



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»  
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ « ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΚΑΙ ΟΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ »**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**Αμφίφιλα Συμπολυμερή κατά Συστάδες P(DMAEMA-co-LMA)-  
b-POEGMA και QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA: Σύνθεση,  
Χαρακτηρισμός, Αυτοοργάνωση σε Υδατικά Διαλύματα,  
Σύμπλεξη με DNA και Εγκλωβισμός Φαρμάκου**

**ΜΑΡΘΑ ΚΑΦΕΤΖΗ  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2018**



## **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

Αμφίφιλα Συμπολυμερή κατά Συστάδες P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA και QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA: Σύνθεση, Χαρακτηρισμός, Αυτοοργάνωση σε Υδατικά Διαλύματα, Σύμπλεξη με DNA και Εγκλωβισμός Φαρμάκου

**ΜΑΡΘΑ ΚΑΦΕΤΖΗ**

**A.M.:** 161004

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:** Μαρίνος Πιτσικάλης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Μαρίνος Πιτσικάλης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Ερμόλαος Ιατρού, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Αστέριος Πίσπας, Διευθυντής Ερευνών, Ινστιτούτο Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας,  
Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 27/02/2018**



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία συντέθηκαν καινοτόμα πολυμερικά συστήματα με εφαρμογές στον τομέα γονιδιακής θεραπείας και μεταφοράς φαρμάκων. Τα αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες λόγω της ικανότητας τους να αυτοοργανώνονται σε νανοσωματίδια όταν εισέρχονται σε υδατικά διαλύματα τα καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμα ως φορείς γονιδίων και φαρμάκων.

Η μελέτη της εργασίας αφορά τη σύνθεση αμφίφιλων δισυσταδικών συμπολυμερών πολυ(μεθακρυλικού εστέρα της διμεθυλοαμινοαιθανόλης-co- μεθακρυλικού εστέρα της δωδεκανόλης) -b- πολυ(μεθακρυλικού εστέρα της ολιγοαιθυνολογλυκόλης) ([poly(2-dimethylamino ethyl methacrylate)-co-(lauryl methacrylate)]-b-poly[oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate]), με τη μέθοδο RAFT και την περεταίρω μετατροπή τους σε δισυσταδικούς κατιοντικούς πολυηλεκτρολύτες. Εξετάστηκε επίσης η ικανότητα αυτοοργάνωσης σε υδατικά μέσα. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των πολυμερών έγινε με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC) και φασματοσκοπικές μεθόδους ( $^1\text{H-NMR}$  και FT-IR). Οι ιδιότητες της αυτοοργάνωσής τους μελετήθηκαν σαν συνάρτηση μεταβολών στο pH, στη θερμοκρασία και στην ιοντική ισχύ με τη χρήση των μεθόδων σκέδασης φωτός (DLS, SLS, ELS), φασματοσκοπίας φθορισμού (FS) και τη μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM). Η απόκριση των συστημάτων στις παραπάνω φυσικοχημικές παραμέτρους συντελεί στην εφαρμογή τους ως νανοφορείς γονιδίων και φαρμάκων. Κατόπιν, τα κατιοντικά πολυηλεκτρολυτικά συμπολυμερή συμπλέχθηκαν με μόρια DNA και εξετάστηκαν οι ιδιότητες των συμπλόκων που σχηματίστηκαν. Τέλος, εγκλωβίστηκε κουρκουμίνη στο υδρόφοβο τμήμα των συμπολυμερών και τα κolloειδή συστήματα που προέκυψαν μελετήθηκαν διεξοδικά.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Σύνθεση και χαρακτηρισμός πολυμερών

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** Αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες, σχηματισμός νανοσωματιδίων, σύμπλεξη με DNA, εγκλωβισμός φαρμάκου

## ABSTRACT

In this work, we report the synthesis of novel block copolymers that can be applied in gene and drug delivery. Amphiphilic block copolymers due to their capability to self-assemble into nanoparticles when inserted in aqueous media are particularly useful as gene and drug vectors.

The aim of the current research is the synthesis of amphiphilic diblock copolymers ([poly(2-dimethylamino ethyl methacrylate)-co-(lauryl methacrylate)]-b-poly[oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate]), using the RAFT technique and their further conversion into cationic polyelectrolyte block copolymers. Their self-assembling behavior in water was also studied. Their molecular characterization was carried out using size exclusion chromatography (SEC) and spectroscopic characterization techniques ( $^1\text{H-NMR}$  and FT-IR). We studied also the block copolymers self-assembling behavior under the effect of pH, temperature and ionic strength changes using dynamic, static and electrophoretic light scattering techniques (DLS, SLS, ELS), fluorescence spectroscopy (FS) and atomic force microscopy (AFM). Block copolymers response to physical and chemical parameters contributes to their application as gene and drug vectors. Moreover, the cationic polyelectrolyte block copolymers were complexed with DNA molecules. The resulting complexes were also studied. Finally, curcumin was encapsulated in the hydrophobic part of the block copolymers and the colloidal systems that emerged were studied thoroughly.

**SUBJECT AREA:** Polymer synthesis and characterization

**KEYWORDS:** Amphiphilic block copolymers, nanoparticles, DNA complexation, drug encapsulation

**Αφιερωμένο στην οικογένειά μου**

**Σας ευχαριστώ...**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία μου εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα μου Δρ. Αστέριο Πίσπα, Διευθυντή Ερευνών στο Ινστιτούτο Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών για την αρμονική συνεργασία, την πολύτιμη συμβολή, καθοδήγηση και υποστήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας ερευνητικής εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα μου, Δρ. Μαρίνο Πιτσικάλη, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών για την καθοδήγηση και τον ενδιαφέρον του, τον Δρ. Ερμόλαο Ιατρού καθώς και όλους του διδάσκοντες του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Επιστήμη Πολυμερών και Εφαρμογές της» για τις πολύτιμες γνώσεις που αποκόμισα παρακολουθώντας το πρόγραμμα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον υποψήφιο διδάκτορα Αθανάσιο Σκανδάλη για την πολύτιμη βοήθεια, καθοδήγηση και συμπαράσταση του κατά την διάρκεια της εργασίας μου. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Βαρβάρα Χρυσοστόμου για τη βοήθεια που μου προσέφερε στα πλαίσια της εργασίας μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ερευνητές του Ινστιτούτου Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, καθώς και τους διδακτορικούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές του Ινστιτούτου για τις πολύτιμες συμβουλές τους και το ευχάριστο περιβάλλον εργασίας.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου για τις θυσίες που πραγματοποιούν προκειμένου να εκπληρώνω τα όνειρα μου και στους φίλους μου που με στήριξαν και μου συμπαραστάθηκαν στον απόλυτο βαθμό όλη αυτή τη περίοδο.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	<b>17</b>
<b>1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>19</b>
1.1 Αμφίφιλα συμπολυμερή.....	19
1.2 Αυτοοργάνωση αμφίφιλων συμπολυμερών.....	21
1.2.1 Αυτοοργάνωση αμφίφιλων συσταδικών συμπολυμερών .....	21
1.2.2 Αυτοοργάνωση των αμφίφιλων τυχαίων συμπολυμερών .....	23
1.2.3 Τρόποι παρασκευής μικκυλίων από αμφίφιλα συμπολυμερή .....	24
1.2.4 Χαρακτηρισμός μικκυλίων .....	25
1.3 Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις .....	27
1.4 Πολυηλεκτρολύτες.....	27
1.4.1 Αμφίφιλα συμπολυμερή με συστάδες πολυηλεκτρολύτη.....	30
1.5 Αποκρίσμα πολυμερή.....	31
1.5.1 Θερμοαποκρινόμενα πολυμερή .....	32
1.5.2 pH-Αποκρινόμενα πολυμερή .....	34
1.5.3 Επίδραση ιοντικής ισχύος .....	36
1.6 Σύμπλεξη πολυμερών με DNA .....	37
1.7 Εγκλωβισμός φαρμάκων στα συσσωματώματα συσταδικών συμπολυμερών..	38
1.8 Πολυμερισμός αντιστρεπτής προσθήκης–μεταφοράς αλυσίδας με απόσπαση (RAFT polymerization) .....	39
1.9 Σκοπός της παρούσας εργασίας .....	44
<b>2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ</b> .....	<b>45</b>
2.1 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC).....	45
2.2 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) .....	47
2.3 Φασματοσκοπία υπερέθρου (IR) .....	49
2.4 Φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) .....	52

2.5	Φασματοσκοπία Φθορισμού (FS) .....	53
2.6	Σκέδαση φωτός (LS).....	55
2.6.1	Στατική σκέδαση φωτός (LS) .....	56
2.6.2	Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) .....	59
2.6.3	Ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός (ELS) – ζ-δυναμικό .....	61
2.7	Μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM) .....	63
<b>3.</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΠΕΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>65</b>
3.1	Υλικά και αντιδραστήρια .....	65
3.2	Οργανολογία και μέθοδοι χαρακτηρισμού .....	66
3.3	Σύνθεση P(DMAEMA-co-LMA) και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA .....	69
3.3.1	Σύνθεση τυχαίου συμπολυμερούς P(DMAEMA-co-LMA) .....	69
3.3.2	Σύνθεση συμπολυμερούς κατά συστάδες P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA.....	70
3.4	Χημική τροποποίηση των συμπολυμερών κατά συστάδες P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA .....	71
3.4.1	Σύνθεση των συμπολυμερών QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA.....	71
3.5	Αυτοοργάνωση P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA και QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA σε υδατικά διαλύματα .....	72
3.6	Επίδραση φυσικοχημικών παραμέτρων στα υδατικά διαλύματα των P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA και QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA σε νανοσωματίδια .....	73
3.6.1	Επίδραση της θερμοκρασίας .....	73
3.6.2	Επίδραση της μεταβολής του pH .....	74
3.6.3	Επίδραση της ιοντικής ισχύος.....	75
3.7	Σύμπλεξη των QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA συσσωματωμάτων με μόρια DNA .....	75

3.8	Εγκλωβισμός κουρκουμίνης στα νανοσωματίδια των P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA .....	77
<b>4.</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>79</b>
4.1	Σύνθεση συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA .....	80
4.2	Μοριακός χαρακτηρισμός των P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA .....	81
4.3	Μοριακός - Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των συσσωματωμάτων συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA .....	89
4.3.1	Μελέτη επίδρασης φυσικοχημικών παραμέτρων στα διαλύματα πολυμερών P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA .....	92
4.3.1.1	Μελέτη επίδρασης pH .....	92
4.3.1.2	Μελέτη επίδρασης θερμοκρασίας.....	102
4.4	Σύνθεση συμπολυμερών QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA .....	109
4.5	Φυσικοχημική μελέτη των υδατικών διαλυμάτων των συμπολυμερών QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA .....	113
4.5.1	Επίδραση ιοντικής ισχύος στα διαλύματα των συμπολυμερών QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA .....	114
4.6	Σύμπλεξη των QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA με DNA.....	116
4.6.1	Μελέτη επίδρασης της ιοντικής ισχύος στα σύμπλοκα Q(PDMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA/DNA .....	126
4.7	Εγκλωβισμός κουρκουμίνης στα συσσωματώματα των P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA .....	128
<b>5.</b>	<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>134</b>
<b>6.</b>	<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ .....</b>	<b>136</b>
<b>7.</b>	<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ .....</b>	<b>137</b>
<b>8.</b>	<b>ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....</b>	<b>139</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Δομικά χαρακτηριστικά του thiocarbonylthio CTA και το ενδιάμεσο προϊόν που σχηματίζεται κατά τη προσθήκη ριζών .....	40
Σχήμα 1.2: Μηχανισμός πολυμερισμού RAFT.....	41
Σχήμα 4.1: Συνθετική πορεία για τη παρασκευή του αμφίφιλου τυχαίου συμπολυμερούς P(DMAEMA-co-LMA) .....	80
Σχήμα 4.2: Γενική συνθετική πορεία παρασκευής συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA.....	81
Σχήμα 4.3: Χρωματογραφήματα SEC των δειγμάτων P(DMAEMA-co-LMA)-2 και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 .....	83
Σχήμα 4.4: Χρωματογραφήματα SEC των δειγμάτων P(DMAEMA-co-LMA)-1 και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-3 .....	83
Σχήμα 4.5: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του τυχαίου συμπολυμερούς P(DMAEMA-co-LMA)-1 σε $\text{CDCl}_3$ .....	84
Σχήμα 4.6: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του δισυσταδικού συμπολυμερούς P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-3.....	85
Σχήμα 4.7: Φάσμα ATR-FTIR του τυχαίου συμπολυμερούς P(DMAEMA-co-LMA)-2....	87
Σχήμα 4.8: Συγκριτικό φάσμα ATR-FTIR των συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA)-2 και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6.....	88
Σχήμα 4.9: Διάγραμμα της έντασης του λόγου των σχετικών κορυφών $I_1 / I_3$ του πυρενίου συναρτήσει συγκέντρωσης για το συμπολυμερές P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4.....	90
Σχήμα 4.10: Διάγραμμα της έντασης του λόγου των σχετικών κορυφών $I_1 / I_3$ του πυρενίου συναρτήσει συγκέντρωσης για το συμπολυμερές P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5.....	91
Σχήμα 4.11: Διάγραμμα εξάρτησης της $I$ από τη μεταβολή του pH για το συμπολυμερές P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 .....	93
Σχήμα 4.12: Διάγραμμα εξάρτησης της $R_h$ και ζ-δυναμικού από τη μεταβολή του pH για το συμπολυμερές P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 .....	94

Σχήμα 4.13: Διαγράμματα κατανομής μεγεθών των σωματιδίων σε pH 7,9 και 3 για το δείγμα P(DMAEMA-co-PLMA)-b-POEGMA-5.....	96
Σχήμα 4.14: Διάγραμμα εξάρτησης της I από τη μεταβολή του pH για το.. συμπολυμερές P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 .....	97
Σχήμα 4.15: Διάγραμμα εξάρτησης της $R_h$ από τη μεταβολή του pH για το συμπολυμερές P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6.....	98
Σχήμα 4.16: Φάσματα εκπομπής πυρενίου για για το συμπολυμερές P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 σε pH 7,9 και 3.....	99
Σχήμα 4.17: Διάγραμμα εξάρτησης της I συναρτήσει της θερμοκρασίας για το συμπολυμερές P(DMAEMA-co-LMA)-POEGMA-5.....	104
Σχήμα 4.18: Διάγραμμα εξάρτησης της $R_h$ συναρτήσει της θερμοκρασίας για το συμπολυμερές P(DMAEMA-co-LMA)-POEGMA-5.....	104
Σχήμα 4.19: Διάγραμμα κατανομής μεγεθών των σωματιδίων σε θερμοκρασία 40°C για το δείγμα P(DMAEMA-co-PLMA)-b-POEGMA-5 .....	105
Σχήμα 4.20: Φάσμα εκπομπής του πυρενίου για το δείγμα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 σε θερμοκρασίες 25°C και 55°C.....	108
Σχήμα 4.21: Αντίδραση τεταρτοταγοποίησης της αμίνης του τμήματος PDMAEMA (Quaternization reaction) .....	110
Σχήμα 4.22: Συγκριτικά φάσματα ATR-FTIR για τα συμπολυμερή QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5.....	113
Σχήμα 4.23: Διάγραμμα εξάρτησης της I και της $R_h$ από την επίδραση της ιοντικής ισχύος για το δείγμα QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5.....	115
Σχήμα 4.24: Διάγραμμα εξάρτησης της I και της $R_h$ από την επίδραση της ιοντικής ισχύος για το δείγμα QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6.....	116
Σχήμα 4.25: Σχηματική απεικόνιση της συναρμογής του QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA με το DNA προς σχηματισμό συμπλόκων.....	118
Σχήμα 4.26: Διάγραμμα εξάρτησης της έντασης από τη μεταβολή του λογου N/P για το σύστημα QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5/DNA .....	118

Σχήμα 4.27: Διάγραμμα εξάρτησης της υδροδυναμικής ακτίνας και του ζ-δυναμικού από τη μεταβολή του λόγου N/P για το σύστημα QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5/DNA .....	119
Σχήμα 4.28: Καμπύλη κατανομής μεγεθών για το δείγμα QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5/DNA σε αναλογία φορτίων N/P=1 .....	120
Σχήμα 4.29: Διάγραμμα απόσβεσης φθορισμού και αντίστοιχα φάσματα που περιγράφει την αλληλεπίδραση EtBr/DNA με το συμπολυμερές QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5.....	124
Σχήμα 4.30: Φάσματα απορρόφησης υπεριώδους για το δείγμα QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5/DNA σε αναλογίες N/P από 0.25 έως 8 .....	125
Σχήμα 4.31: Διαγράμματα μεταβολής της I και R <sub>h</sub> με αύξηση της ιοντικής ισχύος για το δείγμα QP(DMAEA-co-PLMA)-b-POEGMA-5/DNA σε N/P=0.5 .....	127
Σχήμα 4.32: Διαγράμματα μεταβολής της I και R <sub>h</sub> με αύξηση της ιοντικής ισχύος για το δείγμα QP(DMAEA-co-PLMA)-b-POEGMA-5/DNA σε N/P=6 .....	127
Σχήμα 4.33: Σχηματική απεικόνιση του εγκλωβισμού της κουρκουμίνης και των χημικών δομών της κουρκουμίνης και του πολυμερούς .....	129
Σχήμα 4.34: Διάγραμμα μεταβολής της έντασης σκεδάσεως και της υδροδυναμικής ακτίνας σε σχέση με χρόνο του δείγματος P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6/curcumin50% σε H <sub>2</sub> O .....	130
Σχήμα 4.35: Καμπύλη αναφοράς της κουρκουμίνης σε THF .....	132

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Σχηματική απεικόνιση ενός δισυσταδικού και ενός τυχαίου συμπολυμερούς. .....	20
Εικόνα 1.2: Απεικόνιση σχηματισμού μικκυλίων από δισυσταδικό πολυμερές .....	22
Εικόνα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση ενός διαλύματος πολυηλεκτρολύτη .....	28
Εικόνα 1.4: Αναπαράσταση της μετάπτωσης φάσης που συνδέεται με την LCST και UCST .....	33
Εικόνα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση του διαχωρισμού ενός αραιού πολυμερικού διαλύματος με χρήση της χρωματογραφίας SEC .....	46
Εικόνα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση οργανολογίας SEC .....	46
Εικόνα 2.3: Σχηματική απεικόνιση φασματομέτρου NMR .....	49
Εικόνα 2.4: Η τεχνική ATR .....	51
Εικόνα 2.5: Σχηματική απεικόνιση φασματοφωτομέτρου UV-Vis .....	53
Εικόνα 2.6: Διάγραμμα Jablonski .....	54
Εικόνα 2.7: Διάγραμμα Zimm .....	58
Εικόνα 2.8: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης στατικής σκέδασης φωτός .....	59
Εικόνα 2.9: Σχηματική αναπαράσταση μιας πειραματικής διάταξης μέτρησης του ζ-δυναμικού .....	63
Εικόνα 2.10: Τυπική αναπαράσταση ενός AFM .....	64
Εικόνα 4.1: Εικόνες από AFM των δειγμάτων P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4 ( εικόνες a και b) και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 (εικόνα c) σε βασικό pH .....	102
Εικόνα 4.2: Εικόνα από AFM των συμπλόκων του δείγματος Q(PDMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5/DNA .....	122

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 4.1: Μοριακά χαρακτηριστικά P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA.....	86
Πίνακας 4.2: Αποτελέσματα εύρεσης CAC με φασματοσκοπία φθορισμού.....	91
Πίνακας 4.3: Λόγοι $R_g/R_{h0}$ , όπως καθορίστηκαν μέσω της στατικής σκέδασης φωτός για το δείγμα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 για τις τιμές pH 3, 7, 9.....	96
Πίνακας 4.4: Λόγοι $I_1/I_3$ για τα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA σε pH 7,9 και 3	100
Πίνακας 4.5: Λόγοι $R_g/R_{h0}$ , όπως καθορίστηκαν μέσω της στατικής σκέδασης φωτός για το δείγμα P(DMAEMA-co-PLMA)-b-POEGMA-5 για εύρος θερμοκρασιών 25°C-70°C	107
Πίνακας 4.6: Οι λόγοι $I_1/I_3$ για τα δείγματα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 σε θερμοκρασίες 25°C και 55°C .	109
Πίνακας 4.7: Τα μοριακά βάρη και οι % κατά βάρος συστάσεις των συμπολυμερών QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA.....	111
Πίνακας 4.8: Αποτελέσματα μέτρησεων δυναμικής σκέδασης φωτός για τα δείγματα QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-3, QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 και QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6	114
Πίνακας 4.9: Αποτελέσματα τεχνικών SLS και DLS, με βάση την αναλογία N/P για το δείγμα QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5/DNA	121
Πίνακας 4.10: Αποτελέσματα Δυναμικής Σκέδασης Φωτός για τα δείγματα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4 και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 με μέγιστο δυνατό ποσοστό εγκλωβισμένης κουρκουμίνης % 50w/w σε διαλύτη H <sub>2</sub> O και NaCl 0.15 M .	131
Πίνακας 4.11: Αποτελέσματα ELS για τα δείγματα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4 και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 με μέγιστο δυνατό ποσοστό εγκλωβισμένης κουρκουμίνης 50%w/w σε διαλύτη H <sub>2</sub> O και NaCl 0.15	132
Πίνακας 4.12: Αποτελέσματα υπολογισμού απόδοσης εγκλωβισμού της κουρκουμίνης για τα δείγματα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4/curcumin και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6/curcumin	133



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματεύεται τη σύνθεση αμφίφιλων συμπολυμερών κατά συστάδες με τη χρήση τη τεχνικής πολυμερισμού RAFT, το χαρακτηρισμό και τη μελέτη της αυτοοργάνωσής τους σε υδατικά διαλύματα. Στο πρώτο κεφάλαιο παρουσιάζονται βασικές πληροφορίες για τα αμφίφιλα συμπολυμερή, τις ιδιότητες αυτοοργάνωσής τους σε υδατικά διαλύματα και περιγράφεται αναλυτικά η μεθοδολογία του ζωντανού/ελεγχόμενου πολυμερισμού RAFT. Στο τέλος του πρώτου κεφαλαίου παρουσιάζεται ο σκοπός της εργασίας μου.

Στο δεύτερο κεφάλαιο αναπτύσσονται οι αρχές λειτουργίας και διατάξεις των τεχνικών ενόργανης ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη και τον χαρακτηρισμό των υλικών που παρασκευάστηκαν.

Στο τρίτο κεφάλαιο περιγράφεται η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη παρασκευή των συμπολυμερών καθώς και τον χαρακτηρισμό τους. Στο τέταρτο κεφάλαιο γίνεται η παρουσίαση και η συζήτηση των αποτελεσμάτων που εξήχθησαν, παραθέτοντας τα αντίστοιχα διαγράμματα, σχήματα, εικόνες και πίνακες για την σωστή ανάλυσή τους. Το τελευταίο κεφάλαιο αναφέρεται στα συμπεράσματα που αποκομίσθησαν κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων και την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν στο Ινστιτούτο Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

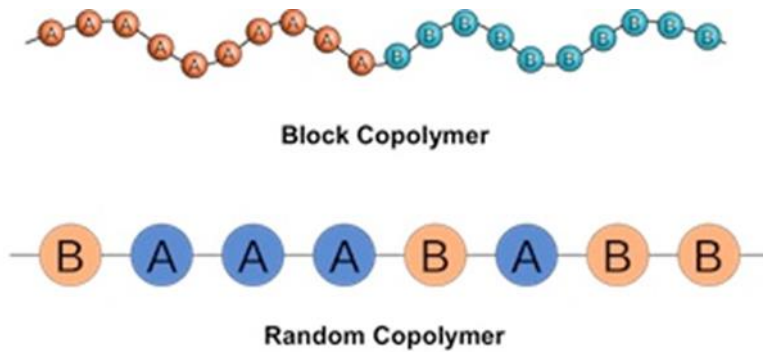


# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Αμφίφιλα συμπολυμερή

*Πολυμερές* είναι ένα μακρομόριο το οποίο αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων μονάδων, *τα μονερή*, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με ομοιοπολικό δεσμό. [1] Σημαντικά πολυμερή όπως το DNA, οι πρωτεΐνες, η κυτταρίνη μας τα έχει δώσει η ίδια η φύση, ενώ πολύ περισσότερα όπως το πολυστυρένιο, το πολυαιθυλένιο παράγονται μόνο μέσω συνθετικών διαδικασιών. Σε μερικές περιπτώσεις, πολυμερή τα οποία προέρχονται από τη φύση μπορούν επίσης να παραχθούν συνθετικά. Συχνά, είναι η δυνατή η απόκτηση πολυμερών με καινούργιες και επιθυμητές ιδιότητες μέσω της σύνδεσης διαφορετικών μονομερών ή επαναλαμβανόμενων ομάδων, κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού. Πολυμερή που έχουν δύο διαφορετικές επαναλαμβανόμενες ομάδες στην αλυσίδα τους ονομάζονται *συμπολυμερή (copolymers)*, ενώ όπου υπάρχουν τρεις επαναλαμβανόμενες ομάδες, οι οποίες διαφέρουν χημικώς μεταξύ τους, το πολυμερές που προκύπτει ονομάζεται *τριπολυμερές (terpolymer)*. Όταν τα διαφορετικά είδη επαναλαμβανόμενων μονάδων εντοπίζονται σε διακριτές συστάδες (*blocks*) κατά μήκος της πολυμερικής αλυσίδας το συμπολυμερές ή το τριπολυμερές ονομάζεται *δισυσταδικό συμπολυμερές (diblock copolymer)* ή κατά συστάδες τριπολυμερές (*triblock terpolymer*). Στην περίπτωση που οι δομικές μονάδες του πολυμερούς είναι τυχαία κατανομημένες κατά μήκος της αλυσίδας, το πολυμερές ονομάζεται *τυχαίο ή στατιστικό (random ή statistical)*. [2] Τα δισυσταδικά ή τρισυσταδικά συμπολυμερή διατηρούν τις ιδιότητες των συστατικών ομοπολυμερικών συστάδων πολύ καλύτερα από τα αντίστοιχα στατιστικά συμπολυμερή, όπου τα δύο ή τρία είδη μονομερών είναι τυχαία κατανομημένα κατά μήκος της πολυμερικής αλυσίδας. Σε αυτή την περίπτωση οι ιδιότητες που εμφανίζει το στατιστικό συμπολυμερές είναι συνδυασμός των ιδιοτήτων των συστατικών μονομερών ομάδων. Άλλες κατηγορίες συμπολυμερών είναι τα εμβολιασμένα συμπολυμερή και τα αστεροειδή.



**Εικόνα 1.1: Σχηματική απεικόνιση ενός δισυσταδικού και ενός τυχαίου συμπολυμερούς.**

Όταν τα συμπολυμερή αποτελούνται από μονομερικές ομάδες οι οποίες διαλύονται σε διαφορετικούς διαλύτες, τότε ονομάζονται *αμφίφιλα (amphiphilic copolymers)*. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αμφίφιλα συμπολυμερή που αποτελούνται από υδρόφοβα και υδρόφιλα μονομερή. Τα συμπολυμερή αυτά παρουσιάζουν πολλές ιδιαιτερότητες, αλλά και δυσκολίες στη σύνθεσή τους, λόγω της δυσκολίας εύρεσης κοινών διαλυτών. Το συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για αυτά τα πολυμερή οφείλεται στις ενδιαφέρουσες ιδιότητές τους, οι οποίες καθορίζονται από τη μοριακή δομή τους και τα καθιστούν ελκυστικά σε όλους τους τομείς της επιστήμης, αλλά και της βιομηχανίας. Η ασυμβατότητα των συστάδων μεταξύ τους έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενδιαφέρουσων μορφολογιών σε στερεή κατάσταση ή σε διάλυμα. Σε διαλύματα, η πιο χαρακτηριστική ιδιότητά τους είναι αυτή της αυτοοργάνωσης η οποία οδηγεί στο σχηματισμό οργανωμένων δομών, συνήθως μικκυλίων, ανάλογα με το διαλύτη στον οποίο είναι διαλυμένα.

*Αμφίφιλο συμπολυμερές κατά συστάδες (amphiphilic block copolymer)*, είναι το πολυμερές το οποίο αποτελείται από μια λυόφιλη και μια λυόφοβη συστάδα. Η λυόφιλη συστάδα τείνει να έρχεται σε επαφή με τον διαλύτη, ενώ η λυόφοβη αποφεύγει οποιαδήποτε επαφή με τον διαλύτη.[4] Όταν ο διαλύτης είναι νερό, τότε οι συστάδες καλούνται υδρόφιλες και υδρόφοβες. Η ασυμβατότητα μεταξύ των διαφορετικών τους τμημάτων έχει σαν συνέπεια την αυτοοργάνωση τους σε διαλύματα, σχηματίζοντας μικκύλια (*micelles*).[5] Έτσι, η μικκυλοποίηση των συσταδικών συμπολυμερών σε ένα εκλεκτικό

διαλύτη για τη μία συστάδα, όπως αναφέρεται αναλυτικότερα και παρακάτω, είναι αιτία των κολλοειδών ιδιοτήτων τους. Οι εφαρμογές που βρίσκουν τα συμπολυμερή αυτά είναι ποικίλες. Συνήθως χρησιμοποιούνται σαν νανοφορείς, γαλακτωματοποιητές, μέσα διασποράς, τροποποιητές επιφανειών και ρυθμιστές ιξώδους. [6]

Τα τελευταία χρόνια οι ερευνητικές ομάδες έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στα αμφίφιλα τυχαία συμπολυμερή (amphiphilic random copolymers), λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν σε σύγκριση με τα αμφίφιλα συσταδικά πολυμερή. Αρχικά, σε αντίθεση με τα συσταδικά συμπολυμερή που προκειμένου να συντεθούν απαιτούν πολυμερισμό μέσω πολλών σταδίων, τα τυχαία συμπολυμερή μπορούν να παρασκευαστούν με τον συμπολυμερισμό δυο διαφορετικών μονομερών, σε ένα μόνο στάδιο. [7] Ο γρήγορος και εύκολος τρόπος πολυμερισμού των αμφίφιλων τυχαίων συμπολυμερών τα κάνει ιδιαίτερα ελκυστικά για την παραγωγή τους σε βιομηχανική κλίμακα. Επιπρόσθετα, τα αμφίφιλα τυχαία συμπολυμερή όταν αυτοοργανώνονται σε διαλύματα σχηματίζουν ιδιαίτερες νανο-δομές που αξίζει να μελετηθούν εκτενέστερα. [7]

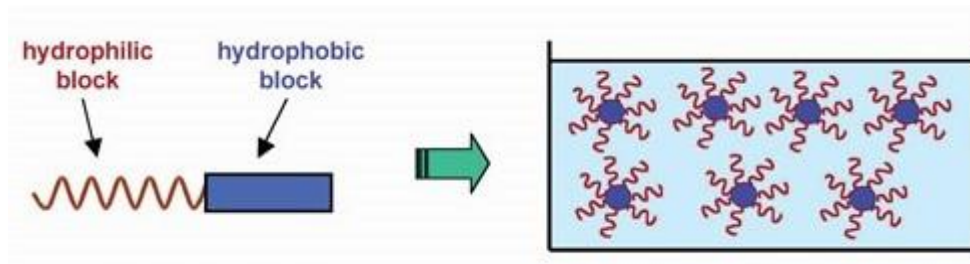
## **1.2 Αυτοοργάνωση αμφίφιλων συμπολυμερών**

Η πιο σημαντική ιδιότητα των αμφίφιλων συμπολυμερών είναι η αυτοοργάνωση τους σε νανοδομές όταν εισέρχονται σε έναν εκλεκτικό διαλύτη, δηλαδή έναν διαλύτη που είναι καλός μόνο για ένα από τα μονομερικά/πολυμερικά συστατικά. [8]

### **1.2.1 Αυτοοργάνωση αμφίφιλων συσταδικών συμπολυμερών**

Όταν ένα συσταδικό πολυμερές διαλύεται σε ένα διαλύτη, ο οποίος είναι θερμοδυναμικά καλός για τα μία συστάδα και κακός για την άλλη, οι πολυμερικές αλυσίδες οργανώνονται προς σχηματισμό μικκυλίων. Ο διαλύτης αυτός ονομάζεται *εκλεκτικός*. [9] Οι αδιάλυτες συστάδες συσσωματώνονται σχηματίζοντας έναν πυρήνα ο οποίος περιβάλλεται από τις διαλυτές συστάδες που αποτελούν την κορώνα, η οποία αποτρέπει την καθίζηση των

συσσωμάτων και σταθεροποιεί το σχηματιζόμενο νανοσωματίδιο στο διάλυμα. [10] Οι δομές που δημιουργούνται ονομάζονται μικκύλια.



