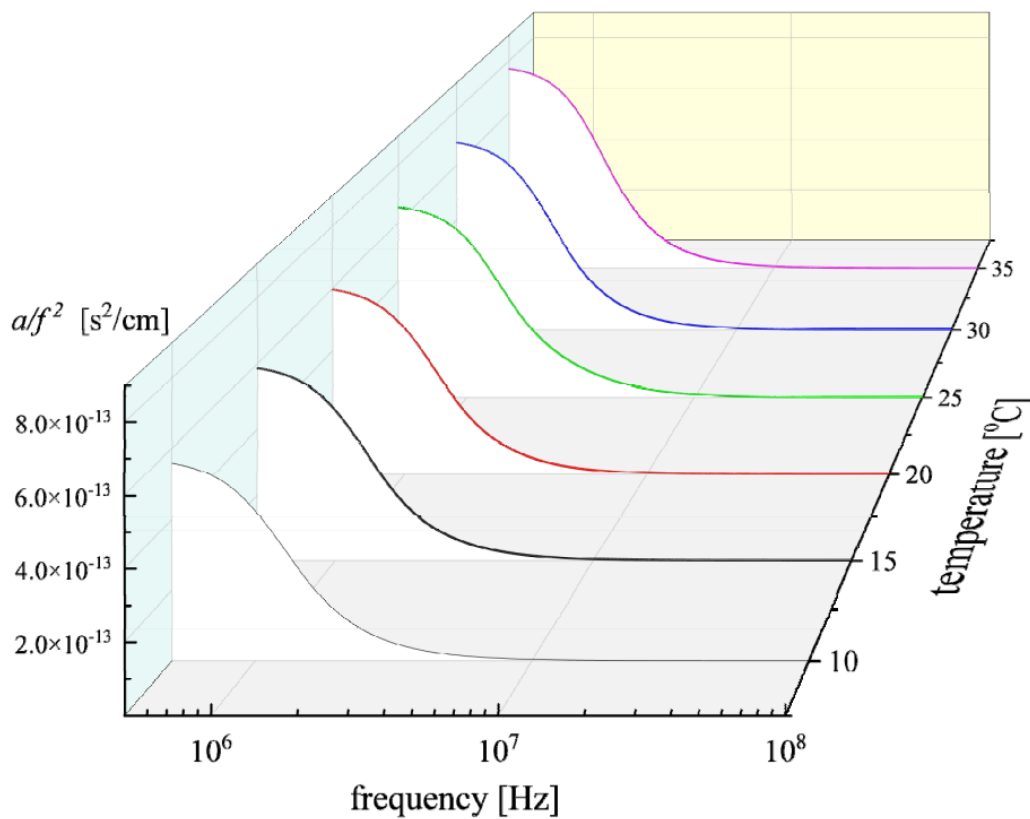


Σχήμα 6.6 : Διαγράμματα του πλάτους αποκατάστασης των υπερήχων A_i (a, c) και της συχνότητας αποκατάστασης f_{ri} (b, d) συναρτήσει της συγκέντρωσης της Νισίνης σε θερμοκρασία 20°C. Το σφάλμα για τη συχνότητα αποκατάστασης f_r βρέθηκε χαμηλότερο από $\pm 2.5\%$, ενώ για τα A και B ήταν κάτω από $\pm 5\%$. Οι δείκτες 1 και 2 δηλώνουν τις ακουστικές παραμέτρους που σχετίζονται με τις διαμορφωτικές αλλαγές και την αυτοσυσσωμάτωση της Νισίνης, αντίστοιχα.

Από το παραπάνω σχήμα, παρατηρείται πως το πλάτος αποκατάστασης A_1 εμφανίζει μία μονότονη αυξητική τάση με αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος, ενώ η συχνότητα αποκατάστασης f_{r1} είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση και παραμένει σταθερή. Επομένως, συμπεραίνεται πως η αποκατάσταση που παρατηρείται σχετίζεται με τη μονομοριακή ισορροπία μεταξύ διαφορετικών περιστροφικών ισομερών. Παρατηρείται επίσης, πως η θερμική ισορροπία διακατέχει έναν κυρίαρχο ρόλο στα διαλύματα της Νισίνης. Από την άλλη, το πλάτος αποκατάστασης A_2 και η χαρακτηριστική συχνότητα f_{r2} της δεύτερης διαδικασίας αποκατάστασης, η οποία παρατηρείται σε υψηλότερες συχνότητες, παρουσιάζουν μία

μονότονη αυξητική τάση με την αύξηση της συγκέντρωσης της Νισίνης. Το γεγονός αυτό υποστηρίζει την προτεινόμενη υπόθεση πως αυτή η διαδικασία αποκατάστασης αντιστοιχεί στο μηχανισμό αυτοσυσσωμάτωσης. Τέλος, η κλασική συμβολή του συντελεστή απορρόφησης B φαίνεται να είναι σχεδόν ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση στο μελετώμενο εύρος συχνοτήτων.

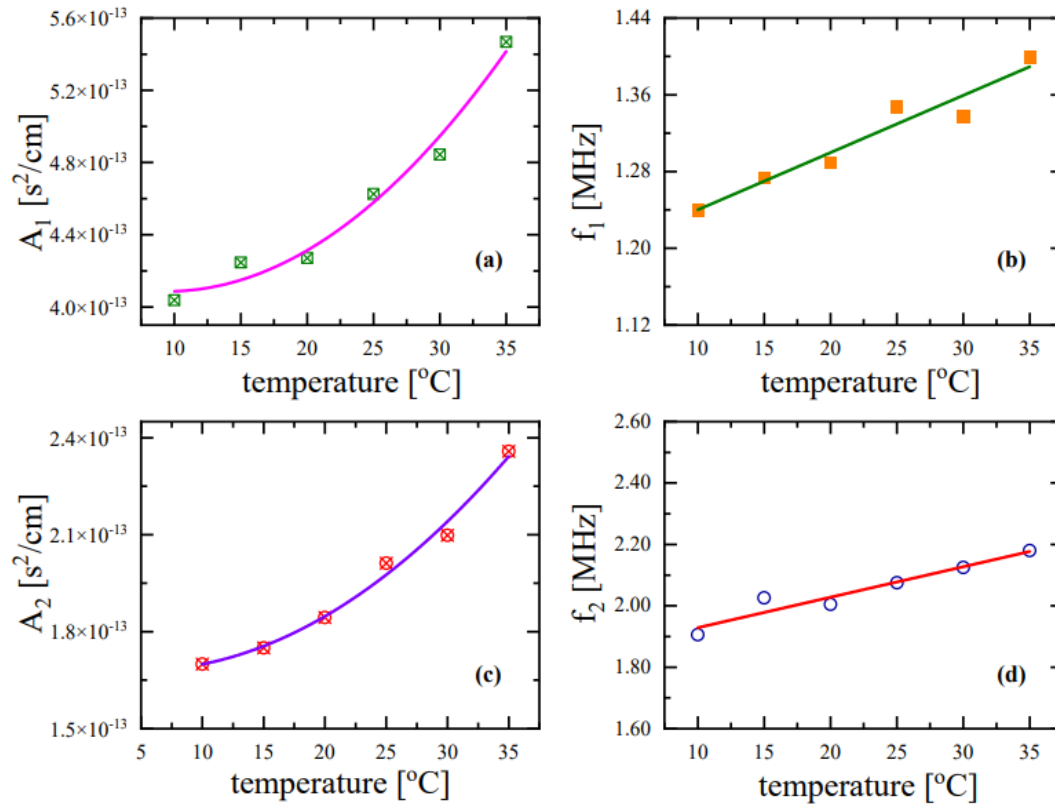
Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τους πειραματικούς συντελεστές απορρόφησης και τις καμπύλες προσαρμογής τους συναρτήσει της θερμοκρασίας για διάλυμα Νισίνης συγκέντρωσης 3 mM . Στο Σχήμα 6.7 παρουσιάζονται τα φάσματα τις ακουστικής απορρόφησης ως συνάρτηση της συχνότητας για όλες τις μελετώμενες θερμοκρασίες.



Σχήμα 6.7 : Γράφημα του ανηγμένου συντελεστή απόσβεσης συναρτήσει της συχνότητας για διάλυμα της Νισίνης συγκέντρωσης $C = 3\text{ mM}$. Οι συμπαγείς γραμμές αντιπροσωπεύουν τις καμπύλες αποκατάστασης για κάθε θερμοκρασία όπως λαμβάνονται από τη διαδικασία *fitting*. Σε όλες τις θερμοκρασίες παρατηρείται μείωση του συντελεστή a/f^2 με αύξηση της συχνότητας, γεγονός χαρακτηριστικό μίας διαδικασίας αποκατάστασης.

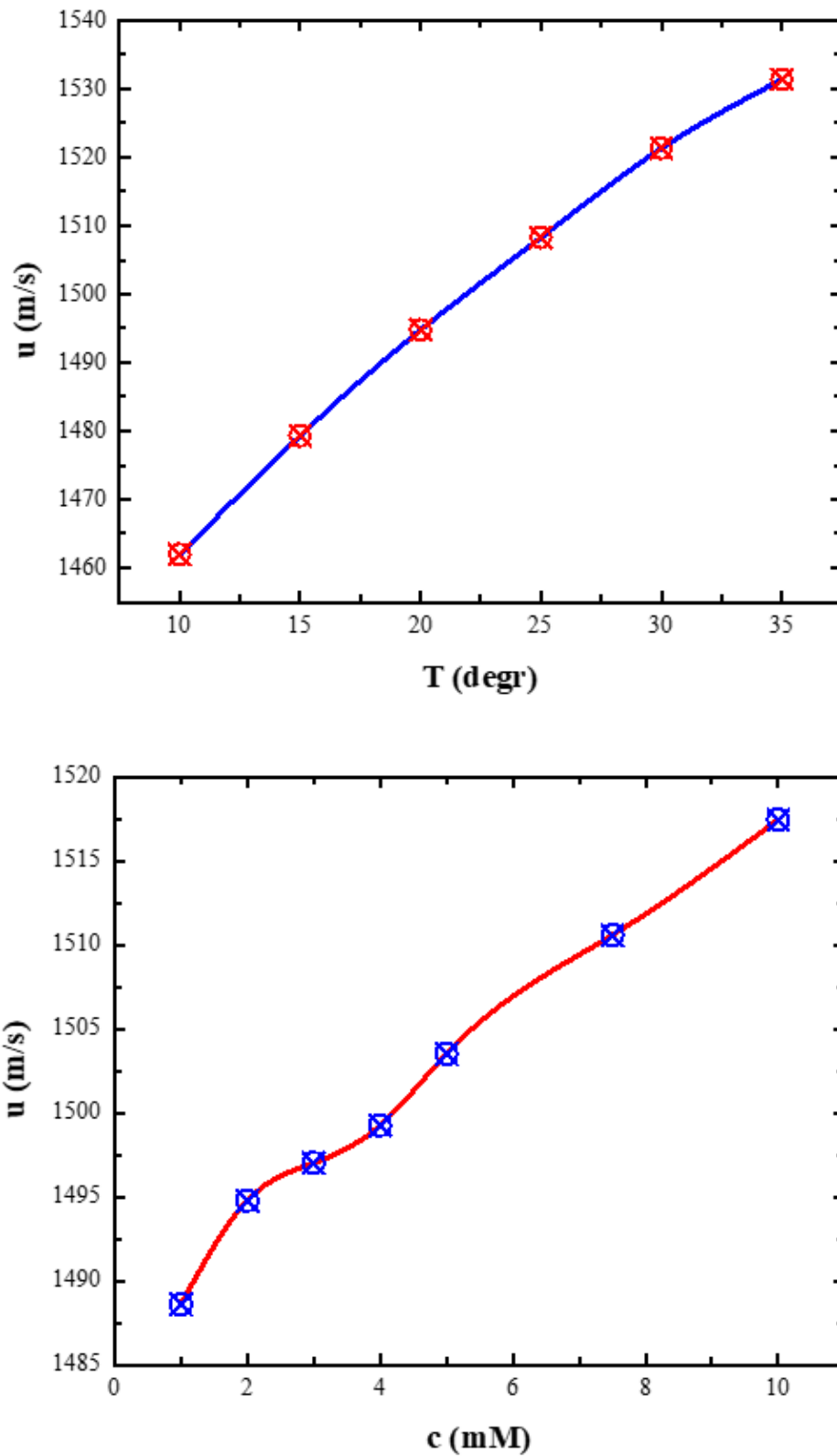
Η συνάρτηση κατανομής *Cole – Davidson* προσαρμόστηκε επαρκώς στις πειραματικές τιμές του a/f^2 συναρτήσει της θερμοκρασίας, όπως και παραπάνω, και παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.8 για τις δύο διαδικασίες αποκατάστασης που έχουν ήδη αναφερθεί. Παρατηρείται αύξηση και στα δύο πλάτη αποκατάστασης A_1 και A_2 με αύξηση της θερμοκρασίας, ενώ οι

συχνότητες αποκατάστασης, f_{r1} και f_{r2} , παρουσιάζουν μία καθαρή γραμμική μετατόπιση προς υψηλότερες συχνότητες (*blue shift*).



Σχήμα 6.8 : Διαγράμματα του πλάτους αποκατάστασης των υπερήχων A_i (a, c) και της συχνότητας αποκατάστασης f_{ri} (b, d) συναρτήσει της θερμοκρασίας για διάλυμα Νισίνης συγκέντρωσης $C = 3 \text{ mM}$. Οι δείκτες 1 και 2 δηλώνουν τις ακουστικές παραμέτρους που σχετίζονται με τις διαμορφωτικές αλλαγές και την αυτοσυσσωμάτωση της Νισίνης, αντίστοιχα.

Η πειραματική ταχύτητα των υπερήχων συναρτήσει της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης των διαλυμάτων της Νισίνης παρουσιάζεται στο [Σχήμα 6.9](#) a και b, αντίστοιχα. Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρείται μονότονη αύξηση της ταχύτητας, το οποίο είναι σύμφωνο με τα υπόλοιπα αποτελέσματα και τις υποθέσεις για τους δύο μηχανισμούς που πραγματοποιούνται.



Σχήμα 6.9 : Διαγράμματα υπερηχητικής ταχύτητας συναρτήσει της θερμοκρασίας (a) και συναρτήσει της συγκέντρωσης σε σταθερή θερμοκρασία 20 °C (b).

Η αξιολόγηση των ενθαλπιών ενεργοποίησης και των διαφορών των ενθαλπιών που σχετίζονται με τις διαμορφωτικές αλλαγές και με το μηχανισμό αυτοσυσσωμάτωσης μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας την εξάρτηση των αντίστοιχων παραμέτρων προσαρμογής από τη θερμοκρασία. Από την κλίση του διαγράμματος τύπου *Arrhenius* του $\ln(f_r/T)$ προς το $1/T$, όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.9 α, c, για αποκατάσταση χαμηλής και υψηλής συχνότητας, μπορεί να υπολογιστεί η ενθαλπία ενεργοποίησης για τη μονομοριακή ισορροπία μεταξύ των διαφορετικών περιστροφικών ισομερών καθώς και για την αντίδραση διμερισμού της Νισίνης, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τη θεωρία του *Eyring*, η χαρακτηριστική συχνότητα αποκατάστασης, f_r , σχετίζεται με τις θερμοδυναμικές παραμέτρους με βάση την εξίσωση:

$$\frac{1}{2\pi f_r} = \frac{h}{k_B T} \exp\left(\frac{\Delta H^* - T\Delta S^*}{R}\right) \quad (6.5)$$

ή

$$\ln\left(\frac{f_r}{T}\right) = -\frac{\Delta H^*}{1000R}\left(\frac{1000}{T}\right) + \left[\frac{\Delta S^*}{R} + \ln\left(\frac{k_B}{2\pi h}\right)\right] \quad (6.6)$$

όπου το ΔH^* είναι η ενθαλπία ενεργοποίησης, το ΔS^* είναι η εντροπία ενεργοποίησης, το k_B είναι η σταθερά Boltzmann, το h η σταθερά Planck και το R η παγκόσμια σταθερά των αερίων. Η διαφορά ενθαλπίας ΔH^0 μπορεί να υπολογιστεί από τη σχέση:

$$\frac{T\mu_{max}}{u^2} = \frac{\pi\rho V\theta^2(\Delta H^0)^2}{2JC_p^2} \exp\left(\frac{\Delta S^0}{R}\right) \exp\left(-\frac{\Delta H^0}{RT}\right) \quad (6.7)$$

όπου το μ_{max} υπολογίζεται άμεσα με τη χρήση των παραμέτρων αποκατάστασης f_r και A . Η ταχύτητα του ήχου υπολογίζεται με τη βοήθεια της σχέσης:

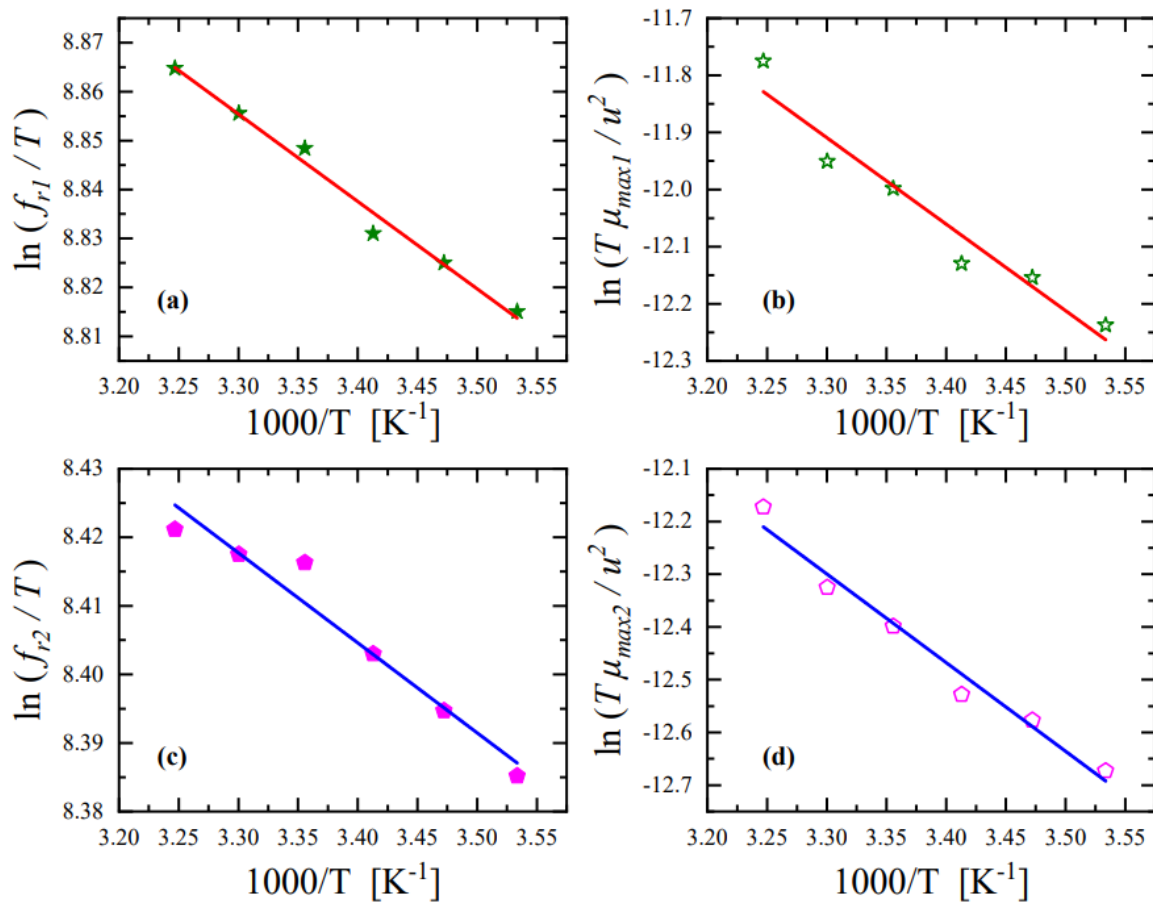
$$\mu_{max} = \frac{1}{2} A u f_r \quad (6.8)$$

Επιπλέον, στη σχέση (6.7), το V δηλώνει το μοριακό όγκο, το θ το συντελεστή θερμικής διαστολής και το C_p την ειδική θερμότητα σε σταθερή πίεση. Τέλος, με ρ συμβολίζεται η πυκνότητα του διαλύματος και με $J = 4.187 \text{ J/cal}$ ο συντελεστής μετατροπής των *Joule* σε *calories*. Επειδή το θερμοκρασιακό εύρος της πειραματικής διαδικασίας είναι σχετικά περιορισμένο, είναι δυνατόν η διαφορά ενθαλπίας να αντιμετωπιστεί ως ανεξάρτητη από τη θερμοκρασία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, να μπορεί να βρεθεί από την κλίση του διαγράμματος του $T\mu_{max}/u^2$ ως προς το $1/T$, όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.10 b, d.