**Εικόνα 1.2: Απεικόνιση σχηματισμού μικκυλίων από δισυσταδικό πολυμερές**

Συνήθως έχουν σφαιρικό σχήμα με δομή "πυρήνα-κελύφους", (*core-shell micelles*). Στην περίπτωση αυτή η αδιάλυτες συστάδες που αποτελούν τον πυρήνα είναι μικρότερες από τις διαλυτές, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται μικκυλιακές δομές που αποτελούνται από ένα μικρό σε μέγεθος και συμπαγή πυρήνα και μια μεγάλη σε μέγεθος κορώνα. Στην αντίθετη περίπτωση που οι αδιάλυτες αλυσίδες είναι μεγαλύτερες των διαλυτών σχηματίζονται μικκύλια που διαθέτουν μεγάλο και συμπαγή πυρήνα και μια μικρή και εκτεταμένη κορώνα. Αυτά αναφέρονται ως "*crew cut micelles*". [11,12,13] Έχουν παρατηρηθεί και άλλες δομές όπως τα ραβδόμορφα μικκύλια (*rod-like micelles*). [14,15] Τα υδατοδιαλυτά αμφίφιλα συσταδικά συμπολυμερή μπορεί να αποτελούνται από μια υδρόφοβη και μια υδρόφιλη συστάδα. Στην περίπτωση λοιπόν που ο διαλύτης είναι νερό, ο πυρήνας σχηματίζεται από τη αυτοοργάνωση των υδρόφοβων συστάδων και η κορώνα που τον περιβάλλει από τις υδρόφιλες συστάδες. Η συμπεριφορά κατά την αυτοοργάνωση σε διαλύματα ελέγχεται από τη στενή κατανομή μοριακών βαρών και το μήκος της συστάδας. Συνεπώς οι τροποποιήσεις στη δομή των νανοδομών μπορούν να επιτευχθούν ρυθμίζοντας τις κατάλληλες παραμέτρους (σύσταση και μοριακό βάρος) κατά τη σύνθεση του συμπολυμερούς.[15] Η αυτοοργάνωση των αμφίφιλων συμπολυμερών προς το σχηματισμό μικκυλίων σε υδατικό διάλυμα έχει μελετηθεί λεπτομερώς. Μια από τις πιο χρήσιμες ιδιότητες των μικκυλίων που σχηματίζουν τα υδατοδιαλυτά συσταδικά συμπολυμερή είναι η ικανότητα να διαλυτοποιούν στο νερό υδρόφοβα μόρια. Αυτό γίνεται διότι ο υδρόφοβος πυρήνας του μικκυλίου αποτελεί ένα συμβατό, φιλόξενο

μικροπεριβάλλον για υδρόφοβα μόρια είτε αυτά είναι μικρού μοριακού βάρους είτε μακρομόρια. Το γεγονός αυτό υπόσχεται πολλές περιβαλλοντικά φιλικές εφαρμογές αφού το νερό μπορεί να αντικαταστήσει τους οργανικούς διαλύτες σε πολλούς τομείς.

### 1.2.2 Αυτοοργάνωση των αμφίφιλων τυχαίων συμπολυμερών

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα τελευταία χρόνια αρκετές ερευνητικές ομάδες μελετούν τη σύνθεση και την αυτοοργάνωση σε διαλύματα των αμφίφιλων τυχαίων συμπολυμερών. Τα τυχαία συμπολυμερή δεν προτιμούνταν λόγω των μη καλά καθορισμένων ιδιοτήτων τους και των ευρέων κατανομών μοριακού βάρους. Κάθε αλυσίδα του τυχαίου αμφίφιλου συμπολυμερούς αποτελείται από υδρόφοβα και υδρόφιλα τμήματα, σε αντίθεση με τα συσταδικά που οι επαναλαμβανόμενες μονάδες εντοπίζονται σε διακριτές συστάδες. Συνήθως τα τυχαία συμπολυμερή όταν διαλυθούν στο νερό αυτοοργανώνονται μέσω ενδομοριακής αλλαγής της διαμόρφωσης της αλυσίδας τους (ενδομοριακή αναδίπλωση-intramolecular self-folding) δημιουργώντας μονομοριακά μικκύλια (unimer micelles), ενώ τα συσταδικά αυτοοργανώνονται συνήθως σε πολυμοριακά μικκύλια. Η αναλογία υδρόφοβου/υδρόφιλου τμήματος και το μήκος της αλυσίδας (βαθμός πολυμερισμού, DP) καθορίζουν την αυτοοργάνωση των τυχαίων συμπολυμερών.[16,7] Όταν το υδρόφοβο ποσοστό είναι αρκετά μικρότερο σε σχέση με το υδρόφιλο, τα τυχαία συμπολυμερή αυτο-αναδιπλώνονται ενδομοριακά σχηματίζοντας unimer micelles με υδρόφοβους πυρήνες διότι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις λόγω του μικρού ποσοστού υδρόφοβου τμήματος δεν μπορούν να ανταγωνιστούν τους δεσμούς υδρογόνου με το περιβάλλον νερό. Αύξηση του υδρόφοβου τμήματος έχει σαν αποτέλεσμα την διαμοριακή αυτοοργάνωση του τυχαίου συμπολυμερούς σε νερό, σχηματίζοντας συσσωματώματα πολλαπλών αλυσίδων (*multichain aggregates*).[16,7] Για κάθε σύστημα τυχαίου συμπολυμερούς υπάρχει ένας συγκεκριμένος βαθμός πολυμερισμού που εξαρτάται από τη σύστασή του και θεωρείται ως κατώφλι (*composition-depedent threshold degree of polymerization, DP<sub>th</sub>*). Τυχαία συμπολυμερή με μικρότερο DP του DP<sub>th</sub> αυτοοργανώνονται διαμοριακά σχηματίζοντας συσσωματώματα, με το

μέγεθος τους να αυξάνεται όσο αυξάνεται το υδρόφοβο ποσοστό.[16] Λόγω της εξάρτησης του μοριακού βάρους από τη σύσταση των συμπολυμερών, τυχαία συμπολυμερή με ευρεία κατανομή μοριακών βαρών αυτοοργανώνονται σε νανο-συσσωματώματα εξαιτίας της ταυτόχρονης ενδομοριακής αναδίπλωσης των πολυμερικών αλυσίδων με DP μεγαλύτερο του  $DP_{th}$  και της διαμοριακής αυτοοργάνωσης των πολυμερικών αλυσίδων με DP μικρότερο του  $DP_{th}$ . [7]

### 1.2.3 Τρόποι παρασκευής μικκυλίων από αμφίφιλα συμπολυμερή

Η μικκυλίωση των αμφιφιλικών συμπολυμερών κατά συστάδες λαμβάνει χώρα σε αραιά διαλύματα εκλεκτικού διαλύτη για τη μία συστάδα, όταν η συγκέντρωση του διαλύματος υπερβαίνει την κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση (critical micelle concentration, cmc), η οποία αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα του εκάστοτε συστήματος συμπολυμερούς-διαλύτη. Σε συγκεντρώσεις μικρότερες της cmc στο διάλυμα υπάρχουν μόνο μοριακά διαλυμένες μεμονωμένες αλυσίδες (unimer chains) του συμπολυμερούς, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις συνυπάρχουν πολυμοριακά μικκύλια και μεμονωμένες αλυσίδες σε θερμοδυναμική ισορροπία μεταξύ τους.

Η πιο κοινή μέθοδος παρασκευής μικκυλιακών δομών είναι η διαλυτοποίηση του πολυμερούς σε έναν κοινό διαλύτη για όλες τις συστάδες και στη συνέχεια μεταβολή των συνθηκών, όπως η θερμοκρασία ή η σύσταση του διαλύτη. Η δύσταση του διαλύτη μεταβάλλεται με την σταδιακή προσθήκη νέου διαλύτη, ο οποίος τείνει να κατακρημνίσει μία ή και περισσότερες από τις συστάδες (στην περίπτωση τριπολυμερών ή πολυμερών με περισσότερες από τρεις συστάδες διαφορετικής χημικής σύστασης).

Η άλλη μέθοδος παρασκευής μικκυλίων είναι η σταδιακή αλλαγή της συνολικής ποσότητας του κοινού διαλύτη, από διαλύτη ο οποίος είναι εκλεκτικός μόνο για τη μία συστάδα και τείνει να καταβυθίσει τις υπόλοιπες.

Και στις δυο προαναφερόμενες περιπτώσεις, δεν επιτυγχάνεται κατάσταση θερμοδυναμικής ισορροπίας και ειδικότερα εάν ο πυρήνας σχηματίζεται από πολυμερές με υψηλή τιμή θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης ( $T_g$ ), με κύριο αποτέλεσμα την παρατήρηση "παγωμένων" μικκυλίων (frozen micelles).



Ο σχηματισμός μικκυλίων με τη πρώτη μέθοδο οδηγεί στην εξάρτηση της μορφολογίας του δείγματος σε στερεά κατάσταση από την αλληλεπίδραση του διαλύτη με αυτή. Για να επιτευχθεί κατάσταση ισορροπίας σε σύντομο χρονικό διάστημα, θα πρέπει ο εκλεπτικός διαλύτης να διογκώνει και την αδιάλυτη συστάδα, γεγονός που θεωρείται αδύνατο στις περισσότερες των περιπτώσεων. [5]

#### 1.2.4 Χαρακτηρισμός μικκυλίων [17,18]

Τα μικκύλια χαρακτηρίζονται από τις ακόλουθες παραμέτρους:

- Κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση, CMC
- Κρίσιμη μικκυλιακή θερμοκρασία, CMT
- Ολικό μέγεθος του μικκυλίου (γυροσκοπική ακτίνα του μικκυλίου  $-R_g$ )
- Διαστάσεις του πυρήνα ( $R_c$ -η ακτίνα του πυρήνα του μικκυλίου) και του κελύφους (L-το πάχος του κελύφους του μικκυλίου)
- Υδροδυναμική ακτίνα του μικκυλίου  $-R_h$
- Λόγος  $R_g/R_h$  που δίνει πληροφορίες για το σχήμα του μικκυλίου
- Φαινόμενο (*apparent*) μοριακό βάρος κατά βάρος του μικκυλίου  $M_{w,app}$
- Αριθμός συσσωμάτωσης ( $N_w$ : ο αριθμός των πολυμερικών αλυσίδων ανά μικκύλιο)

Οι τεχνικές με τις οποίες μελετώνται όλα αυτά τα χαρακτηριστικά των μικκυλίων είναι:

- Τεχνικές μικροσκοπίας, οι οποίες παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για το σχήμα και το μέγεθος των μικκυλίων και είναι, η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (*Transmission Electron Microscopy, TEM*), η πιο πρόσφατη παραλλαγή της κρυογονικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διαπερατότητας (*cryo-TEM*), ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (*Scanning Electron Microscopy, TEM*) και η μικροσκοπία ατομικής δύναμης (*Atomic Force Microscopy, AFM*).
- Τεχνικές σκέδασης, όπως η σκέδαση νετρονίων και ακτίνων X σε μικρές γωνίες (*SANS* και *SAXS*), αλλά και η δυναμική και στατική

σκέδαση φωτός (*DLS* και *SLS*), αποτελούν χρήσιμα πειραματικά εργαλεία για τη μελέτη των μικκυλιακών συστημάτων *in situ* και η χρήση τους είναι ιδιαίτερος διαδεδομένη. Μέσω των μετρήσεων σκέδασης εξάγονται σημαντικές παράμετροι του συστήματος, συμπεριλαμβανομένων της ακτίνας του πυρήνα, της ακτίνας του μικκυλίου, του μοριακού βάρους του μικκυλίου, μέσω του οποίου υπολογίζεται ο αριθμός συσσωμάτωσης, καθώς και της υδροδυναμικής και της γυροσκοπικής ακτίνας του μικκυλίου. Η υδροδυναμική ακτίνα εξάγεται επίσης μέσω μετρήσεων ιξωδομετρίας, οι οποίες επιπροσθέτως παρέχουν το εσωτερικό ιξώδες του συστήματος.

- Φασματοσκοπικές μετρήσεις φθορισμού χρησιμοποιούνται συνήθως για τον προσδιορισμό της κρίσιμης μικκυλιακής συγκέντρωσης και τη διερεύνηση της δυναμικής των αλυσίδων. Γίνεται είτε με ελεύθερους φθορίζοντες ιχνηθέτες, όπως είναι το πυρένιο, είτε με ομοιοπολικά συνδεδεμένες φθορίζουσες ομάδες. Το πυρένιο είναι έντονα υδρόφοβο και έχει πολύ μικρή διαλυτότητα στο νερό. Είναι ένας φθορίζων ιχνηθέτης αποτελούμενος από τέσσερις συμπυκνωμένους βενζολικούς δακτυλίους με υψηλή συμμετρία χημικής δομής. Εκπέμπει φως με φωτοδιέγερση στα 334 nm και χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση της πολικότητας του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται διαλυμένο. Η διαλυτότητα του πυρενίου στο νερό είναι αρκετά περιορισμένη, αλλά μπορεί να αυξηθεί σημαντικά σε λιγότερο πολικό περιβάλλον, όπως σε υδατικά διαλύματα μικκυλίων, αφού ως υδρόφοβη ουσία μπορεί να εισχωρήσει στο εσωτερικό των πυρήνων των μικκυλίων.
- Φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, χρησιμοποιείται συνήθως για τον προσδιορισμό της κρίσιμης μικκυλιακής συγκέντρωσης και τη διερεύνηση της δυναμικής των αλυσίδων.
- Υπερφυγοκέντρωση και Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών οι οποίες παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την κατανομή του μεγέθους ή/και του βάρους των μικκυλίων και την ισορροπία με τις μεμονωμένες αλυσίδες στο διάλυμα.

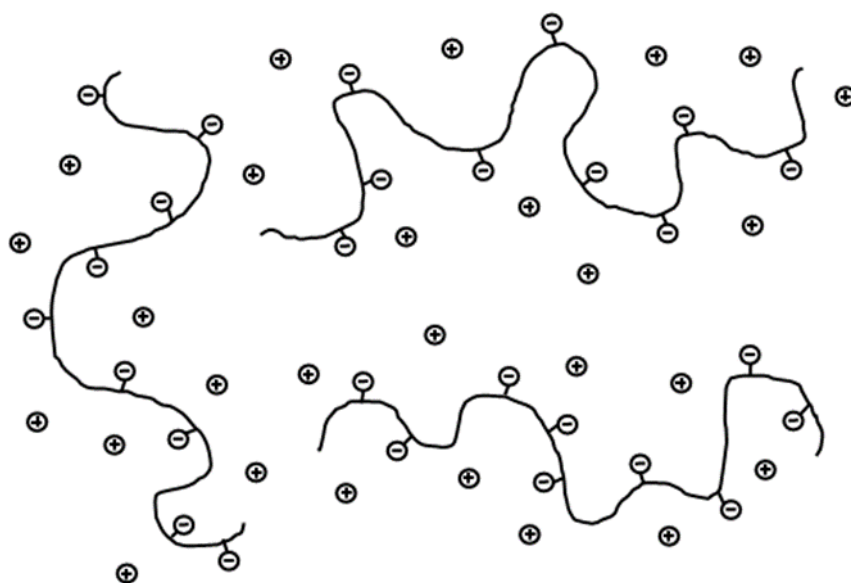
### 1.3 Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις [19]

Η υδρόφοβη αλληλεπίδραση περιγράφει την ασυνήθιστα ισχυρή έλξη μεταξύ υδρόφοβων μορίων στο νερό, πολύ συχνά ισχυρότερη από την αλληλεπίδραση τους απουσία νερού. Η υδρόφοβη αλληλεπίδραση είναι εντροπικό φαινόμενο και δεν σχετίζεται με κάποιο είδος δεσμού, αλλά προέρχεται από τις αναδιατάξεις των συνδεδεμένων με δεσμούς υδρογόνου μορίων νερού στις αλληλοεπικαλυπτόμενες ζώνες ενυδάτωσης καθώς τα δύο υδρόφοβα είδη πλησιάζουν. Δεν προκαλείται από άμεσες συνεκτικές δυνάμεις των μορίων του νερού, αλλά από την ειδική δομή τους. Άλλοι παράγοντες που καθορίζουν τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είναι οι δυνάμεις Van der Waals μεταξύ των υδρόφοβων ομάδων καθώς και ο περιορισμός των βαθμών ελευθερίας (κυρίως περιστροφής) των υδρόφοβων ομάδων, προκαλούμενος από τη συνάθροιση των μορίων του νερού. Η υδρόφοβη αλληλεπίδραση παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλά φαινόμενα, στη μοριακή αυτοοργάνωση, στο σχηματισμό μικκυλίων, σε διεργασίες που περιλαμβάνουν υψηλά επίπεδα συσσώματωσης, όπως στο σχηματισμό βιολογικών μεμβρανών, στον καθορισμό διαμορφώσεων των πρωτεϊνών, σε μεταβολές διαμόρφωσης των βιοπολυμερών και στη σύνδεση ενζύμου-υποστρώματος. Αντίθετα με τις ιδιότητες των υδατικών διαλυμάτων των υδρόφοβων μορίων οι οποίες προκύπτουν από τη αποπειρώμενη απόρριψη του σωματιδίου της διαλυμένης ουσίας από τον διαλύτη, η συμπεριφορά των υδατικών διαλυμάτων των πολύ πολικών ενώσεων κυριαρχείται από τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ νερού και των μορίων της διαλυμένης ουσίας. Τα φαινόμενα επιδιαλύτωσης συνεισφέρουν σημαντικά στην ελεύθερη ενέργεια διαμορφώσεων πολικών μορίων με αποτέλεσμα να προκαλούνται διαφορετικές προτιμώμενες διαμορφώσεις από τους οργανικούς διαλύτες.

### 1.4 Πολυηλεκτρολύτες

Οι πολυηλεκτρολύτες είναι πολυμερή τα οποία φέρουν ιοντικές ομάδες και αποκτούν ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε υδατικά διαλύματα, όπου οι ιοντικές ομάδες είναι ιονισμένες. Από τη σκοπιά της διάστασης σε υδατικό μέσο, οι πολυηλεκτρολύτες διαχωρίζονται σε ισχυρούς και ασθενείς. Οι ιοντιζόμενες

ομάδες των ισχυρών πολυηλεκτρολυτών δίστανται πλήρως κατά τη διαλυτοποίηση σε νερό, ενώ στην περίπτωση των ασθενών πολυηλεκτρολυτών οι αντίστοιχες ομάδες δίστανται πλήρως κατά την εξουδετέρωση, δηλαδή την αλλαγή του pH του διαλύματος. Ως εκ τούτου, οι ασθενείς πολυηλεκτρολύτες δεν είναι πλήρως φορτισμένοι σε διάλυμα και το συνολικό τους φορτίο μπορεί να μεταβληθεί συναρτήσει του pH, της συγκέντρωσης των αντισταθμιστικών ιόντων ή/και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος. [18]



Εικόνα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση ενός διαλύματος πολυηλεκτρολύτη

Συγκριτικά με τα μη ιοντικά πολυμερή οι διαφορετικές ιδιότητες που απαντώνται στους πολυηλεκτρολύτες είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού περισσότερων χαρακτηριστικών, της παρουσίας σταθερών φορτίων πάνω στην αλυσίδα του πολυμερούς, της ύπαρξης λίγο έως πολύ ελεύθερων αντισταθμιστικών ιόντων στον όγκο του διαλύματος και της συμπεριφοράς σαν μη εύκαμπτα μακρομόρια σε διαλύματα μικρής ιοντικής ισχύος. Οι αλληλεπιδράσεις Coulomb διέπουν τα υδατικά διαλύματα πολυηλεκτρολυτών, όμως υπάρχουν και άλλες αλληλεπιδράσεις όπως η υδρόφοβη αλληλεπίδραση, η δημιουργία διπόλου και η δημιουργία δεσμών υδρογόνου, οι οποίες παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στα φαινόμενα διασύνδεσης και επηρεάζουν τη συμπεριφορά και τη σταθερότητα των σχηματιζόμενων συσσωματωμάτων στο διάλυμα ή προκαλούν καταβύθιση. Η συμπεριφορά

των πολυηλεκτρολυτών στο νερό καθορίζεται κυρίως από τη διαμόρφωση της μακρομοριακής αλυσίδας. Η διαμόρφωση αυτή είναι ένα δύσκολο πρόβλημα, αντικείμενο πολλών διαφορετικών ερμηνειών, αφού είναι αποτέλεσμα μιας λεπτής ισορροπίας μεταξύ των απώσεων τύπου Coulomb μεταξύ κοντινών φορτίων, της προάσπισης της άπωσης αυτής (*screening*), εξαιτίας της επαναδιευέτησης ιόντων στο διάλυμα και της απώλειας εντροπίας εξαιτίας του εντοπισμού του νέφους των αντισταθμιστικών ιόντων. Επιπλέον, η ιοντική ισχύς του διαλύματος και η πυκνότητα φορτίου της μακρομοριακής αλυσίδας καθορίζουν την εμβέλεια των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Οι φορτισμένες αλυσίδες των πολυηλεκτρολυτών υιοθετούν περισσότερο εκτεταμένες διαμορφώσεις, συγκριτικά με τις ουδέτερες πολυμερικές αλυσίδες, λόγω των ηλεκτροστατικών απώσεων μεταξύ των φορτισμένων τμημάτων της αλυσίδας. Στη περίπτωση που αυξηθεί η ιοντική ισχύς του διαλύματος μέσω της προσθήκης άλατος επέρχεται προάσπιση των φορτίων και εξασθένιση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων του συστήματος, με αποτέλεσμα οι πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες να μεταβαίνουν σε λιγότερο εκτεταμένες διαμορφώσεις, παρόμοιες με αυτές των ουδέτερων πολυμερών σε συνθήκες καλού διαλύτη. Αυτό ονομάζεται και ως φαινόμενο του πολυηλεκτρολύτη (*polyelectrolyte effect*). Η πρακτική πλευρά του προβλήματος της διαμόρφωσης των πολυηλεκτρολυτών έχει μεγάλη σημασία αφού μια μικρή αλλαγή στο βαθμό ιοντισμού αλλάζει δραματικά τις ιδιότητες του συστήματος του πολυηλεκτρολύτη. [20] Η πυκνότητα φορτίων της μακρομοριακής αλυσίδας μπορεί να ελεγχθεί με διάφορους τρόπους. Συνήθης μέθοδος είναι ο συμπολυμερισμός ιοντικών και μη ιοντικών μονομερών. Επίσης χρησιμοποιώντας πολυμερή τα οποία περιέχουν ασθενείς όξινες ή αλκαλικές ομάδες η πυκνότητα φορτίου καθορίζεται από την ελεγχόμενη μέσω του pH διάσταση των δραστικών ομάδων. Για παράδειγμα μετατρέποντας το βαθμό εξουδετέρωσης του πολυακρυλικού οξέος, το οποίο είναι ασθενές οξύ, επιτυγχάνεται η μεταβολή του μέσου όρου των φορτισμένων μονομερών στη μακρομοριακή αλυσίδα. Ο βαθμός εξουδετέρωσης μεταβάλλεται με συνεχή τρόπο μεταβολής της ισχύος των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, που

ελέγχουν τη διαμόρφωση και τη γυροσκοπική ακτίνα της αλυσίδας του πολυηλεκτρολύτη.

#### **1.4.1 Αμφίφιλα συμπολυμερή με συστάδες πολυηλεκτρολύτη**

Τα αμφίφιλα συσταδικά συμπολυμερή που περιέχουν συστάδες πολυηλεκτρολυτών συνδυάζουν τα δομικά χαρακτηριστικά των πολυηλεκτρολυτών, των συσταδικών συμπολυμερών και των επιφανειοδραστικών ουσιών. Λόγω των ασυνήθιστων και μοναδικών ιδιοτήτων τους προσελκύουν το ενδιαφέρον των ερευνητών τις τελευταίες δεκαετίες. Πολλές από τις ιδιότητές τους εφαρμόστηκαν σε τεχνολογικές εφαρμογές και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις φυσικοχημικές ιδιότητες στις κυτταρικές δομές βιολογικών μορίων. Η αυτοοργάνωση τους σε υδατικά διαλύματα εξαρτάται από αρκετούς εξωτερικούς παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία και η αλατότητα, οι οποίες σχετίζονται με διάφορες τεχνολογικές και βιολογικές διεργασίες.[21,22] Αποτέλεσμα της αυτοοργάνωσης τους σε υδατικά διαλύματα είναι ο σχηματισμός μικκυλιακών δομών, που αποτελούνται από ένα υδρόφοβο πυρήνα και μια πολυηλεκτρολυτική κορώνα και των οποίων οι ιδιότητες εξαρτώνται από το βαθμό διάστασης των φορτισμένων ομάδων, το pH και τη συγκέντρωση του άλατος στο διάλυμα, καθώς και τις πολικές αλληλεπιδράσεις του συστήματος.

Παρά ταύτα, τα σφαιρικά μικκύλια δεν είναι η μόνη δομή που είναι αποτέλεσμα της αυτοοργάνωσης των αμφίφιλων συσταδικών συμπολυμερών με συστάδες πολυηλεκτρολυτών. Με την αύξηση του μήκους της υδρόφοβης συστάδας υπάρχει η τάση να σχηματίζονται κυστίδια πολυμερών κατά συστάδες. Με τις τεχνική cryo-TEM και AFM παρατηρήθηκαν κυστίδια που προέρχονται από την αυτοοργάνωση του συμπολυμερούς PB-P2VP.HCl. Τα κυστίδια που παρατηρήθηκαν παρουσιάζουν μια κοκκώδη επιφάνεια δύο στρωμάτων λόγω του μεγάλου αριθμού ινών και περιβάλλονται από κορώνες μικκυλίων και δίκτυο ινών. Η συνύπαρξη των σφαιρικών μικκυλίων με τα κυστίδια υπάρχει για μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων, από πολύ αραιά έως πυκνά διαλύματα. [2,18]

## 1.5 Αποκρίσιμα πολυμερή

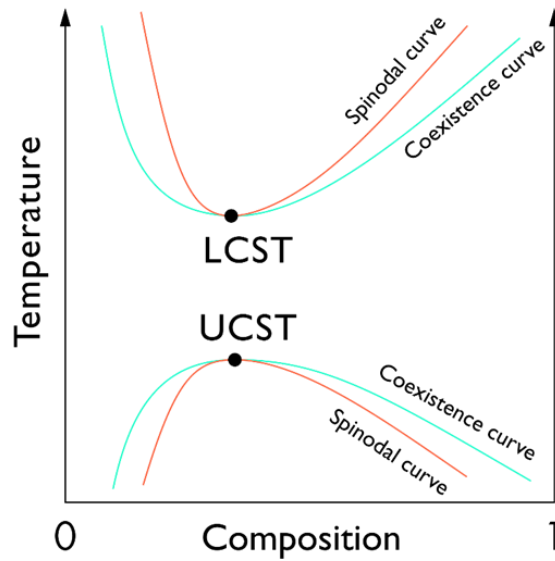
Τα τελευταία χρόνια η επιστήμη των πολυμερών στρέφεται σε υλικά τα οποία να αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα (μεταξύ των οποίων το pH, η θερμοκρασία και η ιονική ισχύς) και δημιουργούν πολυμοριακά συσσωματώματα, όπως σφαιρικά και κυλινδρικά μικκύλια, κοίλες σφαίρες (vesicles), σύμπλοκα πολυηλεκτρολυτών και «σχιζοφρενικά» μικκύλια.[23] Το ενδιαφέρον για αυτά τα πολυμερή έχει αυξηθεί εκθετικά λόγω των δυναμικών εφαρμογών στη βιομηχανία των χρωμάτων, των καλλυντικών, τον καθαρισμό του νερού, αλλά κυρίως στο πεδίο της βιοϊατρικής. Ως αποκρίσιμα σε εξωτερικά ερεθίσματα πολυμερή ορίζονται τα πολυμερή που υφίστανται σχετικά μεγάλες και άμεσες φυσικές ή χημικές μεταβολές αποκρινόμενα σε μικρές εξωτερικές αλλαγές στις συνθήκες περιβάλλοντος.[24,25] Σε αυτά τα πολυμερή έχουν δοθεί ονομασίες όπως αποκρίσιμα [25], έξυπνα [26,27] και περιβαλλοντικά ευαίσθητα[39] πολυμερή. Αυτά τα συστήματα αναγνωρίζουν ένα ερέθισμα ως σήμα, κρίνουν το μέγεθος του σήματος και μεταβάλουν τη διαμόρφωση της αλυσίδας με άμεση απόκριση. Υπάρχουν πολλά διαφορετικά ερεθίσματα που ρυθμίζουν την απόκριση των πολυμερών και μπορούν να ταξινομηθούν είτε ως χημικά, είτε ως φυσικά ερεθίσματα. Τα χημικά ερεθίσματα, όπως το pH, η ιονική ισχύς, οι ιονικοί και χημικοί παράγοντες, αλλάζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων ή μεταξύ των αλυσίδων και του διαλύτη σε μοριακό επίπεδο. Τα φυσικά ερεθίσματα, όπως η θερμοκρασία, το ηλεκτρικό ή μαγνητικό πεδίο και η μηχανική τάση, επηρεάζουν τους θερμοδυναμικούς παράγοντες (ενθαλπία και εντροπία) και μεταβάλουν τις μοριακές αλληλεπιδράσεις. Αυτές οι αποκρίσεις των πολυμερικών συστημάτων είναι πολύ χρήσιμες σε βιολογικές εφαρμογές, όπως στη μεταφορά φαρμάκων, [28,29] στη βιοτεχνολογία [30] και στη χρωματογραφία.[29] Ορισμένα πολυμερικά συστήματα συνδυάζουν απόκριση σε δυο ή περισσότερα ερεθίσματα, για παράδειγμα είναι θερμοαποκρινόμενα, αλλά και αποκρίσιμα σε μεταβολές του pH.[31,32] Από την άλλη μεριά υπάρχουν εργασίες που αναφέρουν την ταυτόχρονη επιβολή δυο ερεθισμάτων για να υπάρξει απόκριση από το πολυμερές, το οποίο ονομάζεται διπλοαποκρινόμενο.[32] Μια καινούργια κατηγορία εξωτερικού

ερεθίσματος θεωρείται το βιοχημικό ερέθισμα, το οποίο περιλαμβάνει απόκριση σε αντιγόνα, ένζυμα, υποκαταστάτες και βιοχημικούς παράγοντες.[32]

### **1.5.1 Θερμοαποκρινόμενα πολυμερή**

Η θερμοκρασία είναι ίσως το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο ερέθισμα στα αποκρίσιμα πολυμερικά συστήματα. Η μεταβολή της θερμοκρασίας δεν είναι μόνο σχετικά εύκολο να ελεγχθεί, αλλά επίσης είναι εύκολο να χρησιμοποιηθεί τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Για παράδειγμα θερμοαποκρινόμενα υδροπηκτώματα ή μικκύλια, που περιέχουν φάρμακα μπορούν να εφαρμοστούν *in vivo*. Μια από τις μοναδικές ιδιότητες των θερμοαποκρινόμενων πολυμερών είναι η ύπαρξη μιας κρίσιμης θερμοκρασίας διάλυσης (Lower Critical Solution Temperature, LCST). Η LCST είναι η θερμοκρασία στην οποία η φάση του πολυμερούς και του διαλύματος αλλάζουν ασυνεχώς σύμφωνα με τη σύστασή τους. Αν το διάλυμα του πολυμερούς (κυρίως υδατικό) έχει μια φάση κάτω από μια θερμοκρασία, ενώ παρατηρείται διαχωρισμός φάσεων πάνω από τη θερμοκρασία αυτή, τότε αυτό το πολυμερές έχει LCST. Αλλιώς ονομάζεται ανώτατη κρίσιμη θερμοκρασία διάλυσης (Upper Critical Solution Temperature, UCST). Ωστόσο οι περισσότερες εφαρμογές σχετίζονται με πολυμερικά συστήματα που εμφανίζουν LCST.[33] Συρρίκνωση των αλυσίδων λαμβάνει χώρα πριν τη διαμοριακή συσσωμάτωση στην LCST και αυτή η συρρίκνωση των μεμονωμένων αλυσίδων αυξάνει τη σκεδαζόμενη ακτινοβολία από το διάλυμα (σημείο θολώσεως, cloud point). Ο διαχωρισμός φάσεων μεταξύ του πολυμερούς και του διαλύτη παρατηρείται στο σημείο θολώσεως.





**Εικόνα 1.4: Αναπαράσταση της μετάπτωσης φάσης που συνδέεται με την LCST και UCST**

Ο λόγος για τον οποίο ο διαχωρισμός φάσεων ευνοείται περισσότερο όταν αυξάνεται η θερμοκρασία είναι κυρίως εξαιτίας της εντροπίας του συστήματος. Συγκεκριμένα, η κινητήρια δύναμη είναι η εντροπία του νερού, που όταν το πολυμερές δεν βρίσκεται εντός του διαλύματος, το νερό είναι λιγότερο οργανωμένο και έχει μεγαλύτερη εντροπία. Αυτό ονομάζεται επίσης "φαινόμενο υδροφοβικότητας". Γενικά δυο είδη διαμοριακών δυνάμεων θεωρείται ότι υπάρχουν: οι δεσμοί υδρογόνου και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Με μεταβολή της θερμοκρασίας μπορεί να δημιουργούνται ή να καταστρέφονται δεσμοί υδρογόνου με συνέπεια υδροπηκτώματα αποτελούμενα από πολυοξέα (πρωτονιοδότης σε χαμηλό pH) και πολυαμίδια (πρωτονιοδέκτης) να διογκώνονται και να συρρικνώνονται αντιστρεπτά γύρω από μια κρίσιμη θερμοκρασία.[34,35] Από την άλλη μεριά η διαμοριακή συσσωμάτωση μπορεί να ελεγχθεί από την ισορροπία υδρόφιλου-υδρόφοβου και τη θερμοκρασία.[35] Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα πολυμερούς με LCST είναι το πολυ(N-ισοπροπυλ-ακρυλαμίδιο), PNIPAAm, το οποίο εμφανίζει απότομη μεταβολή φάσης στο νερό στους 32°C.[33]

Η LCST ενός θερμοαποκρινόμενου πολυμερούς επηρεάζεται από την ύπαρξη υδρόφιλων ή υδρόφοβων τμημάτων στις πολυμερικές αλυσίδες.

Γενικά για να αυξηθεί η LCST ενός τέτοιου πολυμερούς αρκεί ο στατιστικός συμπολυμερισμός του με ένα μικρό ποσοστό υδρόφιλου μονομερούς.[35] Αντίθετα μικρή ποσότητα υδρόφοβου συστατικού έχει παρατηρηθεί να ελαττώνει την LCST του συμπολυμερούς.[34] Συνεπώς η LCST θα μπορούσε να ελεγχθεί με ενσωμάτωση υδρόφιλων ή υδρόφοβων τμημάτων σε μια επιθυμητή τιμή. Η ρύθμιση της LCST κοντά στη θερμοκρασία του σώματος είναι πολύ σημαντική για εφαρμογές μεταφοράς φαρμάκων.