Η εξίσωση (6.7), ισχύει όταν πληρείται το κριτήριο $r \ll l$, όπου το r είναι η ισχύς του μηχανισμού αποκατάστασης και δίνεται από τη σχέση:

$$r_i = \frac{A_i u_i f_{ri}}{\pi} - \frac{1}{4} \left(1 - \frac{2B_i}{A_i} \right) \left(\frac{A_i u_i f_{ri}}{\pi} \right)^2 \quad (6.9)$$

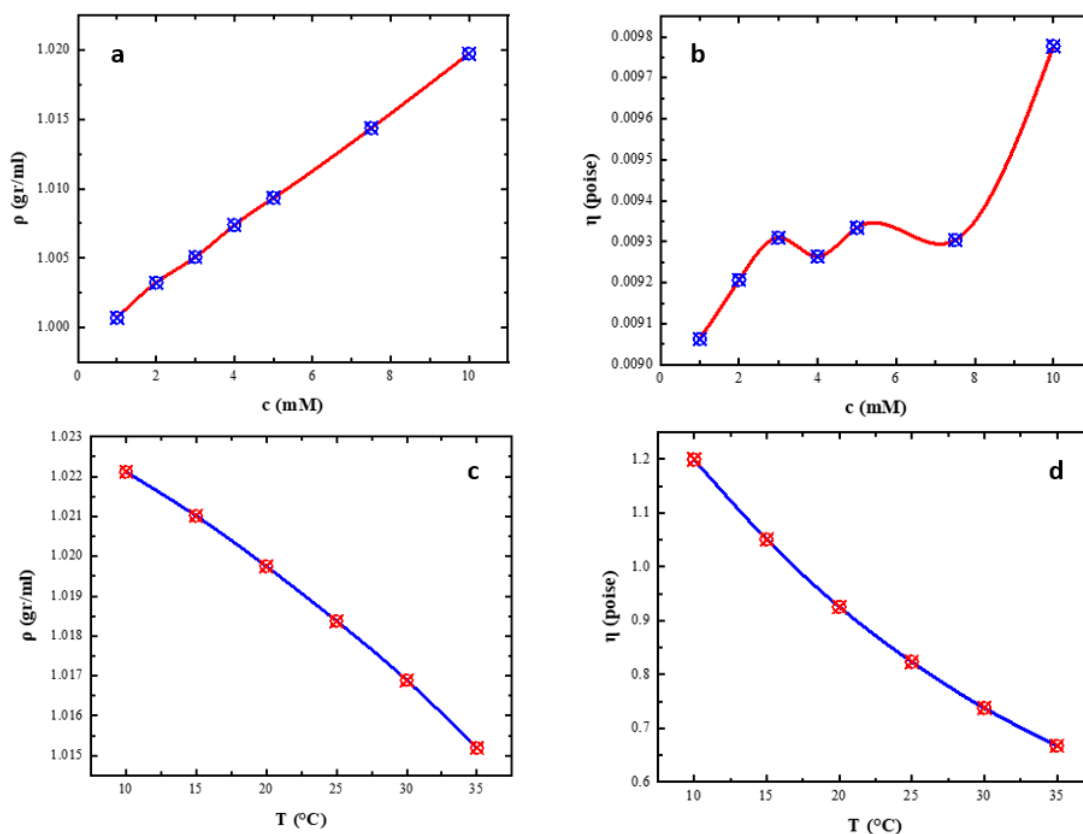
Μέσω της παραπάνω σχέσης, υπολογίστηκαν οι παράμετροι r_1 και r_2 , οι οποίες αντιστοιχούν στην αποκατάσταση χαμηλής και υψηλής συχνότητας, αντίστοιχα. Η αποκατάσταση χαμηλής συχνότητας αποδίδεται στη διαμορφωτική αλλαγή, ενώ αυτή της υψηλής συχνότητας στο μηχανισμό αυτοσυσσωμάτωσης, όπως έχει αναφερθεί ήδη.



Σχήμα 6.10 : Στα γραφήματα (a) και (c) φαίνονται οι συχνότητες αποκατάστασης συναρτήσει της αντίστροφης θερμοκρασίας για τη διαμορφωτική αλλαγή και για το μηχανισμό αυτοσυσσωμάτωσης, αντίστοιχα. Στα γραφήματα (b) και (d) παριστάνεται το $T\mu_{max}/u^2$ ως προς το $1/T$ για τις διαμορφωτικές αλλαγές και για το μηχανισμό συσσωμάτωσης, αντίστοιχα.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, πραγματοποιήθηκαν επιπλέον βοηθητικές μετρήσεις του κινηματικού ιξώδους η καθώς και της πυκνότητας ρ των διαλυμάτων της Νισίνης. Τα αποτελέσματα της πυκνότητας συναρτήσει της θερμοκρασίας παρουσιάζουν μία μονότονη

μείωση, γεγονός που αποδίδεται στην εξασθένιση των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων με αύξηση της θερμοκρασίας, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της πυκνότητας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης, τα οποία εμφανίζουν μία αύξηση, που οφείλεται στο μηχανισμό αυτοσυσσωμάτωσης της Νισίνης και το σχηματισμό διμερών. Επιπλέον, τα δεδομένα των μετρήσεων του κινηματικού ιξώδους συναρτήσει της θερμοκρασίας εμφανίζουν και αυτά, μία μείωση καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, για το λόγο που αναφέρθηκε παραπάνω. Τέλος, τα αποτελέσματα του κινηματικού ιξώδους ως συνάρτηση της συγκέντρωσης είναι πιο περίπλοκα. Ενώ αρχικά παρατηρείται μία μονότονη αύξηση, σε συγκέντρωση 4 mM υπάρχει μείωση του ιξώδους, το οποίο αποδίδεται στη δημιουργία των διμερών. Ακολουθεί μία σχεδόν γραμμική τάση του ιξώδους για τις άλλες δύο συγκεντρώσεις και απότομη αύξηση στα 10 mM . Το τελευταίο πιθανώς οφείλεται στο γεγονός πως σε μεγάλες συγκεντρώσεις αυξάνεται ο αριθμός των διμερών της Νισίνης σε σχέση με τα μονομερή που υπάρχουν στο διάλυμα. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.11.



Σχήμα 6.11 : Διαγράμματα της πυκνότητας και του κινηματικού ιξώδους συναρτήσει της συγκέντρωσης στους $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (a, b) και συναρτήσει της θερμοκρασίας (c, d).

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται η ισχύς αποκατάστασης, η πυκνότητα του διαλύματος και οι σχετικές ακουστικές παράμετροι για διάλυμα Νισίνης συγκέντρωσης 3 mM σε όλες τις μελετώμενες θερμοκρασίες, ενώ στον Πίνακα 2 συνοψίζονται τα αποτελέσματα όλων των συγκεντρώσεων σε σταθερή θερμοκρασία 20°C .

Πίνακας 1 : Ιδιότητες διαλύματος Νισίνης συγκέντρωσης 3 mM για τις μελετώμενες θερμοκρασίες.

T (°C)	u (m/s)	ρ (g/cm ³)	$A_1 (\times 10^{-13} \text{ s}^2/\text{cm})$	$B_1 (\times 10^{-16} \text{ s}^2/\text{cm})$	f_{r1} (MHz)	$A_2 (\times 10^{-13} \text{ s}^2/\text{cm})$	$B_2 (\times 10^{-16} \text{ s}^2/\text{cm})$	f_{r2} (MHz)	$\mu_{\max 1}$	$\mu_{\max 2}$	r_1	r_2
10	1462.0	1.0069	4.04	1.46	1.24	1.70	3.80	1.91	0.0366	0.0237	0.0232	0.0150
15	1479.3	1.0062	4.25	1.46	1.27	1.75	4.42	2.03	0.0400	0.0262	0.0253	0.0166
20	1494.8	1.0051	4.27	1.46	1.29	1.84	3.26	2.00	0.0412	0.0276	0.0260	0.0175
25	1508.3	1.0037	4.63	1.46	1.35	2.01	4.37	2.08	0.0470	0.0315	0.0297	0.0199
30	1521.3	1.0024	4.84	1.46	1.34	2.10	3.68	2.12	0.0493	0.0339	0.0311	0.0215
35	1531.4	0.9999	5.47	1.46	1.40	2.36	3.28	2.18	0.0586	0.0394	0.0369	0.0249

Πίνακας 2 : Ιδιότητες των διαλυμάτων Νισίνης όλων των μελετώμενων συγκεντρώσεων στους 20°C.

C (mM)	u (m/s)	ρ (g/cm ³)	$A_1 (\times 10^{-13}$ s ² /cm)	$B_1 (\times 10^{-16}$ s ² /cm)	f_{r1} (MHz)	$A_2 (\times 10^{-13}$ s ² /cm)	$B_2 (\times 10^{-16}$ s ² /cm)	f_{r2} (MHz)	$\mu_{\max 1}$	$\mu_{\max 2}$	r_1	r_2
1	1488.6	1.0007	4.24	1.46	1.26	1.84	2.55	2.000	0.0398	0.0274	0.0252	0.0174
2	1494.8	1.0032	4.26	1.45	1.26	1.84	2.48	2.002	0.0401	0.0401	0.0254	0.0174
3	1497.0	1.0051	4.27	1.46	1.29	1.84	2.26	2.005	0.0412	0.0412	0.0261	0.018
4	1499.2	1.0074	4.30	1.47	1.28	1.85	2.54	2.010	0.0413	0.0413	0.0261	0.0177
5	1503.5	1.0093	4.33	1.46	1.29	1.86	2.26	2.015	0.0420	0.0420	0.0266	0.0179
7.5	1510.6	1.0144	4.43	1.46	1.24	1.89	2.46	2.034	0.0415	0.0415	0.0262	0.0184
10	1517.4	1.0198	4.58	1.45	1.24	1.94	2.46	2.060	0.0431	0.0431	0.0272	0.0192

Οι τιμές των r_1 και r_2 είναι και για τους δύο μηχανισμούς πολύ μικρότερες από το I , όπως φαίνεται από τους πίνακες, και επομένως η εξίσωση (6.7) παρέχει ακριβή αποτελέσματα.

Τα διαγράμματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 6.12 επιβεβαιώνουν τις αρχικές υποθέσεις πως οι ενθαλπίες ενεργοποίησης και οι διαφορές των ενθαλπιών είναι ανεξάρτητες από τη θερμοκρασία, καθώς παρουσιάζουν μία σαφώς γραμμική εξάρτηση. Για τη διαμορφωτική αλλαγή, η ενθαλπία ενεργοποίησης υπολογίστηκε ίση με $\Delta H_1^* = 0.354 \pm 0.028 \text{ kcal/mol}$ και η διαφορά της ενθαλπίας $\Delta H_1^0 = 3,008 \pm 0.367 \text{ kcal/mol}$. Τέλος, οι ίδιες θερμοδυναμικές παράμετροι για την αυτοσυσσωμάτωση της Νισίνης βρέθηκαν ίσες με $\Delta H_2^* = 0.261 \pm 0.004 \text{ kcal/mol}$ και $\Delta H_2^0 = 3,340 \pm 0.264 \text{ kcal/mol}$.

Σχετικά με το μηχανισμό αυτοσυσσωμάτωσης της Νισίνης, λαμβάνοντας υπόψη πως πραγματοποιείται ως μία μέση αντίδραση και πως η διαδικασία βρίσκεται, κινητικά, στο χρονικό παράθυρο των υπερήχων, τότε η συχνότητα αποκατάστασης f_{r2} και η συγκέντρωση της Νισίνης C σχετίζονται με τη σχέση

$$2\pi f_{r2} = n^2 k_f C^{n-1} + k_b \quad (6.10)$$

όπου τα k_f και k_b αντιπροσωπεύουν τις σταθερές ρυθμού προς τα εμπρός και προς τα πίσω, αντίστοιχα, και η παράμετρος n δηλώνει τον αριθμό συσσωμάτωσης. Η παράμετρος αυτή είναι πάντα ακέραιος αριθμός. Σχεδιάστηκε το γινόμενο $2\pi f_{r2}$ ως προς το C^{n-1} , το οποίο αναμένεται να είναι γραμμικό, για διάφορες ακέραιες τιμές του n και στη συνέχεια υπολογίστηκε ο συντελεστής *Pearson*. Ο καλύτερος συντελεστής *Pearson* $R = 0.98378$ λήφθηκε για $n = 2$. Για αυτή την τιμή υπολογίστηκαν, έπειτα, οι σταθερές ρυθμού από την κλίση και την τομή της γραφικής παράστασης. Αυτές βρέθηκαν ίσες με $k_f = 5.98 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ και $k_b = 1.25 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Εκτός από τα παραπάνω, όταν εφαρμόζεται ένα ηχητικό κύμα στο υδατικό διάλυμα Νισίνης, το σύστημα διαταράσσεται προκαλώντας, έτσι, μία πεπερασμένη αλλαγή του όγκου που συνοδεύει την αντίδραση. Συγκεκριμένα, η ισεντροπική μεταβολή του όγκου ΔV_{s_i} για κάθε διεργασία μπορεί να υπολογιστεί από τη σχέση:

$$\mu_{max_i} = \frac{\pi \rho u^2 \Gamma_i}{2RT} (\Delta V_{s_i})^2 \quad (6.11)$$

όπου ο δείκτης i δηλώνει τη μέγιστη τιμή της απορρόφησης ανά μήκος κύματος που σχετίζεται με τη διαμορφωτική αλλαγή και ο δείκτης 2 αναφέρεται στην αντίστοιχη παράμετρο που σχετίζεται με το μηχανισμό συσσωμάτωσης της Νισίνης. Το Γ_i είναι η παράμετρος συγκέντρωσης και σχετίζεται με την πρόοδο της i -ης διαδικασίας. Η παράμετρος αυτή μπορεί να υπολογιστεί σύμφωνα με τη σχέση:

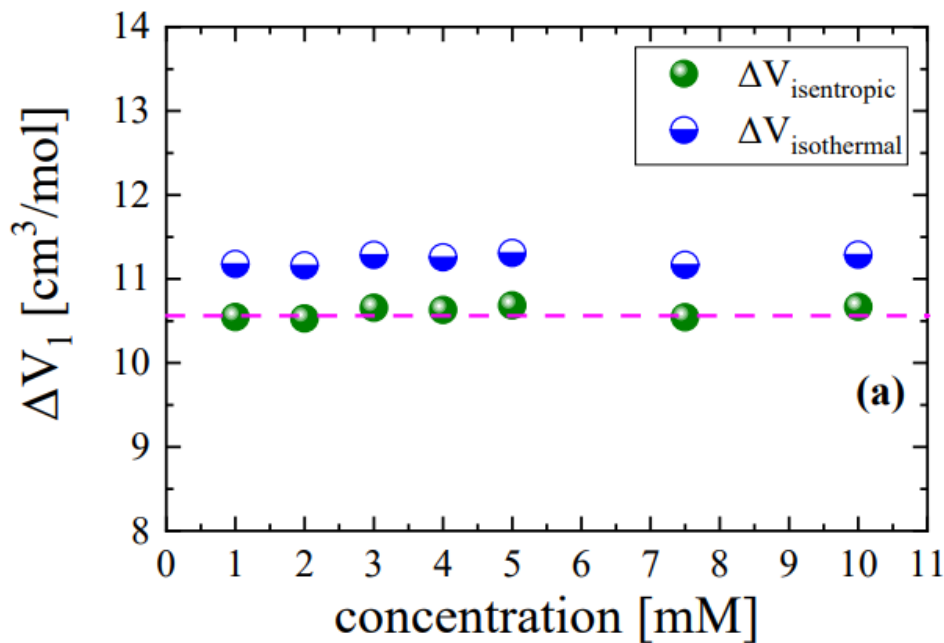
$$\Gamma = \frac{1}{V} \left[\frac{\partial}{\partial \ln K_C} \left(\frac{n_j - n_j^0}{v_j} \right) \right]_{p,T} \quad (6.12)$$

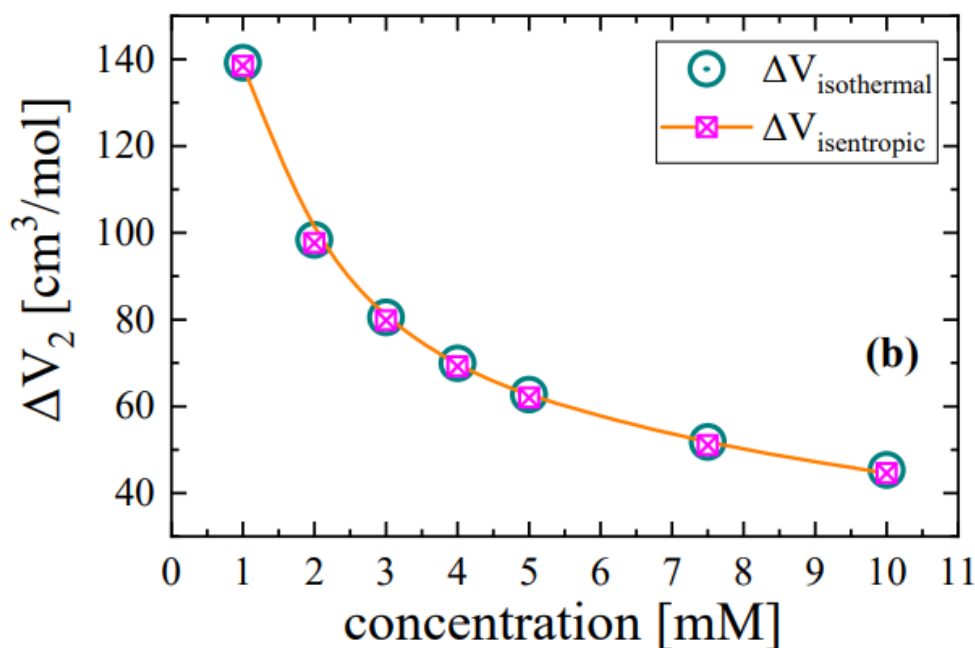
όπου το v_j είναι οι στοιχειομετρικοί συντελεστές του j -ου είδους, το οποίο συμμετέχει στη χημική αντίδραση και το n_j^0 είναι ο μοριακός αριθμός στην κατάσταση χημικής ισορροπίας.

Η ισοθερμική μεταβολή του όγκο, ΔV_{T_i} , υπολογίζεται με τη χρήση της ισεντροπικής μεταβολής:

$$\Delta V_{T_i} = \Delta V_{S_i} + \frac{\alpha_p \Delta H_i}{\rho C_p} \quad (6.13)$$

Στην παραπάνω εξίσωση, η θερμική διαστολή του διαλύματος, α_p , και η θερμοχωρητικότητα υπό σταθερή πίεση, C_p , θεωρήθηκαν ίσες με τις αντίστοιχες ιδιότητες του διαλύτη, καθώς τα διαλύματα της Νισίνης ήταν αραιά. Η αναλογία $\alpha_p \Delta H_i / \rho C_p$ δηλώνει την ενθαλπική συνεισφορά στην ισεντροπική μεταβολή του όγκου και είναι σχετικά μικρή σε σχέση με τους όρους της μεταβολής του ισοθερμικού και ισεντροπικού όγκου. Οι λαμβανόμενες ισοθερμικές και ισεντροπικές μεταβολές του όγκου, οι οποίες σχετίζονται με τη διαμορφωτική αλλαγή και με το μηχανισμό αυτοσυσσωμάτωσης, παρουσιάζονται στο [Σχήμα 6.12](#) α και β, αντίστοιχα. Όπως γίνεται αντιληπτό, η παραπάνω αναλογία είναι μέτρια σε σύγκριση με την ισοθερμική μεταβολή του όγκου λόγω των δύο διαδικασιών που πραγματοποιούνται στα διαλύματα.





Σχήμα 6.12 : Ισοθερμικές και ισεντροπικές μεταβολές του όγκου λόγω της διαμορφωτικής αλλαγής (a) και της αυτοσυσσωμάτωσης (b) συναρτήσει της συγκέντρωσης της Νισίνης.

Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα, η αλλαγή του όγκου λόγω του μηχανισμού αυτοσυσσωμάτωσης επηρεάζεται έντονα από τη συγκέντρωση του διαλύματος, σε αντίθεση με την αλλαγή του όγκου που οφείλεται στις διαμορφωτικές αλλαγές. Επειδή η αλλαγή του όγκου είναι μεγαλύτερη, όσο ισχυρότερη είναι η επίδραση ενός μηχανισμού στη δομή, η υπολογιζόμενη μεταβολή του όγκου μεταξύ των περιστροφικών ισομερών αναμένεται να είναι μικρότερη από αυτή του μηχανισμού αυτοσυσσωμάτωσης.

Η τυπική μεταβολή του όγκου, ΔV_2 , η οποία σχετίζεται με το μηχανισμό αυτοσυσσωμάτωσης της Νισίνης, μπορεί να εκτιμηθεί θεωρητικά με τη χρήση της σχέσης:

$$\Delta V_2 = \bar{V}_{(Nisin)_n} - n\bar{V}_{Nisin} \quad (6.14)$$

όπου το $\bar{V}_{(Nisin)_n}$ δηλώνει το μερικό μοριακό όγκο του συσσωματώματος της Νισίνης, το $\bar{V}_{Nisin}$ το μερικό μοριακό όγκο του μονομερούς της Νισίνης και το n τον αριθμό συσσωμάτωσης, που ισούται με 2. Η τυπική μεταβολή του όγκου λόγω της συσσωμάτωσης της Νισίνης βρέθηκε, θεωρητικά, ίση με $\Delta V_2 = 165.69 \text{ cm}^3/\text{mol}$. Η τιμή αυτή είναι συγκρίσιμη με τα πειραματικά αποτελέσματα στην αραή περιοχή, λαμβάνοντας υπόψη πως ο θεωρητικός υπολογισμός πραγματοποιήθηκε σε κενό περιβάλλον.

Η μεταβολή του όγκου, ΔV_1 , η οποία αφορά τη διαμορφωτική αλλαγή της Νισίνης, δεν είναι εφικτό να υπολογιστεί θεωρητικά. Τα πολυπεπίδια, γενικά, υπάρχουν συνήθως ως

ραβδοειδείς ελικοειδείς δομές, άκαμπτες, ή ακόμα και τυχαίες μορφές πηνίου. Η μετάβαση μεταξύ αυτών των μορφών και ο πιθανός ισομερισμός που μπορεί να πραγματοποιείται σε κάθε μία από τις μορφές αυτές, επηρεάζονται από τη θερμοκρασία, τον τύπο του διαλύτη καθώς και το pH του διαλύματος. Λόγω της πολυπλοκότητας στη μοριακή δομή της Νισίνης, είναι αδύνατος ο χειρισμός των θεωρητικά πιθανών αλλαγών της διαμόρφωσής της χρησιμοποιώντας κβαντομηχανικές προσεγγίσεις.

Το ελεύθερο διαμοριακό μήκος (*free intermolecular length*), L , είναι μία ιδιότητα η οποία περιγράφει την απόσταση μεταξύ των επιφανειών των μορίων. Το ελεύθερο μήκος μπορεί να υπολογιστεί απευθείας χρησιμοποιώντας τις θερμοακουστικές παραμέτρους, έτσι ώστε να είναι δυνατόν να μελετηθούν οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις που πραγματοποιούνται στα διαλύματα. Ο υπολογισμός του γίνεται με τη χρήση της παρακάτω εμπειρικής σχέσης:

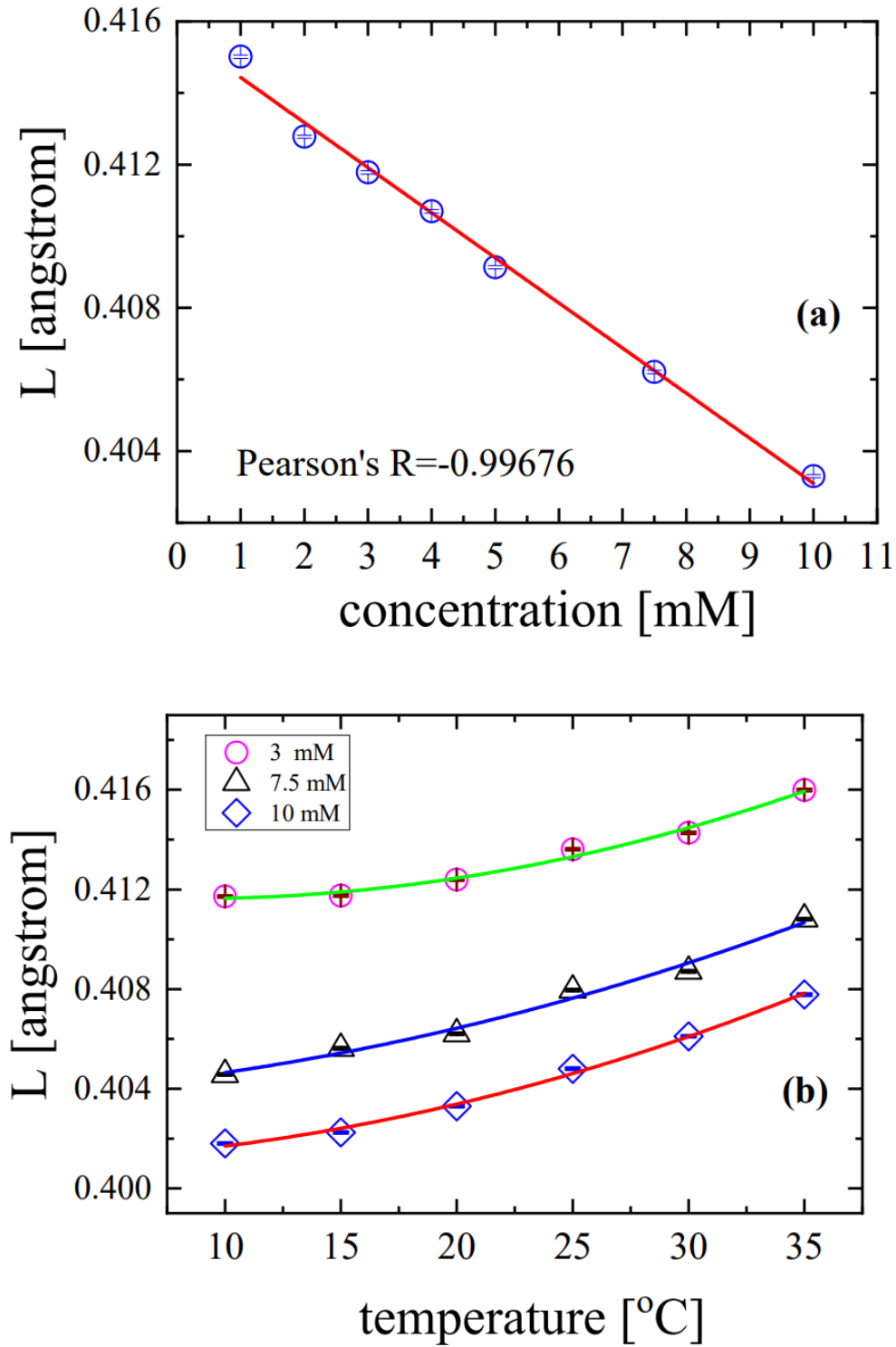
$$L = K\sqrt{\beta_S} \quad (6.15)$$

όπου K είναι η σταθερά του *Jacobson*, η οποία εξαρτάται από τη θερμοκρασία και την πίεση, και β_S είναι η αδιαβατική συμπιεστότητα του συστήματος, που δίνεται από την εξίσωση:

$$\beta_S = \frac{1}{\rho u^2} \quad (6.16)$$

Στα Σχήματα 6.13 a και b παρουσιάζονται οι υπολογισμένες τιμές του ελεύθερου μήκους L συναρτήσει της συγκέντρωσης και της θερμοκρασίας του διαλύματος, αντίστοιχα. Παρατηρείται μονότονη μείωση του ελεύθερου διαμοριακού μήκους με αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος σε σταθερή θερμοκρασία. Με άλλα λόγια, η απόσταση μεταξύ των γειτονικών μορίων μειώνεται με αύξηση της συγκέντρωσης, ενισχύοντας έτσι τη διάδοση των υπερηχητικών κυμάτων. Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι μοριακές αλληλεπιδράσεις είναι ισχυρότερες, με αποτέλεσμα η μοριακή συσσωμάτωση να γίνεται άκαμπτη.

Από την άλλη πλευρά, το ελεύθερο διαμοριακό μήκος αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας με μία πολωνυμική τάση σε ορισμένες συγκεντρώσεις. Η αύξηση της θερμοκρασίας, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της απόστασης μεταξύ των επιφανειών των γειτονικών μορίων και, έτσι, οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις γίνονται ασθενέστερες. Τέλος, είναι εμφανές πως η ταχύτητα του ήχου και η πυκνότητα μάζας έχουν άμεση σχέση με το ελεύθερο διαμοριακό μήκος και μπορούν να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με διάφορα διαμοριακά φαινόμενα.



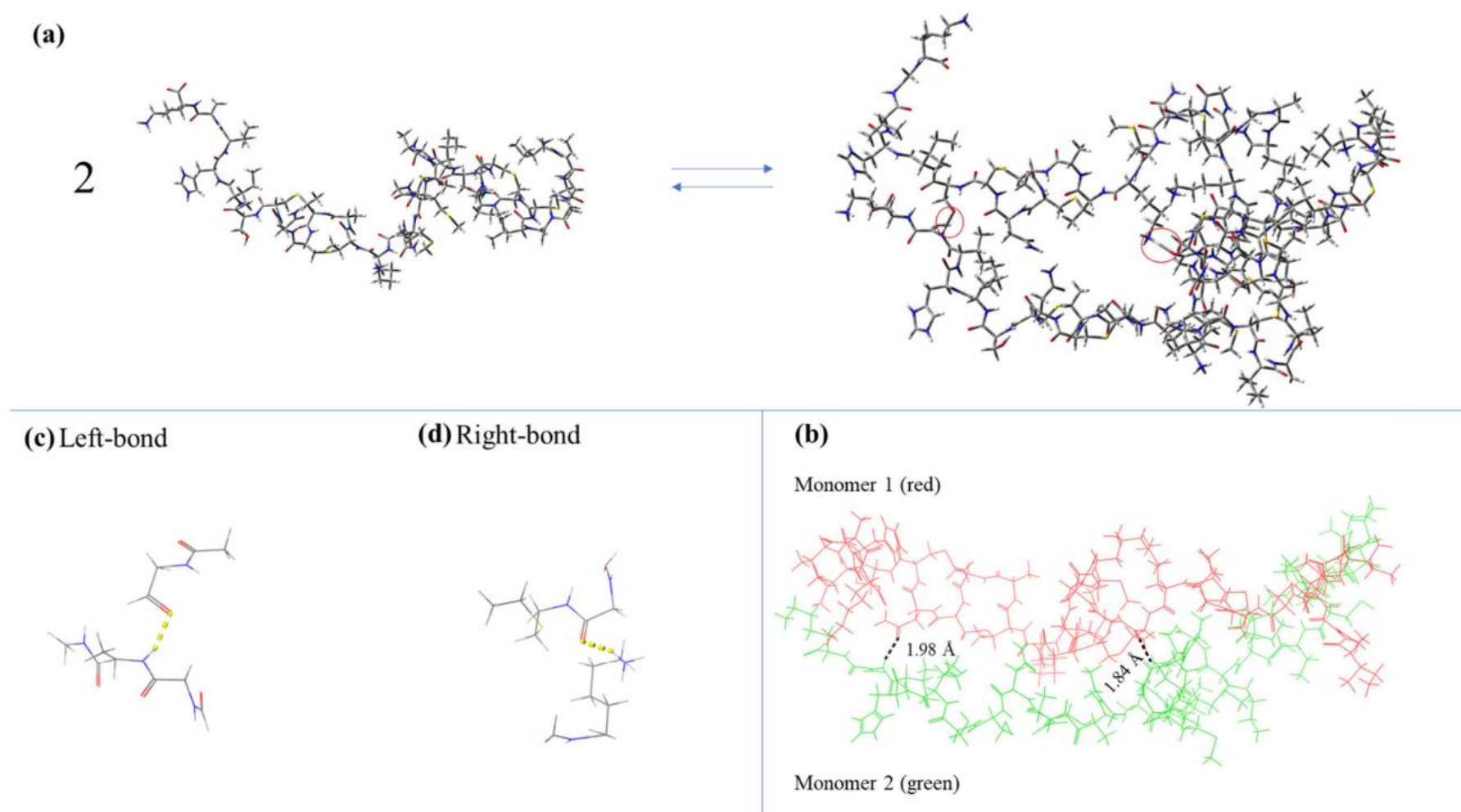
Σχήμα 6.13 : Ελεύθερο διαμοριακό μήκος συναρτήσει της συγκέντρωσης στους 20°C (a) και της θερμοκρασίας (b) σε τρεις επιλεγμένες συγκεντρώσεις.

6.4 Αποτελέσματα Κβαντομηχανικών Υπολογισμών

Η δομή του μονομέρους της Νισίνης, σε μορφή *.pdb, λήφθηκε από τη βάση δεδομένων *RCSB*, έτσι ώστε να πραγματοποιηθούν οι κβαντομηχανικοί υπολογισμοί. Πριν ξεκινήσουν οι υπολογισμοί της μοριακής πρόσδεσης, η δομή αυτή βελτιστοποιήθηκε με τη χρήση της ημι-εμπειρικής μεθόδου *PM3*.

Η υπολογιστική διερεύνηση της μοριακής πρόσδεσης μεταξύ των μονομερών της Νισίνης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού μοριακής πρόσδεσης *Schrödinger*. Αρχικά, το μέγεθος του κουτιού ορίζεται ίσο με $70 \text{ \AA} \times 70 \text{ \AA} \times 70 \text{ \AA}$, έτσι ώστε να είναι αρκετά μεγάλο για να χωράει επαρκώς τα δύο μόρια της Νισίνης και να καθιστά εφικτή την ελεύθερη πιθανή πρόσδεσή τους. Δεδομένου ότι το μόριο της Νισίνης έχει έναν μεγάλο αριθμό περιστρεφόμενων δεσμών, η κύρια αλυσίδα του μορίου εισάγεται ως άκαμπτη και αφήνονται ελεύθεροι για περιστροφή οι δεσμοί των πλευρικών αλυσίδων. Κατά τη διάρκεια των υπολογισμών, η αντιστοίχιση των μερικών φορτίων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των φορτίων *Gasteiger* και χρησιμοποιήθηκε ο γενετικός αλγόριθμος *Lamarzian* για την επιλογή της πόζας. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας 25000 αρχικές πόζες και μετά το πέρας του υπολογισμού, η ελεύθερη ενέργεια δέσμευσης βρέθηκε ίση με -3.84 kcal/mol για την καλύτερη δυνατή πόζα.

Στη συνέχεια, η ληφθείσα δομή του διμερούς της Νισίνης χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των συχνοτήτων δόνησης καθώς και για τη λήψη των θεωρητικών φασμάτων *Raman*. Λόγω του μεγάλου αριθμού των ατόμων στο διμερές της Νισίνης, δεν ήταν εφικτό να πραγματοποιηθούν κβαντομηχανικοί υπολογισμοί που να καλύπτουν την πλήρη δομή του και γι' αυτόν το λόγο απομονώθηκαν οι δύο περιοχές πρόσδεσης των δύο μονομερών και πραγματοποιήθηκαν οι κβαντομηχανικοί υπολογισμοί για τα δύο αυτά μέρη της δομής, όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.14. Η μέθοδος με την οποία έγιναν οι υπολογισμοί είναι η υβριδική μέθοδος *B3LYP* και ως σύνολο βάσης χρησιμοποιήθηκε το *6-31G(d)*. Για να αποφευχθούν οι αλληλεπιδράσεις των μορίων της Νισίνης με τα μόρια του διαλύτη, οι κβαντομηχανικοί υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν σε κενό περιβάλλον, απουσία διαλύτη. Τέλος, για το θεωρητικό υπολογισμό των μεταβολών του όγκου ΔV χρησιμοποιήθηκε η ημι-εμπειρική μέθοδος *PM6*.