Όπως περιγράφηκε και προηγουμένως τα θερμο-αποκρίσιμα πολυμερή (PNIPAAm, PEO, PEGMA) εμφανίζουν LCST σε υδατικά μέσα, πάνω από την οποία η συμπεριφορά αυτών των πολυμερών μετατρέπεται από υδρόφιλη σε υδρόφοβη (λιγότερο υδρόφιλη). Αυτή η ρυθμιζόμενη ιδιότητα έχει αξιοποιηθεί ως βασική αρχή για τη δημιουργία ενός πολυμερικού συστήματος, του οποίου η αμφιφιλικότητα θα μεταβάλλεται σύμφωνα με αλλαγές στη θερμοκρασία γύρω από την LCST, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ή τη διάλυση θερμοαποκρινόμενων μικκυλίων. Δυο είδη μικκυλιακών δομών από πολυμερή με μια θερμοαποκρινόμενη συστάδα μπορούν να δημιουργηθούν είτε με θερμοαποκρινόμενη κορώνα, είτε με θερμοαποκρινόμενο πυρήνα. Στη μια περίπτωση η θερμοαποκρινόμενη συστάδα έχει συνδυαστεί με μια υδρόφοβη συστάδα, ενώ στην άλλη περίπτωση έχει συνδυαστεί με μια υδρόφιλη συστάδα.[36] Ο Armes και οι συνεργάτες του [37] επίσης ανέφεραν τη δημιουργία θερμοαποκρινόμενων μικκυλίων. Χρησιμοποίησαν δισυσταδικά συμπολυμερή των DMAEMA/MEMA, τα οποία έχουν θερμο-εξαρτώμενη υδροφιλικότητα. Αρχικά τα μικκύλια σταθεροποιήθηκαν στους 60°C και με ψύξη στους 25°C παρατηρήθηκε διόγκωση του πυρήνα λόγω αύξησης της υδροφιλικότητάς του. Αυτό το φαινόμενο ήταν αντιστρεπτό μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους θέρμανσης/ψύξης.

### **1.5.2 pH-Αποκρινόμενα πολυμερή**

Τα pH-αποκρινόμενα πολυμερή είναι μια κατηγορία αποκρίσιμων πολυμερών που υφίστανται αλλαγές στη δομή και στις ιδιότητές τους, όπως η επιφανειακή τάση, η διαμόρφωση της αλυσίδας, η διαλυτότητα και η χωροδιάταξη τους, όταν μεταβάλλεται το pH του διαλύματος. [38] Αποτελούνται από μονομερή

που μπορούν να ιονιστούν, δηλαδή να δώσουν ή να λάβουν πρωτόνια σε απόκριση με τη μεταβολή του pH. Τα pH-αποκρινόμενα πολυμερικά συστήματα λόγω των αξιόλογων ιδιοτήτων που παρουσιάζουν χρησιμοποιούνται σε πλήθος εφαρμογών, όπως στη μεταφορά φαρμάκων, στη γονιδιακή θεραπεία, σε αισθητήρες, μεμβράνες και σε μεθόδους χρωματογραφίας.

Τα πολυμερή που αποκρίνονται στο pH είναι γραμμικά, διακλαδισμένα ή σχηματίζουν δίκτυα. Μπορεί να δείχνουν διαφορετική απόκριση σε συνθήκες διαλύματος και διαφορετικές συμπεριφορές κατά την αυτοοργάνωσή τους, ανάλογα με τη δομή τους. Για παράδειγμα, η μεταβολή του pH μπορεί να προκαλέσει (από)πρωτονίωση των δραστικών ομάδων της πολυμερικής αλυσίδας. Σε ορισμένες περιπτώσεις όταν πρόκειται για ομοπολυμερή η (απο)πρωτονίωση των δραστικών ομάδων μπορεί να προκαλέσει κροκκίδωση, κατάρρευση της αλυσίδας, καταβύθιση, αλλά και να έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό μικκυλίων, ελεύθερων αλυσίδων, κυστιδίων, δίογκωση και αποδίογκωση. Καθώς το pH αλλάζει ο βαθμός ιονισμού του πολυμερούς αλλάζει δραματικά γύρω από μια συγκεκριμένη τιμή pH, που ονομάζεται pKa. Αυτή η γρήγορη αλλαγή στο συνολικό φορτίο της αλυσίδας προκαλεί μεταβολή του υδροδυναμικού όγκου των πολυμερικών αλυσίδων. Η μετάβαση από συρρικνωμένη σε εκτεταμένη διαμόρφωση ερμηνεύεται από την οσμωτική πίεση, που προκαλούν τα αντισταθμιστικά ιόντα των φορτίων των αλυσίδων.[38]

Υπάρχουν δυο είδη αποκρινόμενων στο pH πολυηλεκτρολυτών: ασθενή πολυοξέα και ασθενείς πολυβάσεις. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα ασθενούς πολυοξέως είναι το πολυακρυλικό οξύ, το οποίο είναι ουδέτερο σε χαμηλό pH, ενώ ιονίζεται σε υψηλό pH.[39] Από την άλλη μεριά πολυβάσεις, όπως η 4-βινυλοπυριδίνη, ο πολυ(μεθακρυλικός εστέρας της διμεθυλοαμινοαιθανόλης) (PDMAEMA) και ο πολυ(μεθακρυλικός εστέρας της διαιθυλοαμινοαιθανόλης) (PDEAEMA) είναι πρωτονιωμένοι σε χαμηλό pH και ουδέτεροι σε υψηλό pH.[40] Πιο συγκεκριμένα η αμινομάδα των PDMAEMA και PDEAEMA είναι ουδέτερη σε αλκαλικό περιβάλλον, ενώ φορτίζεται θετικά (προσλαμβάνοντας ένα πρωτόνιο) σε όξινο περιβάλλον. Οι μεγαλύτερες υδρόφοβες ομάδες του

PDEAEMA το καθιστούν συνολικά πιο υδρόφοβο και προκαλούν ισχυρότερες υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις σε υψηλό pH. Τόσο το PDMAEMA, όσο και το PDEAEMA καταβυθίζονται σε  $pH > 8$  λόγω της αποπρωτονίωσης των αμινοομάδων.[41] Η πολυ(4 ή 2-βυνιλοπυριδίνη) (PVP) εμφανίζει επίσης ευαισθησία σε μεταβολές του pH. Στο πολυμερές αυτό παρατηρείται μεταβολή φάσεων σε  $pH < 5$ , που οφείλεται στην πρωτονίωση/αποπρωτονίωση των ομάδων της πυριδίνης. [42] Συνεπώς η κατάλληλη επιλογή μεταξύ πολυοξέων και πολυβάσεων πρέπει να γίνει για κάθε διαφορετική εφαρμογή. Τα υδρόφοβα τροποποιημένα pH-ευαίσθητα πολυμερή έχουν μια ευαίσθητη ισορροπία μεταξύ ηλεκτροστατικών απώσεων και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Όταν οι ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις εξαφανίζονται, τότε υπερισχύουν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, με αποτέλεσμα να προκαλείται συσσωμάτωση των πολυμερικών αλυσίδων σε υδατικό περιβάλλον. Η ρύθμιση του κατάλληλου κρίσιμου pH ( $pH^*$ ), στο οποίο παρατηρούνται αντιστρεπτές μεταβολές στη διαμόρφωση των αλυσίδων, είναι ένας σημαντικός παράγοντας στις εφαρμογές των pH-αποκρίσιμων πολυμερών. Η περιοχή pH, στην οποία παρατηρείται μια αντιστρεπτή μεταβολή της φάσης μπορεί να ρυθμιστεί με δυο τρόπους είτε επιλέγοντας πολυοξέα και πολυβάσεις, των οποίων τα  $pK$  συμπίπτουν με εκείνη την περιοχή pH, είτε με ενσωμάτωση ενός υδρόφοβου τμήματος στην πολυμερική αλυσίδα του πολυοξέος ή της πολυβάσης με αποτέλεσμα το  $pK$  να συμπίπτει με το  $pH^*$ . Η δεύτερη περίπτωση έχει μελετηθεί συστηματικά αλλάζοντας το ποσοστό του υδρόφοβου τμήματος στην πολυμερική αλυσίδα.

### 1.5.3 Επίδραση ιοντικής ισχύος

Η αποκρισιμότητα στην ιοντική ισχύ είναι με τυπική ιδιότητα όταν πρόκειται για πολυμερή που περιέχουν ιοντικές ομάδες. Αλλαγές στην ιοντική ισχύ μπορεί να προκαλούν αλλαγές στο μέγεθος των πολυμερικών μικκυλίων, στη διαλυτότητα του πολυμερούς και στην κινητική απόσβεσης φθορισμού των χρωμοφόρων που είναι δεσμευμένες. Οι πολυαμφούτες περιέχουν ανιοντικά και κατιοντικά φορτία στην ίδια πολυμερική αλυσίδα και για τον λόγο αυτό η συμπεριφορά τους σε διαλύματα εξαρτάται από την αναλογία ιόντων που είναι ενσωματωμένα στο πολυμερές. Η αναλογία αυτή μπορεί να τροποποιηθεί

μέσω συνθετικών πορειών και εξωγενών αλλαγών στο υδατικό περιβάλλον, συγκεκριμένα μεταβάλλοντας το pH. [43] Η προσθήκη άλατος στο σύστημα πολυμερούς/διαλύτη μπορεί να επηρεάσει την θέση της μετάπτωσης φάσης. Η παρουσία αλάτων διαταράσσει την δομή ενυδάτωσης γύρω από τις πολυμερικές αλυσίδες με αποτέλεσμα την μείωση της θερμοκρασίας διαχωρισμού φάσεων.[27] Αυτή η δράση εξαρτάται από το είδος των ιόντων και περιγράφεται από τις σειρές Hofmeister. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω μεταβολή της ιοντικής ισχύος επιφέρει αλλαγές στη διαλυτότητα. Ειδικότερα, λόγω του ανταγωνισμού των πολυμερικών μορίων με τα ιόντα του άλατος για τα μόρια νερού που απαιτούνται για την επιδιαιλούσά τους, η διαλυτότητα μειώνεται (γνωστό και σαν φαινόμενο εξαλάτωσης-salting out). Σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων τα μόρια του νερού που είναι διαθέσιμα για την διαλυτότητα των πολυμερών δεν είναι αρκετά καθώς η πλειονότητά τους συνδέεται ισχυρά με τα άλατα. Έτσι, οι αλληλεπιδράσεις πολυμερούς-πολυμερούς υπερτερούν των αλληλεπιδράσεων πολυμερούς-νερού, οπότε σχηματίζονται συσσωματώματα με αποτέλεσμα την καταβύθιση των πολυμερικών μορίων.

## 1.6 Σύμπλεξη πολυμερών με DNA

Η γονιαδική θεραπεία αποτελεί μια διαφορετική προσέγγιση στη θεραπεία των εγγενών ή επίκτητων ασθενειών σε σχέση με τα συμβατικά φαρμακευτικά προϊόντα. Η πολλά υποσχόμενη αυτή θεραπεία βασίζεται στη εισαγωγή θεραπευτικών γονιδίων σε στοχευμένα κύτταρα προκειμένου να παραχθούν βιοενεργοί παράγοντες οι οποίοι θα αντικαταστήσουν τα ελαττωματικά γονίδια ή θα παύσουν την ανεπιθύμητη γονιαδική έκφραση. Η μη ιογενής γονιαδική θεραπεία, έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι της χρήσης ιογενών φορέων όπως η ασφάλεια, το μικρό κόστος παραγωγής και ο σωστός μακρομοριακός σχεδιασμός για τη μεταφορά του DNA.

Ανάμεσα στους μη ιογενείς φορείς οι κατιοντικοί πολυηλεκτρολύτες ξεχωρίζουν, καθώς μειώνουν τον ανοσογονικό κίνδυνο και προσφέρουν τη δυνατότητα σχεδιασμού μακρομοριακών δομών για την απόκτηση εξατομικευμένων υλικών. Τα πολυκατιόντα σχηματίζουν σύμπλοκα με τα

νουκλειϊκά οξέα προκειμένου να μεταφέρουν DNA στα κύτταρα. Τα νανοσωματίδια των συμπλόκων καταστέλλουν την αποικοδόμηση του DNA κατά τη μεταφορά του στον πυρήνα και μεταγενέστερα το απελευθερώνουν. Παραδείγματα κατιοντικών μακρομορίων που έχουν χρησιμοποιηθεί σαν μεταφορείς γενετικού υλικού είναι η χιτοσίνη και οι πολυαιθυλενοϊμίνες.[44] Η σύμπλεξη των πολυηλεκτρολυτών και DNA σε υδατικό μέσο είναι αποτέλεσμα των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αντίθετων φορτίων των δυο ειδών μακρομορίων. Η διαδικασία της σύμπλεξης καθώς και η δομή των σχηματιζόμενων συμπλόκων επηρεάζονται από πλήθος παραμέτρων, με σημαντικότερες την αναλογία μεταξύ των δύο συστατικών, τη συγκέντρωση, το pH, τη θερμοκρασία και την ιοντική ισχύ του διαλύματος. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει το μοριακό βάρος, η πυκνότητα του φορτίου, η ακαμψία και η υδροφοβικότητα της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας, καθώς και η διαμόρφωση και η επιφανειακή κατανομή του μακρομορίου. [44]

### **1.7 Εγκλωβισμός φαρμάκων στα συσσωματώματα συσταδικών συμπολυμερών**

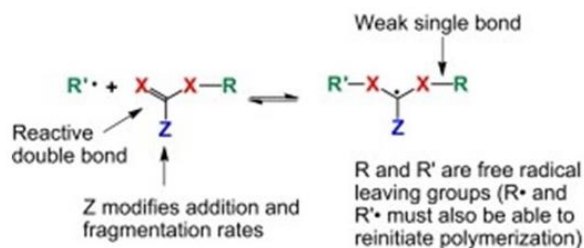
Τα συσσωματώματα που σχηματίζονται από την αυτοοργάνωση των αμφίφιλων συσταδικών συμπολυμερών σε υδατικά μέσα, αποτελούν μια κατηγορία φαρμακευτικών νανοφορέων που έχει συγκεντρώσει έντονο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, λόγω των ιδιοτήτων που παρουσιάζουν. Αρχικά, τα υδρόφοβα φάρμακα μπορούν να εγκλωβιστούν στον πυρήνα των μικκυλίων των συσταδικών πολυμερών και να μεταφερθούν σε συγκεντρώσεις που ξεπερνούν την εγγενή διαλυτότητά τους στο νερό. Επιπρόσθετα υδρόφιλες συστάδες οι οποίες συχνά απαρτίζονται από πολυαιθυλενοξειδίο (PEO), σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα υδατικά μέσα και σχηματίζουν σφιχτές κορώνες που περιβάλλουν τον πυρήνα του μικκυλίου με αποτέλεσμα τα συστατικά του πυρήνα να προστεούνται από την υδρόλυση και την ενζυματική αποικοδόμηση. Επιπλέον, λόγω της PEO κορώνας αποφεύγεται η αναγνώριση του φαρμάκου που έχει εγκλωβιστεί στον πυρήνα από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα και συνεπώς η εξάλειψη των μικκυλίων από τη κυκλοφορία του αίματος. Ένα τελευταίο χαρακτηριστικό των αμφίφιλων συμπολυμερών στο οποίο οφείλεται η εφαρμογή τους ως φαρμακευτικοί

νανοφορείς είναι η εύκολη τροποποίηση της χημική τους σύστασης, του συνολικού μοριακού τους βάρους και του μήκους της κάθε συστάδας με αποτέλεσμα το μέγεθος και η μορφολογία των μικκυλίων να μπορούν να διαμορφωθούν ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες. [45]

### **1.8 Πολυμερισμός αντιστρεπτής προσθήκης–μεταφοράς αλυσίδας με απόσπαση (RAFT polymerization) [46,47,48,49]**

Οι πρώτες βιβλιογραφικές αναφορές για τον πολυμερισμό αντιστρεπτής μεταφοράς αλυσίδας με προσθήκη και απόσπαση (Reversible Addition Fragmentation Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization, RAFT) αναφέρθηκαν πρώτη φορά το 1998 και από τότε έχει εξελιχθεί σε μια πολυχρηστική τεχνική για την σύνθεση πολύπλοκων πολυμερικών αρχιτεκτονικών. Ο πολυμερισμός RAFT μαζί με τον πολυμερισμό με χρήση νιτροξειδικών ριζών (Nitroxide Mediated Polymerization, NMP) και τον πολυμερισμό αντιστρεπτής μεταφοράς ατόμου (Atom Transfer Radical Polymerization, ATRP) αποτελούν τεχνικές ζωντανού/ελεγχόμενου πολυμερισμού (Controlled Radical Polymerization, CRP), μιας διαδικασίας η οποία μιμείται τα χαρακτηριστικά του ζωντανού πολυμερισμού ενώ ταυτόχρονα επωφελείται από την προσαρμοστικότητα ενός ριζικού. Ο πολυμερισμός RAFT επιτρέπει τη σύνθεση όχι μόνο συμπολυμερών με καθορισμένη αρχιτεκτονική όπως τα κατά συστάδες, εμβολιασμένα, διακλαδισμένα, αστεροειδή, αλλά και πολυμερών αποκρίσιμων σε χημικά και φυσικά ερεθίσματα τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως σε βιολογικές εφαρμογές. Με τη χρήση της τεχνικής RAFT συντίθενται σύνθετες πολυμερικές αρχιτεκτονικές με προβλεπόμενο μοριακό βάρος, στενές κατανομές μοριακών βαρών, ακραίες ομάδες υψηλής πιστότητας και τη δυνατότητα για συνεχιζόμενη αύξηση της αλυσίδας. Ο πολυμερισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος χρησιμοποιώντας ως διαλύτη νερό, χωρίς τη χρήση προστατευτικών ομάδων. Επίσης η διαδικασία διεξαγωγής του δεν είναι τόσο σύνθετη και απαιτητική σε αντίθεση με άλλα είδη πολυμερισμού.

Η ενσωμάτωση λειτουργικών μονομερών και η επιλογή του κατάλληλου μέσου μεταφοράς αλυσίδας (Chain Transfer Agent, CTA) επιτρέπει την τροποποίηση των πλευρικών ή ακραίων ομάδων μετά τον πολυμερισμό.



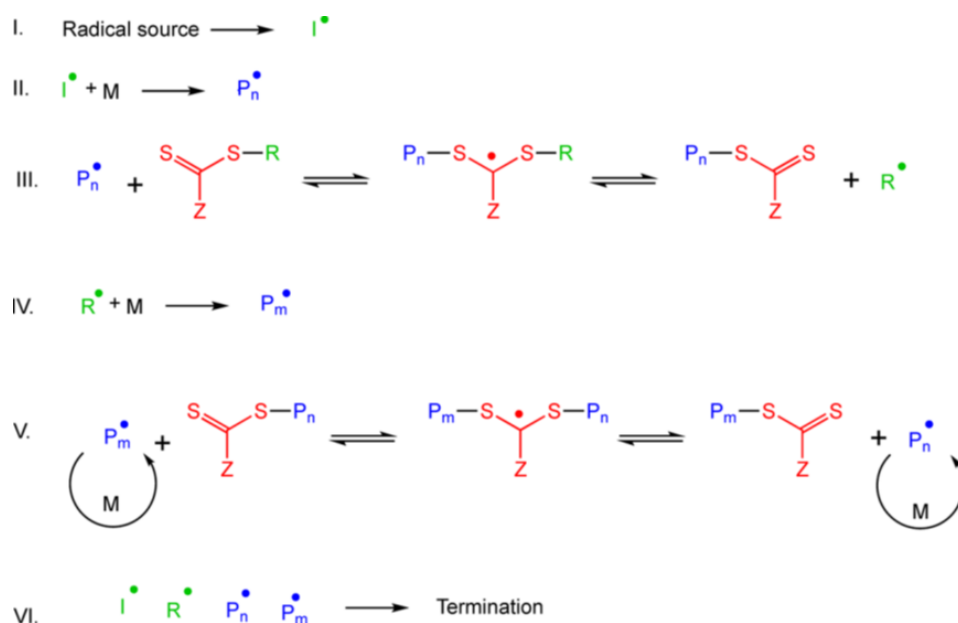
**Σχήμα 1.1: Δομικά χαρακτηριστικά του thiocarbonylthio CTA και το ενδιάμεσο προϊόν που σχηματίζεται κατά τη προσθήκη ριζών**

Ο RAFT βασίζεται στην ισορροπία μεταξύ ενεργών και αδρανών αλυσίδων και επιτυγχάνεται μέσω εκφυλιστικής μεταφοράς. Σε ένα σύστημα εκφυλιστικής μεταφοράς ο συνολικός αριθμός ριζών κατά τη διαδικασία ενεργοποίησης-απενεργοποίησης δεν μεταβάλλεται και ως εκ τούτου απαιτείται μια πηγή παραγωγής ριζών, συνήθως ένας ριζικός απαρχητής. Καθώς ο RAFT αποτελεί ουσιαστικά ριζικό πολυμερισμό που διεξάγεται με την παρουσία ενός CTA, το στάδιο της εκκίνησης μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση παραδοσιακών ριζικών απαρχητών, όπως αζωενώσεις, υπεροξειδία, οξειδοαναγωγικά συστήματα έναρξης, φωτοαπαρχητές και ακτινοβολία-γ.

Ο μηχανισμός RAFT (Σχήμα 1.2) είναι αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ προσθήκης και απόσπασης. Η έναρξη και ο τερματισμός πραγματοποιείται όπως και στον κλασικό ριζικό πολυμερισμό. Η πρόδρομη ρίζα  $I\bullet$  προστίθεται στο μονομερές παράγοντας μια διαδιδόμενη ολιγομερική αλυσίδα ( $P_n\bullet$ ), η οποία αντιδρά με το CTA ( $RSC(Z)=S$ ) προκειμένου να δημιουργηθεί μια ενδιάμεση ρίζα, η οποία στη συνέχεια θραυσατοποιείται και δημιουργείται ένα νέο είδος ρίζας ( $R\bullet$ ) και μιας πολυμερικής thiocarbonylthio ένωσης. Το στάδιο προ-ισορροπία (pre-equilibrium) ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται ώστε όλα τα θραύσματα  $R\bullet$  να προσθέσουν μονομερικές μονάδες για να σχηματιστούν νέες διαδιδόμενες αλυσίδες  $P_m\bullet$  και διέπεται από τις τέσσερις



σταθερές  $k_{\text{add}}$ ,  $k_{-\text{add}}$ ,  $k_{\beta}$  και  $k_{-\beta}$ . Η ταχεία ισορροπία μεταξύ των ενεργών διαδιόμενων ριζών ( $P_n^\bullet$  και  $P_m^\bullet$ ) και των αδρανών πολυμερικών thiocarbonylthio ενώσεων δίνει ίσες πιθανότητες για όλες τις αλυσίδες να αναπτυχθούν και επιτρέπει την παραγωγή πολυμερών με στενές κατανομές μοριακών βαρών. Όταν ο πολυμερισμός ολοκληρωθεί (ή διακοπεί), οι περισσότερες αλυσίδες διατηρούν την thiocarbonylthio ακραία ομάδα. Στην περίπτωση που οι ενεργές αλυσίδες αντιδρούν μεταξύ τους, σχηματίζονται αλυσίδες που δεν μπορούν να αντιδράσουν περαιτέρω και συνεπώς επέρχεται ο τερματισμός του πολυμερισμού. Ο τερματισμός μπορεί να συμβεί με δύο τρόπους, με διαμοριακό συνδυασμό (*bimolecular combination*), είτε με δυσαναλογία/ανακατανομή (*disproportionation*). Όταν ο αρχικός τρόπος τερματισμού είναι διαμοριακός συνδυασμός, ο αριθμός των νεκρών αλυσίδων δημιουργείται με το μισό των αλυσίδων να προέρχονται από τον απαρχητή. Στην περίπτωση όπου η δυσαναλογία είναι ο κυρίαρχος τρόπος τερματισμού, ο αριθμός των νεκρών αλυσίδων δημιουργείται με τον συνολικό αριθμό των αλυσίδων που προέρχονται από τον απαρχητή. Ιδανικά, η ενεργή ρίζα είναι επαρκώς παρεμποδισμένη έτσι ώστε να μην υφίσταται αντιδράσεις τερματισμού.



Σχήμα 1.2: Μηχανισμός πολυμερισμού RAFT

Η αποτελεσματικότητα του CTA εξαρτάται από το μονομερές που έχει επιλεχθεί και εξαρτάται από τις ιδιότητες της αποχωρούσας ομάδας R και της ομάδας Z η οποία καθορίζει την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση του (thiocarbonyl) διπλού δεσμού του CTA και τροποποιεί τη σταθερότητα των ενδιάμεσων ριζών. Για ένα αποτελεσματικό πολυμερισμό RAFT, θα πρέπει να ισχύουν τα παρακάτω:

- Ο αρχικός CTA και ο CTA στα άκρα του πολυμερούς πρέπει να έχουν έναν ενεργό διπλό δεσμό C=S (υψηλή  $k_{add}$ ).
- Οι ενδιάμεσες ρίζες πρέπει να αποσπώνται εύκολα (υψηλή  $k_{\beta}$ , ασθενής δεσμός S-R στο ενδιάμεσο) και να μην δίνουν παράπλευρες αντιδράσεις
- Η μετατροπή των ενδιάμεσων ριζών σε προϊόντων πρέπει να ευνοείται ( $k_{\beta} \geq k_{-add}$ ).
- Οι ρίζες που έχουν αποσπαστεί ( $R\cdot$ ) πρέπει να επανεκκινούν αποτελεσματικά τον πολυμερισμό ( $k_i > k_p$ ).

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του πολυμερισμού RAFT είναι η ικανότητά του να πολυμερίζει μεγάλη ποικιλία μονομερών. Τα περισσότερα βινυλικά μονομερή μπορούν να διαιρεθούν σε δυο κατηγορίες ανάλογα τη δραστηρότητά τους. Τα "Περισσότερο δραστικά" ("More activated" monomers /MAMs) έχουν την βινυλική τους ομάδα συζευγμένη με διπλό δεσμό (π.χ βουταδιένιο), αρωματικό δακτύλιο (π.χ στυρένιο), καρβονυλική ομάδα (π.χ (μεθ)ακρυλικά) ή νιτρίλιο (π.χ ακρυλονιτρίλιο). Τα "Λιγότερο δραστικά" ("Less activated" monomers /LAMs), έχουν διπλό δεσμό γειτονικά με μονήρη ζεύγη ηλεκτρονίων οξυγόνου, αζώτου, θείου, αλογόνου ή κορεσμένους άνθρακες (π.χ N-βινυλοπυριλιδόνη, 1-αλκένια). Ο RAFT διασφαλίζει τον έλεγχο στον πολυμερισμό των περισσότερων μονομερών που είναι διαθέσιμα για πολυμερισμό μέσω ελευθέρων ριζών. Εξαιρέσεις αποτελούν μονομερή των οποίων η λειτουργική πλευρική ομάδα μπορεί να υφίσταται παράπλευρες αντιδράσεις με την thiocarbonylthio ομάδα του CTA. Όντως, μονομερή με πυρηνόφιλους υποκαταστάτες όπως οι πρωτοταγείς και οι δευτεροταγείς αμίνες είναι

περισσότερο απαιτητικά, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρκεί οι πειραματικές συνθήκες να ρυθμιστούν, για παράδειγμα πρωτονιώνοντας την αμινομάδα.

Ιδανικά κατά τον πολυμερισμό RAFT η εκκίνηση όλων των πολυμερικών αλυσίδων γίνεται από τα θραύσματα  $R\bullet$  του CTA. Είναι ξεκάθαρο λοιπόν πως ο βαθμός πολυμερισμού ελέγχεται από την αναλογία μονομερούς/CTA και όχι μονομερούς/απαρχητή. Εντούτοις, ένα μικρό ποσοστό αλυσίδων αναπόφευκτα εκκινείται από πρόδρομες ρίζες ( $I\bullet$ ). Συνεπώς, τα δύο πιο σημαντικά κριτήρια ώστε να υπάρχει έλεγχος του μοριακού βάρους σε έναν πολυμερισμό RAFT είναι η επιλογή του κατάλληλου CTA για τον πολυμερισμό του επιθυμητού μονομερούς και η επαρκώς υψηλότερη συγκέντρωση CTA σε σχέση με αυτή του απαρχητή. Σύμφωνα με τον μηχανισμό RAFT, οι πιθανές πηγές παραγωγής πολυμερικών αλυσίδων είναι δύο: τα θραύσματα του απαρχητή και η αποχωρούσα ομάδα του CTA ( $R\bullet$ ). Έτσι, το θεωρητικό μέσο μοριακό βάρος κατ' αριθμό  $\langle M_n \rangle$  μπορεί να προσδιοριστεί σύμφωνα με την εξίσωση:

$$M_{n,th} = \frac{[M]_0 M_{MW} \rho}{[CTA]_0 + 2f[I]_0(1 - e^{-k_d t})} + CTA_{MW} \quad (1.10.1)$$

Όπου  $[M]_0$  η αρχική συγκέντρωση μονομερούς,  $M_{MW}$  το μοριακό βάρος του μονομερούς,  $\rho$  είναι η μετατροπή του μονομερούς,  $[CTA]_0$  η αρχική συγκέντρωση του CTA,  $f$  η αποδοτικότητα του απαρχητή,  $[I]_0$  η αρχική συγκέντρωση του απαρχητή,  $k_d$  η σταθερά ρυθμού αποσύνθεσης του απαρχητή και  $CTA_{MW}$  είναι το μοριακό βάρος του απαρχητή.

Σε έναν καλά σχεδιασμένο πολυμερισμό RAFT, με υψηλή συγκέντρωση CTA σε σχέση με τον απαρχητή, το ποσοστό των αλυσίδων που προέρχονται από τον απαρχητή είναι μικρότερο του 5% και έτσι οι όροι που αντιστοιχούν σε αυτές τις αλυσίδες μπορούν να παραληφθούν και η εξίσωση να πάρει τη μορφή:

$$M_{n,th} = \frac{[M]_0 M_{MWP}}{[CTA]_0} + CTA_{MW} \quad (1.10.2)$$

με αποτέλεσμα η σχέση μοριακού βάρους και μετατροπής του μονομερούς να είναι γραμμική επιτρέποντας καλά καθορισμένα μοριακά βάρη με μικρές τιμές κατανομής μοριακών βαρών.

### 1.9 Σκοπός της παρούσας εργασίας

Πρωταρχικός σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η επιτυχής σύνθεση καινοτόμων αμφίφιλων δισυσταδικών συμπολυμερών, του τύπου πολυ(μεθακρυλικού εστέρα της διμεθυλοαμινοαιθανόλης-co-μεθακρυλικού εστέρα της δωδεκανόλης)-b-πολυ(μεθακρυλικού εστέρα της αιθυνοελογλυκόλης) ([poly(2-dimethylamino ethyl methacrylate)-co-(lauryl methacrylate)]-b-poly[oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate]), P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA). Αρχικά έγινε η σύνθεση της τυχαίας συστάδας P(DMAEMA-co-LMA) και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε σαν παράγοντας μεταφοράς αλυσίδας για τη σύνθεση δισυσταδικού συμπολυμερούς.

Στη συνέχεια τα παραπάνω συμπολυμερή μετατράπηκαν σε συμπολυμερή του τύπου QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA) με την αντίδραση τεταρτοταγοποίησης της τριτοταγούς αμινομάδας της συστάδας του PDMAEMA. Με αυτόν τον τρόπο η PDMAEMA συστάδα μετατράπηκε από ασθενή κατιοντικό πολυηλεκτρολύτη σε ισχυρό κατιοντικό πολυηλεκτρολύτη.

Μετά την επιτυχή σύνθεση των συμπολυμερών το ενδιαφέρον στράφηκε στην μελέτη της αυτοοργάνωσης των συμπολυμερών σε υδατικά διαλύματα και στην απόκριση την οποία παρουσιάζουν στην αλλαγή του pH, της θερμοκρασίας και της ιοντικής ισχύος. Ακολούθως, μελετήθηκε η δυνατότητα σύμπλεξης των πολυηλεκτρολυτικών συμπολυμερών QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA) με μόρια DNA προκειμένου να διερευνηθεί αν τα συστήματα αυτά μπορούν να δράσουν ως φορείς γονιδίων. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ο εγκλωβισμός του υδρόφοβου φαρμάκου κουρκουμίνη στο υδρόφοβο τμήμα των δισυσταδικών συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA) προκειμένου να εξεταστεί η ικανότητά τους ως νανοφορείς φαρμάκων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

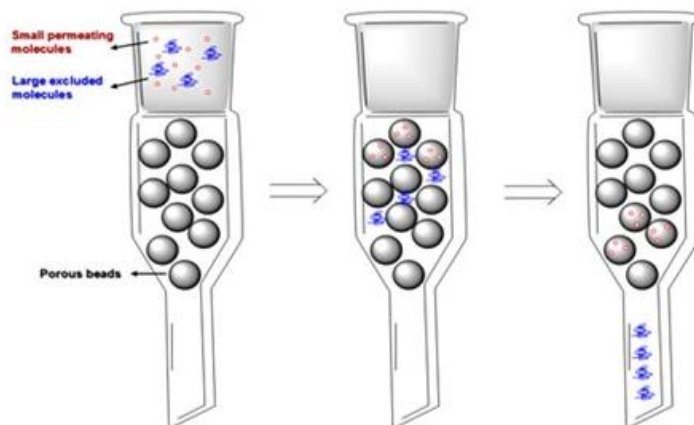
### ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ

#### 2.1 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC)

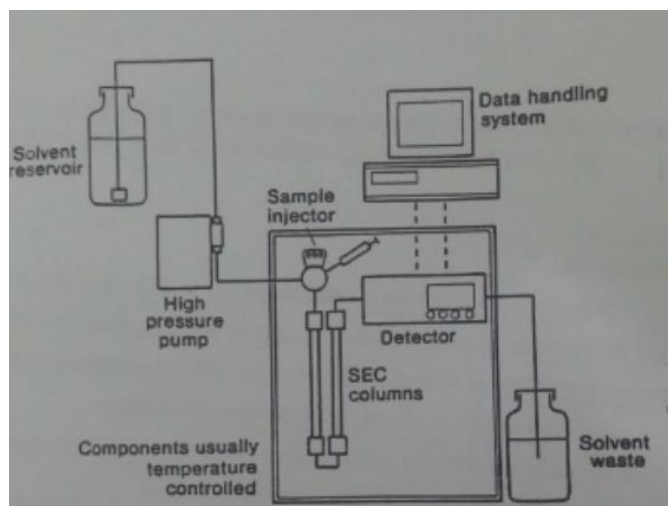
Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC), είναι μια από τις σημαντικότερες μεθόδους προσδιορισμού του μοριακού βάρους και της κατανομής μοριακών βαρών των πολυμερών. Βασίζεται στο διαχωρισμό των μακρομοριακών αλυσίδων βάσει του μεγέθους τους και για αυτόν το λόγο ονομάζεται και χρωματογραφία διαπερατότητας μέσω πηκτής (Gel Permeation Chromatography, GPC). Κατά τη διάρκεια της χρωματογραφίας SEC, τα μακρομόρια διαχωρίζονται σύμφωνα με τον υδροδυναμικό τους όγκο, δηλαδή σύμφωνα με την έκταση που καταλαμβάνει το μόριο τους μέσα στο συγκεκριμένο διαλύτη. [50] Η διαδικασία βασίζεται στο γεγονός ότι ένα αραιό πολυμερικό διάλυμα, το οποίο μπορεί να περιέχει μια πλατεία κατανομή ΜΒ πολυμερικών αλυσίδων, ολογομερών ή ακόμα και μονομερών, τα οποία δεν πολυμερίστηκαν, αφήνεται να περάσει μέσα από μια στήλη η οποία έχει πληρωθεί με στερεά πορώδη σωματίδια πολύ μικρής διαμέτρου.[51] Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι τα μικρά μόρια μπορούν να διεισδύσουν βαθύτερα μέσα στους πόρους του πληρωτικού υλικού της στήλης με αποτέλεσμα να καθυστερήσουν να εξέλθουν της στήλης, ενώ τα μεγάλα μόρια, επειδή δεν μπορούν να εισχωρήσουν μέσα στους μικρότερους πόρους, εκκλύονται πρώτα.[52] Ο τρόπος με τον οποίο διαχωρίζονται τα μόρια αναλόγως του μεγέθους τους φαίνεται στην *Εικόνα 2.1*.