Σχήμα 6.14 : (a) Η αντίδραση αυτοσυσσώματωσης όπως προβλέπεται από τη μελέτη της μοριακής πρόσδεσης. Οι θέσεις δέσμευσης μεταξύ των δύο μονομερών της Νισίνης παριστάνονται με δύο κόκκινους κύκλους. (b) Οι δύο περιοχές δέσμευσης των μονομερών που αποτελούν το διμερές. (c, d) Απομονωμένα τα δύο μέρη της δομής του διμερούς τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για το θεωρητικό υπολογισμό των συχνοτήτων δόνησης. Με κίτρινη διακεκομμένη γραμμή συμβολίζεται ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ των ατόμων των δύο αλυσίδων των μονομερών.

6.5 Βιβλιογραφία

- [1] Abee, T. & Delves-Broughton, J. (2003). Bacteriocins – Nisin. In: Russell, N. J., Gould, G. W. (eds) *Food Preservatives*. Springer, Boston, MA.
- [2] Buchman, G. W., Banerjee, S. & Hansen, J. N. (1988). Structure, Expression, and Evolution of a Gene Encoding the Precursor of Nisin, a Small Protein Antibiotic. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 263 (31), pp. 16260-16266.
- [3] Chandrasekar, V., Knabel, S. J., Anantheswaran, R. C. (2015). Modeling development of inhibition zones in an agar diffusion bioassay. *Food Science and Nutrition*, Vol. 3 (5), pp. 394-403.
- [4] Antosiewicz, J. N. & Shuger, D. (2016). UV-Vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure. Part 2: Selected applications. *Biophysical Reviews*, Vol 8, pp. 163-177.
- [5] Davidson, D. W. & Cole, R. H. (1950). Dielectric Relaxation in Glycerine. *The Journal of Chemical Physics*, Vol. 18 (10), pp. 1417.
- [6] Davidson, D. W. & Cole, R. H. (1951). Dielectric Relaxation in Glycerol, Propylene Glycol, and *n*-Propanol. *The Journal of Chemical Physics*, Vol. 19 (12), pp. 1484-1490.
- [7] Herzfeld, K. F. & Litovitz, T. A. (1959). *Absorption and Dispersion of Ultrasonic Waves*. New York: Academic Press.

Κεφάλαιο 7 : Συμπεράσματα και Προτάσεις για Μελλοντικές Εργασίες

7.1 Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν διαλύματα της Νισίνης με διάφορες τεχνικές, τόσο πειραματικές, όσο και θεωρητικές, με σκοπό να ληφθούν διάφορα αποτελέσματα για την συμπεριφορά του μορίου της Νισίνης μέσα σε υδατικά διαλύματα. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν είναι η φασματοσκοπία αποκατάστασης υπερήχων, η δονητική φασματοσκοπία *Raman*, η φασματοσκοπία απορρόφησης *UV – Vis* και οι θεωρητικοί κβαντομηχανικοί υπολογισμοί. Τα βασικά συμπεράσματα που προέκυψαν από τις τεχνικές αυτές παρουσιάζονται παρακάτω.

Αρχικά, η σύγκριση μεταξύ των πειραματικών και των θεωρητικά υπολογισμένων φασμάτων *Raman* απέδειξε την ύπαρξη της αντίδρασης διμερισμού μεταξύ δύο μονομερών ειδών της Νισίνης, γεγονός που αποκαλύφθηκε και με την υπολογιστική διερεύνηση της μοριακής πρόσδεσης. Σύμφωνα με τους θεωρητικούς υπολογισμούς, δεν ευνοείται ο σχηματισμός τετραμερών, παρά το γεγονός πως αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Τα φάσματα *UV – Vis* φανέρωσαν την παρουσία μεταπτώσεων $\pi \rightarrow \pi^*$ στους πεπτιδικούς δεσμούς, οι οποίες οφείλονται στα δευτερεύοντα δομικά στοιχεία του πολυπεπτιδίου.

Επιπλέον, η ανάλυση των φασμάτων της ακουστικής φασματοσκοπίας αποκάλυψε την ύπαρξη δύο διακριτών μηχανισμών αποκατάστασης, οι οποίοι οφείλονται στην κινητική της διαμορφωτικής αλλαγής και στην αυτοσυσσωμάτωση της Νισίνης. Η υπόθεση πως η αντίδραση διαμορφωτικής αλλαγής αντιστοιχεί στον πρώτο μηχανισμό επιβεβαιώθηκε από το γεγονός πως η συχνότητα αποκατάστασης δεν αλλάζει σημαντικά με αύξηση της συγκέντρωσης. Η ύπαρξη του διμερούς της Νισίνης στα διαλύματα υποστηρίζεται από τα αποτελέσματα των φασματοσκοπιών *Raman* και *UV – Vis*.

Τα αποτελέσματα των ακουστικών φασμάτων ακολουθούν μία αποκατάσταση τύπου *Cole – Davidson*. Τα γραφήματα $\ln(f_H/T)$ ως προς το $1000/T$ που κατασκευάστηκαν, ακολουθούν μία γραμμική εξάρτηση από τη θερμοκρασία και για τους δύο μηχανισμούς που λαμβάνουν χώρα στο διάλυμα. Για την αντίδραση της διαμορφωτικής αλλαγής, η ενθαλπία ενεργοποίησης βρέθηκε ίση με $\Delta H_1^* = 0.354 \pm 0.028 \text{ kcal/mol}$ και η διαφορά ενθαλπίας ίση με $\Delta H_1^0 = 3.008 \pm 0.367 \text{ kcal/mol}$. Για το μηχανισμό αυτοσυσσωμάτωσης, οι αντίστοιχες παράμετροι βρέθηκαν ίσες με $\Delta H_2^* = 0.261 \pm 0.004 \text{ kcal/mol}$ και $\Delta H_2^0 = 3.340 \pm 0.364 \text{ kcal/mol}$.

Τέλος, η αλλαγή του όγκου μεταξύ των περιστροφικών ισομερών ήταν μικρότερη από τη μεταβολή του όγκου λόγω του μηχανισμού της αυτοσυσσωμάτωσης, ο οποίος έχει σημαντικό

αντίκτυπο στη δομή. Είναι κατανοητό πως με αύξηση της θερμοκρασίας, οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις είναι λιγότερο έντονες με αποτέλεσμα η συσσωμάτωση να πραγματοποιείται δυσκολότερα. Από την άλλη πλευρά, η αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος της Νισίνης, έχει τα αντίθετα αποτελέσματα και, έτσι, το διμερές σχηματίζεται σε μετρίως αραιά διαλύματα. Η θεωρητική τυπική μεταβολή του όγκου λόγω της αυτοσυσσωμάτωσης της Νισίνης βρέθηκε ίση με $\Delta V_2 = 165.69 \text{ cm}^3/\text{mol}$, τιμή συγκρίσιμη με τα πειραματικά δεδομένα. Επιπλέον, το ελεύθερο διαμοριακό μήκος, παρουσιάζει μείωση με αύξηση της συγκέντρωσης και αύξηση με την αύξηση της θερμοκρασίας, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση πως ο δεύτερος μηχανισμός που πραγματοποιείται στο διάλυμα οφείλεται στην αυτοσυσσωμάτωση της Νισίνης.

7.2 Προτάσεις για Μελλοντική Εργασία

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι τεχνικές αποκατάστασης υπερήχων σε συνδυασμό με τη δονητική φασματοσκοπία *Raman*, τη φασματοσκοπία απορρόφησης Υπερύθρου – Ορατού καθώς και τους θεωρητικούς κβαντομηχανικούς υπολογισμούς, συμβάλλουν στην επαρκή κατανόηση της δυναμικής του εξεταζόμενου συστήματος και στον προσδιορισμό των μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα στο διάλυμα. Θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν και συμπληρωματικές τεχνικές, όπως αυτή της ακουστικά επαγόμενης διπλοθλαστικότητας με σκοπό την καλύτερη κατανόηση του συστήματος. Επιπλέον, θα μπορούσε να ξεκινήσει μία νέα έρευνα, στην οποία θα μελετηθούν διαλύματα που θα περιέχουν Νισίνη με κυκλοδεξτρίνη, με σκοπό τη διερεύνηση του συστήματος και τον έλεγχο ύπαρξης του διμερούς στο διάλυμα.

Εκτός από τα παραπάνω, στο πλαίσιο των υπερηχητικών τεχνικών, βρίσκεται σε εξέλιξη η μελέτη της Γλουταθειόνης. Η Γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο που δρα κυρίως ως αντιοξειδωτικό δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και προστατεύοντας, έτσι, τον οργανισμό. Ο σκοπός της μελέτης αυτού του συστήματος είναι η διερεύνηση των αντιδράσεων που πραγματοποιούνται μέσα σε διαλύματα της Γλουταθειόνης.

Μερικές προτάσεις για μελλοντικές εργασίες θα μπορούσαν να αφορούν στη μελέτη και άλλων πεπτιδίων ή ακόμα και πρωτεϊνών για την καλύτερη κατανόηση της συμπεριφοράς τους σε υδατικά διαλύματα. Επίσης, επιθυμούμε να μελετήσουμε, τόσο με υπερηχητικές τεχνικές, όσο και με τη βοήθεια συμπληρωματικών μετρήσεων, το σχηματισμό και τη συμπεριφορά μικυλλίων τα οποία θα εμπεριέχουν διάφορα αμινοξέα.

Παράρτημα

Π1 Πρωτόκολλο Μετρήσεων με την Τεχνική του Transmission

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, η πειραματική διάταξη της τεχνικής *διέλευσης* ή *transmission* αποτελείται από μία γεννήτρια παλμών, δύο πιεζοηλεκτρικά στοιχεία, μία κυψελίδα στην οποία βρίσκεται το δείγμα, έναν ενισχυτή και έναν παλμογράφο. Το ένα πιεζοηλεκτρικό στοιχείο λειτουργεί ως πομπός και το άλλο ως δέκτης και το καθένα χαρακτηρίζεται από μία βέλτιστη συχνότητα λειτουργίας. Επομένως, ανάλογα με το μελετώμενο εύρος συχνοτήτων, θα πρέπει να γίνει και κατάλληλη επιλογή των πιεζοηλεκτρικών στοιχείων.

1. Σύνδεση της διάταξης

Αρχικά, η γεννήτρια των παλμών συνδέεται με ένα καλώδιο με το πιεζοηλεκτρικό στοιχείο, που λειτουργεί ως πομπός, και με ένα δεύτερο καλώδιο με το ένα κανάλι του παλμογράφου, με τη βοήθεια ενός διακλαδωτή τύπου *T*. Στο κανάλι αυτό τοποθετείται αντίσταση 50Ω . Στη συνέχεια, το δεύτερο πιεζοηλεκτρικό, που λειτουργεί ως δέκτης, συνδέεται με τον ενισχυτή με τη χρήση ενός καλωδίου. Τέλος, με ένα ακόμα καλώδιο, συνδέεται ο ενισχυτής με τον παλμογράφο. Επομένως, η πορεία του ηλεκτρικού σήματος είναι η εξής: *γεννήτρια παλμών* $\rightarrow$ *πιεζοηλεκτρικό στοιχείο* $\rightarrow$ *κυψελίδα* + *δείγμα* $\rightarrow$ *πιεζοηλεκτρικό στοιχείο* $\rightarrow$ *ενισχυτής* $\rightarrow$ *παλμογράφος*.

Τα δύο πιεζοηλεκτρικά στοιχεία έρχονται σε επαφή με τη κυψελίδα, η οποία έχει πάχος $d = 1\text{ cm}$. Στο σημείο επαφής των πιεζοηλεκτρικών στοιχείων με την κυψελίδα, είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός μέσου μετάδοσης του υπερηχητικού κύματος. Κατά κύριο λόγο, χρησιμοποιείται η κοινή ιατρική γέλη υπερήχων. Ωστόσο, θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή, καθώς το *gel* στεγνώνει μετά από κάποια ώρα εφαρμογής και η διαδικασία αυτή επιταχύνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Σε αυτή την περίπτωση, θα προκύψει κακή μετάδοση του υπερηχητικού κύματος. Για να αποτραπεί αυτό, θα πρέπει να ελέγχεται, σε τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια του πειράματος, η κατάσταση του *gel*. Τέλος, για την αποφυγή της ύπαρξης αέρα μεταξύ των πιεζοηλεκτρικών στοιχείων και της κυψελίδας και την εξασφάλιση της ορθής διάδοσης του κύματος, τα δύο πιεζοηλεκτρικά και η κυψελίδα κρατούνται σε επαφή με τη χρήση ενός σφιγκτήρα, ο οποίος τους ασκεί μία ελαφριά πίεση.

2. Κυψελίδα

Η πλήρωση της κυψελίδας πραγματοποιείται με τη χρήση πιπέτας Pasteur. Κατά την πλήρωση της κυψελίδας, θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στο εσωτερικό της κυψελίδας, ώστε να αποφευχθεί η ύπαρξη φυσαλίδων, καθώς αυτές προκαλούν σκέδαση των υπερηχητικών κυμάτων. Μετά την πλήρωση, το δείγμα αφήνεται να θερμοστατηθεί για περίπου 15 min. Επιλέγεται αυτό το χρονικό περιθώριο καθώς έχει βρεθεί πειραματικά πως αυτή είναι η ιδανική χρονική διάρκεια για να επιτευχθεί θερμική ισορροπία του δείγματος με τη θερμοκρασία του λουτρού.

3. Ρυθμίσεις Γεννήτριας

Σχετικά με τη γεννήτρια παλμών, δεν υπάρχουν ακριβείς ρυθμίσεις. Αυτές μεταβάλλονται ανάλογα με το πιεζοηλεκτρικό στοιχείο και το μελετώμενο δείγμα. Για αυτό το λόγο, θα αναφερθούν οι ρυθμίσεις των πειραμάτων για την παρούσα εργασία.

Αρχικά, ρυθμίζεται η αντίσταση της γεννήτριας στα 50 Ω, σύμφωνα με τα παρακάτω βήματα: *Πλήκτρο Output* → *Load* → *Επιλογή των 50 Ω*, όπως φαίνεται στην [Εικόνα Π1.1](#).



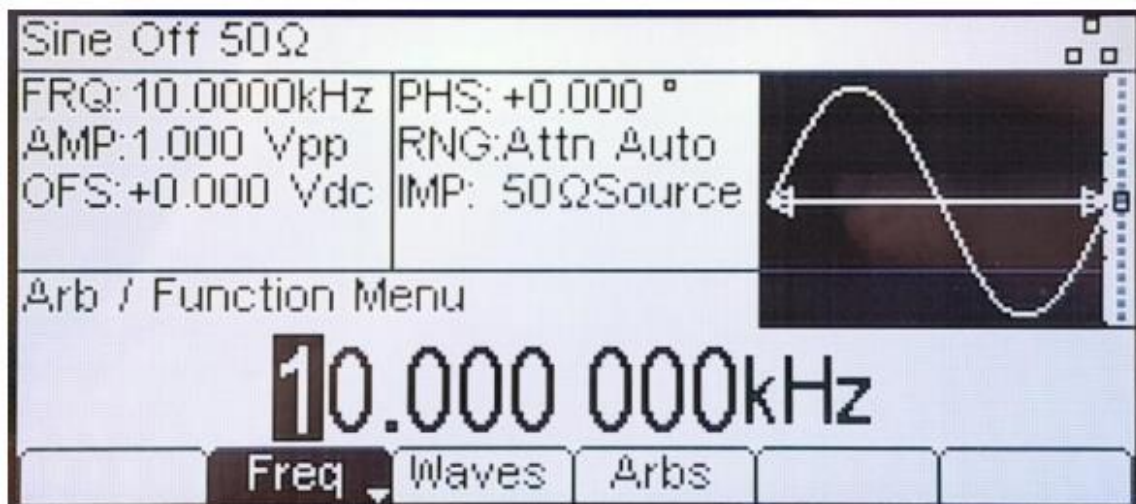
Εικόνα Π1.1 : Ρύθμιση αντίστασης εξόδου της γεννήτριας στα 50 Ω.

Ακολουθεί η ρύθμιση της μέγιστης δυνατής τάσης της γεννήτριας, η οποία για τη συγκεκριμένη γεννήτρια αντιστοιχεί σε 11 Vpp (Volt peak-peak). Η ρύθμιση αυτή πραγματοποιείται ως εξής: *Πλήκτρο Output* → *Ampl* → *πληκτρολόγηση "11 Vpp"*. Τα παραπάνω βήματα φαίνονται στην [Εικόνα Π1.2](#).



Εικόνα Π1.2 : Ρύθμιση της τάσης εξόδου της γεννήτριας.

Αφού ολοκληρωθούν οι παραπάνω ρυθμίσεις εξόδου της γεννήτριας, ρυθμίζονται οι παράμετροι του ηχητικού κύματος, δηλαδή η συχνότητα των παλμών και ο τύπος του κύματος. Ο τύπος του κύματος πραγματοποιείται μέσω της διαδρομής: Πλήκτρο *Arb/Function* → *Wave* → *Sine* → *Done*. Η συχνότητα του κύματος ρυθμίζεται από το ίδιο *menu* με την επιλογή του *Freq* και την πληκτρολόγηση της επιθυμητής τιμής, όπως φαίνεται στην [Εικόνα Π1.3](#).



Εικόνα Π1.3 : Ρύθμιση της συχνότητας του κύματος.

Επιπλέον, πρέπει να ρυθμιστούν οι παράμετροι του ηχητικού παλμού. Αυτό συμβαίνει ως εξής: Πλήκτρο *Burst* → *On*. Η αλλαγή του χρώματος του πλήκτρου *Burst* σε πορτοκαλί, σηματοδοτεί τη μετατροπή του συνεχούς ηχητικού κύματος σε παλμό. Ακόμη, σύμφωνα με τη διαδρομή: Πλήκτρο *Burst* → *Count*, ρυθμίζεται το πλήθος των επαναλήψεων του παλμού. Για την τεχνική *transmission* ρυθμίζεται 1 κύκλος.



Εικόνα Π1.4 : Ρύθμιση του αριθμού των επαναλήψεων του πακέτου παλμών.

Τέλος, ρυθμίζεται η περίοδος επανάληψης, από τη διαδρομή: *Πλήκτρο Burst* → *Set Trg* → *Period*. Για την τεχνική *transmission* επιλέγεται χρόνος 5 ms.



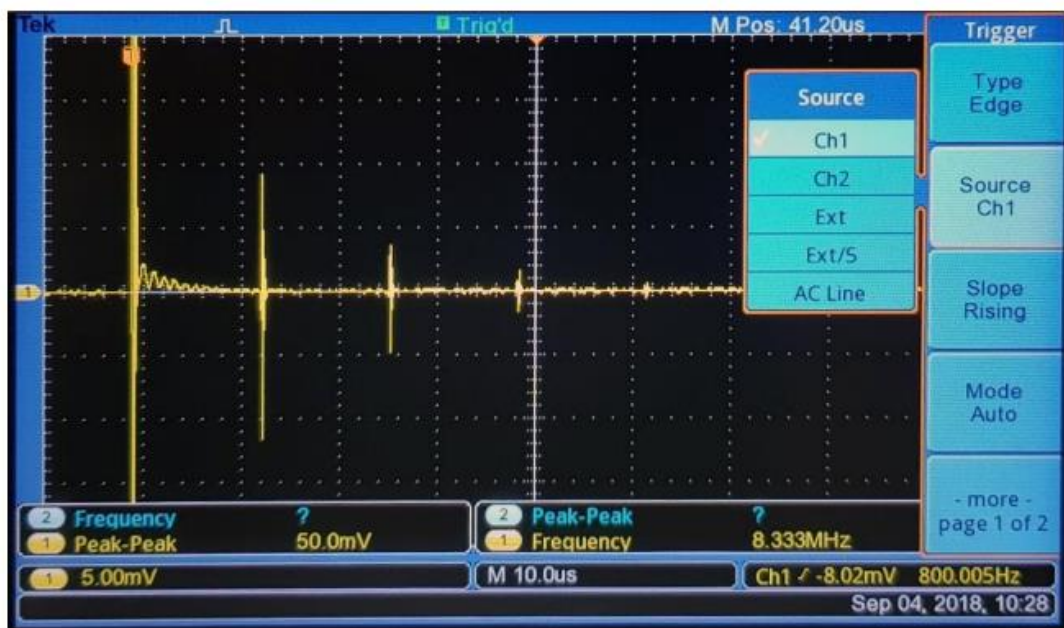
Εικόνα Π1.5 : Ρύθμιση της περιόδου επανάληψης του πακέτου παλμού.

4. Ρυθμίσεις Παλμογράφου

Οι ρυθμίσεις του παλμογράφου είναι απαραίτητες, έτσι ώστε να βρεθεί το ζητούμενο σήμα, σε κατάλληλη κλίμακα, χρόνο και τάση, καθώς και το κατάλληλο *triggering* του σήματος. Καθώς το ηχητικό κύμα διαδίδεται μέσα στο υλικό, υφίσταται απόσβεση. Επομένως, το τελικό λαμβανόμενο σήμα θα είναι εξασθενημένο σε σχέση με το αρχικό σήμα, το οποίο

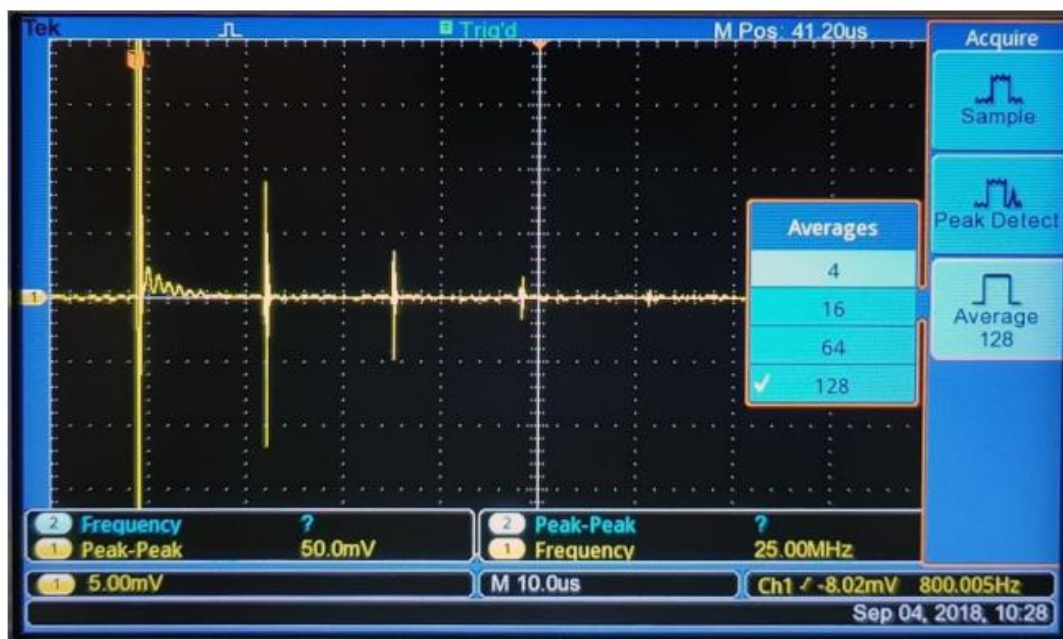
δημιουργείται από τη γεννήτρια. Σε αυτή την περίπτωση, η κλίμακα της τάσης ρυθμίζεται σε μερικά mV/div , ώστε να απεικονίζονται επαρκώς τα σήματα που προέρχονται από τις ανακλάσεις που συμβαίνουν στο δείγμα. Η αρχή του σήματος αντιστοιχεί στη χρονική στιγμή $t = 0$. Μόλις εντοπιστεί αυτή η στιγμή, είναι εύκολο να εντοπιστούν και οι ανακλάσεις του σήματος μέσα στο υλικό, λαμβάνοντας πάντα υπόψη πως οι ανακλάσεις θα έπονται του αρχικού σήματος. Στην περίπτωση όπου είναι δύσκολο να εντοπιστεί το σήμα της πηγής, η λειτουργία *Autoset* μπορεί να το εντοπίσει ικανοποιητικά.

Εάν το λαμβανόμενο σήμα, είτε δεν είναι σταθερό, είτε είναι ασθενές, είτε οι ανακλάσεις εμφανίζονται σε λάθος χρόνο, τότε είναι απαραίτητη η ρύθμιση του *trigger*, όπου η πηγή συγχρονίζεται με τον παλμογράφο με τη χρήση ενός καλωδίου. Ως πηγή του *trigger* ορίζεται το κανάλι που λαμβάνει το σήμα (*Ch1* ή *Ch2*) ή εναλλακτικά η εξωτερική σύνδεση *trigger* (*Ext*) συνδέοντας με ένα καλώδιο την έξοδο *trigger* της γεννήτριας με την είσοδο *external trigger* του παλμογράφου. Αφού ολοκληρωθεί η σύνδεση, θα πρέπει να επιλεγεί η πηγή του *trigger*. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της διαδρομής: Πλήκτρο *Menu* → *Trigger* → *Source* → *Ext*, όπως φαίνεται στην [Εικόνα Π1.6](#). Ακολουθεί η ρύθμιση του επιπέδου του *trigger* με τη χρήση του περιστρεφόμενου διακόπτη “*Level*” της ενότητας *Trigger*.



Εικόνα Π1.6 : Ρύθμιση της πηγής του *trigger* στον παλμογράφο.

Τέλος, θα πρέπει να οριστεί και ο αριθμός δειγματοληψίας, έτσι ώστε να αποθηκευτεί ο μέσος όρος των καταγραφών ως σήμα. Για να παραμείνει σταθερό το σήμα και να μειωθεί ο θόρυβος, επιλέγεται ο μέγιστος αριθμός δειγματοληψίας (128) ως εξής: Πλήκτρο *Acquire* ενότητας *Horizontal* → *Average* → 128.



Εικόνα Π1.7 : Ρύθμιση του αριθμού δειγματοληψίας.

5. Αποθήκευση

Μετά το πέρας ενός εύλογου χρονικού διαστήματος από τη ρύθμιση του παλμογράφου και τη σταθεροποίηση του σήματος, πατώντας του κουμπί της αποθήκευσης, ο παλμογράφος αποθηκεύει την καταγραφή της οθόνης σε ένα *USB Flash Drive*.

6. Καθαρισμός

Μόλις ολοκληρωθεί η πειραματική διαδικασία και ληφθούν τα ζητούμενα σήματα, θα πρέπει να καθαριστεί η κυψελίδα, τόσο εσωτερικά, όσο και τα εξωτερικά καθώς επίσης και τα πιεζοηλεκτρικά στοιχεία. Αρχικά, η κυψελίδα αδειάζει και καθαρίζεται εσωτερικά με απεσταγμένο νερό και ακετόνη. Το εξωτερικό μέρος της κυψελίδας καθώς και οι κεφαλές των πιεζοηλεκτρικών στοιχείων καθαρίζονται προσεκτικά με τη χρήση ενός καθαρού και βρεγμένου πανιού, για να μη στεγνώσει η ιατρική γέλη πάνω τους.

Π2 Πρωτόκολλο Μετρήσεων Υπεριώδους – Ορατού

Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 5, για τις μετρήσεις της φασματοσκοπίας Υπεριώδους – Ορατού είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός φασματοφωτομέτρου UV – Vis και ενός υπολογιστή για την καταγραφή του φάσματος.

1. Πριν τη Μέτρηση

Αρχικά, πριν ξεκινήσει η λήψη των φασμάτων, θα πρέπει να μπει σε λειτουργία το φασματοφωτόμετρο και να πραγματοποιηθεί ένας αυτόματος έλεγχος. Μόλις ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία, το όργανο θα πρέπει να αφεθεί για περίπου *20 min*, έτσι ώστε να θερμανθούν οι λάμπες στο εσωτερικό του, για τη λήψη μετρήσεων μεγαλύτερης ακρίβειας. Μετά το πέρας των *20 min* εμφανίζεται η αρχική οθόνη του οργάνου. Στο σημείο αυτό, ανοίγει και το πρόγραμμα στον υπολογιστή και πλέον δεν εμφανίζεται τίποτα στην οθόνη του φασματοφωτομέτρου.

2. Προετοιμασία δείγματος

Για να είναι εφικτή η λήψη των φασμάτων, το δείγμα τοποθετείται σε μία κυψελίδα και έπειτα στην ειδική υποδοχή του φασματοφωτομέτρου. Στη συγκεκριμένη πειραματική διάταξη, χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα *Quartz 10 mm*.

3. Λήψη Φασμάτων

Για τη μέτρηση της απορρόφησης συναρτήσει του μήκους κύματος και την εξαγωγή του φάσματος, θα πρέπει αρχικά να προετοιμαστεί το κατάλληλο πρόγραμμα στον Η/Υ, ως εξής: *Άνοιγμα του Προγράμματος → File → New → Spectrum Scan*. Θα πρέπει επίσης να οριστεί από το *Settings* και το κατάλληλο μήκος κύματος, από το μεγαλύτερο προς το μικρότερο. Για το συγκεκριμένο φασματοφωτόμετρο, επιλέχθηκε το εύρος από *700 – 190 nm*. Επιπλέον, ως *Internal*, το οποίο δείχνει κάθε πόσα μήκη κύματος λ λαμβάνεται σήμα, επιλέχθηκε το *0.5*, για τη λήψη του καλύτερου δυνατού φάσματος. Αφού ολοκληρωθούν οι παραπάνω ρυθμίσεις, μπορεί να ξεκινήσει η λήψη του ζητούμενου φάσματος.

4. Αποθήκευση Φάσματος

Τέλος, μετά την ολοκλήρωση των επιθυμητών μετρήσεων, τα λαμβανόμενα φάσματα εξάγονται σε ένα *USB Flash Drive* ως εξής: *File* → *Save* → **.ssf*, ή προτιμότερα: *File* → *Export to excel* → *Αποθήκευση ως *.csv*.

5. Καθαρισμός

Μετά το τέλος των μετρήσεων, η κυψελίδα καθαρίζεται εσωτερικά με μεγάλη προσοχή με απεσταγμένο νερό και ακετόνη. Εξωτερικά σκουπίζονται απαλά με ένα πανί οι δύο πλευρές της, οι οποίες δεν είναι από *Quartz*.

Π3 Πρωτόκολλο Μετρήσεων Ιξώδους

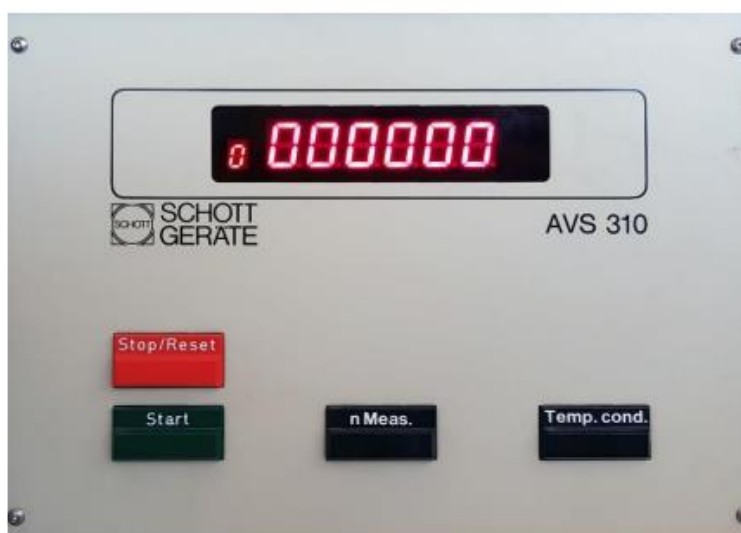
Για τη μέτρηση του κινηματικού ιξώδους χρησιμοποιήθηκε ένα αυτόματο ιξωδόμετρο της εταιρίας *Schott Geräte (AVS 310)*. Για την εξασφάλιση σταθερής θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια των πειραματικών μετρήσεων, το ιξωδόμετρο τοποθετείται μέσα σε ένα υδατόλουτρο θερμοστάτησης, το οποίο έχει τη δυνατότητα σύνδεσης με σύστημα ψύξης, όπως φαίνεται στην [Εικόνα Π3.1](#).



Εικόνα Π3.1: Το σύστημα μέτρησης ιξώδους. Φαίνονται το υδατόλουτρο, ο θερμοστάτης καθώς και η βάση μέτρησης του ιξώδους, η οποία συνδέεται με το τερματικό μέτρησης για την καταγραφή του χρόνου ροής.

1. Ρυθμίσεις Διάταξης

Αρχικά, το λουτρό θερμοστάτησης εισέρχεται σε λειτουργία και ρυθμίζεται η επιθυμητή θερμοκρασία. Επίσης, θα πρέπει να τεθεί σε λειτουργία και η εξωτερική μονάδα ψύξης για τη σταθεροποίηση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, βυθίζεται ένα θερμόμετρο στο υδατόλουτρο για τον έλεγχο και την καταγραφή της θερμοκρασίας. Η βάση του ιξωδόμετρου, η οποία περιέχει δύο αισθητήρες οι οποίοι συμβάλλουν στη μέτρηση του χρόνου ροής, μαζί με τον κατάλληλο σωλήνα εισέρχεται στο εσωτερικό του υδατόλουτρου. Το τερματικό, το οποίο συνδέεται με τη βάση, με τη χρήση καλωδίων μεταφοράς δεδομένων, καταγράφει την ένδειξη του χρόνου (Εικόνα Π3.2). Το τερματικό διαθέτει ένα κουμπί στο πίσω μέρος του για την ενεργοποίησή του.



Εικόνα Π3.2 : Το τερματικό της αυτόματης μέτρησης του ιξώδους. Διακρίνονται τα τέσσερα πλήκτρα, *Stop/Reset*, *Start*, *n Meas.* και *Temp. cond.* Στην οθόνη του εμφανίζεται ο καταγραφόμενος χρόνος ροής.

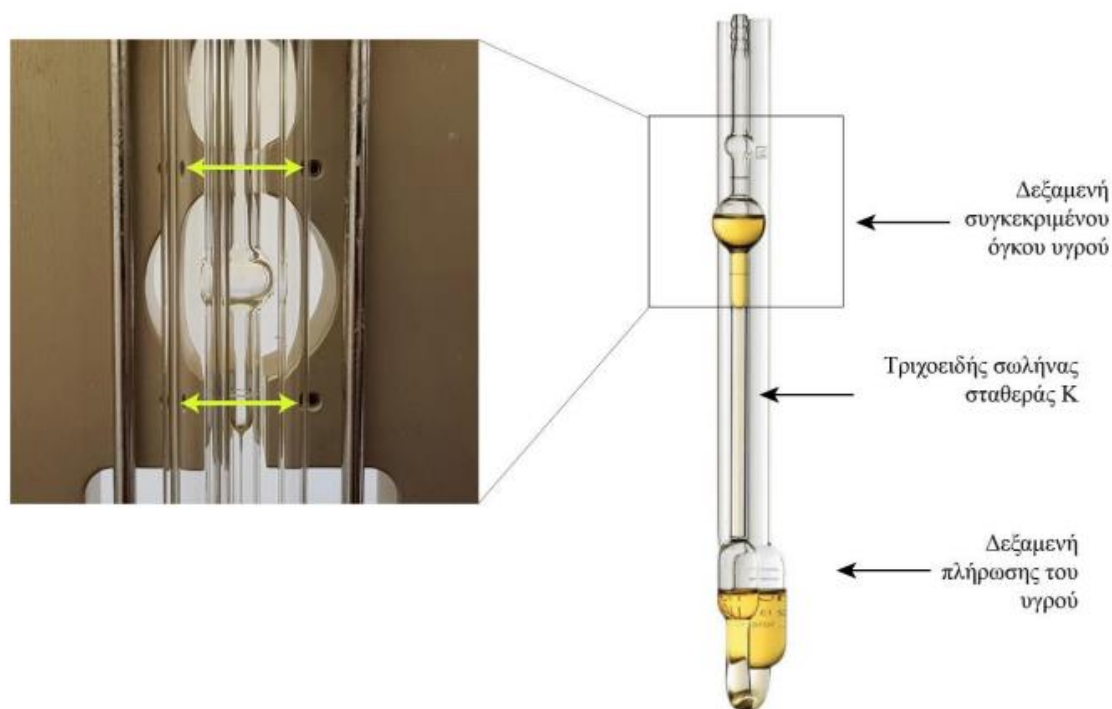
2. Επιλογή Σωλήνα

Για τον προσδιορισμό του ιξώδους με μεγάλη ακρίβεια, είναι καίριας σημασίας η επιλογή του κατάλληλου σωλήνα. Ο κάθε σωλήνας χαρακτηρίζεται από μία σταθερά k και από μία συγκεκριμένη διάμετρο. Όσο μεγαλύτερη είναι η σταθερά k , τόσο μεγαλύτερη είναι και η διάμετρος του σωλήνα. Η κατάλληλη διάμετρος του σωλήνα επιλέγεται σύμφωνα με το είδος του μελετώμενου υγρού. Με άλλα λόγια, όσο πιο παχύρευστο είναι ένα υγρό, τόσο μεγαλύτερη θα είναι η ιδανική διάμετρος, και, άρα, τόσο μεγαλύτερη η σταθερά k . Η καταλληλότητα ενός σωλήνα ελέγχεται πειραματικά με την παρατήρηση του χρόνου ροής. Όσο μεγαλύτερη είναι η διάμετρος ενός σωλήνα, τόσο ευκολότερη θα είναι η ροή, και, επομένως, θα παρατηρηθούν

μικρότεροι χρόνοι. Από τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτό πως ένας σωλήνας θεωρείται κατάλληλος όταν δίνει τιμές στο χρονικό εύρος $120 - 180 \text{ sec}$. Κρίνεται απαραίτητη η αλλαγή του σωλήνα με έναν με μικρότερη σταθερά k , όταν ο καταγραφόμενος χρόνος δεν ξεπερνά τα 20 sec .

3. Πλήρωση του Σωλήνα

Το μελετώμενο δείγμα εισέρχεται στη δεξαμενή πλήρωσης με τη βοήθεια πιπέτας *Pasteur*. Ανάλογα με τον τύπο του σωλήνα που επιλέχθηκε, εισάγεται και η κατάλληλη ποσότητα υγρού. Για τον κάθε σωλήνα, υπάρχει μία σχετική ένδειξη πλήρωσης, η οποία παριστάνεται με μία άσπρη γραμμή. Ένας τυπικός σωλήνας μέτρησης του ιζώδους παρουσιάζεται στην [Εικόνα Π3.3](#).