Το πακεταριστικό υλικό των στηλών μπορεί να είναι οργανικής φύσεως όπως πολυστυρένιο δικτυωμένο με διβινυλοβενζόλιο ή ανόργανο όπως οξειδίο του πυριτίου ή πορώδες γυαλί. Συνήθως προτιμάται πακεταριστικό υλικό από πολυστυρένιο και όχι από ανόργανες ύλες, επειδή έτσι δεν δημιουργούνται δευτερογενείς αλληλεπιδράσεις, οι οποίες θα οδηγούσαν σε δευτερογενείς διαδικασίες κατανομής. Οι λόγοι για τέτοιες δευτερογενείς διαδικασίες είναι

προσρόφηση, κατανομή, ασυμβατότητα κ.α. Γενικά, τέτοιες διαδικασίες αυξάνουν τον όγκο έκλουσης, δίνοντας έτσι μειωμένο μοριακό βάρος για το άγνωστο δείγμα. [53]



**Εικόνα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση του διαχωρισμού ενός αραιού πολυμερικού διαλύματος με χρήση της χρωματογραφίας SEC**



**Εικόνα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση οργανολογίας SEC**

Η χρωματογραφία SEC είναι μια σχετική μέθοδος προσδιορισμού MB διότι απαιτεί βαθμονόμηση για μετατροπή της κατανομής όγκων έκλουσης σε κατανομή MB. Η βαθμονόμηση γίνεται με πρότυπα, μονοδιάσπαρατα

πολυμερή, των οποίων τα MB είναι γνωστά, γιατί έχουν χαρακτηριστεί με απόλυτες μεθόδους, όπως η στατική σκέδαση φωτός και η οσμωμετρία. Με τον τρόπο αυτό γίνεται γνωστός ο χρόνος κατακράτησης στη στήλη μορίων συγκεκριμένου MB και με βάση αυτά μπορούν να μετατραπούν οι χρόνοι κατακράτησης αγνώστων δειγμάτων σε ισοδύναμα MB, με την προϋπόθεση ότι οι συνθήκες διεξαγωγής της βαθμονόμησης και ανάλυσης ενός αγνώστου MB δείγματος παραμένουν οι ίδιες (π.χ. η στήλη, ο φέρων διαλύτης, η ροή του διαλύτη και η πίεση). Ένα πρόβλημα που υπάρχει είναι ότι στην αγορά διατίθεται περιορισμένος αριθμός τύπων ομοπολυμερών στενής κατανομής MB για βαθμονόμηση της SEC. Τα πιο συνηθισμένα είναι τα πρότυπα του πολυστυρενίου, πολυ-μεθακρυλικού μεθυλεστέρα και του πολυ-αιθυλενοξειδίου. Έτσι η βαθμονόμηση γίνεται συνήθως όχι με βάση τη μοριακή μάζα, αλλά με βάση τον υδροδυναμικό όγκο του πολυμερούς στο διάλυμα. Ο υδροδυναμικός όγκος εξαρτάται από την αρχιτεκτονική του πολυμερούς, τη φύση του πολυμερούς, τη θερμοκρασία και τη φύση του χρησιμοποιούμενου διαλύτη. [54]

## **2.2 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)**

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) είναι ένα από τα αποτελεσματικότερα εργαλεία που διαθέτουμε για την τον προσδιορισμό της δομής χημικών ουσιών. Παρέχει ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για τη σύσταση των δομικών μονάδων και τη στερεοχημική διαμόρφωση των μορίων. Για τον προσδιορισμό των δομών πολύπλοκων οργανικών ενώσεων η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται συνήθως σε συνδυασμό με άλλα είδη φασματοσκοπίας και χημικής ανάλυσης. Βασίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων, από περίπου 4 έως 900 MHz. Στη διαδικασία της απορρόφησης μετέχουν οι πυρήνες των ατόμων και σε αντίθεση με την απορρόφηση υπεριώδους, ορατής και υπέρυθρης ακτινοβολίας όπου μετέχουν τα ηλεκτρόνια. Η θεωρητική βάση για τη φασματοσκοπία NMR τέθηκε από τον W. Pauli το 1924, ο οποίος πρότεινε ότι ορισμένοι ατομικοί πυρήνες θα έπρεπε να έχουν

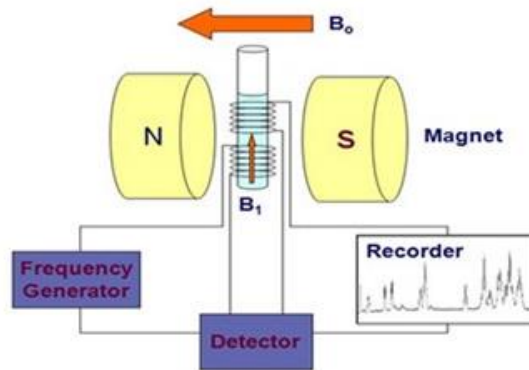
ιδιότητες αυτοστροφορμής (spin) και μαγνητικής ροπής και συνεπώς η έκθεσή τους σε μαγνητικό πεδίο θα οδηγούσε σε διαχωρισμό των ενεργειακών τους επιπέδων. [55,56] Η τεχνική λαμβάνει χώρα είτε σε διάλυμα είτε σε στερεή κατάσταση για μη διαλυτά υλικά και βασίζεται στην αναλογία μεταξύ της μέγιστης παρατηρούμενης έντασης του φάσματος NMR και τον αριθμό των πυρήνων που παράγουν αντίστοιχο σήμα. Για τη λήψη ενός φάσματος NMR είναι αρκετό ένα πολύ μικρό δείγμα, το οποίο παραμένει αναλλοίωτο.

Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται για την μελέτη μιας μεγάλης ποικιλίας πυρήνων, όπως  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  και  $^{31}\text{P}$ . Οι πυρήνες πρωτονίου ( $^1\text{H}$ ) και άνθρακα ( $^{13}\text{C}$ ), θεωρούνται από τους οργανικούς χημικούς οι χρησιμότεροι, αφού το υδρογόνο και ο άνθρακας αποτελούν τα κύρια συστατικά των οργανικών ενώσεων. Η σημαντικότερη και συνηθέστερη χρήση του NMR στα πολυμερή είναι η εύρεση της σύστασης συμπολυμερών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι υπάρχει αναλογικότητα μεταξύ του σήματος και του αριθμού των πυρήνων που δημιουργούν το σήμα αυτό.

Η οργανολογία ενός απλούστερου τύπου φασματομέτρου NMR αποτελείται από τέσσερα μέρη [57] όπως φαίνεται στην *Εικόνα 2.3*.

- Ένα σταθερό μαγνήτη με ευαίσθητο ελεγκτή, για την παραγωγή μαγνητικού πεδίου ακριβείας
- Μια γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων (RF Transmitter), η οποία εκπέμπει σε σταθερή συχνότητα
- Έναν ανιχνευτή (Detector) για τη μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος, ενέργειας RF





Εικόνα 2.3: Σχηματική απεικόνιση φασματομέτρου NMR

### 2.3 Φασματοσκοπία υπέρυθρου (IR)

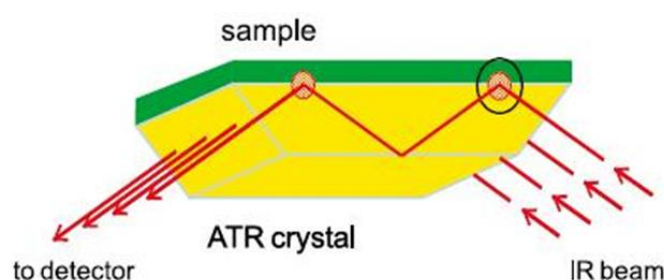
Η φασματοσκοπία υπέρυθρου (Infrared Spectroscopy, IR) αποτελεί κλάδο της δονητικής φασματοσκοπίας και αφορά την αλληλεπίδραση της υπέρυθρης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη. Δίνει δηλαδή ένα μέτρο της ικανότητας του υλικού να απορροφά ή να ανακλά την υπέρυθρη ακτινοβολία, λόγω συντονισμού με τους κανονικούς τρόπους δόνησης του. Το φάσμα υπέρυθρου συνδέεται άμεσα με τη δομή και τη χημική σύσταση ενός υλικού και έμμεσα με τις ιδιότητές του. Για τον λόγο αυτόν αποτελεί μία μέθοδο εύκολης και γρήγορης ταυτοποίησης της ύπαρξης χαρακτηριστικών ομάδων σε ένα μόριο. Η ελάχιστη ποσότητα δείγματος και η ταχύτητα λήψης είναι τα σημεία που καθιστούν την φασματοσκοπία IR ιδιαίτερα χρήσιμη και εύχρηστη μέθοδο στην ταυτοποίηση ενός άγνωστου δείγματος.

Η υπέρυθρη περιοχή του φάσματος περιλαμβάνει ακτινοβολία στην περιοχή από  $14000\text{ cm}^{-1}$  μέχρι  $10\text{ cm}^{-1}$ . Το φάσμα της υπέρυθρης ακτινοβολίας υποδιαιρείται συμβατικά σε τρεις περιοχές: την εγγύς, μέση και άπω περιοχή, (εγγύς περιοχή:  $14000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ , μέση περιοχή  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ , άπω περιοχή  $400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$ ). Βασίζεται στην αρχή ότι οι χημικοί δεσμοί απορροφούν την υπέρυθρη ακτινοβολία, χαρακτηριστικής ενέργειας και κάθε δείγμα παράγει ένα φάσμα το οποίο απεικονίζει τη συνδυασμένη απορρόφηση των ατόμων

που είναι παρόντα. Επειδή κάθε διαφορετικό υλικό είναι ένας μοναδικός συνδυασμός ατόμων, καμία ένωση δύο ατόμων δεν παράγει ακριβώς το ίδιο φάσμα υπέρυθρου. Επομένως, η φασματοσκοπία υπέρυθρου μπορεί να οδηγήσει σε έναν σαφή προσδιορισμό (ποιοτική ανάλυση) των διαφορετικών ειδών του υλικού. [58,59] Όταν μια ποσότητα ύλης ακτινοβολείται με υπέρυθη ακτινοβολία, ένα ποσοστό από τα μόρια που δέχονται την ακτινοβολία διεγείρονται, αυξάνοντας την ενέργεια δόνησης και περιστροφής τους. Για να λάβει χώρα η απορρόφηση ενέργειας από τα μόρια, θα πρέπει η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας να συμπίπτει με την συχνότητα δόνησης των ατόμων του δεσμού. Οι συχνότητες με τις οποίες δονούνται τα άτομα στο μόριο εξαρτώνται μόνο από τις μάζες των ατόμων, τον τύπο του δεσμού και το σχήμα του μορίου. Αν ένα μόριο είναι συμμετρικό δεν παρατηρείται απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας. Ένα μόριο θα απορροφήσει στο IR μόνο εφόσον μεταβάλλεται η διπολική ροπή του κατά την διάρκεια της δόνησης. Διαφορετικά, η δόνηση θεωρείται ανενεργή στο IR. Όσο μεγαλύτερη είναι η μεταβολή της διπολικής ροπής, τόσο ισχυρότερη είναι και η απορρόφηση. Στη φασματοσκοπία IR έχουμε απορροφήσεις που οφείλονται σε δονήσεις ή κάμψεις των ατόμων στα μόρια και στους κρυστάλλους. Σε ένα μόριο κάθε δεσμός απορροφά ακτινοβολία σε ορισμένα μήκη κύματος δίνοντας κβαντωμένες διεγερμένες καταστάσεις δόνησης. Οι δονήσεις που λαμβάνουν χώρα διακρίνονται σε δονήσεις τάσης και κάμψης. Στις δονήσεις τάσης, τα άτομα δονούνται με ένα συγκεκριμένο τρόπο, πλησιάζουν ή απομακρύνονται μεταξύ τους κινούμενα κατά μήκος του δεσμού. Αυτό χαρακτηρίζεται ως τάση δεσμού. Υπάρχουν δύο είδη τάσης: η συμμετρική όπου και τα άτομα πλησιάζουν ή απομακρύνονται συγχρόνως και η αντισυμμετρική όπου το ένα άτομο πλησιάζει όταν το άλλο απομακρύνεται. Στις δονήσεις κάμψης μόρια με περισσότερα από δύο άτομα σχηματίζουν γωνίες που μεταβάλλονται συνεχώς. Εκτός από τις δονήσεις και τις κάμψεις υπάρχουν και άλλα είδη παραμόρφωσης της δομής των μορίων όπως αιωρήσεις (rocks), σείσεις (wags), συστροφές (twists). Μόνο οι δονήσεις που προκαλούν μεταβολή της διπολικής ροπής οδηγούν σε ταινίες απορρόφησης.

[60] Η τεχνική εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total

Reflectance, ATR) χρησιμοποιείται για τη λήψη φασμάτων υπερόθρου πολλών ουσιών όπως πολυμερή, ελαστικά και άλλα στερεά. [61] Η αρχή της μεθόδου περιγράφεται ως εξής. Όταν μια δέσμη ακτινοβολίας διέρχεται από ένα πυκνότερο σε ένα αραιότερο υλικό συμβαίνει ανάκλαση. Το ανακλώμενο τμήμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας αυξάνει με αύξηση της γωνίας πρόσπτωσης και μετά από μια κρίσιμη γωνία η ανάκλαση γίνεται ολική. Έχει αποδειχθεί θεωρητικά και πειραματικά ότι κατά την ανάκλαση η δέσμη στην πραγματικότητα συμπεριφέρεται σαν να διεισδύει σε μικρό βάθος στο αραιότερο μέσο πριν συμβεί ανάκλαση. Το βάθος αυτό κυμαίνεται από κλάσμα του μήκους κύματος μέχρι αρκετά μήκη κύματος και εξαρτάται από το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, τον δείκτη διάθλασης των δύο υλικών και τη γωνία που σχηματίζει η προσπίπτουσα δέσμη με τη διεπιφάνεια των δύο υλικών. Η ακτινοβολία που διεισδύει καλείται αποσβεννύμενη. Εάν το αραιότερο μέσο απορροφεί την αποσβεννύμενη ακτινοβολία, η δέσμη εξασθενεί στα μήκη κύματος των ζωνών απορρόφησης. Το δείγμα τοποθετείται στις απέναντι πλευρές ενός διαφανούς κρυσταλλικού υλικού με μεγάλο δείκτη διάθλασης. Με κατάλληλη ρύθμιση της γωνίας πρόσπτωσης η ακτινοβολία υπόκειται σε πολλές εσωτερικές ανακλάσεις πριν περάσει από τον κρύσταλλο προς τον ανιχνευτή. Σε κάθε ανάκλαση συμβαίνει απορρόφηση και εξασθένιση. Η εφαρμογή της τεχνικής ATR απαιτεί καλή επαφή κρυστάλλου-δείγματος, η οποία εξασφαλίζεται με εφαρμογή πίεσης.



**Εικόνα 2.4: Η τεχνική ATR**

Η τεχνική ATR δίνει τη δυνατότητα μη καταστρεπτικής ανάλυσης υμενίων με σχετικά μεγάλο πάχος ή πολύ υψηλούς συντελεστές μοριακής απορροφητικότητας. Επίσης, είναι δυνατή η ανάλυση πολυστρωματικών

δειγμάτων και τα φάσματα λαμβάνονται άμεσα και με ελάχιστη προετοιμασία.  
[62,63]

## 2.4 Φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) [64,65]

Η φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (Uv-Vis spectroscopy) βασίζεται στην αλληλεπίδραση της ύλης με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Οι μετρήσεις απορρόφησης βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στον ποσοτικό προσδιορισμό μιας μεγάλης ποικιλίας ανόργανων και οργανικών ουσιών. Όταν μονοχρωματική ακτινοβολία διέρχεται από διάλυμα ικανό να την απορροφήσει τότε η ισχύς της ακτινοβολίας ελαττώνεται προοδευτικά κατά μήκος της διαδρομής. Η ελάττωση της ισχύος εξαρτάται από την συγκέντρωση της ουσίας που την απορροφά και από την απόσταση που διάνυσε η δέσμη μέσα στο διάλυμα. [92] Οι σχέσεις αυτές εκφράζονται με τον νόμο των Lambert-Beer και διατυπώνεται με τη μορφή:

$$A = \log(P_0/P) = -\log T = \log(100/\%T) = abc_{g/L} = \epsilon b c_{mol/L} \quad (2.4.1)$$

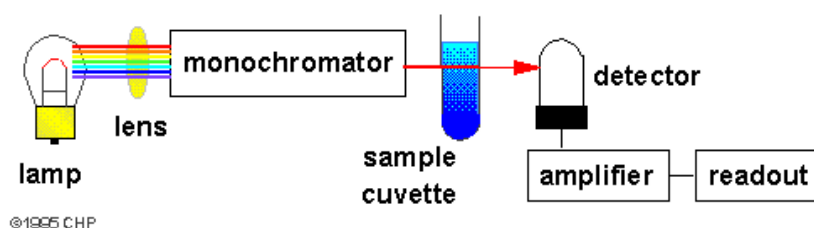
όπου A είναι η απορρόφηση, P<sub>0</sub> η ισχύς της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, P η ισχύς της εξερχόμενης ακτινοβολίας, μετά την διέλευση από το διάλυμα, T η διαπερατότητα ίση με P/P<sub>0</sub>, a η σταθερά αναλογίας όταν η c εκφράζεται σε g/L και καλείται απορροφητικότητα (g<sup>-1</sup>L cm<sup>-1</sup>), b το μήκος διαδρομής που διανύθηκε μέσα στο διάλυμα και εκφράζεται συνήθως σε cm, ε η σταθερά αναλογίας όταν η c εκφράζεται σε mol/L, η οποία καλείται μοριακή απορροφητικότητα (mol<sup>-1</sup>Lcm<sup>-1</sup> ή M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>).

Επειδή πρακτικώς είναι αδύνατη η μέτρηση των P και P<sub>0</sub> για την μέτρηση της απορρόφησης A, στην πράξη συγκρίνεται η ισχύς της ακτινοβολίας που διέρχεται από το διάλυμα του δείγματος, με την ισχύ της ακτινοβολίας που διέρχεται από το τυφλό.

$$A = \epsilon bc = \log(P_0/P) = \log(P_{\text{τυφλό}}/P_{\text{δείγμα}}) \quad (2.4.2)$$

Θεωρητικά είναι δυνατός ο υπολογισμός της c με την παραπάνω εξίσωση, αυτό όμως είναι πρακτικά ανεφάρμοστο (διαφορά στην τιμή της ε με διάφορα φασματοφωτόμετρα) και γι' αυτό στην πράξη χρησιμοποιείται πάντοτε

καμπύλη αναφοράς της απορρόφησης ως συνάρτηση της συγκέντρωσης (που λαμβάνεται με σειρά προτύπων διαλυμάτων). Η κλίση της καμπύλης αναφοράς, που αναφέρεται και ως διάγραμμα του νόμου του Beer, ισούται με  $eb$  ή  $ab$  και απ' αυτή μπορεί να υπολογιστεί η τιμή της  $\epsilon$  ή  $a$  ( $b$  είναι γνωστό). Απεικόνιση της  $A$  ή της  $T$  ως συνάρτηση του μήκους κύματος  $\lambda$  ή του κυματάριθμου  $\nu$  παρέχει το φάσμα απορροφήσεως, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την διαπίστωση της ύπαρξης χαρακτηριστικών ομάδων, για την διευκρίνηση της δομής της ουσίας που απορροφά και για την ταυτοποίησή της. Η απορρόφηση ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας προκαλεί μεταπτώσεις ηλεκτρονίων εξωτερικών στοιβάδων. Το μόριο απορροφά φως με αποτέλεσμα την διέγερση των ηλεκτρονίων σθένους από την βασική στην διεγερμένη κατάσταση. Υπάρχουν τρεις τύποι ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων κατά την απορρόφηση ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας: οι μεταπτώσεις  $\pi$ ,  $\sigma$  και  $n$  ηλεκτρονίων, οι μεταπτώσεις  $d$  και  $f$  ηλεκτρονίων και οι μεταπτώσεις μεταφοράς φορτίου. Στην περίπτωση των μεταλλικών ιόντων παρατηρούνται μεταπτώσεις  $d$  ηλεκτρονίων.

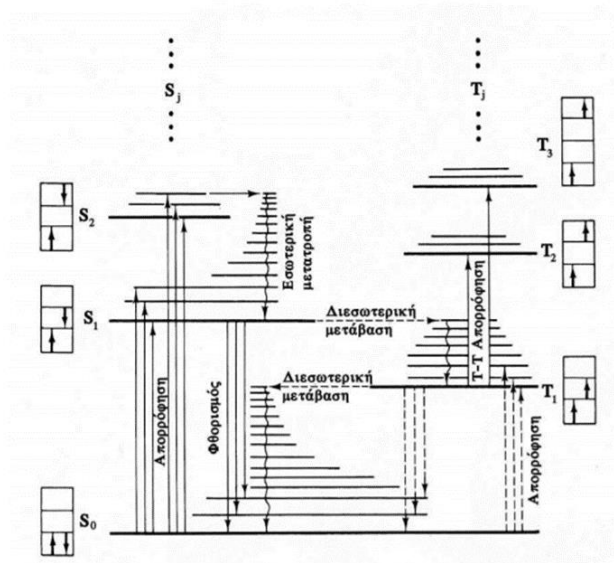


Εικόνα 2.5: Σχηματική απεικόνιση φασματοφωτομέτρου UV-Vis

## 2.5 Φασματοσκοπία Φθορισμού (FS) [66]

Η φασματοσκοπία φθορισμού (Fluorescence Spectroscopy, FS), επιτρέπει την ανίχνευση συστατικών πολύπλοκων δομών, με εξαιρετική ευαισθησία και εκλεκτικότητα. Ο φθορισμός είναι αποτέλεσμα μιας διαδικασίας τριών σταδίων που συμβαίνει σε συγκεκριμένα μόρια που ονομάζονται μόρια χρωμοφόρου φθορισμού (fluorophore) ή φθορίζουσες χρωστικές (fluorescent dyes). Οι φθορίζοντες ιχνηθέτες είναι μόρια χρωμοφόρου φθορισμού, οι οποίοι είναι σχεδιασμένοι με τέτοιο τρόπο ώστε να εντοπίζονται εντός μιας συγκεκριμένης περιοχής του δείγματος ή να αποκρίνονται σε ένα συγκεκριμένο ερέθισμα. Το

φαινόμενο του φθορισμού απεικονίζεται στο διάγραμμα Jablonski. (Εικόνα 2.6)



**Εικόνα 2.6: Διάγραμμα Jablonski**

Τα στάδια του φθορισμού περιγράφονται ως εξής:

- **Στάδιο 1<sup>ο</sup>: Διέγερση.** Ένα φωτόνιο ενέργειας  $h\nu_{EX}$  παρέχεται από μια εξωτερική πηγή όπως laser ή λάμπα πυρακτώσεως και απορροφάται από το μόριο που βρίσκεται στη θεμελιώδη ηλεκτρονιακή κατάσταση  $S_0$ . Αποτέλεσμα της απορρόφησης αυτής, είναι η μετάβαση ενός ηλεκτρονίου από τη θεμελιώδη κατάσταση κατάσταση  $S_1$ . Κάθε ηλεκτρονιακή κατάσταση διαχωρίζεται σε επιμέρους δονητικά επίπεδα και η μετάβαση συνήθως πραγματοποιείται στο υψηλότερο ενεργειακά δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης κατάστασης  $S_1$ .
- **Στάδιο 2<sup>ο</sup>: Διάρκεια ζωής της διεγερμένης κατάστασης.** Η διεγερμένη κατάσταση υπάρχει μόνο για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (συνήθως 1-10 nanoseconds). Στο χρονικό διάστημα αυτό το μόριο χάνει ενέργεια καθώς υποβάλλεται σε αλλαγές στη διαμόρφωση και υπόκειται σε πολλαπλές αλληλεπιδράσεις με τον περιβάλλον του. Οι διαδικασίες αυτές έχουν ως συνέπεια τη μετάβαση του ηλεκτρονίου από το υψηλότερο στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης κατάστασης  $S_1$  και η διαδικασία αυτή καλείται δονητική επαναφορά.

- Στάδιο 3<sup>ο</sup>: Εκπομπή φθορισμού. Όταν το μόριο αποδιεγείρεται το ηλεκτρόνιο μεταπίπτει από το χαμηλότερο ενεργειακά δονητικό επίπεδο της κατάστασης  $S_1$  στη θεμελιώδη κατάσταση  $S_0$  εκπέμποντας παράλληλα ακτινοβολία ενέργειας  $h\nu_{EM}$ .

Η διαδικασία φθορισμού είναι κυκλική. Εάν το μόριο δεν έχει καταστραφεί μη αντιστρεπτά κατά τη διέγερση, μπορεί να διεγείρεται και να ανιχνεύεται επανειλημμένα. Το γεγονός ότι ένα μόριο μπορεί να παράξει πολλά ανιχνεύσιμα φωτόνια είναι το βασικό στοιχείο των τεχνικών ανίχνευσης φθορισμού υψηλής ευαισθησίας.

## 2.6 Σκέδαση φωτός (LS)

Η τεχνική της σκέδασης του φωτός (Light Scattering Technique) αποτελεί μια από τις σημαντικότερες πειραματικές τεχνικές για το χαρακτηρισμό των πολυμερών σε αραιά διαλύματα, διότι επιτρέπει τον προσδιορισμό του απολύτου μοριακού βάρους κατά βάρος  $\langle M_w \rangle$  και της γυροσκοπικής ακτίνας,  $\langle R_g^2 \rangle$  (στατική σκέδαση φωτός), καθώς και της υδροδυναμικής ακτίνας  $R_h$  (δυναμική σκέδαση του φωτός). Οι πρώτες μελέτες σκέδασης του φωτός από διαλύματα έγιναν από τον Faraday τον 19<sup>ο</sup> αιώνα κατά την μελέτη κολλοειδών διασπορών του χρυσού. Οι μελέτες αυτές συνεχίστηκαν από τον Tyndall και ολοκληρώθηκαν από τον Rayleigh, όταν το 1871 θεμελίωσε τη θεωρία σκέδασης του φωτός από σωματίδια που έχουν μέγεθος πολύ μικρότερο σε σχέση με το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Όταν μια δέσμη φωτός προσπέσει σε ένα κολλοειδές διάλυμα ένα μέρος της ακτινοβολίας διέρχεται μέσα από το διάλυμα και το υπόλοιπο σκεδάζεται προς όλες τις κατευθύνσεις. Στην περίπτωση διαλυμάτων μακρομορίων η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι πολύ μεγαλύτερη από εκείνη των διαλυμάτων των “μικρών” μορίων. Η όλη τεχνική της σκέδασης του φωτός συνίσταται στη μέτρηση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από το διάλυμα σε διάφορες κατευθύνσεις σε σχέση με την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Το φως είναι μια ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που αποτελείται από ένα ηλεκτρικό και ένα μαγνητικό πεδίο, τα οποία είναι κάθετα μεταξύ τους. Όταν μια δέσμη φωτός προσπέσει σε ένα υλικό, τα ηλεκτρόνια του υλικού αλληλεπιδρούν με

το φως, διεγείρονται και γίνονται δευτερογενείς πηγές ακτινοβολίας, επανεκπέμποντας την απορροφούμενη ενέργεια προς όλες τις κατευθύνσεις με το ίδιο ακριβώς μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η τεχνική της σκέδασης του φωτός συνίσταται στη μέτρηση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε διάφορες κατευθύνσεις σε σχέση με την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός εξαρτάται από το μήκος κύματος του προσπίπτοντος φωτός, το μέγεθος και το σχήμα των κέντρων σκέδασης, τις οπτικές ιδιότητες των σκεδαστών και τη γωνία παρατήρησης.[67] Η τεχνική της σκέδασης του φωτός είναι μια γρήγορη μέθοδος, μη καταστρεπτική για το δείγμα, απόλυτη γιατί δεν χρειάζεται βαθμονόμηση και μπορεί να εφαρμοστεί σε συστήματα, τα οποία αποτελούνται από μεγάλο αριθμό σωματιδίων. Υπάρχουν όμως και δυο μειονεκτήματα: το δείγμα δεν πρέπει να είναι πολύ πυκνό για να μην γίνεται πολλαπλή σκέδαση και δεν πρέπει να υπάρχει πουθενά στο σύστημα σκόνη, διότι τα σωματίδια σκόνης αποτελούν και αυτά κέντρα σκέδασης.

### 2.6.1 Στατική σκέδαση φωτός (LS) [53,67,68,69]

Στη περίπτωση της στατικής σκέδασης φωτός (*Static Light Scattering, SLS*), η μέση χρονική τιμή της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, μετράται συναρτήσει της γωνίας σκέδασης  $\theta$  και της συγκέντρωσης του διαλύματος  $c$  και εκφράζεται μέσω του λόγου Rayleigh,  $R_\theta$ , ο οποίος ορίζεται ως:

$$R_\theta = \frac{d^2}{V f} \frac{I_s}{I_0} \quad (2.6.1.1)$$

Όπου:  $d$  είναι η απόσταση μεταξύ δείγματος και ανιχνευτή,  $V$  ο σκεδαζόμενος όγκος,  $f$  ο παράγοντας διόρθωσης ως προς το επίπεδο πόλωσης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας και  $I_s$ ,  $I_0$  οι εντάσεις της σκεδαζόμενης και προσπίπτουσας ακτινοβολίας, αντίστοιχα.

Σε ένα αραιό σύστημα, όπως για παράδειγμα ένα αέριο, τα μόρια κατανέμονται τυχαία στο χώρο και σε μεγάλες αποστάσεις μεταξύ τους, οπότε η συνεισφορά κάθε μορίου στην ένταση σκέδασης μπορεί να θεωρηθεί ανάλογη του αριθμού τους. Στην περίπτωση όμως πυκνών συστημάτων,



όπως τα καθαρά υγρά και τα διαλύματα, τα μόρια βρίσκονται σε κοντινές αποστάσεις, οπότε η ακτινοβολία που σκεδάζεται από κάθε μόριο αλληλεπιδρά με εκείνη που προέρχεται από άλλα μόρια. Η πιθανότητα για καταστρεπτική συμβολή αυξάνεται και το φαινόμενο αυτό μειώνει την ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Η περιγραφή του φαινομένου αυτού μπορεί να γίνει μέσω της θεωρίας των διακυμάνσεων Einstein-Smoluchowski, η οποία λαμβάνει υπόψη τις τοπικές διακυμάνσεις της διηλεκτρικής σταθεράς, σε κλίμακα της τάξης μεγέθους του μήκους κύματος, οι οποίες προέρχονται από διακυμάνσεις πυκνότητας σε ένα καθαρό υγρό και/ή από διακυμάνσεις συγκέντρωσης σε ένα διάλυμα. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, η συνεισφορά των διακυμάνσεων συγκέντρωσης στη σκέδαση εκφράζεται μέσω της σχέσης:

$$\Delta R_{\theta} = R_{\theta, \text{διαλύματος}} - R_{\theta, \text{διαλύτη}} \quad (2.6.1.2)$$

Όπως φαίνεται στη σχέση (2.6.1.2), ο λόγος  $R_{\theta}$  εξαρτάται από τη γεωμετρία της πειραματικής διάταξης. Για το λόγο αυτό στην πράξη υπολογίζεται ο απόλυτος λόγος  $R_{\theta}$ , ο οποίος κανονικοποιείται ως προς πρότυπους διαλύτες όπως το τολουόλιο, ως εξής:

$$R_{\theta} = R_T \frac{n_0^2}{n_T^2} \frac{I_S}{I_{S,T}} \quad (2.6.1.3)$$

Όπου:  $R_T$  ο λόγος Rayleigh του τολουολίου,  $n_0$  και  $n_T$  οι δείκτες διάθλασης του διαλύτη και του τολουολίου και  $I_S$  και  $I_{S,T}$  οι εντάσεις της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας του διαλύματος και του τολουολίου, αντίστοιχα.

Στην περίπτωση των πολυμερικών διαλυμάτων, η διαφορά  $\Delta R_{\theta}$  συνδέεται με τα μοριακά χαρακτηριστικά του πολυμερούς και τις θερμοδυναμικές ιδιότητες του διαλύματος μέσω της εξίσωσης Zimm:

$$\frac{K c}{\Delta R_{\theta}} = \frac{1}{M_w} \left( 1 + \frac{1}{3} R_g^2 q^2 \right) + 2A_2 c \quad (2.6.1.4)$$

όπου  $M_w$  το μοριακό βάρος του πολυμερούς,  $R_g$  η γυροσκοπική ακτίνα του πολυμερούς,  $A_2$  ο δεύτερος συντελεστής Virial, ο οποίος εκφράζει αλληλεπιδράσεις μεταξύ δύο μορίων και  $q$  το διάνυσμα σκέδασης.

Το διάνυσμα σκέδασης  $q$ , ορίζεται ως:

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2.6.1.5)$$

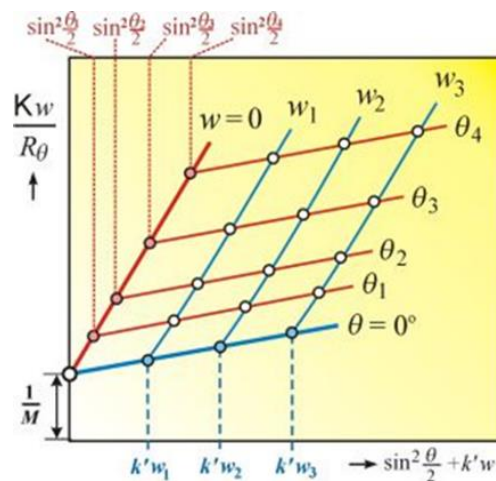
όπου  $\lambda$  το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

Η σταθερά  $K$  δίνεται από τη σχέση:

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda^4 N_A} \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)^2 \quad (2.6.1.6)$$

όπου  $N_A$  ο αριθμός του Ανογαδρο και  $\partial n/\partial c$  ο διαφορικός δείκτης διάθλασης.

Μέσω της εξίσωσης (2.6.1.4) και για μετρήσεις σε πολλαπλές γωνίες  $\theta$  και συγκεντρώσεις  $c$ , προκύπτει το διάγραμμα Zimm. Από το διάγραμμα αυτό με διπλή προέκταση των μετρούμενων τιμών του λόγου  $Kc/\Delta R_\theta$  σε μηδενική γωνία σκέδασης και μηδενική συγκέντρωση, εξάγεται το μοριακό βάρος  $M_w$  ως το αντίστροφο της κοινής τεταγμένης επί της αρχής, ενώ ο συντελεστής  $A_2$  και η γυροσκοπική ακτίνα  $R_g$  υπολογίζονται από τις κλίσεις των ευθειών για  $\theta = 0$  και  $c = 0$ , αντίστοιχα.



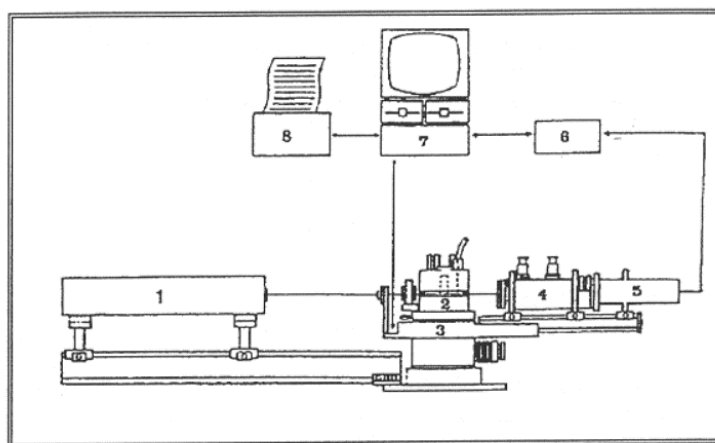
Εικόνα 2.7: Διάγραμμα Zimm

Όπως φαίνεται από τη σχέση (2.6.1.6), ο διαφορικός δείκτης διάθλασης  $\partial n/\partial c$  του πολυμερικού διαλύματος, είναι μια απαραίτητη παράμετρος για την ανάλυση των μετρήσεων στατικής σκέδασης φωτός. Η παράμετρος αυτή αποτελεί το μέτρο της μεταβολής του δείκτη διάθλασης του διαλύματος

συναρτήσει της αύξησης της συγκέντρωσης του πολυμερούς, είναι χαρακτηριστική του κάθε συστήματος πολυμερούς-διαλύτη και μετράται με τη χρήση διαφορικών διαθλασιμέτρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι, στην περίπτωση συμπολυμερών κατά συστάδες και διαλυμάτων που περιέχουν δύο ή περισσότερα μόρια, τα οποία δεν παρουσιάζουν ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ τους, ο διαφορικός δείκτης διάθλασης του διαλύματος  $(\partial n/\partial c)_{ολικό}$  μπορεί να υπολογιστεί ως σταθμισμένος μέσος όρος των διαφορικών δεικτών διάθλασης  $(\partial n/\partial c)_1$  και  $(\partial n/\partial c)_2$  των επιμέρους συστατικών, ως εξής:

$$\left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)_{ολικό} = w_1 \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)_1 + w_2 \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)_2 \quad (2.6.1.7)$$

όπου  $w_1$  και  $w_2$  τα κλάσματα βάρους των δύο συστατικών.



Εικόνα 2.8: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης στατικής σκέδασης φωτός

## 2.6.2 Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) [53,67,70,71]

Η συνεχής μεταβολή της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας λόγω της κίνησης Brown των αλυσίδων (ή των νανοσωματιδίων γενικότερα) σε ένα διάλυμα πολυμερούς (ή σε μία σωματιδιακή διασπορά) είναι η κύρια αρχή λειτουργίας της δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS). Έτσι η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι αποτέλεσμα των καταστρεπτικών ή ενισχυτικών αλληλεπιδράσεων της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από κάθε σωματίδιο – σκεδαστή μέσα στο διάλυμα ξεχωριστά. Εξαιτίας όμως της κίνησης Brown, οι σκεδαστές κινούνται μέσα στο διάλυμα

και οι αλληλεπιδράσεις των σκεδαζόμενων ακτινών είναι διαφορετικές με αποτέλεσμα η συνολική ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας που φτάνει στον ανιχνευτή να μεταβάλλεται με τον χρόνο. Η μεταβολή της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε σχέση με το χρόνο περιγράφεται από μία χρονική συνάρτηση αυτοσυσχέτισης. Γενικά μία συνάρτηση αυτοσυσχέτισης μεταξύ δύο σφαιρικών σωμάτων που δεν αλληλεπιδρούν έχει τη μορφή:

$$G_{(2)}(t) = \langle I_{(0)} \cdot I_{(t)} \rangle = A + B \cdot e^{-\Gamma t} = A + B \cdot e^{-Dq^2 t} \quad (2.6.2.1)$$

Όπου A και B είναι πειραματικές σταθερές, Γ είναι η ταχύτητα που φθίνει η συνάρτηση, D είναι ο μεταφορικός συντελεστής διάχυσης και q είναι το διάνυσμα σκέδασης, το οποίο ορίζεται ως:

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2.6.2.2)$$

όπου  $n_0$  ο δείκτης διάθλασης του δείγματος,  $\lambda$  το μήκος κύματος του λέιζερ που ακτινοβολεί το δείγμα και  $\theta$  η γωνία που τοποθετείται ο ανιχνευτής σε σχέση με την κυψελίδα που περιέχει το δείγμα.

Ο μεταφορικός συντελεστής διάχυσης, D περιγράφει την δυσκολία κίνησης ενός σώματος μέσα σε ένα διάλυμα, και είναι αντιστρόφως ανάλογος του μεγέθους του πολυμερούς (ή νανοσωματιδίου) και συγκεκριμένα της υδροδυναμικής ακτίνας.

$$D_0 = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad (2.6.2.3)$$

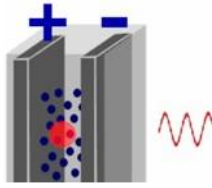
όπου k η σταθερά Boltzmann, T η απόλυτη θερμοκρασία,  $\eta$  το ιξώδες του διαλύματος και  $R_h$  η υδροδυναμική ακτίνα του πολυμερούς. Συμπερασματικά μετρώντας και εκφράζοντας τις μεταβολές της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από ένα διάλυμα πολυμερούς ως συνάρτηση του χρόνου, είναι δυνατός ο υπολογισμός της υδροδυναμικής ακτίνας  $R_h$  των πολυμερών στο διάλυμα. Ο υπολογισμός της υδροδυναμικής ακτίνας από τη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης προκύπτει έπειτα από ανάλυση από κάποιο μαθηματικό αλγόριθμο. Δύο τέτοιοι αλγόριθμοι που χρησιμοποιούνται σχεδόν αποκλειστικά για την παραπάνω ανάλυση είναι η μέθοδος των αθροισμάτων και οι τεχνικές

κανονικοποίησης μέσω του προγράμματος CONTIN. Σύμφωνα με τη μέθοδο των αθροισμάτων η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης περιγράφεται με ένα πολυώνυμο, συνήθως 2<sup>ης</sup> ή 3<sup>ης</sup> τάξης, και από τους συντελεστές του πολυωνύμου προκύπτουν ο συντελεστής διάχυσης (1<sup>ος</sup> cumulant) και η πολυδιασπορά μεγέθους του συστήματος (2<sup>ος</sup> cumulant). Ενώ με ανάλυση μέσω του προγράμματος CONTIN, η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης έχει σαν αποτέλεσμα μία πληθώρα πιθανών λύσεων που στην συνέχεια απορρίπτονται οι πιο περίπλοκες λύσεις ως λιγότερο πιθανές να υπάρξουν σε πραγματικά συστήματα. Βέβαια η προκύπτουσα λύση δεν είναι μοναδική και για αυτό θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψη όλες οι λύσεις που προτείνει το πρόγραμμα. Η ανάλυση μέσω του προγράμματος CONTIN οδηγεί στον προσδιορισμό της συνάρτησης κατανομής μεγεθών των σωματιδίων στο διάλυμα.

### **2.6.3 Ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός (ELS) – ζ-δυναμικό [72,73,74,75]**

Η ύπαρξη καθαρού φορτίου στην επιφάνεια των σωματιδίων του κολλοειδούς επηρεάζει την κατανομή των ιόντων που υπάρχουν γύρω από το σωματίδιο. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να υπάρχει μια αυξημένη συγκέντρωση αντισταθμιστικών ιόντων (counter ions) κοντά στην επιφάνεια του σωματιδίου. Έτσι σχηματίζεται μία ηλεκτρική διπλή στοιβάδα στην περιοχή της διεπιφάνειας σωματιδίου – υγρού. Η διπλή αυτή στοιβάδα μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από δύο τμήματα: μια εσωτερική περιοχή, η οποία περιλαμβάνει ιόντα δεσμευμένα σχετικά ισχυρά με τη φορτισμένη επιφάνεια και ονομάζεται στοιβάδα Stern, και μια εξωτερική (διάχυτη) περιοχή, στην οποία η κατανομή των αντισταθμιστικών ιόντων καθορίζεται από μία ισορροπία μεταξύ ηλεκτροστατικών δυνάμεων και τυχαίας θερμικής κίνησης. Η εξωτερική περιοχή ονομάζεται στοιβάδα Gouy-Chapman. Όταν ένα φορτισμένο σωματίδιο βρεθεί μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, τότε αυτό μαζί με τα πιο κοντινά του αντισταθμιστικά ιόντα (που αποτελούν τη στοιβάδα Stern) κινούνται ως ενιαία μονάδα, προς το ηλεκτρόδιο αντίθετης πολικότητας. Η στοιβάδα αντισταθμιστικών ιόντων που ακολουθεί το φορτισμένο σωματίδιο ονομάζεται και επίπεδο διάτμησης (shear plane) ή επίπεδο γλιστρήματος

(slipping plane). Η αρχή για τον προσδιορισμό του ζ-δυναμικού είναι πολύ απλή. Με ηλεκτρόδια εμβαπτισμένα στο δείγμα του κολλοειδούς εφαρμόζεται ένα σταθερό ηλεκτρικό πεδίο και αυτό προκαλεί την κίνηση των σωματιδίων προς το ηλεκτρόδιο με αντίθετη πολικότητα. Ιξώδεις δυνάμεις που δρουν πάνω στο κινούμενο σωματίδιο τείνουν να αντισταθούν σε αυτή την κίνηση και έτσι αναπτύσσεται γρήγορα μια ισορροπία μεταξύ των φαινομένων της ηλεκτροστατικής έλξης και του ιξώδους μέσου. Συνεπώς, τα σωματίδια φτάνουν σε μια σταθερή τελική ταχύτητα. Η ταχύτητα αυτή εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, τη διηλεκτρική σταθερά και το ιξώδες του μέσου, καθώς και από το ζ-δυναμικό του σωματιδίου. Επειδή σε ένα υδατικό αιώρημα το ιξώδες και η διηλεκτρική σταθερά είναι γνωστά, αυτό που χρειάζεται για να υπολογιστεί το ζ-δυναμικό των σωματιδίων είναι η ταχύτητα με την οποία αυτά κινούνται. Σε μια τυπική μέτρηση ζ-δυναμικού ή ηλεκτροφορητικής σκέδασης του φωτός (Electrophoretic Light Scattering, ELS), όπως αλλιώς λέγεται η τεχνική, ένα μέρος από το δείγμα του κολλοειδούς τοποθετείται σε μια κυψελίδα και υπόκειται σε ηλεκτροφόρηση μέσω δύο ηλεκτροδίων. Στο δείγμα προσπίπτει μια δέσμη μονοχρωματικής ακτινοβολίας (laser) και η σκεδαζόμενη από το διάλυμα ακτινοβολία συλλέγεται από έναν ανιχνευτή. Όσο μεγαλύτερη είναι η ταχύτητα των σωματιδίων του κολλοειδούς (εξαρτάται από το φορτίο τους) τόσο μεγαλύτερη θα είναι η μεταβολή στη συχνότητα της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (φαινόμενο Doppler). Ένας διαχωριστής (splitter) χρησιμοποιείται ώστε ένα μέρος της ακτινοβολίας που εκπέμπει το laser να φτάνει απ' ευθείας στον ανιχνευτή χωρίς να προσπίπτει πάνω στο δείγμα. Συσχετίζοντας τις δύο διαφορετικές ακτινοβολίες που φτάνουν στον ανιχνευτή (προσπίπτουσα και σκεδαζόμενη) είναι εύκολο και προσδιοριστεί η μετατόπιση Doppler, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ταχύτητας των σωματιδίων.



**Εικόνα 2.9:** Σχηματική αναπαράσταση μιας πειραματικής διάταξης μέτρησης του ζ-δυναμικού

Η εξίσωση που συνδέει την ταχύτητα του σωματιδίου, το ιξώδες και τη διηλεκτρική σταθερά του διαλύτη με το ζ-δυναμικό είναι η εξίσωση Smoluchowski:

$$\zeta = \frac{\eta}{\epsilon} U_e \quad (2.6.3.1)$$

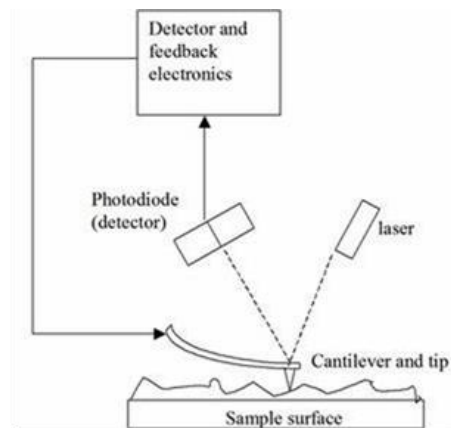
Όπου  $\eta$  είναι το ιξώδες,  $\epsilon$  η διηλεκτρική σταθερά του μέσου και  $U_e$  η ηλεκτροφορητική κινητικότητα (electrophoretic mobility) των σωματιδίων, που εκφράζεται ως:

$$U_e = \frac{v}{V/L} \quad (2.6.3.2)$$

όπου,  $v$ , η ταχύτητα του σωματιδίου,  $V$ , η εφαρμοζόμενη τάση και  $L$  η απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων.

## 2.7 Μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM) [76]

Το μικροσκόπιο ατομικών δυνάμεων (atomic force microscope, AFM) έχει αναλυτική ικανότητα μερικών νανομέτρων και παρέχει εικόνες ατόμων που βρίσκονται πάνω σε μια επιφάνεια ή μέσα σε αυτή. Το AFM λειτουργεί στηριζόμενο στη σάρωση που εκτελεί μια λεπτή κεραμική ή από ημιαγώγιμο υλικό βελόνα, πάνω σε μια επιφάνεια. Η αιχμή της βελόνας τοποθετείται στην άκρη ενός μοχλοβραχίονα που μπορεί να ταλαντεύεται ενώ είναι στερεωμένος στο άλλο άκρο.



**Εικόνα 2.10: Τυπική αναπαράσταση ενός AFM**

Καθώς η ακίδα έλκεται ή απωθείται από την επιφάνεια που σαρώνει, ο μοχλοβραχίονας αποκλίνει. Το μέγεθος της απόκλισης καταγράφεται από μια δέσμη λέιζερ, η οποία ανακλάται σε αμβλεία γωνία από το άκρο του μοχλοβραχίονα που ταλαντώνεται. Το γράφημα της απόκλισης της δέσμης λέιζερ σε σχέση με την θέση της ακίδας πάνω στην επιφάνεια του δείγματος, δίνει την ανάλυση της επιφάνειας σε όρη και κοιλάδες που περιέχει αυτή. Παρέχει δηλαδή την μορφολογία της επιφάνειας. Το AFM λειτουργεί με την ακίδα σε επαφή με το δείγμα, είτε χτυπώντας ελαφρά πάνω στην επιφάνεια του δείγματος καθώς η ακίδα μετακινείται. Με την μέθοδο αυτή καταγράφονται οι μεταβολές που παρατηρούνται ως προς την σκληρότητα της επιφάνειας ή ως προς την τάση προσκόλλησης της ακίδας στην επιφάνεια. Η μικροσκοπία ατομικής δύναμης έχει διακριτική ικανότητα επί της επιφάνειας από Angstroms μέχρι μερικά  $\mu\text{m}$ . Η ακτίνα της ακίδας είναι της τάξης των 20 nm. Η δύναμη που ασκείται μεταξύ ακίδας και επιφάνειας είναι της τάξης των  $10^{-11}$  έως  $10^{-6}$  N.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 3.1 Υλικά και αντιδραστήρια

Τα υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας είναι τα εξής:

**Μονομερή:** Μεθακρυλικός εστέρας της διμεθυλοαμινοαιθανόλης (n-Dimethylamino ethyl methacrylate, DMAEMA), Μεθακρυλικός εστέρας της δωδεκανόλης (lauryl methacrylate, LMA), Μεθακρυλικός εστέρας της ολιγοαιθυλενογλυκόλης με  $M_w=475$  (oligo (ethylene glycol) methyl ether methacrylate, OEGMA),

**Μέσο μεταφοράς αλυσίδας (CTA):** 4-κυανο-4-(φαινυλοκαρβονυλοθειο) πεντανοϊκό οξύ (4-cyano-4-(phenylcarbonothioylthio) pentanoic acid, CPAD) (Sigma Aldrich)

**Απαρχητής:** Αζωδισισοβουτυρονιτρίλιο (azobisisobutyronitrile, AIBN) (Sigma Aldrich)

**Ρητίνες:** Απομάκρυνσης σταθεροποιητών 311340 και 311332 (Sigma Aldrich)

**Αντιδραστήριο τεταρτοταγοποίησης της αμινομάδας του PDMAEMA:** Μεθυλοϊωδίδιο (methyl iodide),  $\text{CH}_3\text{I}$  (Sigma Aldrich)

**DNA:** από σπέρμα σολωμού (Deoxyribonucleic acid sodium salmon testes), μοριακού βάρους  $1.3 \times 10^6$  Da (~2,000 ζεύγη βάσεων) (Sigma Aldrich)

**EtBr:** Βρωμιούχο αιθίδιο, Ethidium bromide (Sigma Aldrich)

**Κουρκουμίνη:** (Curcumin), κετονική μορφή (Merck )

**Διαλύτες:** Τετραϋδροφουράνιο (tetrahydrofuran, THF), Κανονικό εξάνιο (n-Hexane), 1,4-Διοξάνιο (1,4 dioxane), Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (deuterated chloroform,  $\text{CDCl}_3$ ), Δευτεριωμένη ακετόνη (deuterated acetone,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ) (Sigma Aldrich)

### 3.2 Οργανολογία και μέθοδοι χαρακτηρισμού

#### Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών

Τα μοριακά βάρη και οι κατανομές μοριακών βαρών των δειγμάτων προσδιορίστηκαν με τη χρήση χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών, χρησιμοποιώντας ένα όργανο Waters, αποτελούμενο από μια ισοκρατική αντλία Waters 1515, ένα σετ από τρεις στήλες διαχωρισμού μεικτής σύστασης μ-Styragel (εύρος πόρων  $10^2$  -  $10^6$  Å ), έναν ανιχνευτή δείκτη διάθλασης Waters 2414 (ισορροπημένος στους 40°C) και ελεγχόμενο από το λογισμικό Breeze. Η κινητή φάση είναι τετραϋδροφουράνιο, το οποίο περιέχει 5%v/v τριαιθυλαμίνη με ρυθμό ροής 1mL/min στους 30° C. Η βαθμονόμηση του οργάνου έγινε με πρότυπα δείγματα πολυστυρενίου με στενές κατανομές μοριακών βαρών και μέσα μοριακά βάρη στο εύρος 1.200 έως 929.000 g/mol. Τα δείγματα ήταν ήδη διαλυμένα στην κινητή φάση σε συγκεντρώσεις της κλίμακας των 2-4 mg/mL.

#### Φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$

Τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  ελήφθησαν από ένα φασματόμετρο Bruker AC 300 FT-NMR. Οι χημικές μετατοπίσεις παρουσιάζονται σε ppm με σημείο αναφοράς το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS). Η προετοιμασία των δειγμάτων για τις μετρήσεις  $^1\text{H-NMR}$  ήταν η εξής: διάλυση περίπου 10mg δείγματος σε 0,5ml δευτεριωμένο χλωροφόρμιο και εισαγωγή του διαλύματος στα σωληνάκια NMR (NMR tubes). Η ανάλυση των φασμάτων NMR έγινε με χρήση του λογισμικού MestReNova της εταιρίας MestRelabs.

#### Φασματοσκοπία ATR-FTIR

Οι μετρήσεις στην περιοχή του εγγύς υπέρυθρου ( $550$ - $4000$   $\text{cm}^{-1}$ ) πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ενός φασματομέτρου μετασχηματισμού Fourier (Equinox 55 από την Bruker Optics), εξοπλισμένο με διαμάντι ATR μονής αντανάκλασης (Dura-Samp1IR II της εταιρίας SensIR Technologies).

### Φασματοσκοπία UV-Vis-NIR

Τα φάσματα UV-Vis-NIR καταγράφηκαν από ένα φασματοφωτόμετρο, Perkin–Elmer (Lambda 19) UV-Vis-NIR. Χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες χαλαζία, στις οποίες τοποθετούνταν 3mL από το προς μέτρηση δείγμα.

### Φασματοσκοπία φθορισμού

Τα φάσματα καταγράφηκαν σε φθορισμόμετρο NanoLog (Horiba Jobin Yvon), χρησιμοποιώντας μία δίοδο λέιζερ ως πηγή διέγερσης (NanoLED, 440 nm, εύρος παλμού 100 ps) και ανιχνευτή UV TBX-PMT series (250-850 nm) από την Horiba Jobin Yvon.

### Δυναμική και στατική σκέδαση φωτός

Οι μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το όργανο ALV/CGS-3 Compact Goniometer System (ALV GmbH, Germany), εξοπλισμένο με λέιζερ JDS Uniphase 22mW He–Ne, που λειτουργεί στα 632.8 nm, συνδεδεμένο με έναν ψηφιακό συσχετιστή 288 καναλιών ALV-5000/EPP multi-tau και μία ηλεκτρονική μονάδα σκέδασης φωτός ALV/LSE-5003 για έλεγχο της σταδιακής κίνησης του γωνιομέτρου και έλεγχο του διακόπτη ακραίας θέσης. Η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας και οι συναρτήσεις συσχέτισης μετρήθηκαν στις 30°-150°. Οι συναρτήσεις συσχέτισης καταγράφηκαν πέντε φορές και αναλύθηκαν με τη μέθοδο αθροισμάτων και τον αλγόριθμο CONTIN, ο οποίος παρέχει τις κατανομές για την φαινόμενη υδροδυναμική ακτίνα με χρήση αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης με τη βοήθεια της σχέσης Stokes – Einstein. Οι μετρήσεις στατικής σκέδασης φωτός πραγματοποιήθηκαν με το ίδιο όργανο σε γωνιακό εύρος 30°-150° λαμβάνοντας μέτρηση ανά 10 μοίρες και χρησιμοποιώντας τολουόλιο σαν πρότυπο. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων για τον υπολογισμό του φαινόμενου μοριακού βάρους και του γυροσκοπικού λόγου έγιναν με τη χρήση της προσέγγισης Guinier 2<sup>ης</sup> τάξης. Έγιναν μετρήσεις σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πολυμερούς οι οποίες προέκυψαν με αραιώση ενός αρχικού διαλύματος υψηλότερης συγκέντρωσης. Όλα τα διαλύματα διηθήθηκαν με υδρόφιλο φίλτρο πορώδους 0.45μm πριν τη μέτρηση.

### Ηλεκτροφορητική Σκέδαση Φωτός- ζ-δυναμικό

Το ζ-δυναμικό μετρήθηκε σε σύστημα της εταιρίας *Malvern (Nano Zeta Sizer)* εφοδιασμένο με λέιζερ He-Ne 4mW μήκους κύματος  $\lambda=633\text{nm}$ . Χρησιμοποιεί μία φωτοδίοδο ως ανιχνευτή και η σκεδαζόμενη ακτινοβολία μετριέται σε γωνία  $173^\circ$ . Οι ηλεκτροκινητικές μετρήσεις για τον προσδιορισμό της κινητικότητας και των τιμών  $\zeta_r$  των κολλοειδών, πραγματοποιήθηκαν με τη με χρήση της τεχνικής LDV (*Laser Doppler Velocimetry*) και με την προσέγγιση κατά Smoluchowski. Οι αναφερόμενες τιμές  $\zeta_r$  είναι η μέση τιμή 100 μετρήσεων. λαμβάνοντας μέτρηση ανά 10 μοίρες.

### Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης

Οι μετρήσεις AFM διεξήχθησαν σε ένα μικροσκόπιο ατομικής δύναμης Quesant Q-Scope 250Veeco της εταιρίας *Quesant Instrument Co., U.S.A.*, σε λειτουργία περιοδικής επαφής υπό συνθήκες περιβάλλοντος. Το όργανο ήταν εξοπλισμένο με πρόβολο πυριτίου NSC16 ( $\text{W}_2\text{C Si}_3\text{N}_4$ ), διαθέσιμο από την εταιρία *Quesant instruments, U.S.A.*, με τυπική σταθερά δύναμης 40 N/m, γωνία κώνου μικρότερη των  $20^\circ$  και ακτίνα καμπυλότητας μικρότερη των 10 nm. Η απεικόνιση διεξήχθη με σαρωτή Dual PZT 40  $\mu\text{m}$  σε διαφορετικές περιοχές σάρωσης, με ρυθμό σάρωσης 3 Hz και με ανάλυση εικόνας 600 x 600 pixels σε διακοπτόμενη επαφή (broadband mode). Η βαθμονόμηση του άξονα z πραγματοποιήθηκε με απεικόνιση ενός φράγματος πυριτίου TGZ01 με βήματα οξειδίου του πυριτίου με ύψος 18.3 nm (*Mikromasch Inc*). Τα προς απεικόνιση δείγματα παρασκευάστηκαν με εμφύσηση στεγνών δισκίων πυριτίου, τα οποία είχαν προηγουμένως καθαριστεί με ισοπροπανόλη, στα υδατικά διαλύματα των συμπολυμερών, για 5 έως 10 λεπτά. Μετά την απόσυρση του δισκίου από το διάλυμα, απομακρύνθηκε η περίσσεια νερού με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού και τα δείγματα αφέθηκαν στον ατμοσφαιρικό αέρα για να στεγνώσουν. Με τον τρόπο αυτό, κατέστη δυνατή η άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων της μικροσκοπίας ατομικής δύναμης με αυτά της σκέδασης φωτός, καθώς οι μοριακές δομές που απορροφήθηκαν στην επιφάνεια του δισκίου προέρχονται από τα ίδια διαλύματα που μελετήθηκαν με τεχνικές σκέδασης φωτός.

### **3.3 Σύνθεση P(DMAEMA-co-LMA) και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA**

Οι συνθέσεις των αμφίφιλων τυχαίων συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA) και των αμφίφιλων δισυσταδικών συμπολυμερών (PDMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA έγιναν με τη χρήση της τεχνικής αντιστρεπτής προσθήκης-μεταφοράς αλυσίδας με απόσπαση (RAFT). Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε προκειμένου να συντεθούν και οι δυο κατηγορίες συμπολυμερών περιγράφεται στη συνέχεια.

#### **3.3.1 Σύνθεση τυχαίου συμπολυμερούς P(DMAEMA-co-LMA)**

Πραγματοποιήθηκε η σύνθεση δυο τυχαίων συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA). Τα δύο αυτά συμπολυμερή διαφέρουν ως προς το μοριακό βάρος ( $M_w$ ), τη κατανομή μοριακών βαρών ( $I$ ) και τη κατά βάρος σύστασή τους (%wt) ως προς το PLMA, το οποίο αποτελεί το υδρόφοβο τμήμα του αμφίφιλου τυχαίου συμπολυμερούς. Ακολουθεί η γενική πειραματική πορεία της σύνθεσης των τυχαίων συμπολυμερών πολυ(μεθακρυλικού εστέρα της διμεθυλοαμινοαιθανόλης-co-μεθακρυλικού εστέρα της δωδεκανόλης) (P(DMAEMA-co-LMA)).

Αρχικά, τα μονομερή DMAEMA και LMA καθαρίστηκαν από τους παραμποδιστές τους οποίους περιείχαν (μονομεθυλαιθέρας της υδροκινόνης), διαπερνώντας τα από στήλη, πληρωμένη με τη κατάλληλη ρητίνη.

Σε σφαιρική φιάλη, τοποθετούνται κατάλληλες ποσότητες από τα καθαρισμένα πλέον από τους παρεμποδιστές τους μονομέρη DMAEMA και LMA, (4-cyano-4-(phenylcarbonothioylthio) pentanoic acid (CPAD) ως αντιδραστήριο μεταφοράς ομάδας (CTA), αζωδισσοβουτυρονιτρίλιο (AIBN) ως απαρχητής και 1,4-διοξάνιο ως διαλύτη για τον πολυμερισμό. Η αναλογία CTA / απαρχητή (σε mol) που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των τυχαίων συμπολυμερών είναι CPAD / AIBN = 10.

Στη συνέχεια ακολούθησε η απαέρωση του διαλύματος με τη χρήση αερίου αζώτου για είκοσι λεπτά. Μετά το τέλος της απαέρωσης, η σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο θερμοκρασίας 70°C. Η διάρκεια του πολυμερισμού ήταν 18 ώρες. Μετά το πέρας των 18 ωρών, το διάλυμα ψύχθηκε για περίπου 10 λεπτά στο ψυγείο και ανοίχθηκε η φιάλη στην

ατμόσφαιρα προκειμένου να επέλθει τερματισμός. Τέλος, η απομάκρυνση του (των) μονομερούς (μονομερών) που δεν αντέδρασαν έγινε χρησιμοποιώντας γραμμή υψηλού κενού. Οπότε το πολυμερές απαλλαγμένο από μονομερές που δεν αντέδρασε, συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε στο φούρνο κενού για 48 ώρες.

### **3.3.2 Σύνθεση συμπολυμερούς κατά συστάδες P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA**

Το τυχαίο συμπολυμερές P(DMAEMA-co-LMA) χρησιμοποιήθηκε σαν μακρο-CTA για την έναρξη του πολυμερισμού της δεύτερης συστάδας του δισυσταδικού συμπολυμερούς, η οποία αποτελείται από μεθακρυλικό εστέρα της ολιγοαιθυλενογλυκόλης. Παρασκευάστηκαν τέσσερα διαφορετικά συμπολυμερή κατά συστάδες πολυ(μεθακρυλικού εστέρα της διμεθυλοαμινοαιθανόλης-co-μεθακρυλικού εστέρα της δωδεκανόλης)-b-πολυ(μεθακρυλικού εστέρα της ολιγοαιθυλενογλυκόλης) (P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA), τα οποία ανά δύο έφεραν ως πρώτη συστάδα το ίδιο τυχαίο συμπολυμερές P(DMAEMA-co-LMA). Τα συμπολυμερή κατά συστάδες διέφεραν ως προς το μοριακό βάρος, την κατανομή μοριακών βαρών και τη κατά βάρος σύσταση (%wt) σε PLMA και POEGMA. Η γενική συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση των συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA περιλαμβάνει την τεχνική πολυμερισμού RAFT και παρουσιάζεται παρακάτω.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός του μονομερούς OEGMA από τους παρεμποδιστές τους οποίους περιείχε (μονομεθυλαιθέρας της υδροκινόνης και τριτοταγής βουτυλική κατεχόλη), διαβιβάζοντας το από στήλη πληρωμένη με τις κατάλληλες ρητίνες.

Έπειτα, σε σφαιρική φιάλη προστέθηκαν οι κατάλληλες ποσότητες τυχαίου συμπολυμερούς P(DMAEMA-co-LMA) (ως αντιδραστήριο μεταφοράς αλυσίδας), αζωδισοβουτυρονιτρίλιο (AIBN) ως απαρχητής, μεθακρυλικός εστέρας της ολιγοαιθυλενογλυκόλης (OEGMA) ως μονομερές και 1,4- διοξάνιο ως διαλύτης για τον πολυμερισμό. Η αναλογία CTA / απαρχητή (σε mol) που χρησιμοποιήθηκε είναι P(DMAEMA-co-LMA) / AIBN = 5.