Εικόνα Π3.3 : Σωλήνας μέτρησης ιζώδους. Στην εικόνα διακρίνονται η δεξαμενή πλήρωσης του υγρού, ο τριχοειδής σωλήνας που χαρακτηρίζεται από μία συγκεκριμένη σταθερά k καθώς και η δεξαμενή συγκεκριμένου όγκου. Από την τελευταία μετράται ο χρόνος ροής, με τη βοήθεια των δύο φωτοανιχνευτών, οι οποίοι παριστάνονται με κίτρινα βέλη.

Πριν την καταγραφή των μετρήσεων, είναι απαραίτητο το δείγμα να παραμείνει στο σωλήνα για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, ώστε να θερμοστατηθεί. Ο χρόνος αυτός διαφέρει ανάλογα με τον όγκο του υγρού. Για συνολικό όγκο 15 ml απαιτείται χρονικό διάστημα περίπου 15 min , ενώ για όγκο υγρού 3 ml απαιτούνται συνήθως 3 min για

θερμοστάτηση. Ο χρόνος που απαιτείται για τη θερμοστάτηση του υγρού μπορεί να μετρηθεί, είτε με τη χρήση εξωτερικού χρονομέτρου, είτε να ορισθεί στο τερματικό με το πλήκτρο *Temp. cond.*



Εικόνα Π3.4 : Σύνδεση του σωλήνα Ubbelohde με το τερματικό αυτόματης μέτρησης ιξώδους. Τα δύο σωληνάκια που διακρίνονται ασκούν πίεση στο υγρό. Το κόκκινο σωληνάκι συνδέεται με το άκρο του σωλήνα που καταλήγει στη δεξαμενή πλήρωσης. Το μαύρο σωληνάκι συνδέεται με το άκρο που δεν οδηγεί στη δεξαμενή μέτρησης του όγκου του υγρού. Τέλος, το άκρο του σωλήνα που περιέχει τη δεξαμενή συγκεκριμένου όγκου, αφήνεται χωρίς κάποια σύνδεση.

4. Καταγραφή Μετρήσεων

Αφού σταθεροποιηθεί η θερμοκρασία του υγρού, ξεκινάει η καταγραφή του χρόνου ροής. Αρχικά, πατώντας το πλήκτρο *Start* ξεκινάει η εφαρμογή πίεσης, έτσι ώστε να γεμίσει η δεξαμενή συγκεκριμένου όγκου. Όταν το υγρό φτάσει λίγο πριν το ελεύθερο άκρο του σωλήνα, η πίεση διακόπτεται αυτόματα. Σε περίπτωση όπου παρατηρηθεί άνοδος σχεδόν μέχρι το άκρο του σωλήνα πρέπει να πατηθεί το πλήκτρο *Stop/Reset*, έτσι ώστε να μην υπάρξει υπερχειλίση του υγρού στο υδατόλουτρο. Αφού το υγρό φτάσει στο μέγιστο ύψος και διακοπεί η πίεση, ξεκινά η μη-εξαναγκασμένη ροή προς τη δεξαμενή πλήρωσης, επομένως το υγρό περνά μέσω των δύο φωτοανιχνευτών που βρίσκονται στη βάση. Έτσι, καταγράφεται ο απαιτούμενος χρόνος ροής που χρειάζεται το υγρό για να διασχίσει την απόσταση μεταξύ των ανιχνευτών.

Μπορούν να πραγματοποιηθούν περισσότερες από μία μετρήσεις με τη χρήση του πλήκτρου *n Meas*. Από το λαμβανόμενο χρόνο ροής, υπολογίζεται το κινηματικό ιξώδες.

5. Υπολογισμός Ιξώδους

Το κινηματικό ιξώδες ν , με μονάδες μέτρησης cm^2/s , υπολογίζεται από την παρακάτω σχέση:

$$\nu = k(t - \theta) * 10^{-2} \quad (\text{Π3.1})$$

όπου k είναι η σταθερά του εκάστοτε σωλήνα, t είναι ο χρόνος ροής που καταγράφεται από το αυτόματο όργανο μέτρησης του ιξώδους και θ είναι μία διόρθωση ανάλογα με το σωλήνα καθώς και με το λαμβανόμενο χρόνο ροής.

Αφού προσδιοριστεί το κινηματικό ιξώδες, είναι δυνατόν πλέον να προσδιοριστεί και το δυναμικό ιξώδες η , σε *Poise*, από τη σχέση:

$$\eta = \rho * \nu \quad (\text{Π3.2})$$

όπου ρ είναι η πυκνότητα του διαλύματος.

Π4 Πρωτόκολλο Μετρήσεων Πυκνότητας

Για τη μέτρηση της πυκνότητας, είναι απαραίτητη η παρασκευή ενός μικρού όγκου του μελετώμενου δείγματος, περίπου $2 - 3 \text{ ml}$. Το πυκνόμετρο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα πειραματική μελέτη, έχει τη δυνατότητα σύνδεσης με ένα σύστημα θερμοστάτησης από το πίσω μέρος του.



Εικόνα Π4.1 : Η μπροστινή όψη του πυκνόμετρου. Διακρίνεται ο φωτιζόμενος θάλαμος μέτρησης του δείγματος, η οθόνη μέτρησης καθώς και οι τρεις διαθέσιμοι διακόπτες για το άνοιγμα του οργάνου, της λυχνίας και της αντλίας αέρα.

1. Εισαγωγή Δείγματος

Το πυκνόμετρο διαθέτει στο εσωτερικό του έναν σωλήνα τύπου U και στο δεξί του μέρος υπάρχουν δύο οπές από τις οποίες γίνεται η εισαγωγή και η εξαγωγή του δείγματος, όπως φαίνεται στην [εικόνα Π4.2](#). Η εισαγωγή του δείγματος στον σωλήνα U πραγματοποιείται με τη χρήση πιπέτας από την πάνω οπή και με κλειστή την κάτω οπή. Η εισαγωγή του δείγματος θεωρείται επιτυχημένη όταν ο σωλήνας είναι γεμάτος με το δείγμα και δεν υπάρχουν φυσαλίδες στο εσωτερικό του. Κατά την πλήρωση του σωλήνα είναι απαραίτητο το άνοιγμα της λυχνίας, ώστε να είναι δυνατός ο έλεγχος της διαδικασίας. Ωστόσο, μόλις εισαχθεί το δείγμα, η λυχνία θα πρέπει να απενεργοποιηθεί αμέσως, ώστε να αποφευχθούν τυχόν σφάλματα λόγω της θέρμανσης του υγρού.



Εικόνα Π4.2 : Δεξιά όψη του πυκνόμετρου. Η πάνω οπή χρησιμεύει για την εισαγωγή του δείγματος στο σωλήνα, ενώ η κάτω οπή, η οποία διαθέτει κλειστό καπάκι, για την απομάκρυνσή του. Δεξιά του διακρίνεται η έξοδος της αντλίας του αέρα.

2. Καταγραφή Ένδειξης

Αφού αφεθεί το δείγμα για μερικά λεπτά στο σωλήνα, ώστε να θερμομετρηθεί, καταγράφεται η ένδειξη της οθόνης. Πρέπει να σημειωθεί πως η ένδειξη αυτή δεν αποτελεί την πυκνότητα του δείγματος. Το πυκνόμετρο μετρά το “βάρος” W_l του υγρού, το οποίο χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ζητούμενης πυκνότητας.

3. Καθαρισμός

Μετά το πέρας των πειραματικών μετρήσεων, το όργανο καθαρίζεται σχολαστικά. Αρχικά, απομακρύνεται το δείγμα που υπάρχει στο σωλήνα. Για να γίνει αυτό, αφαιρείται το πώμα από την κάτω οπή και συνδέεται με την πάνω οπή η αντλία αέρα. Η αντλία τίθεται σε λειτουργία με το άνοιγμα του διακόπτη *Pump* και έτσι το όργανο στέλνει αέρα και απομακρύνεται το δείγμα. Τέλος, γίνεται έκπληση του σωλήνα με απεσταγμένο νερό και ακετόνη, με μία διαδικασία αντίστοιχη αυτής της εισαγωγής του δείγματος.

4. Υπολογισμός Πυκνότητας

Η πυκνότητα ενός δείγματος μπορεί να υπολογιστεί μέσω της σχέσης:

$$\rho_l = \frac{W_l^2 - W_a^2}{W_w^2 - W_a^2} (\rho_w - \rho_a) + \rho_a \quad (\text{Π4.1})$$

όπου W_l είναι το βάρος του δείγματος, W_w είναι το βάρος του νερού και W_a είναι το βάρος του αέρα.

Τα W_w και W_a μπορούν είτε να μετρηθούν πειραματικά με τη χρήση του πυκνομέτρου είτε να υπολογισθούν μέσω των παρακάτω σχέσεων:

$$W_a = -1.94283 * T + 3.26449 * 10^4 \quad (\text{Π4.2})$$

$$W_w = -4.65068 * 10^{-2} * T^2 - 2.69663 * T + 4.30630 * 10^4 \quad (\text{Π4.3})$$

όπου T είναι η θερμοκρασία του πειράματος.

Εκτός από τα βάρη του αέρα και του νερού, για τον υπολογισμό της πυκνότητας είναι απαραίτητη και η γνώση των αντίστοιχων πυκνοτήτων τους. Οι πυκνότητες αυτές υπολογίζονται θεωρητικά, σε gr/ml , για μία δεδομένη θερμοκρασία σε $^{\circ}C$, από τις σχέσεις:

$$\rho_a = 0.001293 / (1 + 0.00367T) \quad (\text{Π4.4})$$

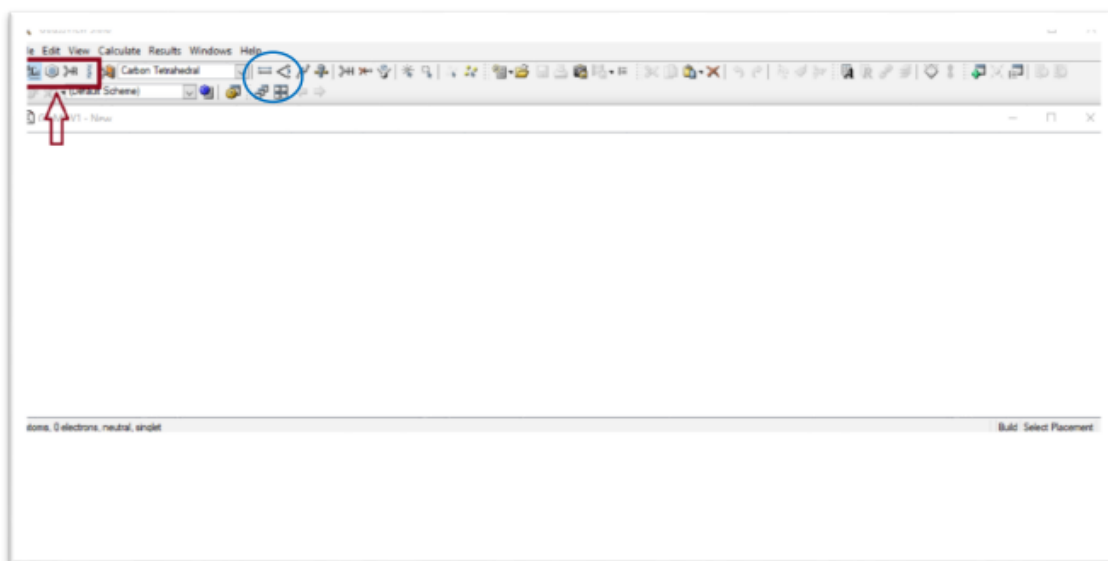
$$\begin{aligned} \rho_w = & 1.30753 * 10^{-8} * T^3 - 5.44149 * 10^{-6} * T^2 \\ & - 6.00025 * 10^{-6} * T + 1.00039 \end{aligned} \quad (\text{Π4.5})$$

Π5 Πρωτόκολλο Εκτέλεσης Θεωρητικών Υπολογισμών με το Πρόγραμμα Gaussian

Ακολουθεί μία αναλυτική περιγραφή της εκτέλεσης των κβαντομηχανικών υπολογισμών με τη χρήση του προγράμματος *Gaussian*, για το απλό μόριο του νερού.

1. Σχεδιασμός του Μορίου στο Πρόγραμμα *GaussView*

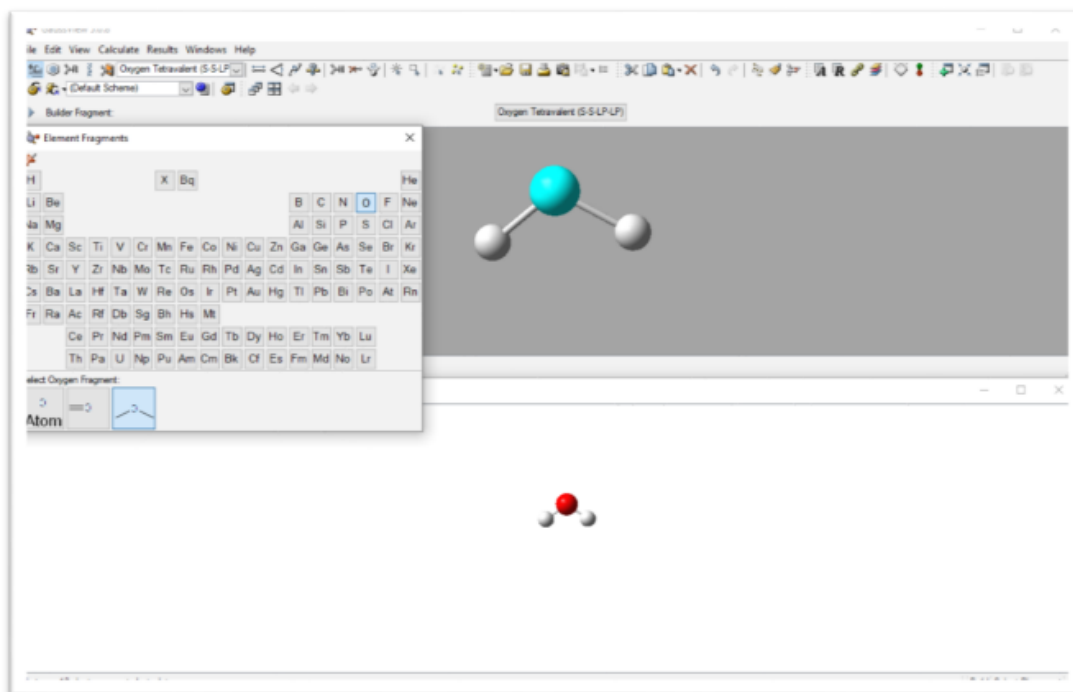
Το μελετώμενο μόριο μπορεί, είτε να σχεδιαστεί από την αρχή βήμα-βήμα, είτε να βρεθεί σε μία βιβλιοθήκη μορίων, με τη βοήθεια των τεσσάρων εικονιδίων που επισημαίνονται με κόκκινο πλαίσιο στην [Εικόνα Π5.1](#). Υπάρχουν, όμως, και διάφορες διαδικτυακές βιβλιοθήκες από όπου μπορεί να ληφθεί έτοιμη η δομή του μορίου. Σε αυτή την περίπτωση, η δομή αποθηκεύεται συνήθως ως αρχείο *.sdf ή *.mol, έτσι ώστε να μπορεί να ανοιχθεί με το πρόγραμμα *GaussView*.



Εικόνα Π5.1 : Περιβάλλον προγράμματος *GaussView*. Στο κόκκινο πλαίσιο σημειώνονται τα εικονίδια που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της δομής του μορίου, ενώ με μπλε κύκλο επισημαίνονται τα εικονίδια για την αλλαγή του μήκους ενός δεσμού ή για τη μεταβολή της γωνίας.

Για την περίπτωση του νερού, αρχικά επιλέγεται το πρώτο εικονίδιο και, στη συνέχεια, επιλέγεται το άτομο του *O* από τα άτομα του περιοδικού πίνακα που εμφανίζεται. Από τις επιλογές που εμφανίζονται για το άτομο του *O*, επιλέγεται η περίπτωση του οξυγόνου με τους

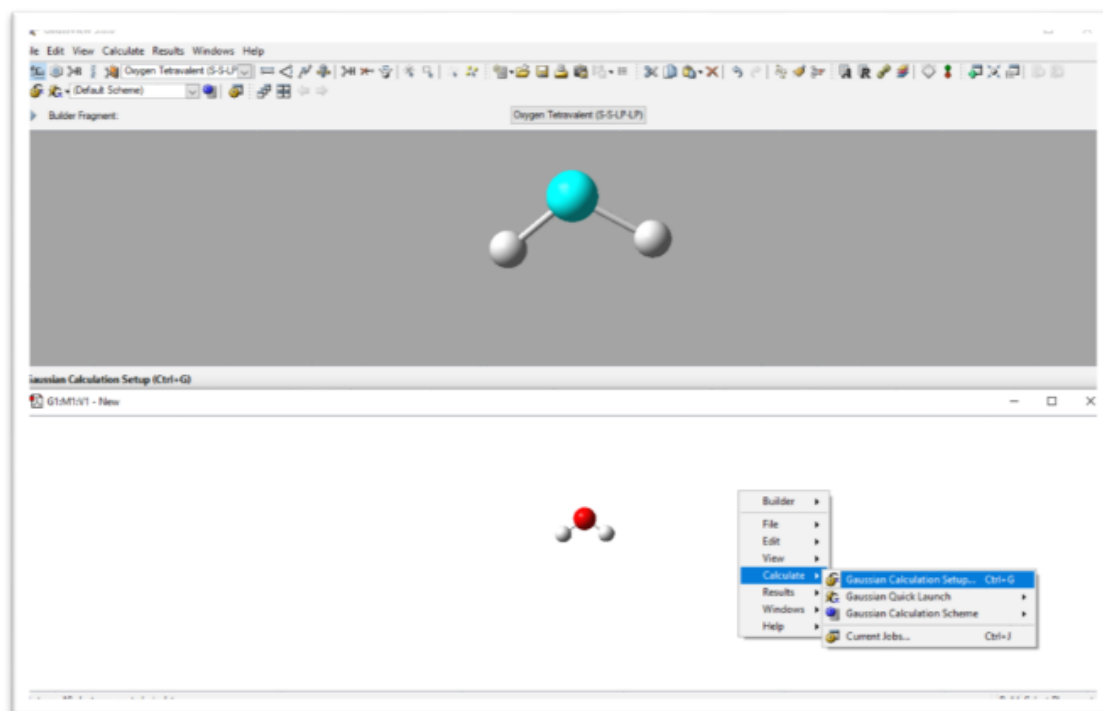
δύο απλούς δεσμούς. Μέσω των επιλογών που υπάρχουν μέσα στο μπλε κύκλο, δίνεται η δυνατότητα αλλαγής του μήκους του δεσμού ή της γωνίας. Για να αλλάξει το μήκος του δεσμού, θα πρέπει, αφού πατηθεί το εικονίδιο, να επιλεγεί ο επιθυμητός δεσμός.