Στη συνέχεια το διάλυμα απαερώθηκε με τη χρήση αερίου αζώτου για 20 λεπτά και η σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο θερμοκρασίας 70°C για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών η αντίδραση πολυμερισμού τερματίστηκε ψύχοντας το διάλυμα για 10 λεπτά. Σε όλες τις περιπτώσεις, είτε αυξανόταν το ποσοστό της σύστασης σε P(DMAEMA-co-LMA) είτε σε POEGMA, το προϊόν της αντίδρασης καταβυθίστηκε σε δεκαπλάσια περίσσεια κανονικού εξανίου σε σχέση με τον αρχικό όγκο του διαλύματος. Το υπερκείμενο αποχύθηκε και το πολυμερές, απαλλαγμένο πλέον από το OEGMA που δεν αντέδρασε, συλλέχθηκε και ξηράνθηκε σε φούρνο κενού για 48 ώρες.

### **3.4 Χημική τροποποίηση των συμπολυμερών κατά συστάδες P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA**

Στα συμπολυμερή που παρασκευάστηκαν, πραγματοποιήθηκε μετατροπή της τριτοταγούς αμίνης των τμημάτων PDMAEMA σε τεταρτοταγή με τη χρήση του αντιδραστήριου CH<sub>3</sub>I. Το αποτέλεσμα της τροποποίησης αυτής είναι η δημιουργία κατιοντικών πολυηλεκτρολύτων με διαφορετικά χημικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA συμπολυμερή.

#### **3.4.1 Σύνθεση των συμπολυμερών QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA**

Στα δισυσταδικά συμπολυμερή P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA, η τριτοταγής αμινομάδα του PDMAEMA τμήματος (ασθενής κατιοντικός πολυηλεκτρολύτης) μετατράπηκε σε τεταρτοταγές άλας αμμωνίου (ισχυρός κατιοντικός πολυηλεκτρολύτης), με τη χρήση του μεθυλοϊωδιδίου (CH<sub>3</sub>I). Η αντίδραση μετατροπής της τριτοταγούς αμινομάδας σε τεταρτοταγή, βιβλιογραφικά αναφέρεται με τον όρο *quaternization* [77]. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε προκειμένου να μετατραπεί η τριτοταγής αμινομάδα σε τεταρτοταγή είναι παρόμοια με αυτή που αναφέρεται στη βιβλιογραφία. [78]

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής. Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει αραιό διάλυμα (2% w/v) του πολυμερούς P(DMAEMA-co-LMA)-

b-POEGMA σε THF, προστέθηκε υπό μέτρια ανάδευση περίσσεια CH<sub>3</sub>I σε αναλογία κατά mol CH<sub>3</sub>I / αμίνη = 2. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, υπό μέτρια ανάδευση για 24 ώρες. Μετά από 24 ώρες, το THF απομακρύνθηκε με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα (rotary evaporator) και το πολυμερές QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε στο φούρνο κενού για 48 ώρες, προκειμένου να ξηρανθεί και να είναι έτοιμο να χρησιμοποιηθεί για επόμενες πειραματικές διαδικασίες.

### **3.5 Αυτοοργάνωση P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA και QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA σε υδατικά διαλύματα**

Τα αμφίφιλα συμπολυμερή που παρουσιάστηκαν παραπάνω μελετήθηκαν τόσο σε επίπεδο μοριακού χαρακτηρισμού (τα αποτελέσματα εκθέτονται στο επόμενο κεφάλαιο) όσο και βάσει της ικανότητάς τους να αυτοοργανώνονται σε υδατικά διαλύματα σχηματίζοντας νανο-συσσωματώματα. Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της επίδρασης φυσικοχημικών παραμέτρων στη μορφολογία των νανοδομών. Τα συμπολυμερή QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA εμφανίζουν διαφορετική συμπεριφορά όταν διαλύονται σε υδατικά μέσα σε σχέση με τα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA, λόγω των μόνιμα θετικά φορτισμένων τεταρτοταγών αμινομάδων και για τον λόγο αυτό μελετώνται και οι δύο κατηγορίες συμπολυμερών.

Το πρωτόκολλο παρασκευής των πολυμερικών νανοσωματιδίων είναι κοινό και για τις δύο κατηγορίες αμφίφιλων συμπολυμερών κατά συστάδες και περιλαμβάνει την απευθείας διάλυση του στερεού πολυμερούς στον εκλεκτικό διαλύτη H<sub>2</sub>O με pH 7. Έπειτα τα δείγματα αφέθηκαν σε ηρεμία όλη τη νύχτα προκειμένου επέλθει δυναμική ισορροπία.



### **3.6 Επίδραση φυσικοχημικών παραμέτρων στα υδατικά διαλύματα των P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA και QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA σε νανοσωματίδια**

Μετά την αυτοοργάνωση των P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA σε νανο-συσσωματώματα, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της επίδρασης ορισμένων φυσικοχημικών παραμέτρων στις ιδιότητες των διαλυμάτων των παραπάνω πολυμερών. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ανάλογα συστήματα συμπολυμερών που περιέχουν PDMAEMA τμήματα αποκρίνονται σε μεταβολές της θερμοκρασίας [81,82], του pH [79] και της ιοντικής ισχύος [81]. Ενώ συστήματα που περιέχουν QPDMAEMA τμήματα αναμένεται να μην αποκρίνονται σε αλλαγές της θερμοκρασίας [83] και του pH, αλλά να αποκρίνονται σε μεταβολές της ιοντικής ισχύος, καθώς το QPDMAEMA αποτελεί ισχυρό κατιοντικό πολυηλεκτρολύτη μόνιμα θετικά φορτισμένο. Ακολουθεί περιγραφή της διαδικασίας που ακολουθήθηκε για τη μέλετη της εξάρτησης των παραμέτρων αυτών στην αυτοοργάνωση των πολυμερών.

#### **3.6.1 Επίδραση της θερμοκρασίας**

Με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης των μεταβολών της θερμοκρασίας στις ιδιότητες των διαλυμάτων των πολυμερών διεξήχθησαν μετρήσεις στατικής, δυναμικής σκέδασης φωτός και φασματοσκοπίας φθορισμού. Αρχικά, παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα συγκεντρώσεων  $5,0 \times 10^{-3}$  g/ml σε pH 7. Οι μετρήσεις στατικής και δυναμικής σκέδασης φωτός πραγματοποιήθηκαν σε εύρος θερμοκρασιών από 25°C έως 70°C, ανά 5°C και το διάλυμα παρέμενε σε κάθε θερμοκρασία 15 λεπτά, πριν από τη μέτρηση, προκειμένου να επιτευχθεί εξισορρόπηση. Οι μετρήσεις δυναμικής/στατικής σκέδασης έγιναν υπό γωνία 90°. Οι μετρήσεις φασματοσκοπίας φθορισμού έγιναν σε θερμοκρασία 25°C και 45°C. Παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης  $1,0 \times 10^{-3}$  g/mL σε pH 7 και ιχνηθετήθηκαν με πυρένιο, σε αναλογία 1  $\mu$ L διαλύματος πυρενίου (C= 1mM) / 1 mL διαλύματος πολυμερούς. Τα δείγματα αφέθηκαν σε ηρεμία για 24 ώρες, ώστε να εγκλωβιστεί το πυρένιο στον υδρόφοβο πυρήνα των

νανοσωματιδίων και έπειτα μετρήθηκαν. Πρώτα πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις στους 25°C και στη συνέχεια η θερμοκρασία αυξήθηκε στους 55°C, όπου το διάλυμα παρέμεινε για 15 λεπτά προκειμένου να επέλθει εξισορόπηση και έπειτα μετρήθηκε. Οι μετρήσεις φασματοσκοπίας φθορισμού πραγματοποιήθηκαν υπό γωνία 90°.

### 3.6.2 Επίδραση της μεταβολής του pH

Η επίδραση της μεταβολής του pH στις ιδιότητες των νανοσωματιδίων που σχηματίζονται ως συνέπεια της αυτοοργάνωσης του δυσσταδικού συμπολυμερούς P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA σε υδατικά διαλύματα εξετάστηκε με τις τεχνικές δυναμικής και στατικής σκέδασης φωτός καθώς και φασματοσκοπίας φθορισμού. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε η μικροσκοπία ατομικής δύναμης για την ανίχνευση δομικών και μορφολογικών αλλαγών που επιφέρει η μεταβολή του pH. Αρχικά, παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης  $1.0 \times 10^{-3}$  g/mL σε pH 7 και μελετήθηκαν με δυναμική και στατική σκέδαση φωτός. Όταν ολοκληρώθηκαν οι μετρήσεις σε pH 7, σε κυψελίδα που περιείχε διάλυμα όγκου 1 mL προστέθηκε στάγδην κατάλληλος όγκος υδατικού διαλύματος NaOH 0.1M ώστε να ρυθμιστεί το pH από τη τιμή 7 στη τιμή 9. Το δείγμα αφέθηκε σε ηρεμία για 15 λεπτά ώστε να επέλθει ισοροπία και έπειτα μετρήθηκε. Τέλος, μετά το πέρας των μετρήσεων σε pH 9 στο ίδιο διάλυμα προστέθηκε κατάλληλος όγκος υδατικού διαλύματος HCl 1M ώστε το pH να μετατραπεί από 7 σε 3. Το δείγμα αφέθηκε σε ηρεμία για 15 λεπτά ώστε να επέλθει ισοροπία και έπειτα μετρήθηκε. Οι μετρήσεις δυναμικής/στατικής σκέδασης του φωτός πραγματοποιήθηκαν υπό γωνία 90°. Προκειμένου να διεξαχθούν οι μετρήσεις φασματοσκοπίας φθορισμού, παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης  $1.0 \times 10^{-3}$  g/mL σε pH 7, 9 και 3. Η τροποποίηση του pH από 7 σε 9 και από 7 σε 3 έγινε με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Στην περίπτωση της φασματοσκοπίας φθορισμού, η ρύθμιση του pH έγινε πριν την διεξαγωγή των μετρήσεων ώστε να καταστεί δυνατή η προσθήκη πυρενίου (σε αναλογία 1  $\mu$ L / 1 mL) που δρά σαν ιχνηθέτης. Τα δείγματα αφέθηκαν σε ηρεμία για 24 ώρες και έπειτα μετρήθηκαν.

### 3.6.3 Επίδραση της ιοντικής ισχύος

Η επίδραση της ιοντικής ισχύος μελετήθηκε στο σύστημα QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA, με σταδιακή προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων υδατικού διαλύματος NaCl 1M έτσι ώστε να επιτευχθούν οι εξής διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος στο δείγμα:

**$C_{NaCl}$ : 0.01M, 0.02M, 0.03M, 0.047M, 0.091M, 0.2M, 0.33M, 0.43M, 0.5M**

Η κάθε προσθήκη πραγματοποιούνταν στο ίδιο διάλυμα ανά 15 λεπτά. Μετά από 15 λεπτά από τη προσθήκη, το διάλυμα μετρήθηκε μέσω της δυναμικής σκέδασης φωτός. Η αρχική συγκέντρωση διαλύματος ήταν  $1.0 \times 10^{-3} \text{ g/ml}$  σε pH 7. Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν με την απευθείας διαλυτοποίηση του πολυμερούς σε NaCl 0.01 M. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν υπό γωνία  $90^\circ$

### 3.7 Σύμπλεξη των QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA συσσωματωμάτων με μόρια DNA

Τα αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA συμπλέχθηκαν με μόρια DNA προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητάς τους ως φορείς γενετικού υλικού. Η σύμπλεξη του DNA με το συμπολυμερές QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 επιτεύχθηκε με την ανάμιξη του διαλύματος του πολυμερούς με το διάλυμα του DNA .

Παρασκευάστηκαν σύμπλοκα με δέκα διαφορετικούς λόγους N/P. Οι λόγοι που επιλέχθηκαν είναι:

<b>N/P</b>										
<b>ratio</b>	<b>0.25</b>	<b>0.5</b>	<b>0.75</b>	<b>1</b>	<b>1.25</b>	<b>1.5</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>8</b>

Ο λόγος N/P εκφράζεται σε mol και ορίζεται ως ο λόγος των θετικά φορτισμένων μονάδων για τις αλυσίδες του QPDMAEMA που αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του μορίου του DNA.

Η σύμπλεξη επιτεύχθηκε ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφεται στη συνέχεια. Αρχικά, παρασκευάστηκε διάλυμα πολυμερούς συγκέντρωσης

$1.0 \times 10^{-3} \text{ g/mL}$  σε διαλύτη NaCl 0.01M και διάλυμα DNA  $2.0 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$  σε διαλύτη NaCl 0.01M.

Οι υπολογισμοί των ποσοτήτων έγιναν ως εξής: υπολογίζεται η κατά βάρος σύσταση (%wt) σε QPDMAEMA και συνεπώς υπολογίζονται τα mol QPDMAEMA που υπάρχουν στο διάλυμα συγκέντρωσης  $1.0 \times 10^{-3} \text{ g/mL}$ . Δεδομένου ότι ο αριθμός των mol QPDMAEMA παραμένει σταθερός σε όλα τα δείγματα και με βάση τον λόγο N/P του συμπλόκου που θέλουμε να παρασκευάσουμε υπολογίζουμε τα mol των φωσφορικών ομάδων και βρίσκουμε την ποσότητα DNA που θα χρησιμοποιήσουμε σε κάθε περίπτωση.

Τα αρχικά διαλύματα πολυμερούς και DNA που αφέθηκαν σε ηρεμία για 24 ώρες και η ανάμειξή τους ανάλογα με τον επιθυμητό λόγο N/P, πραγματοποιήθηκε την επόμενη μέρα. Το πρωτόκολλο ανάμειξης που χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται παρακάτω. Σε κάθε διάλυμα πολυμερούς όγκου 2 mL που αναδεύεται ήπια προστίθεται σε κατάλληλη ποσότητα το διάλυμα του DNA. Το διάλυμα συνεχίζει να αναδεύεται για περίπου 2 λεπτά και έπειτα αραιώνεται με NaCl 0.01 M έως ότου ο τελικός του όγκος είναι 10 mL. Τα σύμπλοκα που σχηματίστηκαν αφέθηκαν σε ηρεμία για 24 ώρες ώστε η σύζευξη των θετικά φορτισμένων ομάδων του QPDMAEMA με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του μορίου του DNA να έρθει σε ισορροπία.

Οι ιδιότητες των συμπλόκων που παρασκευάστηκαν, μελετήθηκαν με πλήθος τεχνικών, οι οποίες είναι: στατική-δυναμική-ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός, φασματοσκοπία UV-Vis-NIR και μικροσκοπία ατομικής δύναμης. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στο επόμενο κεφάλαιο. Επιπρόσθετα, εφαρμόστηκαν μελέτες απόσβεσης φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου. Προκειμένου να διερευνηθεί η ικανότητα των ομάδων του QPDMAEMA να σχηματίζει σύμπλοκα με μόρια DNA, εξετάστηκε ο φθορισμός του βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide, EtBr) σε διάφορες N/P αναλογίες. Παρασκευάστηκε διάλυμα DNA συγκέντρωσης  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mg/mL}$ , στο οποίο προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο σε αναλογία  $[EB]=[P]/4$  (κατά mol) και διάλυμα πολυμερούς συγκέντρωσης  $1.0 \times 10^{-3} \text{ mg/mL}$ . Έπειτα, το διάλυμα του DNA τιτλοδοτήθηκε με το διάλυμα του πολυμερούς ξεκινώντας από λόγο N/P ίσο με 0.25 καταλήγοντας σε N/P ίσο με 8. Οι μετρήσεις

πραγματοποιήθηκαν σε  $\lambda_{\text{excitation}} = 535 \text{ nm}$  και η εκπομπή παρατηρήθηκε σε  $\lambda_{\text{emission}} = 620 \text{ nm}$ .

Τέλος, εξετάστηκε πως επιδρά η αύξηση της ιοντικής ισχύος στις ιδιότητες των συμπλόκων του QPDMAEMA με DNA. Η αρχική συγκέντρωση άλατος στα σύμπλοκα είναι NaCl 0.01M. Με σταδιακή προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων υδατικού διαλύματος NaCl 1M, επιτεύχθηκαν οι εξής διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος σε κάθε δείγμα:

**$C_{\text{NaCl}}$ : 0.01M, 0.02M, 0.03M, 0.047M, 0.091M, 0.2M, 0.33M, 0.43M, 0.5M**

### **3.8 Εγκλωβισμός κουρκουμίνης στα νανοσωματίδια των P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA**

Ο εγκλωβισμός της κουρκουμίνης στα συσσωματώματα του P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA έγινε αρχικά χρησιμοποιώντας ως διαλύτη H<sub>2</sub>O σε pH 7 και στη συνέχεια NaCl 0.15M. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται αμέσως μετά. Αρχικά γίνεται η παρασκευή δυο ξεχωριστών διαλυμάτων, πολυμερούς σε THF συγκέντρωσης  $1.0 \times 10^{-2} \text{ g/mL}$  και κουρκουμίνης σε THF. Ακολουθεί ανάμειξη των διαλυμάτων αυτών και ένεσή τους με μεγάλη ταχύτητα στο υπό γρήγορη ανάδευση H<sub>2</sub>O (ή NaCl 0.15M). Στη συνέχεια, το THF εξατμίζεται τοποθετώντας το υπό ανάδευση δείγμα σε υδρόλουτρο 50°C. Μετά την εξάτμιση του THF συμπληρώνεται στο δείγμα H<sub>2</sub>O (ή NaCl 0.15M) έως ότου ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 10 mL και η συγκέντρωση του πολυμερούς στο διάλυμα  $1.0 \times 10^{-3} \text{ g/mL}$ .

Οι υπολογισμοί των ποσοτήτων πραγματοποιήθηκαν με βάση:

- το % κ.β ποσοστό (%wt) του PLMA, καθώς αυτό αποτελεί το υδρόφοβο συστατικό του πολυμερούς.
- Το επιθυμητό ποσοστό της κουρκουμίνης που θα εγκλωβιστεί στα νανοσωματίδια.

Τα δείγματα που προέκυψαν μελετήθηκαν με δυναμική-στατική-ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός. Κατασκευάστηκε επίσης η πρότυπη

καμπύλη αναφοράς της κουρκουμίνης, μετρώντας την απορρόφηση σε  $\lambda_{max} = 420 \text{ nm}$ , έξι διαφορετικών συγκεντρώσεων κουρκουμίνης σε THF με φασματοσκοπία Uv-Vis. Στη συνέχεια, τα δείγματα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA/Curcumin που παρασκευάστηκαν, αναμείχθηκαν με THF και μετρήθηκε η απορρόφησή τους σε  $\lambda_{max} = 420 \text{ nm}$  με φασματοσκοπία Uv-Vis. Με βάση την καμπύλη αναφοράς και την τιμή απορρόφησης κάθε δείγματος, κατέσται δυνατό να υπολογιστεί το πραγματικό ποσοστό κουρκουμίνης που εγκλωβίστηκε στα πολυμερικά νανο-συσσωματώματα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

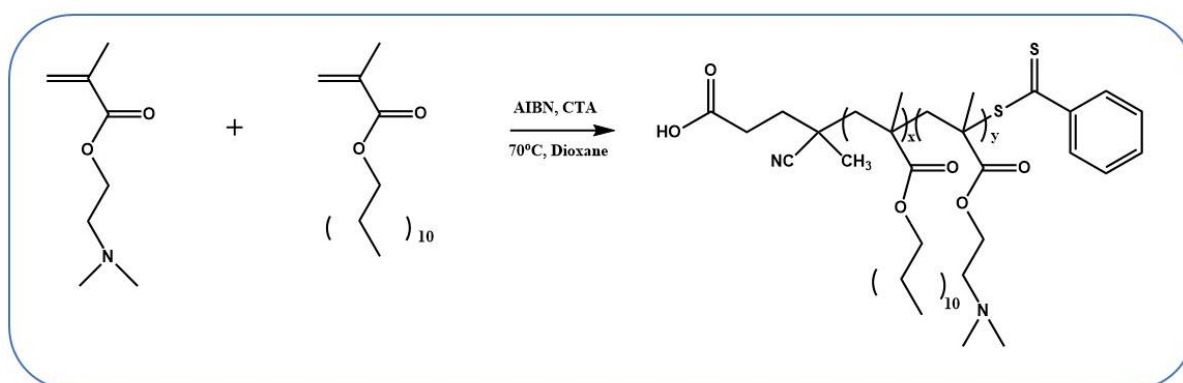
Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται οι πορείες σύνθεσης των αμφίφιλων συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA), P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA και QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA, καθώς και τα μοριακά χαρακτηριστικά τους. Ο μοριακός χαρακτηρισμός τους, επιτεύχθηκε μέσω των τεχνικών: Χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC), Φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου ( $^1\text{H-NMR}$ ) και Φασματοσκοπίας Υπερύθρου (FT-IR). Στη συνέχεια μελετήθηκαν οι ιδιότητές τους σε υδατικά διαλύματα υπό την επίδραση φυσικοχημικών παραμέτρων. Ειδικότερα, οι ιδιότητες των συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA σε υδατικά διαλύματα εξετάστηκαν υπό την επίδραση της θερμοκρασίας και του pH μέσω των τεχνικών φασματοσκοπίας Φθορισμού, της Στατικής και Δυναμικής-Ηλεκτροφορετικής σκέδασης φωτός. Επίσης, μέσω της φασματοσκοπίας φθορισμού ανιχνεύτηκε η κρίσιμη συγκέντρωση των συσσωματωμάτων, σε δείγματα που το επέτρεπε η αναλογία υδρόφοβου/ υδρόφιλου τμήματος. Η μορφολογία των νανοσωματιδίων που σχηματίστηκαν ως αποτέλεσμα της αυτοοργάνωσης τους σε υδατικά διαλύματα εξετάστηκε και με τη χρήση της μεθόδου μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (AFM).

Στη συνέχεια, βάσει των μοριακών και φυσικοχημικών ιδιοτήτων των συμπολυμερών Q(PMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA επιλέχθηκε ένα συστήματα προκειμένου να συμπλεχθούν με μόρια DNA. Τα αποτελέσματα της σύμπλεξης μελετήθηκαν με Στατική, Δυναμική, Ηλεκτροφορετική σκέδαση φωτός, ενώ η επίδραση της ιοντικής ισχύος εξετάστηκε με Δυναμική/Στατική σκέδαση φωτός. Η ικανότητα της σύμπλεξης των μορίων του DNA με το κατιοντικό συμπολυμερές μελετήθηκε μέσω της φασματοσκοπίας φθορισμού, καθώς η δομή του DNA στα σύμπλοκα μελετήθηκε μέσω της φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis). Η μορφολογία των συμπλόκων παρατηρήθηκε μέσω της μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (AFM).

Τέλος, εγκλωβίστηκε το αντικαρκινικό φάρμακο κουρκουμίνη στα συσσωματώματα δύο συστημάτων της κατηγορίας συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA. Τα αποτελέσματα του εγκλωβισμού της κουρκουμίνης μελετήθηκαν με Δυναμική, Στατική, Ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός, φασματοσκοπία υπερύθρου. Ένω το ποσοστό του φαρμάκου που εγκλωβίστηκε υπολογίστηκε με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους.

#### 4.1 Σύνθεση συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA

Αρχικά η σύνθεση του τυχαίου συμπολυμερούς P(DMAEMA-co-LMA) έγινε με την τεχνική πολυμερισμού RAFT, χρησιμοποιώντας ως απαρχητή το AIBN και ως CTA το 4-κυανο-4-(φαινυλοκαρβονυλοθειο) πεντανοϊκό οξύ και ως διαλύτη το 1,4-διοξάνιο. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 70°C για 18 ώρες και περιγράφεται στο Σχήμα 4.1.



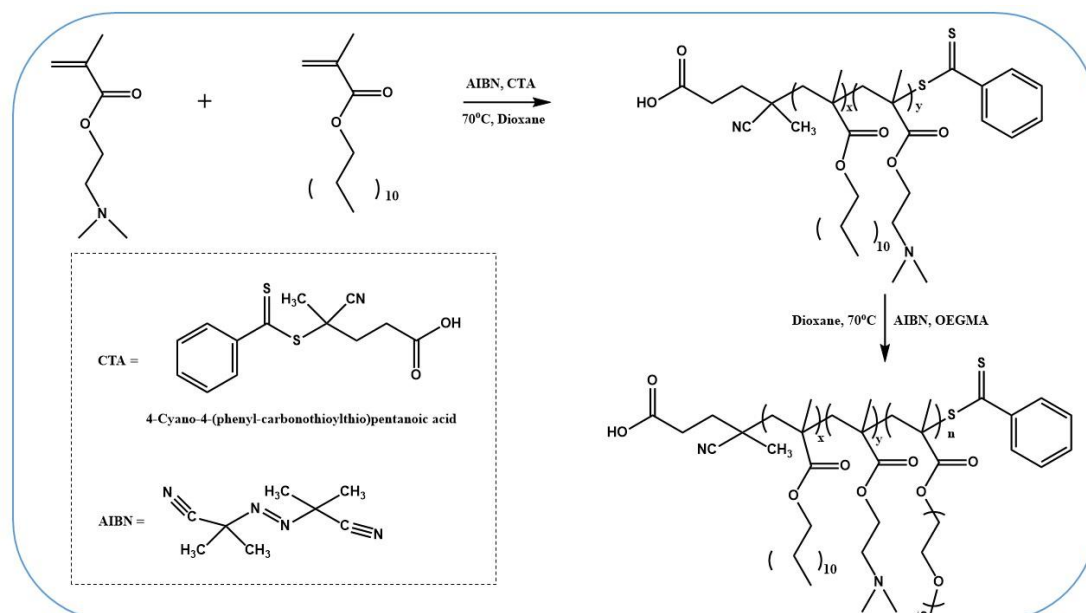
Σχήμα 4.1: Συνθετική πορεία για τη παρασκευή του αμφίφιλου τυχαίου συμπολυμερούς P(DMAEMA-co-LMA)

Συντέθηκαν δύο τυχαία συμπολυμερή με διαφορετικό μοριακό βάρος και διαφορετική κατά βάρος αναλογία PDMAEMA/ PLMA (Πίνακας 4.1).

Η σύνθεση όλων των αμφίφιλων συμπολυμερών κατά συστάδες P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA πραγματοποιήθηκε μέσω της τεχνικής RAFT, χρησιμοποιώντας το τυχαίο συμπολυμερές P(DMAEMA-co-LMA) ως μακρο-CTA, AIBN ως απαρχητή και διαλύτη 1,4 διοξάνιο. Η αντίδραση



πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 70°C για 24 ώρες και περιγράφεται στο Σχήμα 4.2.



**Σχήμα 4.2: Γενική συνθετική πορεία παρασκευής συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA**

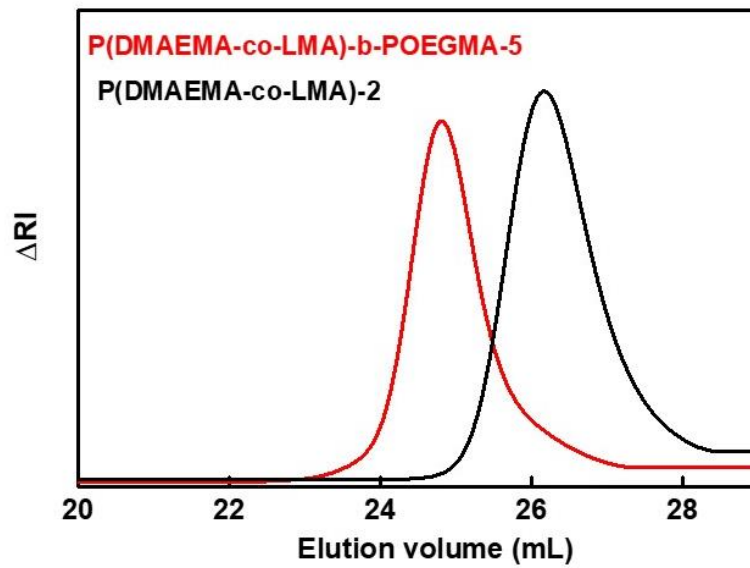
Τελικά συντέθηκαν τέσσερα δισυσταδικά συμπολυμερή διαφορετικού μοριακού βάρους, τα οποία ανά δυο έφεραν σαν πρώτη συστάδα το ίδιο τυχαίο συμπολυμερές P(DMAEMA-co-LMA). Τα μοριακά χαρακτηριστικά τόσο των τυχαίων συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA) όσο και των δισυσταδικών συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA περιγράφονται στον Πίνακα 4.1. Τα δισυσταδικά συμπολυμερή P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA μετά τον καθαρισμό τους από μονομερή που μπορεί να μην είχαν αντιδράσει και την ξηρανσή τους παραλήφθηκαν σε μορφή γέλης.

#### 4.2 Μοριακός χαρακτηρισμός των P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA

Τα μοριακά βάρη και οι κατανομές μοριακών βαρών τόσο του τυχαίου όσο και του δισυσταδικού συμπολυμερούς που συντέθηκαν προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία αποκλεισμού μοριακών βαρών (SEC) και παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.

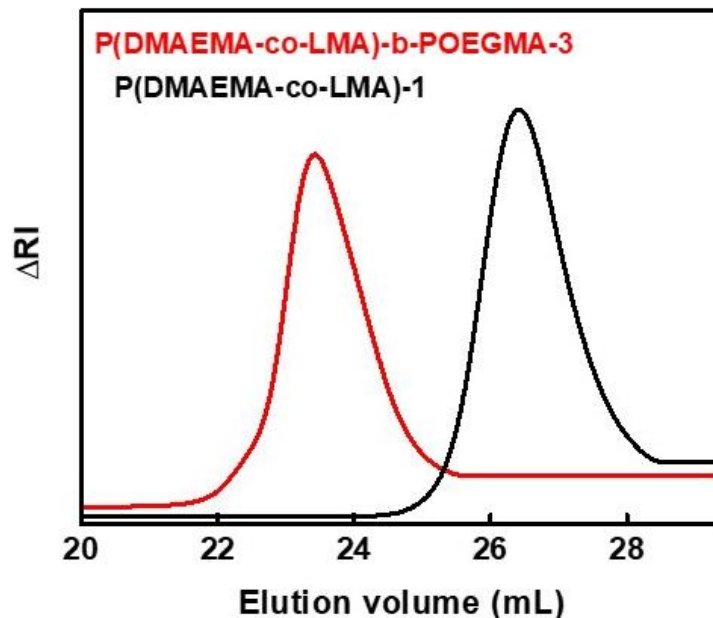
Χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα των P(DMAEMA-co-LMA) και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA παρουσιάζονται παρακάτω. Μέσα από την ανάλυση των χρωματογραφημάτων διαπιστώθηκε ο επιτυχής έλεγχος των μοριακών βαρών των συμπολυμερών που συντέθηκαν, ο οποίος επιτεύχθηκε εφαρμόζοντας την τεχνική του ελεγχόμενου πολυμερισμού RAFT και επιλέγοντας τις κατάλληλες συνθήκες πολυμερισμού. Επίσης πάρθηκαν τα επιθυμητά αποτελέσματα όσον αφορά την καθαρότητα των τελικών συμπολυμερών και τις κατανομές μοριακών βαρών. Οι τιμές των κατανομών των μοριακών βαρών είναι μικρές και ικανοποιητικές όπως επιβάλλει το θεωρητικό υπόβαθρο της τεχνικής πολυμερισμού RAFT.

Στο Σχήμα 4.3 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των P(DMAEMA-co-LMA)-2 και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5. Η σύνθεση του δισυσταδικού συμπολυμερούς P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 έγινε χρησιμοποιώντας P(DMAEMA-co-LMA)-2 σαν πρώτη συστάδα. Από το παρακάτω σχήμα φαίνονται οι στενές κατανομές μοριακών βαρών και συνεπώς ο έλεγχος των μοριακών βαρών ήταν επιτυχής. Επιπλέον το P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 έχει μικρότερο όγκο έκλουσης από το P(DMAEMA-co-LMA)-2, στοιχείο που επιδεικνύει την αύξηση του μοριακού βάρους μετά από τον πολυμερισμό του OEGMA και άρα την επιτυχή σύνθεση του P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5.



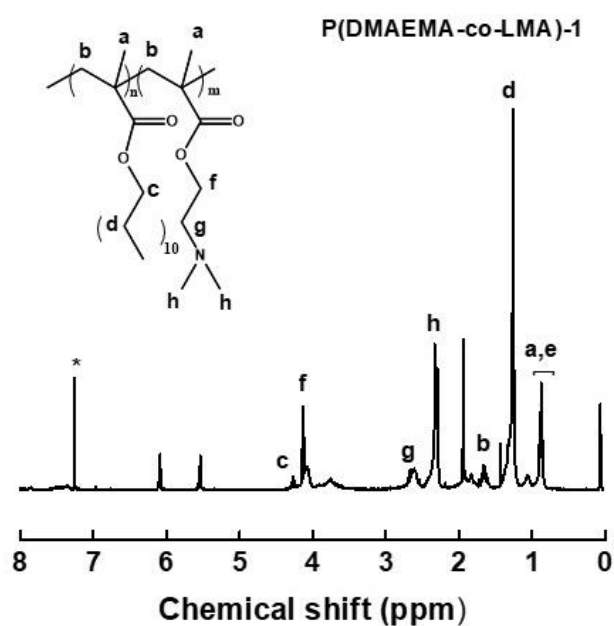
Σχήμα 4.3: Χρωματογραφήματα SEC των δειγμάτων P(DMAEMA-co-LMA)-2 και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5

Ανάλογη είναι και η περίπτωση του δισυσταδικού συμπολυμερούς P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-3, η σύνθεση του οποίου έγινε χρησιμοποιώντας σαν πρώτη συστάδα το P(DMAEMA-co-LMA)-1. Ενδεικτικά, παρουσιάζονται παρακάτω τα χρωματογραφήματά τους, στο Σχήμα 4.4.

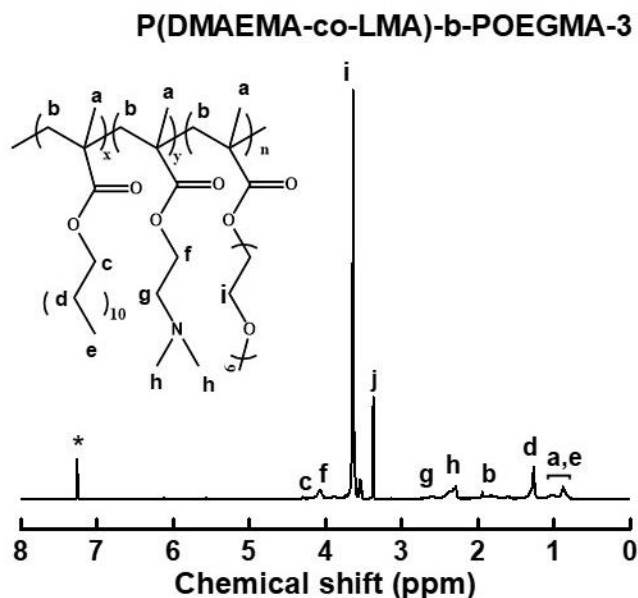


Σχήμα 4.4: Χρωματογραφήματα SEC των δειγμάτων P(DMAEMA-co-LMA)-1 και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-3

Η ταυτοποίηση της χημικής δομής και ο προσδιορισμός της σύστασης των συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA) και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA πραγματοποιήθηκαν με φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ . Χαρακτηριστικά παραδείγματα δίνονται στα Σχήματα 4.5 και 4.6 μαζί με την αποτίμηση των κορυφών του φάσματος σε σχέση με τις δομικές μονάδες των συμπολυμερών.



Σχήμα 4.5: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του τυχαίου συμπολυμερούς P(DMAEMA-co-LMA)-1 σε  $\text{CDCl}_3$



**Σχήμα 4.6: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του δισυσταδικού συμπολυμερούς P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-3**

Με βάση τα παραπάνω ενδεικτικά φάσματα  $^1\text{H-NMR}$ , παρατηρούμε την εμφάνιση νέων κορυφών στο φάσμα του P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA

(Σχήμα 4.6), η οποίες οφείλονται στη συστάδα του POEGMA. Επιπλέον στο Σχήμα 4.6 παρατηρείται διαφορά στην ένταση και στο πλάτος των ήδη υπάρχουσών κορυφών που οφείλονται στο PDMAEMA και στο PLMA σε σχέση με το Σχήμα 4.5 η οποία οφείλεται στην διαφοροποίηση της σύστασης τους στο δισυσταδικό συμπολυμερές. Για τον υπολογισμό της σύστασης του τυχαίου συμπολυμερούς (Σχήμα 4.5) επιλέχθηκαν τα  $-\text{CH}_2$  υδρογόνα της πλευρικής ομάδας των 10 ανθράκων που αντιστοιχούν στο τμήμα του PLMA (κορυφή d) και εμφανίζονται στα 1.25 ppm και τα  $-\text{CH}_3$  υδρογόνα των δύο μεθυλίων που αντιστοιχούν στην αμινομάδα του τμήματος του PDMAEMA (κορυφή h) και εμφανίζονται 2.27 ppm. Στη συνέχεια έγινε διαίρεση του εμβαδού κάθε κορυφής με τον αριθμό των υδρογόνων που αντιστοιχούν σε αυτή και στη συνέχεια πολλαπλασιάζοντας τον αριθμό που προκύπτει με το μοριακό βάρος της αντίστοιχης μονομερικής μονάδας. Τέλος η κατά βάρος σύσταση κάθε τμήματος διαιρώντας τον παραπάνω αριθμό με το άθροισμα αυτού και για τις δύο κορυφές. Οι πειραματικά προσδιορισμένες συστάσεις

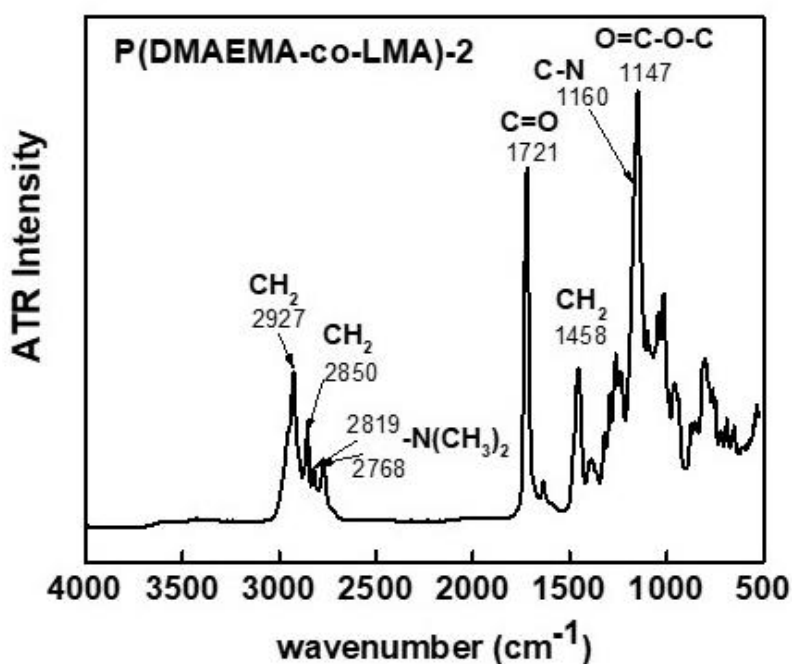
συμφωνούν αρκετά καλά με τις στοιχειομετρικά επιδιωκόμενες, γεγονός που καταδεικνύει τον έλεγχο της διαδικασίας πολυμερισμού στα συγκεκριμένα

συστήματα. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την εύρεση της σύστασης του δισυσταδικού συμπολυμερούς. Για τον υπολογισμό της σύστασης των τμημάτων του PDMAEMA και του PLMA επιλέχθηκε η ίδια οικογένεια υδρογόνων όπως και πριν ενώ για τη συστάδα του POEGMA επιλέχθηκαν τα  $-CH_2$  υδρογόνα (κορυφή i) που εμφανίζονται στα 3.64 ppm.

**Πίνακας 4.1: Μοριακά χαρακτηριστικά P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA**

Δείγμα Συμπολυμερούς	$M_w$ ( $\times 10^4$ ) (g/mol) (SEC)	$M_w / M_n$ (SEC)	$M_w^{random}$ block ( $\times 10^4$ ) (g/mol) (SEC)	Σύσταση %wt PDMAEMA ( $^1H$ -NMR)	Σύσταση %wt PLMA ( $^1H$ -NMR)	Σύσταση %wt POEGMA ( $^1H$ -NMR)
P(DMAEMA-co-LMA)-1	0.21	1.13	-	56	44	-
P(DMAEMA-co-LMA)-2	0.23	1.1	-	62	38	-
P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-3	1.96	1.4	0.21	26	14	60
P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4	1.24	1.15	0.21	26	19	55
P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5	0.53	1.19	0.23	35	18	47
P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6	1.3	1.25	0.23	13	7	80

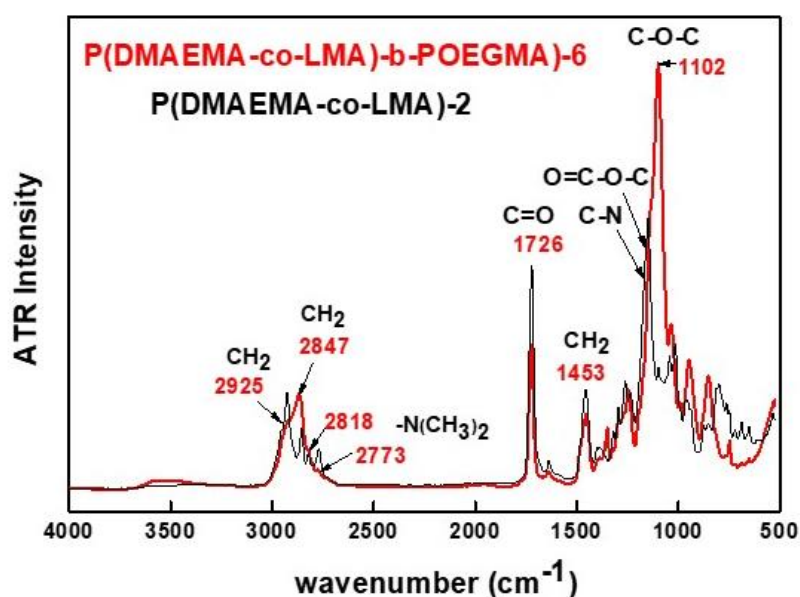
Η ταυτοποίηση της χημικής δομής των συμπολυμερών έγινε ποιοτικά και με την εφαρμογή της φασματοσκοπίας FT-IR. Παρουσιάζονται παρακάτω ενδεικτικά φάσματα μαζί με την αποτίμηση κορυφών για τις χαρακτηριστικές χημικές ομάδες που φέρουν τα συμπολυμερή.



Σχήμα 4.7: Φάσμα ATR-FTIR του τυχαίου συμπολυμερούς P(DMAEMA-co-LMA)-2

Στο Σχήμα 4.7 παρουσιάζεται το φάσμα FT-IR του P(DMAEMA-co-LMA)-2. Από την αποτίμηση των κορυφών, οι μπάντες απορρόφησης: στα 2927 cm<sup>-1</sup> αντιστοιχούν σε δονήσεις έκτασης δεσμών C-H των ομάδων -CH<sub>2</sub> (ασύμμετρη έκταση), ενώ αυτή στα 2850 cm<sup>-1</sup> αντιστοιχεί στις ίδιες ομάδες αλλά σε συμμετρική έκταση του δεσμού. Οι δονήσεις αυτές είναι αποτέλεσμα των -CH<sub>2</sub> του PDMAEMA και του PLMA. Οι κορυφές στους κυματαριθμούς 2819 cm<sup>-1</sup> και 2768 cm<sup>-1</sup> αντιστοιχούν σε δονήσεις έκτασης δεσμών της ομάδας της τριτοταγούς αμίνης N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> του PDMAEMA. Η κορυφή που εμφανίζεται στα 1721 cm<sup>-1</sup> αντιστοιχεί σε δονήσεις έκτασης του καρβονυλίου

της εστερικής ομάδας τόσο του PDMAEMA όσο και του PLMA. Στα  $1458\text{ cm}^{-1}$  παρατηρείται μια ασύμμετρη κάμψη που αντιστοιχεί στους δεσμούς C-H των  $-\text{CH}_2$ . Στα  $1147\text{ cm}^{-1}$  παρατηρείται μια δόνηση έκτασης δεσμών της ομάδας O=C-O. Ωστόσο σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές σε αυτούς τους κυματάρθμους αναμένεται και η δόνηση έκτασης δεσμού του C-N. [83] Θεωρούμε λοιπόν ότι υπάρχει αλληλεπικάλυψη των κορυφών με αποτέλεσμα να μην μπορούμε να διακρίνουμε ποια μπάντα αντιστοιχεί σε κάθε μια από τις δύο χημικές ομάδες. Κρίνοντας από βιβλιογραφικά στοιχεία, θεωρούμε ότι η δόνηση της O=C-O είναι ισχυρότερη.



**Σχήμα 4.8:** Συγκριτικό φάσμα ATR-FTIR των συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA)-2 και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6

Στο *Σχήμα 4.8* παρουσιάζονται συγκριτικά τα φάσματα FT-IR του P(DMAEMA-co-LMA)-2 και του P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6. Οι διαφορές που παρατηρούνται στα δύο φάσματα δεν είναι μεγάλες καθώς ορισμένες χημικές ομάδες είναι κοινές και για τα τρία μονομερή. Παρά ταύτα υπάρχουν ορισμένες διαφοροποιήσεις μεταξύ των φασμάτων που επιδεικνύουν ότι πρόκειται για διαφορετικά πολυμερή. Αρχικά στο φάσμα του P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 παρατηρείται αλλαγή στην μορφή των κορυφών στα  $2925\text{ cm}^{-1}$  και στα  $2847\text{ cm}^{-1}$  σε σχέση με το φάσμα του τυχαίου συμπολυμερούς. Στο φάσμα του τυχαίου συμπολυμερούς είναι δύο



ξεχωριστές κορυφές ενώ στο φάσμα του δισυσταδικού υπάρχει η τάση για αλληλεπικάλυψή τους. Η τάση αυτή μάλλον οφείλεται στο γεγονός ότι οι δονήσεις αυτές είναι αποτέλεσμα των  $-CH_2$  του PDMAEMA, του PLMA και του POEGMA. Παρατηρείται επίσης κορυφή στα  $1102\text{ cm}^{-1}$  με αυξημένη ένταση αναλογικά με τις υπόλοιπες κορυφές του φάσματος, στοιχείο που καταδεικνύει ότι όντως η κορυφή οφείλεται σε δόνηση έκτασης δεσμών της ομάδας C-O-C, διότι αυτή περιέχεται στη δομική μονάδα του μονομερούς OEGMA. [84]

#### **4.3 Μοριακός - Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των συσσωματωμάτων συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA**

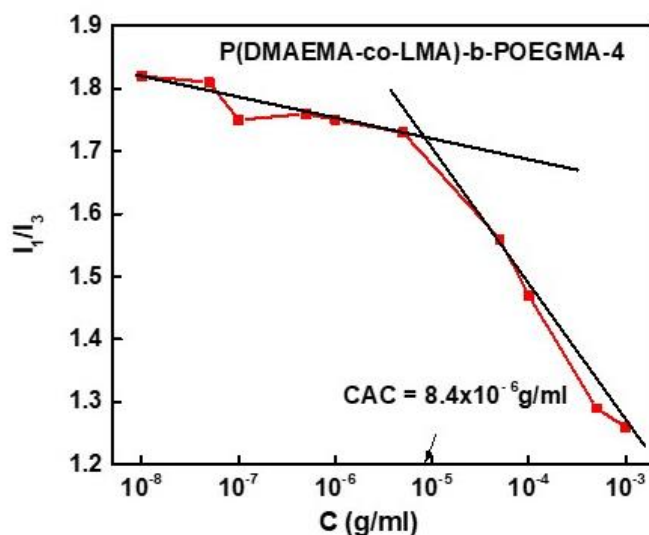
Η αυτοργάνωση των αμφίφιλων δισυσταδικών πολυμερών σε υδατικά μέσα πραγματοποιήθηκε με την απευθείας διάλυση των πολυμερών σε νερό με pH 7. Το πρωτόκολλο σχηματισμού συσσωματωμάτων ήταν κοινό και για τα τέσσερα αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες. Τα διαλύματα των πολυμερών μετρήθηκαν την επόμενη από την παρασκευή τους ημέρα με σκοπό την επίτευξη ισορροπίας.

Τα υδατικά διαλύματα των P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA συμπολυμερών διερευνήθηκαν μέσω της φασματοσκοπίας φθορισμού προκειμένου να διερευνηθεί εάν παρουσιάζουν κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού συσσωματωμάτων (CAC). Ο σκόπος των πειράματων εύρεσης κρίσιμης συγκέντρωσης σχηματισμού συσσωματωμάτων έγινε προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της αρχιτεκτονικής των δισυσταδικών συμπολυμερών στη δημιουργία συσσωματωμάτων καθώς η μια συστάδα αποτελεί τυχαίο συμπολυμερές. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με εγκλωβισμό του πυρενίου στο υδρόφοβο τμήμα των συσσωματωμάτων. Η CAC ορίζεται ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο σημείο που ο λόγος των σχετικών εντάσεων της πρώτης και τρίτης κορυφής ( $I_1/I_3$ ) που εμφανίζονται στο φάσμα του πυρενίου. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αναμένεται η μείωση της CAC με την αύξηση του ποσοστού της υδρόφοβης συστάδας.[85]

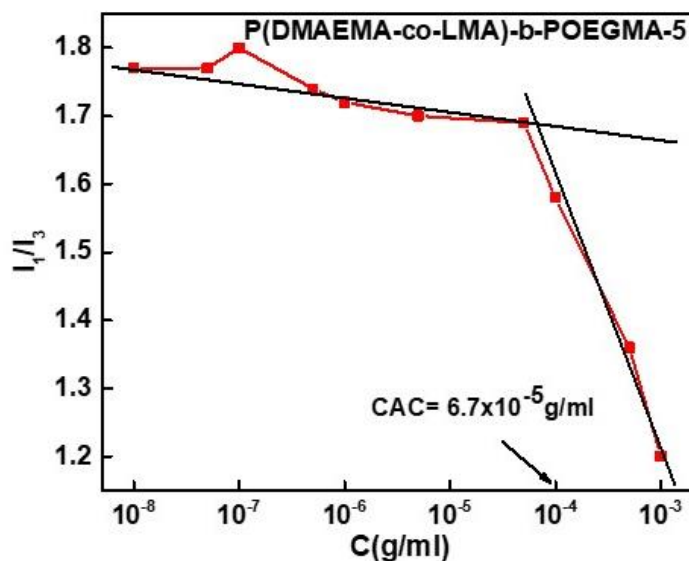
Για τον προσδιορισμό της CAC (και της CMC) χρησιμοποιείται ως ιχνηθέτης το πυρένιο γιατί αποτελεί υδρόφοβη ένωση με μικρή διαλυτότητα στο νερό που μπορεί όμως να αυξηθεί σημαντικά σε λιγότερο πολικό περιβάλλον, αφού

ως υδρόφοβη ουσία μπορεί να εισχωρήσει στο εσωτερικό των υδρόφοβων περιοχών των συσσωματωμάτων. Ο λόγος  $I_1/I_3$  είναι πολύ ευαίσθητος στις μεταβολές πολικότητας του διαλύτη. Αύξηση του υδρόφοβου συστατικού σημαίνει ότι μεγαλύτερο ποσοστό πυρενίου θα εγκλωβιστεί στα συσσωματώματα καθώς ανιχνεύει την ύπαρξη υδρόφοβου μικροπεριβάλλοντος και άρα αναμένεται ο λόγος  $I_1/I_3$  να έχει τιμή 1.0-1.3 που αντιπροσωπεύει υδρόφοβο μικροπεριβάλλον.

Με βάση λοιπόν τις ιδιότητες του πυρενίου και το πρωτόκολλο εύρεσης CAC, επιλέχθηκαν δύο συμπολυμερή, αυτά με το μεγαλύτερο ποσοστό υδρόφοβου συστατικού (PLMA) δηλαδή τα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4 και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-. Τα διαγράμματα συγκέντρωσης συναρτήσεως της έντασης του λόγου των σχετικών κορυφών  $I_1 / I_3$  του πυρενίου για τα δύο συμπολυμερή παρουσιάζονται παρακάτω. Με βάση τα αποτελέσματα των μετρήσεων, αποδείχθηκε ο σχηματισμός συσσωματωμάτων όταν τα δισυσταδικά συμπολυμερή εισέρχονται σε υδατικό μέσο. Η πεποίθηση αυτή στη συνέχεια επιβεβαιώθηκε και με την εφαρμογή άλλων τεχνικών.



**Σχήμα 4.9: Διάγραμμα της έντασης του λόγου των σχετικών κορυφών  $I_1 / I_3$  του πυρενίου συναρτήσεως συγκέντρωσης για το συμπολυμερές P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4**



Σχήμα 4.10: Διάγραμμα της έντασης του λόγου των σχετικών κορυφών  $I_1 / I_3$  του πυρενίου συναρτήσει συγκέντρωσης για το συμπολυμερές P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5

Παρατηρείται καθαρά το πλατώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις όπου δεν εμφανίζονται συσσωματώματα, η περιοχή μετάβασης σε ενδιάμεσες συγκεντρώσεις, καθώς και το πλατώ σε υψηλές συγκεντρώσεις. Η CMC προσδιορίζεται από το πρώτο σημείο καμπής. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2: Αποτελέσματα εύρεσης CAC με φασματοσκοπία φθορισμού

Δείγμα Συμπολυμερούς	CAC (g/ml) (FS)
P(DMAEMA-co-LMA)- b-POEGMA-4	$8.4 \times 10^{-6}$
P(DMAEMA-co-LMA)- b-POEGMA-5	$6.7 \times 10^{-5}$

### 4.3.1 Μελέτη επίδρασης φυσικοχημικών παραμέτρων στα διαλύματα πολυμερών P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA

#### 4.3.1.1 Μελέτη επίδρασης pH

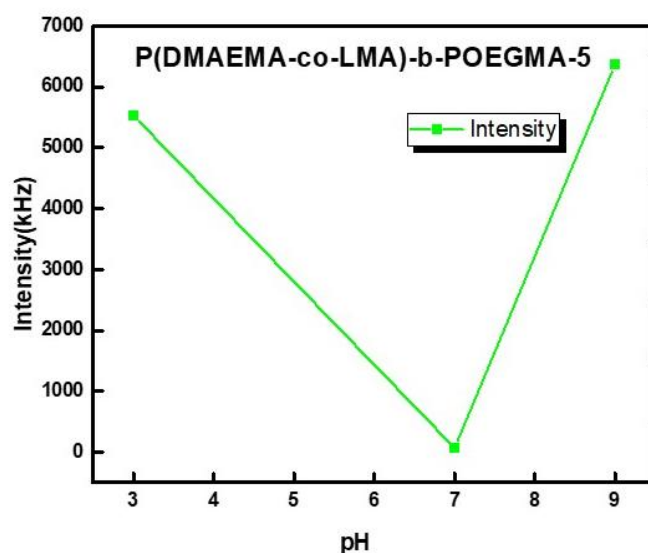
Η μελέτη επίδρασης του pH στη συμπεριφορά των διαλυμάτων των δισυσταδικών συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA πραγματοποιήθηκε μέσω των τεχνικών Δυναμικής-Στατικής-Ηλεκτροφορετικής σκέδασης και μέσω της φασματοσκοπίας φθορισμού. Τα υδατικά διαλύματα παρασκευάστηκαν με την απευθείας διάλυσή τους σε νερό με pH 7. Τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν ήταν συγκέντρωσης  $1.0 \times 10^{-3}$  g/ml. Αρχικά μετρήθηκαν τα διαλύματα σε pH 7, στη συνέχεια μεταβλήθηκε σε pH 9 με την προσθήκη NaOH 0.1 M όπου και εξετάστηκαν και τέλος ρυθμίστηκε σε pH 3 με προσθήκη HCL 1M όπου και εξετάστηκαν εκ νέου. Όλες οι μετρήσεις ανεξαρτήτως μεθόδου έγιναν στους 25°C και οι μετρήσεις δυναμικής/στατικής σκέδασης πραγματοποιήθηκαν στις 90° και για τις τρεις τιμές pH.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το ομοπολυμερές PDMAEMA αποτελεί μια ασθενή πολυβάση και συμπεριφέρεται ως αποκρινόμενος κατιοντικός πολυηλεκτρολύτης λόγω της ισορροπίας μεταξύ πρωτονίωσης-αποπρωτονίωσης της αμινιμάδας η οποία εξαρτάται από τη μεταβολή του pH. Σε ουδέτερα pH αποτελεί ένα υδρόφιλο ομοπολυμερές λόγω της μερικής πρωτονίωσης των αμινοομάδων και τα σωματίδια που υπάρχουν στο διάλυμα είναι σε μορφή ελεύθερων αλυσίδων (unimers). Με την αύξηση του pH σε βασικές τιμές (9 και άνω) συμβαίνει πλήρης αποπρωτονίωση των αμινομάδων με αποτέλεσμα την μείωση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και τον σχηματισμό συσσωματωμάτων. Η μείωση του pH σε όξινες τιμές έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη πρωτονίωση των αμινομάδων του PDMAEMA, οπότε οι ηλεκροστατικές αλληλεπιδράσεις αυξάνονται και άρα αυξάνεται και η υδροφιλικότητα. Συνεπώς σε όξινα pH το PDMAEMA είναι περισσότερο διαλυτό από ότι σε βασικές τιμές pH και άρα αναμένονται σωματίδια μικρότερης μάζας. Η μεταβολή του pH εξαρτάται από το μοριακό

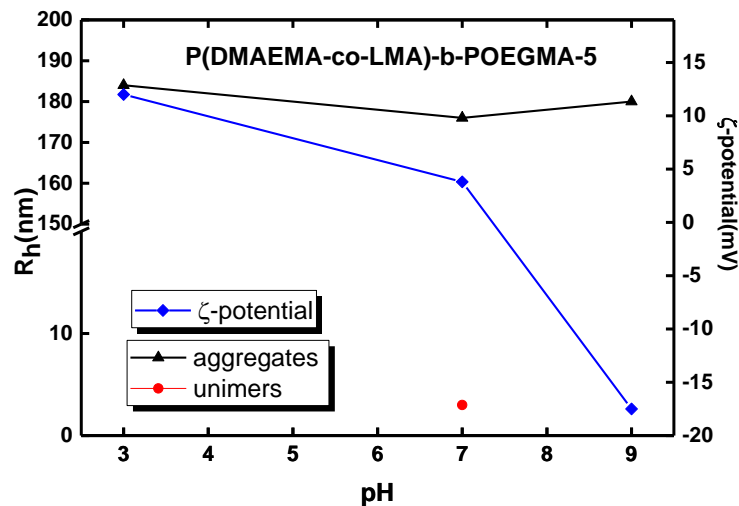
βάρος του πολυμερούς και τη συγκέντρωση του εξεταζόμενου διαλύματος [79,80]

Στην περίπτωση συμπολυμερών που περιέχουν το PDMAEMA ως τμήμα, επίσης αναμένεται εξάρτηση των ιδιοτήτων των συσσωματωμάτων που σχηματίζει το συμπολυμερές σε υδατικά μέσα, ανάλογα με τη μεταβολή του pH. Μάλιστα αναμένεται να κυριαρχεί η ίδια τάση στη συμπεριφορά ανάλογα με την πρωτονίωση-αποπρωτονίωση των αμινομάδων. Φυσικά στη περίπτωση των συμπολυμερών η εξάρτηση από το pH επηρεάζεται και από άλλες παραμέτρους, οι οποίες είναι το μοριακό βάρος του συμπολυμερούς (και στην περίπτωση του ομοπολυμερούς υπάρχει εξάρτηση στη μεταβολή του pH από το μοριακό βάρος), η συγκέντρωση του στο υδατικό διάλυμα (και στην περίπτωση του ομοπολυμερούς υπάρχει εξάρτηση στη μεταβολή του pH από το μοριακό βάρος), η χημική του σύσταση, η αρχιτεκτονική του πολυμερούς και οι υδρόφοβες συστάδες εάν υπάρχουν.

Στο *Σχήμα 4.11* παρουσιάζεται η μεταβολή της έντασης σκεδάσεως συναρτήσει του pH για το διάλυμα του P(DMAEMA-co-PLMA)-b-POEGMA-5 ενώ στο *Σχήμα 4.12* παρουσιάζεται η μεταβολή της υδροδυναμικής ακτίνας και του ζ-δυναμικού συναρτήσει του pH για το διάλυμα του συμπολυμερούς P(DMAEMA-co-PLMA)-b-POEGMA-5 .



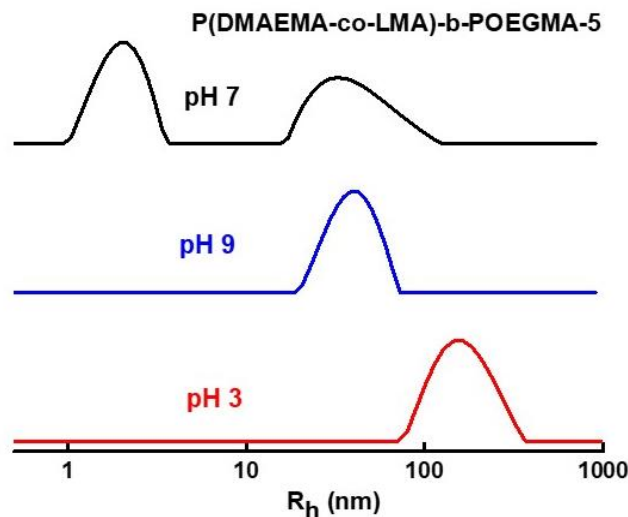
**Σχήμα 4.11:** Διάγραμμα εξάρτησης της I από τη μεταβολή του pH για το συμπολυμερές P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5



**Σχήμα 4.12: Διάγραμμα εξάρτησης της  $R_h$  και ζ-δυναμικού από τη μεταβολή του pH για το συμπολυμερές P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5**

Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρούμε αύξηση της έντασης σκέδασης του διαλύματος από pH 7 (70 kHz) σε pH 9 (6370 kHz) η οποία συνοδεύεται και από αύξηση στην τιμή της υδροδυναμικής ακτίνας. Σε pH 7 μέσα στο διάλυμα υπάρχουν και μοριακά διαλυμένες αλυσίδες συμπολυμερούς (unimers) ( $R_h \sim 3$  nm) και συσσωματώματα ( $R_h = 176$  nm), με τα unimers να υπάρχουν σε υψηλότερη αναλογία και για αυτό η ένταση σκέδασης είναι μικρή. Η συνύπαρξη unimers και συσσωματωμάτων οφείλεται στη τόσο μερική πρωτονίωση των αμινομάδων του PDMAEMA τμήματος αλλά και στην ύπαρξη του PLMA καθώς αποτελεί το υδρόφοβο συστατικό του συμπολυμερούς και εξαιτίας αυτού υπάρχουν υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που είναι υπεύθυνες για την ύπαρξη των συσσωματωμάτων. Προφανώς δεν συμμετέχουν όλες οι αλυσίδες του συμπολυμερούς σε συσσωματώματα. Σε pH 9 παρατηρούμε μεγάλη αύξηση στην ένταση σκέδασης του διαλύματος η οποία οφείλεται στην αύξηση της μάζας των συσσωματωμάτων. Η ύπαρξη συσσωματωμάτων μόνο σε αλκαλικό περιβάλλον είναι αποτέλεσμα της αποπρωτονίωσης των αμινομάδων PDMAEMA και της συμβολής του υδρόφοβου PLMA. Κατά τη μείωση του pH από 9 σε 3 παρατηρείται μικρή πτώση στη τιμή της έντασης και σχετική σταθερότητα στη τιμή της υδροδυναμικής ακτίνας. Παρατηρούμε

λοιπόν την ύπαρξη συσσωματωμάτων παρόλο που οι αμινομάδες είναι πλήρως πρωτονιωμένες. Η απρόσμενη αυτή συμπεριφορά μπορεί να οφείλεται σε έναν συνδυασμό παραμέτρων. Αρχικά το διάλυμα είχε τιμή pH 9 και εκεί προσθέσαμε ποσότητα HCl προκειμένου να το μειώσουμε σε 3, συνεπώς τα συσσωματώματα που είχαν σχηματιστεί μπορεί να μην διασπάστηκαν. Με βάση τη σύσταση του συμπολυμερούς, δεν μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα η συμβολή του υδρόφοβου PLMA στο σχηματισμό συσσωματωμάτων, καθώς σε αντίθεση με το PDMAEMA δεν επηρεάζεται από τη μεταβολή του pH και συνεπώς παραμένει υδρόφοβο. Το POEGMA αποτελεί μια υδρόφιλη συστάδα που όμως παρέχει σταθερότητα στο σύστημα και ίσως δεν επιτρέπει την διάσπαση των συσσωματωμάτων. Τέλος σε pH 3 οι αμινομάδες είναι πλήρως πρωτονιωμένες και υπάρχει άπωση φορτίων των θετικά φορτισμένων αλυσίδων του PDMAEMA τμήματος η οποία μπορεί επίσης να έχει ως αποτέλεσμα τη διόγκωση (swelling) των σωματιδίων. Τέλος η αρχιτεκτονική του πολυμερούς διαδραματίζει έντονο ρόλο στην αυτοοργάνωση των σωματιδίων καθώς είναι αποτελείται από δυο συστάδες εκ των οποίων η πρώτη αποτελείται από τυχαία διευθέτηση των δομικών μονάδων LMA και DMAEMA. Το ζ-δυναμικό παρατηρείται να έχει θετική τιμή σε pH 3, θετική τιμή σε pH 7 όμως κοντά στο μηδέν και αρνητική τιμή σε pH 9. Η θετική τιμή του ζ-δυναμικού οφείλεται στη πρωτονίωση της ομάδας σε όξινο pH, ενώ η μείωση της τιμής του ζ-δυναμικού σε pH=9. Οι αρνητικές τιμές του ζ-δυναμικού αποδίδονται μάλλον στην απορρόφηση των OH<sup>-</sup> ιόντων στην επιφάνεια των σωματιδίων και στην καρβοξυλική ομάδα του μέσου μεταφοράς αλυσίδας. Παρακάτω στο *Σχήμα 4.13* παρουσιάζονται τα συγκριτικά διαγράμματα της κατανομής μεγεθών των σωματιδίων σε pH 7,9 και 3 για το δείγμα P(DMAEMA-co-PLMA)-b-POEGMA-5.



**Σχήμα 4.13: Διαγράμματα κατανομής μεγεθών των σωματιδίων σε pH 7,9 και 3 για το δείγμα P(DMAEMA-co-PLMA)-b-POEGMA-5**

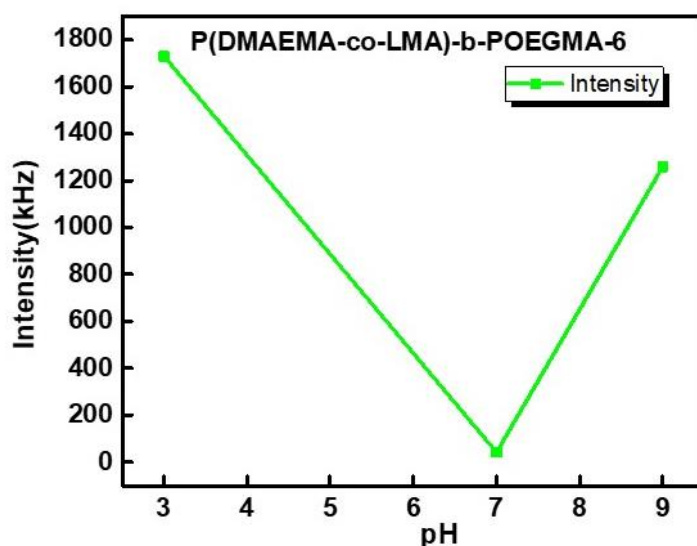
Στη συνέχεια το δείγμα P(DMAEMA-co-PLMA)-b-POEGMA-5 μελετήθηκε μέσω στατικής σκέδασης φωτός σε pH 9 και 3. Σε pH 7 δεν μπόρεσε να εφαρμοσθεί η μέθοδος λόγω της συνύπαρξης δυο διαφορετικών ειδών σωματιδίων στο διάλυμα. Ο λόγος της γυροσκοπικής ακτίνας  $R_g$  προς την υδροδυναμική ακτίνα  $R_h$ , όπως αυτές υπολογίζονται από στατική σκέδαση φωτός, μπορεί να μας δώσει σημαντικά συμπεράσματα για την μορφολογία των αυτό-οργανούμενων νανοσωματιδίων που έχουν σχηματιστεί. Στον Πίνακα 4.3 αναγράφονται οι λόγοι  $R_g/R_h$  για το δείγμα P(DMAEMA-co-PLMA)-b-POEGMA-5. Με βάση τη βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι οι τιμές αυτές αντιστοιχούν σε σωματίδια σφαιρικής γεωμετρίας με σχετικά σφιχτή εσωτερική δομή.