Εικόνα Π5.2 : Δημιουργία του μορίου του νερού. Τα εικονίδια που επιλέγονται εμφανίζονται με γαλάζιο φόντο.

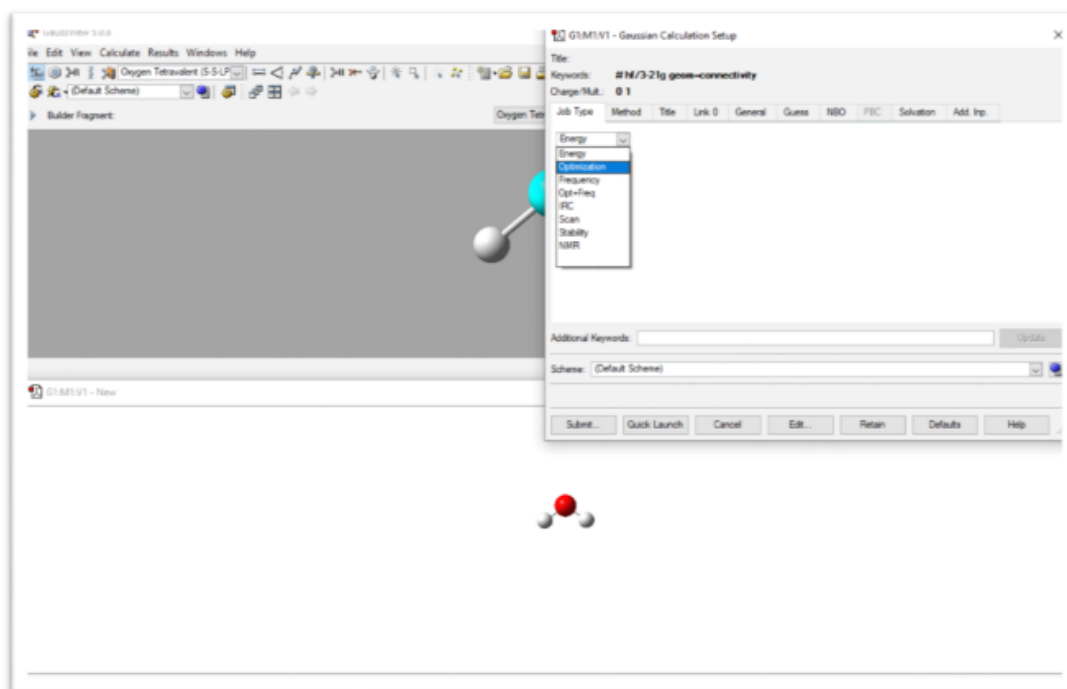
2. Ορισμός των Χαρακτηριστικών του Υπολογισμού

Η δημιουργία του αρχείου εισόδου πραγματοποιείται ως εξής: *Δεξί κλικ* στο φύλλο του προγράμματος στο οποίο έχει δημιουργηθεί το μόριο → *Calculate* → *Gaussian Calculation Setup*, όπως φαίνεται στην [Εικόνα Π5.3](#). Σε αυτό το σημείο ανοίγει ένα νέο παράθυρο με διάφορα φύλλα.

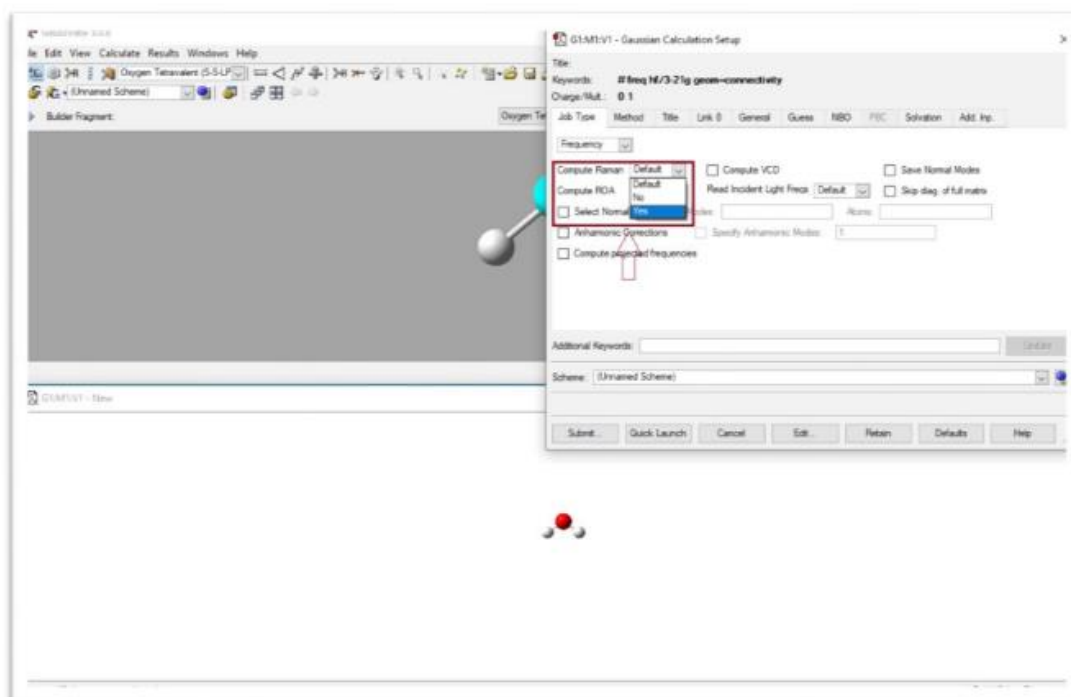


Εικόνα Π5.3 : Τα βήματα για το άνοιγμα του παραθύρου από όπου μπορεί να γίνει η ρύθμιση των απαραίτητων για τον υπολογισμό πληροφοριών.

Στο πρώτο φύλλο *Job type*, ορίζεται ο τύπος του υπολογισμού, όπως φαίνεται στην Εικόνα Π5.4. Δίνονται πολλές επιλογές, συμπεριλαμβανομένων της βελτιστοποίησης της γεωμετρίας, που επιλέγεται το *Optimization*, και των φασμάτων υπερύθρου ή *Raman*, όπου επιλέγεται το *Frequency*. Στην τελευταία περίπτωση, εάν επιλεγεί το *Frequency* πραγματοποιείται υπολογισμός μόνο των συχνοτήτων του φάσματος υπερύθρου. Για τον υπολογισμό και των συχνοτήτων *Raman*, εμφανίζεται ένα αντίστοιχο πεδίο κατά την επιλογή του *Frequency*, όπως φαίνεται στην Εικόνα Π5.5. Παρέχεται επίσης και η δυνατότητα προσθήκης άλλου τύπου υπολογισμού από το πεδίο *Additional Keywords*, όπου πληκτρολογείται η αντίστοιχη λέξη-κλειδί. Κάποια παραδείγματα τέτοιων λέξεων αναφέρονται στο θεωρητικό μέρος της παρούσας εργασίας καθώς επίσης και στην επίσημη ιστοσελίδα του προγράμματος *Gaussian*.

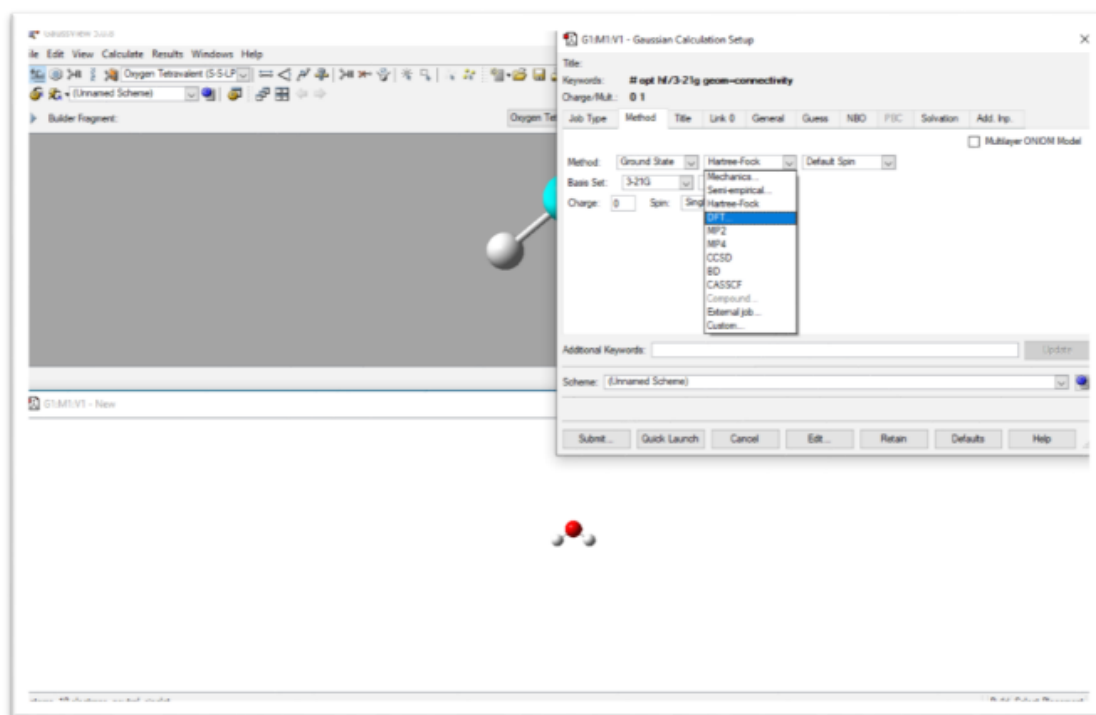


Εικόνα Π5.4 : Επιλογή του τύπου του υπολογισμού. Το *Optimization* οδηγεί στη βελτιστοποίηση της γεωμετρίας της δομής του μορίου. Στο πεδίο *Additional Keywords* πληκτρολογούνται λέξεις-κλειδιά ανάλογα με τον επιθυμητό υπολογισμό.

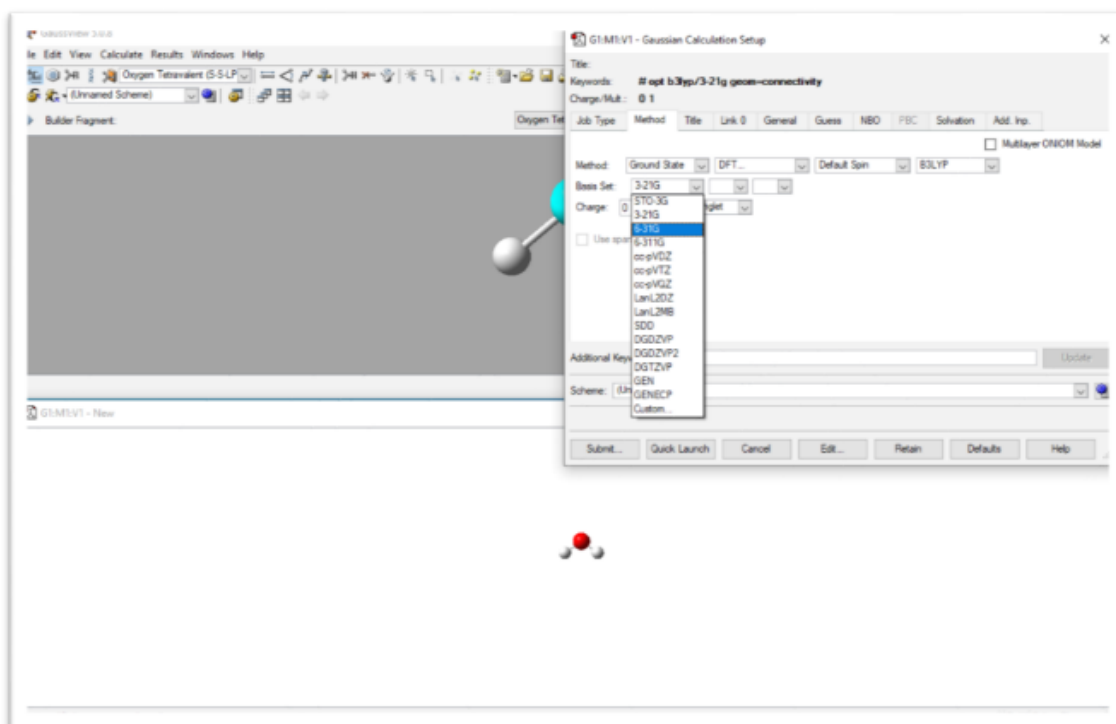


Εικόνα Π5.5 : Επιλογή της εξαγωγής του φάσματος *Raman*. Μετά την επιλογή της λέξης-κλειδί *Frequency* εμφανίζεται το πεδίο *Compute Raman*, από όπου επιλέγεται το *Yes*, έτσι ώστε να υπολογιστούν και οι συχνότητες του φάσματος *Raman* μαζί με αυτό του υπερύθρου.

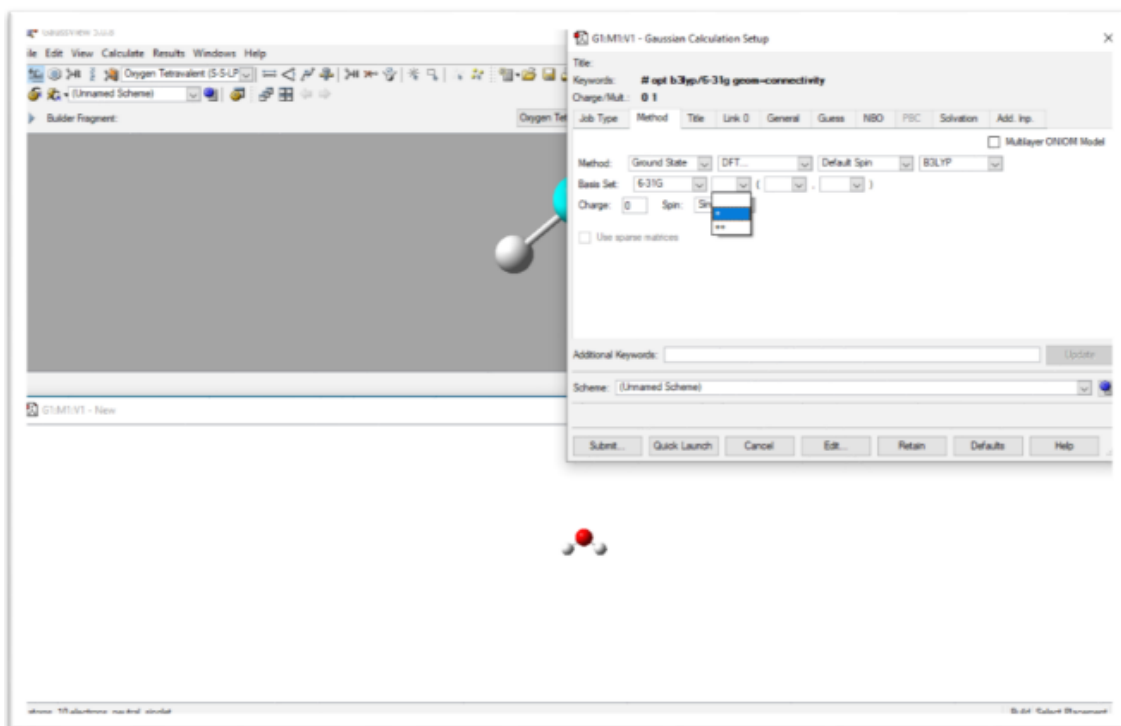
Στο διπλανό φύλλο *Method*, επιλέγεται η μέθοδος καθώς και το σύνολο βάσης του υπολογισμού. Κριτήριο για την επιλογή της μεθόδου είναι το μόριο που πρόκειται να προσομοιωθεί. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα, θα χρησιμοποιηθεί η ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος *B3LYP* και το σύνολο βάσης *6-31G(d)*. Στις παρακάτω εικόνες φαίνεται αναλυτικά η περιγραφόμενη διαδικασία. Με την ένδειξη + παριστάνονται οι συναρτήσεις διάχυσης που μπορούν να προστεθούν στο σύνολο βάσης. Ωστόσο, στο συγκεκριμένο παράδειγμα, δεν προστίθεται κάποια τέτοια συνάρτηση. Οι συναρτήσεις πόλωσης τύπου *d* επιλέγονται δίπλα από το πεδίο για τις συναρτήσεις διάχυσης, όπως φαίνεται στην [Εικόνα Π5.9](#).



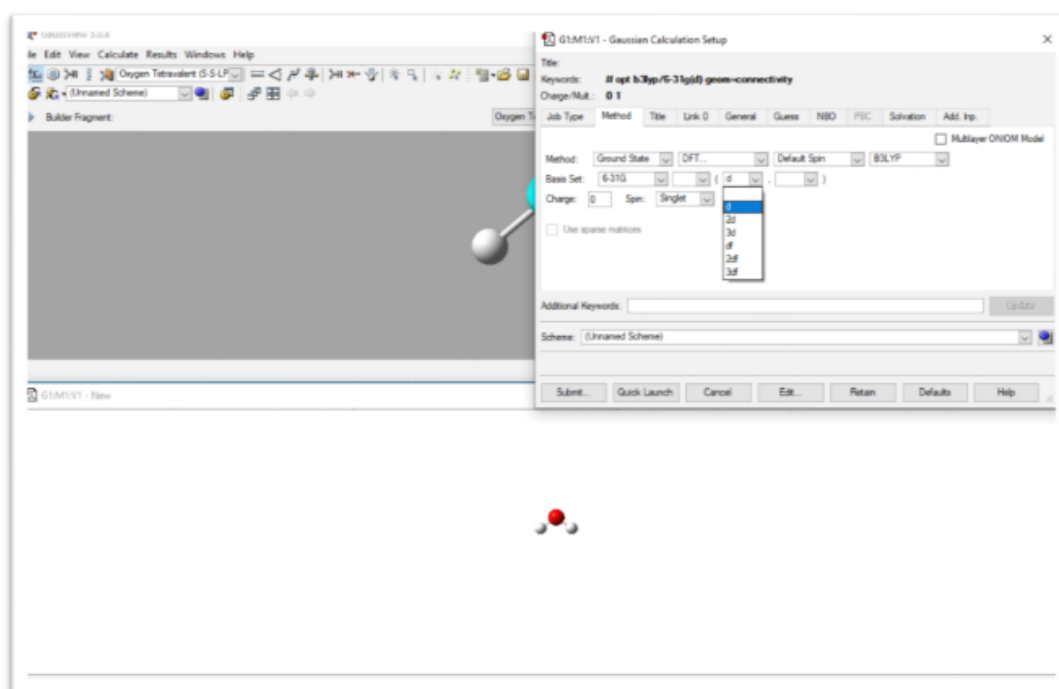
Εικόνα Π5.6 : Επιλογή της μεθόδου του υπολογισμού. Με την επιλογή της μεθόδου *DFT* εμφανίζεται το αντίστοιχο πεδίο για την επιλογή της *B3LYP*.



Εικόνα Π5.7 : Επιλογή του συνόλου βάσης. Στο πεδίο *Basis Set* αναφέρονται οι πιθανές επιλογές. Στην περίπτωση που επιλεγεί διαφορετική μέθοδος, θα υπάρχουν και διαφορετικά σύνολα βάσης.

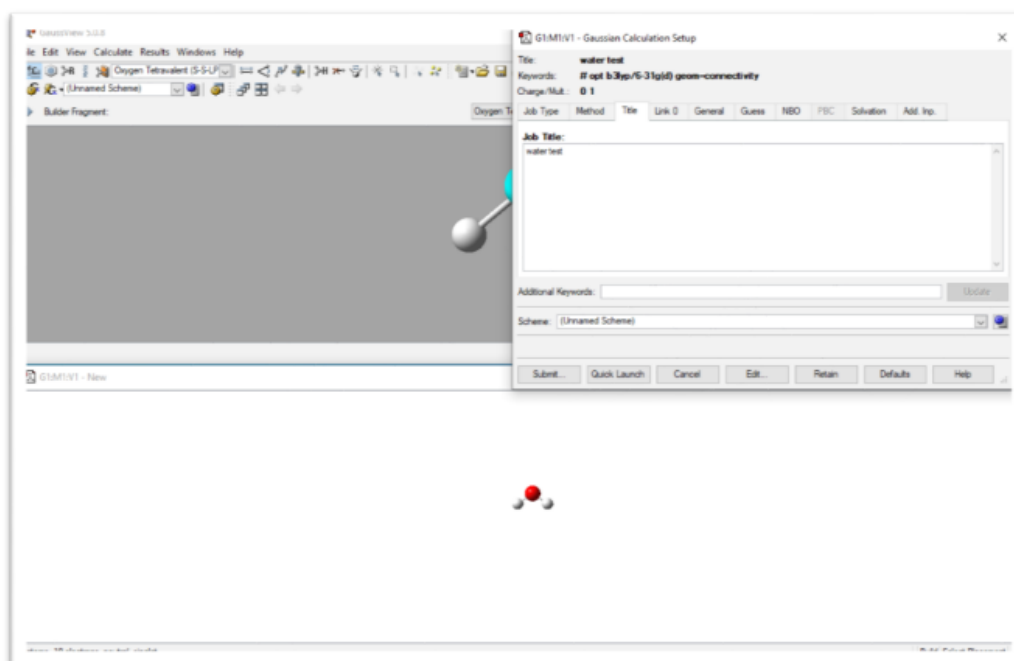


Εικόνα Π5.8 : Εισαγωγή συναρτήσεων διάχυσης. Ανάλογα με τον επιθυμητό τύπο, η εισαγωγή των συναρτήσεων διάχυσης, όπου απαιτείται, πραγματοποιείται με την επιλογή του $+$ (τύπου p) ή του $++$ (τύπου p και s).

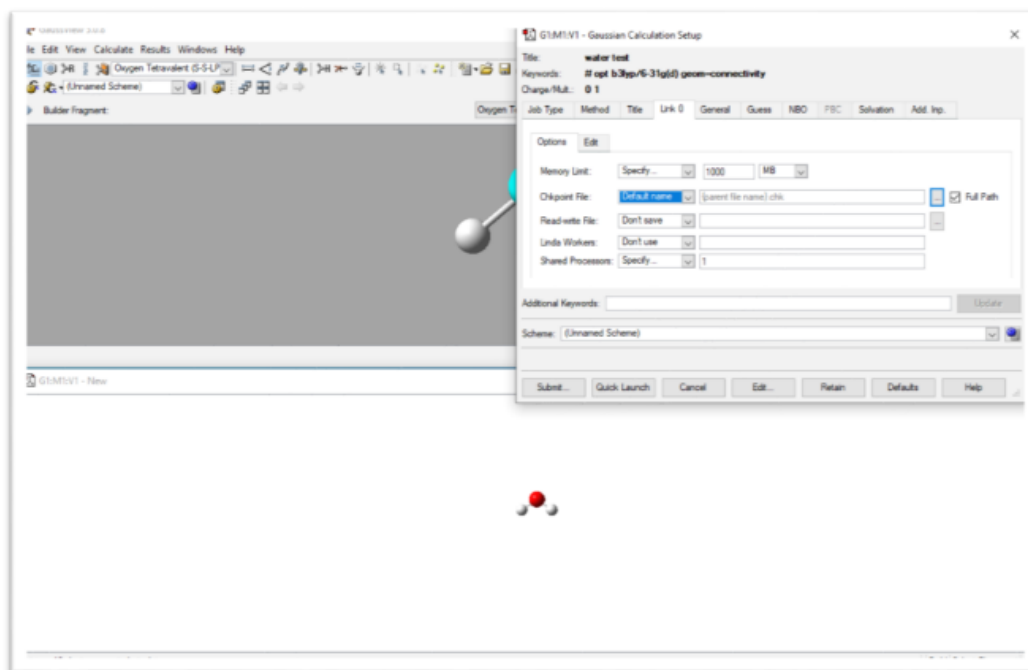


Εικόνα Π5.9 : Εισαγωγή των συναρτήσεων πόλωσης.

Στο επόμενο φύλλο *Title*, καθορίζεται ο τύπος του υπολογισμού, όπως είναι εμφανές στην [Εικόνα Π5.10](#). Στο φύλλο *Link 0* υπάρχει η δυνατότητα να επιλεγεί η μνήμη που θα δεσμευτεί κατά τη διάρκεια του υπολογισμού καθώς και οι διαθέσιμοι πυρήνες.

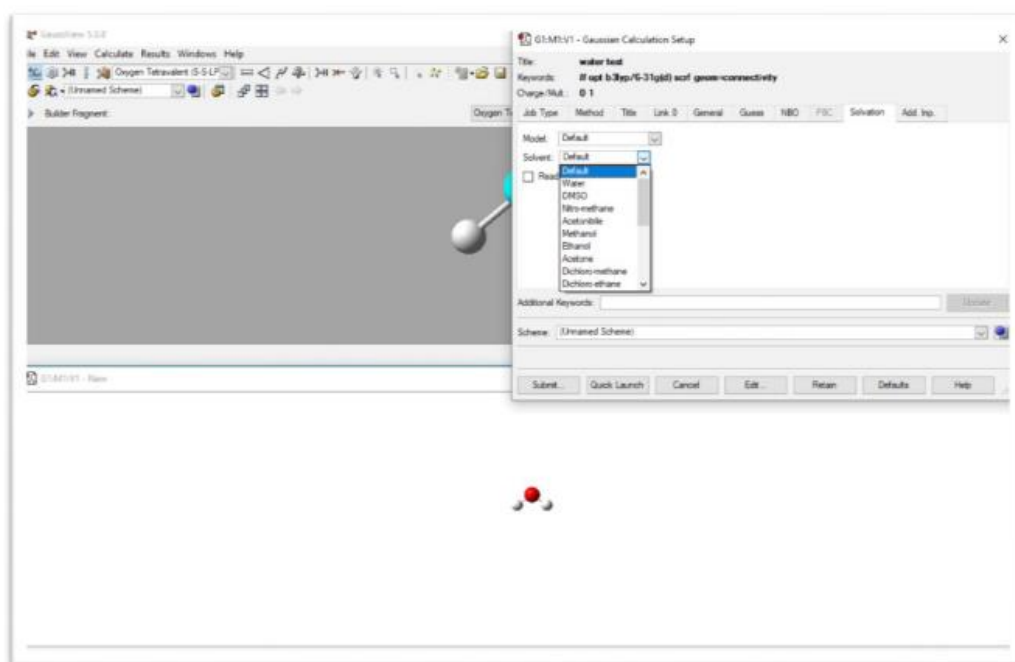


Εικόνα Π5.10 : Καθορισμός του τίτλου του υπολογισμού,



Εικόνα Π5.11 : Ορισμός της δεσμευμένης μνήμης μέσω της επιλογής *Specify* και του αριθμού των πυρήνων μέσω του πεδίου *Shared Processors*.

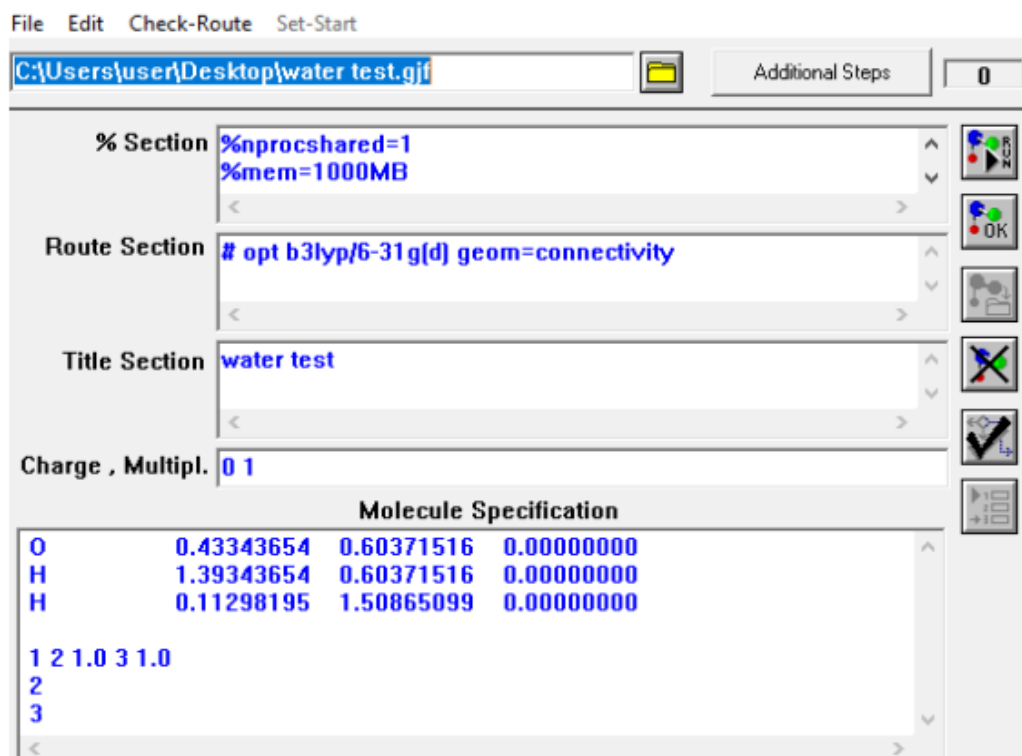
Τέλος, στο φύλλο *Solvation* επιλέγεται το μοντέλο διάχυσης και το αρχείο αποθηκεύεται ως *.com για υπολογισμούς σε H/Y με λειτουργικό *Linux* ή ως *.gif για την εκτέλεση σε H/Y με λειτουργικό *Windows*.



Εικόνα Π5.12 : Επιλογή του διαλύτη. Διατίθεται ένα σύνολο με τους πιο κοινούς διαλύτες, ώστε να επιλεγεί και να ληφθεί υπόψη η επίδραση του επιθυμητού.

3. Εκτέλεση Υπολογισμού στο Πρόγραμμα *Gaussian* και λογισμικό *Windows*

Για την εκτέλεση του υπολογισμού πραγματοποιείται άνοιγμα του αρχείου που αποθηκεύτηκε από το *GaussView*, σύμφωνα με τις παραπάνω οδηγίες, με το πρόγραμμα *Gaussian*. Στο παράθυρο που εμφανίζεται υπάρχουν όσα έχουν οριστεί προηγουμένως, όπως φαίνεται στην [Εικόνα Π5.13](#).



Εικόνα Π5.13 : Το περιβάλλον του προγράμματος *Gaussian* μετά το άνοιγμα του αρχείου εισόδου.

Ο υπολογισμός ξεκινά με την επιλογή του εικονιδίου *Run* και το αρχείο αποθηκεύεται με την επέκταση *.out. Το αρχείο εξόδου μπορεί να ανοιχθεί είτε με προγράμματα επεξεργασίας κειμένου, συμπεριλαμβανομένων του *Word*, του *Text* και του *Editor*, είτε με το πρόγραμμα *GaussView*, ώστε να ληφθούν πληροφορίες μετά το πέρας του υπολογισμού.

4. Εκτέλεση Υπολογισμού στο Πρόγραμμα *Gaussian* και λογισμικό *Linux*

Το αρχείο που αποθηκεύτηκε και προορίζεται για εκτέλεση σε Η/Υ με λειτουργικό *Linux*, μπορεί να ανοιχθεί με πρόγραμμα επεξεργασίας κειμένου και θα έχει την ακόλουθη μορφή:

%mem = (μνήμη *RAM*)

%chk = όνομα.*chk*

%nproc = (αριθμός πυρήνων υπολογιστή)

πληροφορίες υπολογισμού (# *opt b3lyp/6-31g(d) geom=connectivity*)

Τίτλος

Φορτίο, Πολλαπλότητα

Συντεταγμένες μορίου

Λοιπές πληροφορίες

```
%mem=1000MB
%chk=watertest.chk
%nprocshared=1
# opt b3lyp/6-31g(d) geom=connectivity

water test

0 1
O          0.92879258    0.26315789    0.00000000
H          1.88879258    0.26315789    0.00000000
H          0.60833800    1.16809372    0.00000000

1 2 1.0 3 1.0
2
3
```

Εικόνα Π5.14 : Το αρχείο εισόδου που δημιουργείται για την εκτέλεση υπολογισμών σε λειτουργικό σύστημα *Linux*.

Οι εντολές που πληκτρολογούνται στο τερματικό για την εύρεση του αρχείου και την εκκίνηση του υπολογισμού, καθώς και η επέκταση διαφέρουν για τον κάθε H/Y. Συνήθως το τελικό αρχείο εξόδου αποθηκεύεται είτε με τη μορφή **.log.linux* είτε με τη μορφή **.out* και ανοίγει, τόσο με προγράμματα επεξεργασίας κειμένου, όσο και με άλλα βοηθητικά προγράμματα, όπως το *GausView*.

➤ Δομή του αρχείου εξόδου (output file)

Αφού δημιουργηθεί το αρχείο εξόδου, αυτό μπορεί να διαβαστεί με ένα πρόγραμμα επεξεργασίας κειμένου. Στην αρχή του αρχείου εμφανίζονται διάφορες λεπτομέρειες σχετικά με το πρόγραμμα, συμπεριλαμβανομένων των δημιουργών του, της έκδοσής του και της ημερομηνίας εκτέλεσης του υπολογισμού. Έπειτα, ακολουθούν οι λεπτομέρειες έτσι όπως έχουν ορισθεί στο αρχείο εξόδου, όπως η μέθοδος, το σύνολο βάσης και ο τύπος του υπολογισμού. Στη συνέχεια, εμφανίζεται η γεωμετρία του μορίου με τη μορφή *Z-matrix* και ξεκινά η βελτιστοποίησή της. Οι βελτιστοποιημένες παράμετροι παρουσιάζονται με τον τίτλο *Optimized Parameters*. Όσο προχωράει το αρχείο, εμφανίζονται και τα υπόλοιπα αποτελέσματα ανάλογα με τον τύπο του υπολογισμού που έχει ορισθεί.

Επειδή το αρχείο εξόδου είναι αρκετά μεγάλο, ειδικά όσο αυξάνεται ο αριθμός των ατόμων της μελετώμενης ένωσης και προστίθενται λέξεις-κλειδιά στον τύπο του υπολογισμού, ένας εύκολος τρόπος για να βρεθεί η επιθυμητή πληροφορία είναι μέσω της αναζήτησης με τη χρήση κατάλληλων λέξεων. Για την εύρεση των υπολογιζόμενων ενεργειών, αναζητείται στο αρχείο η λέξη *energies*. Το πεδίο αναζήτησης εμφανίζεται με το συνδυασμό των πλήκτρων *Ctrl + F*. Τέλος, στο κάτω μέρος του αρχείου εξόδου υπάρχει ένα μήνυμα που ενημερώνει σχετικά με το αν ολοκληρώθηκε σωστά ο υπολογισμός (*Normal termination of Gaussian 09*) και πληροφορίες για τη διάρκειά του.

Βιογραφικό Σημείωμα

Αφροδίτη
Τρύφων

Διεύθυνση: Πλατεία Λ. Τζαβέλα 15, Ιωάννινα
Τηλέφωνο επικοινωνίας: 6979538372
Email: aphroditetryphon@gmail.com
Οικογενειακή κατάσταση: Άγαμη
Ημερομηνία γέννησης: 02/10/1998
Υπηκοότητα: Ελληνική

Εκπαίδευση

2013 – 2016

Απολυτήριο Λυκείου / Γενικό Λύκειο Αλιστράτης, Αλιστράτη Σερρών
Βαθμός Απολυτηρίου: 18,7 (Άριστα)

2016 - 2021

Πτυχίο Χημείας / Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα
Βαθμός Πτυχίου: 7,35 (Λίαν Καλώς)

2021 – Σήμερα

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης / Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα
Κατεύθυνση “Χημεία, Φυσικοχημεία και Τεχνολογία Υλικών – Επιστημολογία”

Επαγγελματική Εμπειρία

1) 03/2023 – 06/2023

Επικουρικό Διδακτικό Έργο / Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα
Εργαστήριο Φυσικοχημείας Ι

2) 10/2022 – 01/2023

Επικουρικό Διδακτικό Έργο / Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα
Εργαστήριο Φυσικοχημείας ΙΙ

Δημοσιεύσεις σε Διεθνή Περιοδικά

- 1) “Evidence of Self-association and Conformational Change in Nisin antimicrobial polypeptide solutions: A combined Raman and Ultrasonic Relaxation spectroscopic and theoretical study”, A. Tryfon, P. Siafarika, C. Kouderis, S. Kaziannis, S. Boghosian, A. G. Kalampounias, *Antibiotics*, Vol. 28, p. 1147, 2023. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules28031140>
- 2) “Self-assembling of Glutathione in Aqueous Environment: A combined experimental and theoretical study”. A. Tryfon, P. Siafarika, C. Kouderis, A. G. Kalampounias, *Journal of Molecular Liquids*, Vol. 390, p. 122957, 2023. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122957>
- 3) “Insight on the Structural and Dynamical Processes of Peptides by Means of Vibrational and Ultrasonic Relaxation Spectroscopies, Molecular Docking and DFT Calculations”. A. Tryfon, P. Siafarika, C. Kouderis, A. G. Kalampounias, *ChemEngineering*, under review.
- 4) “Kinetic Studies of Surfactant – Aspirin Micellization by Means of Ultrasonic Relaxation Spectroscopy”. C. Kouderis, P. Siafarika, A. Tryfon, C. N. Banti, S. K. Hadjidakou, A. G. Kalampounias. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2023, under review.

Ξένες Γλώσσες – Πιστοποίηση Η/Υ

- Αγγλικά, Επίπεδο Γ2
Proficiency / ECPE, Michigan
- Γερμανικά, Επίπεδο B1
Goethe – Zertifikat B1 / Goethe Institute
- Χειρισμός Η/Υ και Microsoft Office
Unicert Primary / Universal Certification Solutions

Υποτροφίες – Συμμετοχή σε Ερευνητικά Προγράμματα

Συμμετοχή στο ερευνητικό πρόγραμμα με μορφή ανταποδοτικής υποτροφίας:
“Ανάπτυξη ερευνητικών υποδομών για τον σχεδιασμό, την παραγωγή και την ανάδειξη των χαρακτηριστικών ποιότητας και ασφάλειας αγροδιατροφικών και βιολειτουργικών προϊόντων” / Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.