**Πίνακας 4.3: Λόγοι  $R_g/R_{h0}$ , όπως καθορίστηκαν μέσω της στατικής σκέδασης φωτός για το δείγμα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 για τις τιμές pH 3, 7, 9.**

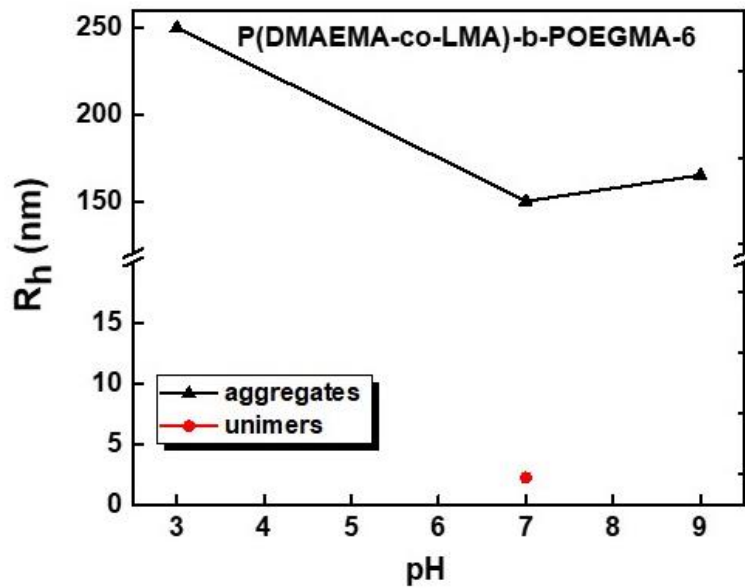
pH	$R_g/R_{h0}$
3	0.7
7	N/A
9	0.6



Όλα τα συστήματα συμπολυμερών εμφάνισαν παρόμοια συμπεριφορά. Σε pH 7 η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας ήταν μικρή και στο διάλυμα υπήρχαν τόσο συσσωματώματα όσο και ελεύθερες αλυσίδες. Σε pH 9 η ένταση αυξανόταν απότομα και σημαντικά καταδεικνύοντας την ύπαρξη συσσωματωμάτων ενώ σε pH 3 παρατηρήθηκε σταθερότητα ή και σε ορισμένες περιπτώσεις (P(DMAEMA-co-PLMA)-b-POEGMA-6) αύξηση στην ένταση της ακτινοβολίας και στην τιμή της υδροδυναμικής ακτίνας, υποδεικνύοντας την περαιτέρω συσσωμάτωση των σωματιδίων. Ενδεικτικά παρουσιάζονται στα Σχήματα 4.14 και 4.15 η εξάρτηση της έντασης και της υδροδυναμικής ακτίνας αντιστοίχως από τη μεταβολή του pH για το δείγμα P(DMAEMA-co-PLMA)-b-POEGMA-6. Επίσης οι λόγοι  $R_g/R_h$  που προσδιορίστηκαν μέσω της στατικής σκέδασης φωτός για όλα τα δείγματα κυμαίνονται από 0.5-0.7, ενισχύοντας την πεποίθησή μας ότι σχηματίζονται τόσο σε pH 3 όσο και σε 9 σφαιρικά σωματίδια με συμπαγή εσωτερική δομή. Η μορφολογία των σωματιδίων οφείλεται μάλλον στο PLMA που βρίσκεται στο εσωτερικό των σωματιδίων αλλά και στην αρχιτεκτονική του πολυμερούς.

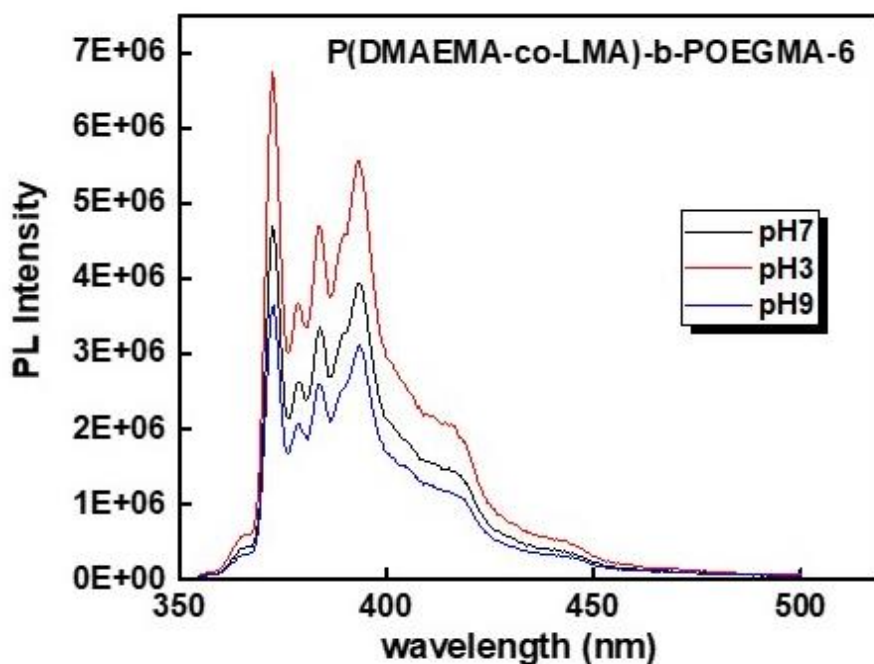


Σχήμα 4.14: Διάγραμμα εξάρτησης της I από τη μεταβολή του pH για το συμπολυμερές P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6



**Σχήμα 4.15: Διάγραμμα εξάρτησης της  $R_h$  από τη μεταβολή του pH για το συμπολυμερές P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6**

Η επίδραση του pH στη συμπεριφορά των διαλυμάτων των δισυσταδικών συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA μελετήθηκε και μέσω της φασματοσκοπίας φθορισμού, χρησιμοποιώντας το πυρένιο ως ιχνηθέτη. Μέσω των χαρακτηριστικών φασμάτων εκπομπής του πυρενίου εκφράστηκε η εξάρτηση των ιδιοτήτων των διαλυμάτων συναρτήσει της μεταβολής του pH. Παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα του ίδιου πολυμερούς σε pH 7, 9 και 3, στη συνέχεια προστέθηκε πυρένιο σε κάθε ένα από τα διαλύματα και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την επόμενη μέρα. Στο Σχήμα 4.16 παρουσιάζεται ενδεικτικά τα φάσματα εκπομπής πυρενίου για το δείγμα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 σε pH 7, 9 και 3.



Σχήμα 4.16: Φάσματα εκπομπής πυρενίου για για το συμπολυμερές P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 σε pH 7,9 και 3

Το πυρένιο είναι υδρόφοβη ένωση με μικρή διαλυτότητα στο H<sub>2</sub>O και ο λόγος της πρώτης και της τρίτης κορυφής ( $I_1/I_3$ ) εκπομπής του φάσματος του αποτελεί ποιοτικό μέτρο της πολικότητας του διαλύτη και του περιβάλλοντος μέσου γενικότερα.[85] Παρακάτω παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.4 οι λόγοι  $I_1/I_3$  για τα δείγματα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA σε pH 7,9 και 3, όπως υπολογίστηκαν με βάση τα φάσματα εκπομπής φθορισμού του πυρενίου.

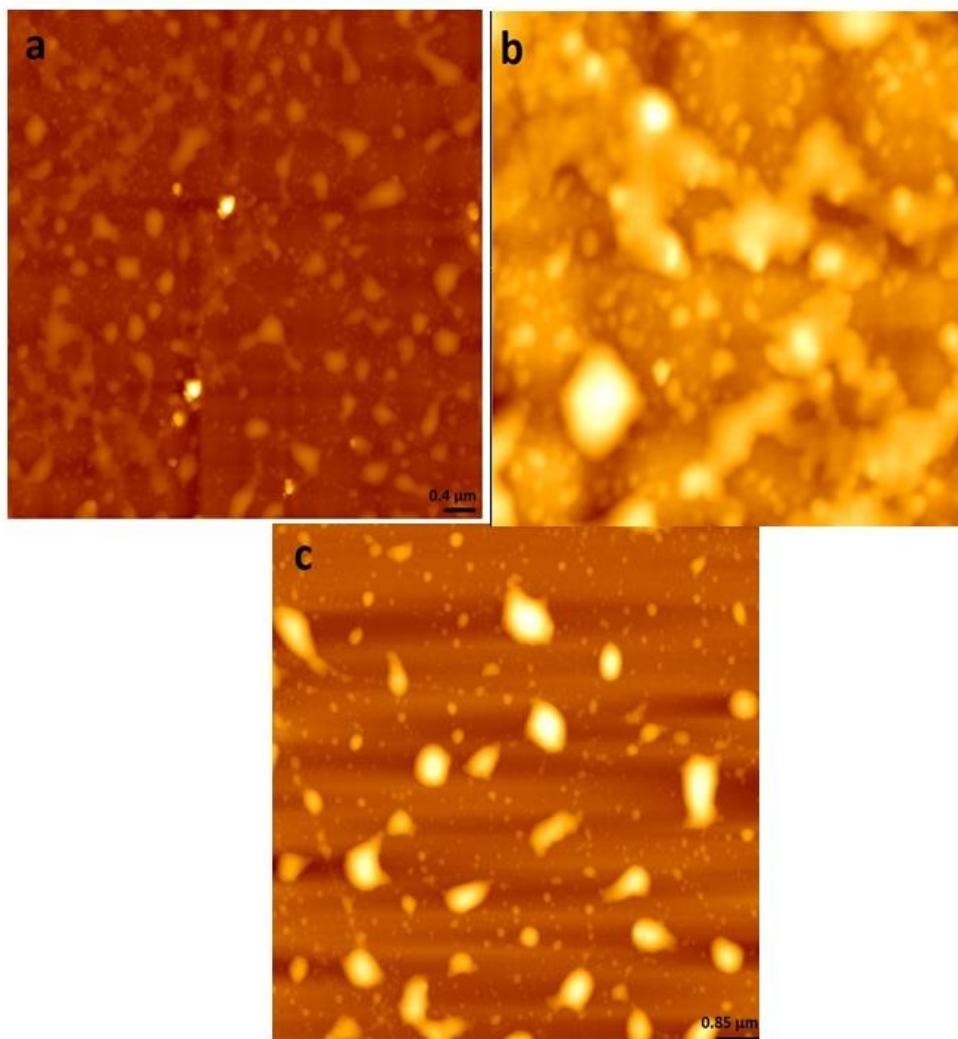
Πίνακας 4.4: Λόγοι  $I_1/I_3$  για τα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA σε pH 7,9 και 3

Δείγμα Συμπολυμερούς	pH	$I_1/I_3$ (FS)
P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-3	3	1.4
	7	1.36
	9	1.34
P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4	3	1.35
	7	1.32
	9	1.27
P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5	3	1.35
	7	1.17
	9	1.11
P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6	3	1.43
	7	1.4
	9	1.31

Σε pH 9 η αποπρωτονίωση των αμινομάδων του PDMAEMA τμήματος έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της υδροφοβικότητας και λόγω της μείωσης της πολικότητας στο μέσο η οποία εκφράζεται με τη μείωση του λόγου  $I_1/I_3$  το πυρένιο εγκλωβίζεται στα συσσωματώματα και η ένταση εκπομπής του μειώνεται. Αντίθετα σε pH 7 που οι αμινομάδες PDMAEMA είναι μερικώς πρωτονιωμένες και άρα το PDMAEMA υδρόφιλο. Σε όξινο pH οι αμινομάδες στις αλυσίδες του PDMAEMA είναι πλήρως πρωτονιωμένες με αποτέλεσμα την περαιτέρω αύξηση της υδροφιλικότητας και συνεπώς την αύξηση του

λόγου  $I_1/I_3$ . Η ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στα όλα τα δείγματα συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA, όπως φαίνεται και στον Πίνακα.4.4. Όπως ήταν αναμενόμενο σε βασικό pH οι λόγοι  $I_1/I_3$  μειώνονται καταδεικνύοντας την ύπαρξη περισσότερο υδρόφοβου περιβάλλοντος.

Για τον προσδιορισμό της δομής των συσσωματωμάτων και την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη μορφολογία αυτών σε βασικό pH, εφαρμόστηκε η τεχνική AFM για τα δείγματα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4 και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 σε pH 9. Οι εικόνες που ελήφθησαν αποκαλύπτουν την ύπαρξη καλοσχηματισμένων συσσωματωμάτων, σφαιρικού σχήματος πάνω σε επιφάνεια SiO<sub>2</sub>, ενώ και στις δυο περιπτώσεις δειγμάτων παρατηρούνται δυο ειδών σωματίδια. Η μέση ακτίνα των μικρότερων σωματιδίων που προκύπτει από το AFM είναι ~160 nm και συμπίπτει με τιμές της υδροδυναμικής ακτίνας που λαμβάνονται από το DLS ( $R_h = 160-165$  nm). Η μέση ακτίνα των μεγαλύτερων συσσωματωμάτων όπως προκύπτει από τη τεχνική AFM είναι 375 nm στην περίπτωση του δείγματος P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 και 300 nm στην περίπτωση του P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4. Η ύπαρξη μεγαλύτερων συσσωματωμάτων οφείλεται είτε στην περαιτέρω συσσωμάτωση καθώς φαίνεται πως αρκετά σωματίδια βρίσκονται ενωμένα μεταξύ τους ή το ένα επικαλύπτει το άλλο, είτε στο γεγονός ότι οι μετρήσεις AFM έγιναν σε σωματίδια σε ξηρή μορφή, απουσία διαλύτη, με αποτέλεσμα αυτά να "απλωθούν" στην επιφάνεια SiO<sub>2</sub> και η μέση διάμετρος που υπολογίζεται από το AFM να είναι μεγαλύτερη από αυτή που προκύπτει από το DLS. Παρακάτω παρουσιάζονται οι εικόνες που ελήφθησαν μέσω της τεχνικής AFM, για τα δείγματα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4 και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6. (Η εικόνα b αποτελεί μεγένθυση της εικόνας a.)



Εικόνα 4.1: Εικόνες από AFM των δειγμάτων P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4 (εικόνες a και b) και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 (εικόνα c) σε βασικό pH

#### 4.3.1.2 Μελέτη επίδρασης θερμοκρασίας

Προκειμένου να διερευνηθεί η εξάρτηση των ιδιοτήτων των διαλυμάτων των συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA από τη μεταβολή της θερμοκρασίας επιλέχθηκαν δυο δείγματα, το P(DMAEMA-co-LMA)-POEGMA-5 και το P(DMAEMA-co-LMA)-POEGMA-6. Τα δείγματα επιλέχθηκαν με βάση την κατά βάρος σύστασή τους σε PDMAEMA. Το δείγμα 5 περιέχει το μεγαλύτερο ποσοστό %PDMAEMA (= 35%) ενώ το δείγμα 6 το μικρότερο (=13%). Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν με απευθείας διάλυση των πολυμερών σε νερό με pH 7 και η συγκέντρωση στην οποία παρασκευάστηκαν ήταν  $5 \times 10^{-3}$  g/ml. Οι ιδιότητες των διαλυμάτων

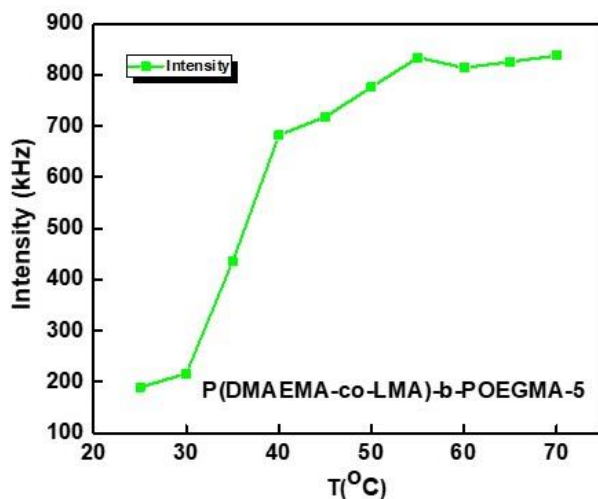
μελετήθηκαν μέσω της σκέδασης φωτός, ανά 5°C και της φασματοσκοπίας φθορισμού επιλέγοντας ως ιχνηθέτη το πυρένιο. Οι μετρήσεις της σκέδασης φωτός έγιναν υπό γωνία 90°.

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές το ομοπολυμερές PDMAEMA είναι αποκρίσιμο στις θερμοκρασιακές μεταβολές και έχει ως κρίσιμη κατώτερη θερμοκρασία διάλυσης (LCST) στο νερό τους 40°C με 50°C [81]. Επομένως το PDMAEMA σε θερμοκρασίες κάτω της LCST είναι υδρόφιλο και οι αλυσίδες του παραμένουν διαλυμένες στο νερό. Αυτό συμβαίνει καθώς σε θερμοκρασίες κάτω της LCST οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ H<sub>2</sub>O και πολυμερούς κυριαρχούν έναντι των αλληλεπιδράσεων πολυμερούς-πολυμερούς. Συνεπώς οι αλυσίδες του PDMAEMA παραμένουν διαλυμένες στο υδατικό μέσο και δεν σχηματίζονται συσσωματώματα. Σε αντίθετη περίπτωση, σε θερμοκρασίες άνω της LCST το PDMAEMA είναι υδρόφοβο καθώς με την αύξηση της θερμοκρασίας καταστρέφονται οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των μονάδων του PDMAEMA και του υδατικού μέσου και άρα υπερισχύουν οι αλληλεπιδράσεις πολυμερούς-πολυμερούς.[81] Η τιμή της LCST για τα ομοπολυμερή εξαρτάται από το μοριακό βάρος του πολυμερούς, τη συγκέντρωση του διαλύματος, την ιοντική ισχύ αλλά και το pH καθώς σε όξινες τιμές pH αναμένεται να μην υπάρχει θερμοκρασιακή απόκριση. [82] Σε περιπτώσεις συσταδικών συμπολυμερών στις παραπάνω παραμέτρους προστίθενται η αρχιτεκτονική του πολυμερούς, η σύσταση του σε PDMAEMA αλλά και το χημικό είδος των άλλων συσταδών.

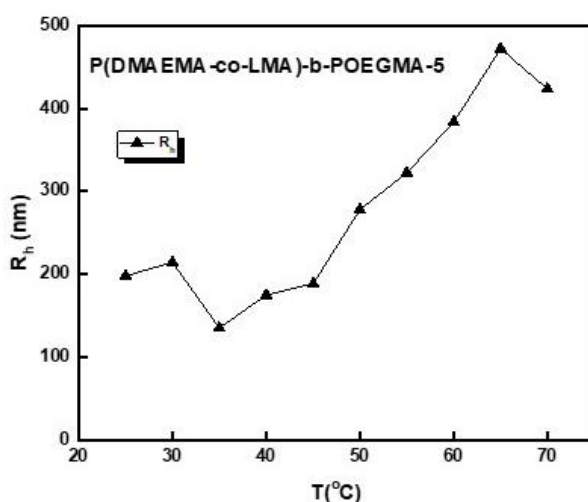
Στο δικό μας σύστημα το LMA αποτελεί το υδρόφοβο συστατικό το οποίο δεν είναι θερμοκρασιακά αποκρίσιμο συμβάλλει όμως στην αυτοοργάνωση των συσσωματωμάτων. Το POEGMA είναι η υδρόφιλη συστάδα που επίσης δεν αποκρίνεται σε θερμοκρασιακές αλλαγές. Παρά ταύτα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σύστημα καθώς αποτελεί το εξωτερικό τμήμα των συσσωματωμάτων και άρα προστατεύει το υδρόφοβο μέρος από καταβύθιση και επιπλέον είναι βιοσυμβατό, χαρακτηριστικό απαραίτητο για βιολογικές εφαρμογές. Τέλος και η αρχιτεκτονική του πολυμερούς επηρεάζει τη μορφολογία των συσσωματωμάτων καθώς πρόκειται για δισυσταδικό

πολυμερές του οποίου η πρώτη συστάδα αποτελείται από τυχαία διευθετημένες τις δομικές μονάδες του DMAEMA και του LMA.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα εξάρτησης της έντασης σκεδάσεως ( $I$ ) (Σχήμα 4.17) η οποία αποτελεί μέτρο της μεταβολής της μάζας των σωματιδίων και της υδροδυναμικής ακτίνας ( $R_h$ ) (Σχήμα 4.18) για εύρος θερμοκρασιών 25°C-70°C για το δείγμα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5



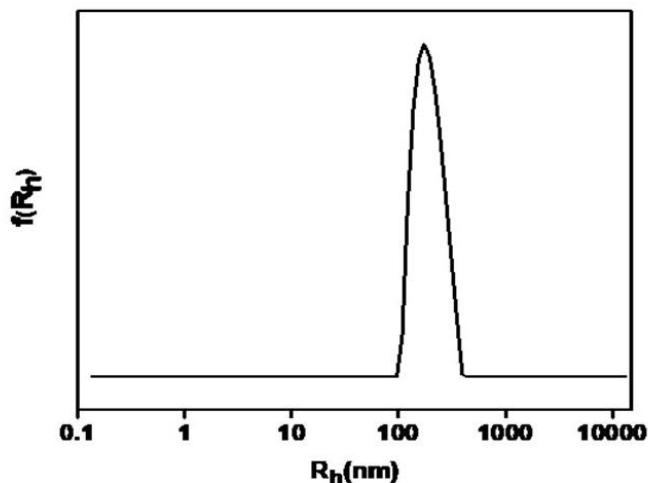
Σχήμα 4.17: Διάγραμμα εξάρτησης της  $I$  συναρτήσεως της θερμοκρασίας για το συμπολυμερές P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5



Σχήμα 4.18: Διάγραμμα εξάρτησης της  $R_h$  συναρτήσεως της θερμοκρασίας για το συμπολυμερές P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5



Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρούμε ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας, αυξάνεται η ένταση σκέδασης του διαλύματος και η υδροδυναμική ακτίνα. Συνεπώς η αύξηση της θερμοκρασίας έχει ως αποτέλεσμα τη συσσωμάτωση των πολυμερικών αλυσίδων. Η θερμοκρασία μετάβασης για το δείγμα P(DMAEMA-co-LMA)-POEGMA-5 είναι  $\sim 30^{\circ}\text{C}$ . Το συμπέρασμα αυτό εξάγεται από το γεγονός ότι στους  $30^{\circ}\text{C}$  παρατηρείται η απότομη αύξηση στην ένταση σκεδάσεως και άρα στη μάζα των υπερμοριακών δομών και μικρή αύξηση στην τιμή της υδροδυναμικής ακτίνας. Στους  $35^{\circ}\text{C}$  η τιμή της υδροδυναμικής ακτίνας μειώνεται λόγω της συρρίκνωσης των αλυσίδων και την τάση του συστήματος προς συσσωμάτωση. Η συρρίκνωση των αλυσίδων PDMAEMA τμήματος πάνω από τη θερμοκρασία μετάβασης συμβαίνει λόγω μείωσης της διαλυτότητας του συστήματος. Σε θερμοκρασίες μεγαλύτερη των  $35^{\circ}\text{C}$  η τιμή της υδροδυναμικής ακτίνας αυξάνεται συνεχώς λόγω της συσσωμάτωσης των σωματιδίων η οποία είναι αποτέλεσμα της μείωσης της υδροφιλικότητας του συστήματος που πραγματοποιείται λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας.



**Σχήμα 4.19:** Διάγραμμα κατανομής μεγεθών των σωματιδίων σε θερμοκρασία  $40^{\circ}\text{C}$  για το δείγμα P(DMAEMA-co-PLMA)-b-POEGMA-5

Επομένως η αύξηση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σχετίζεται με την αύξηση σε μάζα λόγω συσσωμάτωσης των αρχικών υπερμοριακών δομών. Η μείωση της υδροδυναμικής ακτίνας σχετίζεται με την συρρίκνωση των αλυσίδων P(DMAEMA-co-LMA). Οπότε σε θερμοκρασία κάτω των  $30^{\circ}\text{C}$  τ

PDMAEMA τμήμα έχει περισσότερο υδρόφιλο χαρακτήρα και ο σχηματισμός των σωματιδίων ευθύνεται κυρίως στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των τμημάτων του PLMA, ενώ σε θερμοκρασία άνω των 30°C το PDMAEMA τμήμα έχει περισσότερο υδρόφοβο χαρακτήρα και σχηματίζονται συσσωματώματα. Η τιμή της θερμοκρασίας μετάβασης είναι χαμηλότερη της LCST του ομοπολυμερούς PDMAEMA που αναφέρεται στη βιβλιογραφία, το οποίο ήταν και αναμενόμενο καθώς το PLMA έχει υδρόφοβο χαρακτήρα και βοηθά στο σχηματισμό συσσωματωμάτων σε μικρότερες θερμοκρασίες. Το διάλυμα του P(DMAEMA-co-LMA)-POEGMA-6 σε υδατικό μέσο φαίνεται πως δεν παρουσιάζει ιδιαίτερη εξάρτηση από την αύξηση της θερμοκρασίας. Η ένταση σκεδάσεως και η υδροδυναμική ακτίνα δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά γεγονός που μάλλον οφείλεται στο μικρό ποσοστό της συστάδας P(DMAEMA-co-LMA) (και αντίστοιχα μεγάλο της συστάδας POEGMA). Μέσω της στατικής σκέδασης φωτός προσδιορίστηκε ο λόγος  $R_g/R_{ho}$  για το δείγμα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 ώστε να αντλήσουμε περισσότερες πληροφορίες για τη μορφολογία των σωματιδίων που υπάρχουν στο διάλυμα και να εξετάσουμε αν υπάρχει εξάρτηση της μορφολογίας από τις μεταβολές της θερμοκρασίας. Οι λόγοι  $R_g/R_{ho}$  παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.5

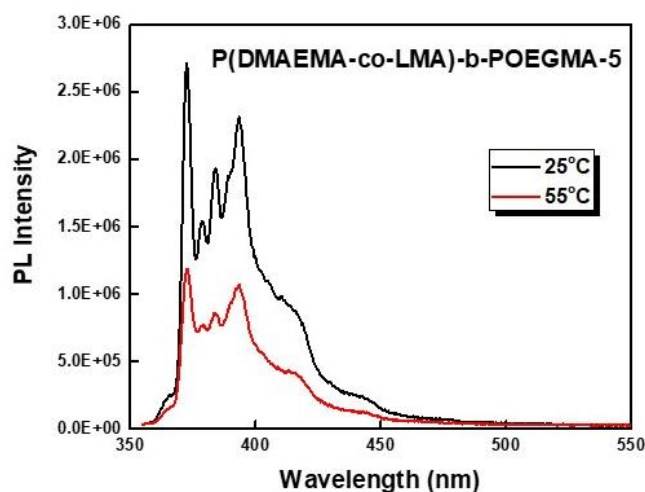
**Πίνακας 4.5: Λόγοι  $R_g/R_{h0}$ , όπως καθορίστηκαν μέσω της στατικής σκέδασης φωτός για το δείγμα P(DMAEMA-co-PLMA)-b-POEGMA-5 για εύρος θερμοκρασιών 25°C-70°C**

<b>T(°C)</b>	<b><math>R_g/R_{h0}</math></b>
<b>25</b>	0.6
<b>30</b>	0.7
<b>35</b>	0.7
<b>40</b>	0.6
<b>45</b>	0.5
<b>50</b>	0.6
<b>55</b>	0.5
<b>60</b>	0.6
<b>65</b>	0.6
<b>70</b>	0.7

Παρατηρούμε ότι οι λόγοι  $R_g/R_{h0}$  κυμαίνονται σε εύρος 0.5 έως 0.7 και με βάση βιβλιογραφικές αναφορές τα σωματίδια που υπάρχουν στο διάλυμα είναι σφαιρικής γεωμετρίας με συμπαγή εσωτερική δομή. Δεν παρατηρείται κάποια αλλαγή στη μορφολογία των σωματιδίων με την αλλαγή της θερμοκρασίας.

Τέλος έγιναν μετρήσεις φασματοσκοπίας φθορισμού του δείγματος P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 με τη χρήση πυρενίου ως ιχνηθέτη προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω η εξάρτηση των ιδιοτήτων των σωματιδίων από τη μεταβολή της θερμοκρασίας. Οι θερμοκρασίες επιλέχθηκαν με βάση τα αποτελέσματα των μετρήσεων δυναμικής σκέδασης.

Οπότε οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 25°C που προηγείται της θερμοκρασίας μετάβασης και τα τμήματα PDMAEMA έχουν υδρόφιλο χαρακτήρα και στους 55°C που έπεται της θερμοκρασίας μετάβασης και τμήματα PDMAEMA έχουν περισσότερο υδρόφοβο χαρακτήρα. Τα αποτελέσματα που εξάγουμε από τη φασματοσκοπία φθορισμού είναι ότι η συστάδα του PDMAEMA έχει περισσότερο υδρόφοβο χαρακτήρα. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων δείχνουν ότι ο λόγος  $I_1/I_3$ , που είναι το μέτρο της πολικότητας του μέσου, ήταν μικρότερος στους 55°C υποδεικνύοντας την αύξηση της υδροφοβικότητας των συστάδων του PDMAEMA. Στους 25°C η ένταση εκπομπής φθορισμού του πυρενίου και ο λόγος  $I_1/I_3$  είναι μεγαλύτερα από ότι στους 55°C, αποδεικνύοντας ότι η συστάδα του PDMAEMA έχει υδρόφιλο χαρακτήρα. Συγκεκριμένα η τιμή του λόγου για θερμοκρασία 25°C είναι 1.12 και για 55°C είναι 1.08. Στο Σχήμα 4.20 παρατίθεται το φάσμα εκπομπής του πυρενίου για το δείγμα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 σε θερμοκρασίες 25°C και 55°C.



**Σχήμα 4.20: Φάσμα εκπομπής του πυρενίου για το δείγμα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 σε θερμοκρασίες 25°C και 55°C**

Επίσης, έγιναν μετρήσεις φασματοσκοπίας φθορισμού του δείγματος P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 με τη χρήση πυρενίου ως ιχνηθέτη και υπολογίστηκαν οι λόγοι  $I_1/I_3$ , σε θερμοκρασίες 25°C και 55°C. Στο δείγμα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 παρατηρείται η ίδια τάση με το δείγμα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5, ο λόγος  $I_1/I_3$  ελαττώθηκε σε

θερμοκρασία 55°C σε σύγκριση με τον λόγο  $I_1/I_3$  στους 25°C, υποδεικνύοντας την αύξηση της υδροφοβικότητας του συστήματος με την αύξηση της θερμοκρασίας. Η μείωση αυτή βέβαια είναι μικρή λόγω της ύπαρξης των υδρόφοβων μονομερικών μονάδων. Στον Πίνακα 4.6 αναγράφονται οι τιμές των λόγων  $I_1/I_3$  σε θερμοκρασίες 25°C και 55°C για τα δείγματα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 όπως υπολογίστηκαν με βάση τα φάσματα εκπομπής φθορισμού του πυρενίου.

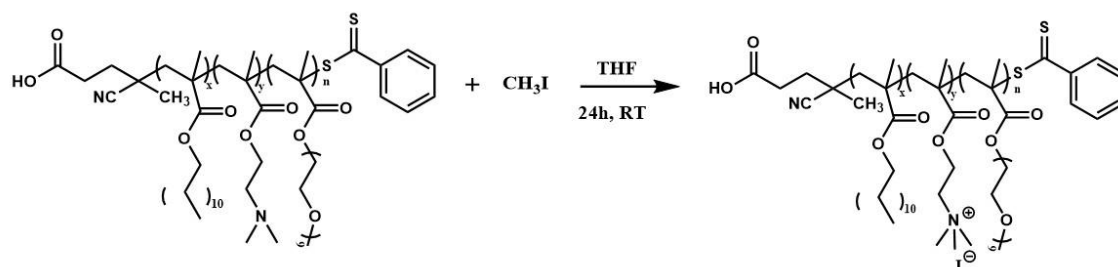
**Πίνακας 4.6:** Οι λόγοι  $I_1/I_3$  για τα δείγματα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 σε θερμοκρασίες 25°C και 55°C .

<b>Δείγμα συμπολυμερούς</b>	<b>T(°C)</b>	<b><math>I_1/I_3</math> (FS)</b>
<b>P(DMAEMA-co-LMA)-b- POEGMA-5</b>	25	1.12
	55	1.08
<b>P(DMAEMA-co-LMA)-b- POEGMA-6</b>	25120	1.4
	55	1.36

#### **4.4 Σύνθεση συμπολυμερών QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA**

Στα συμπολυμερή P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA πραγματοποιήθηκε μετατροπή της τριτοταγούς αμίνης του PDMAEMA τμήματος της P(DMAEMA-co-LMA) συστάδας σε τεταρτοταγές άλας αμμωνίου μέσω της αντίδρασης με CH<sub>3</sub>I. Η αντίδραση τεταρτοταγοποίησης (Quaternization) της αμίνης είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός νέου συμπολυμερούς. Η αντίδραση αυτή παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.21. Μέσω της αντίδρασης αυτής το PDMAEMA μετατρέπεται από έναν ασθενή σε ένα ισχυρό κατιοντικό πολυηλεκτρολύτη. Σε σφαιρική φιάλη όπου αναδεύεται πολυμερές διαλυμένο σε THF προστίθεται περίσσεια CH<sub>3</sub>I (μεθυλοϊωδίδιο) και η αντίδραση πραγματοποιείται υπό

συνεχή ανάδευση για 24 ώρες σε θερμοκαρασία περιβάλλοντος. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το διάλυμα του πολυμερούς σε THF παραλήφθηκε και παρατηρήθηκε η αλλαγή στο χρώμα του διαλύματος. Το THF απομακρύνθηκε με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα και παραλήφθηκε το πολυμερές σε μορφή γέλης και χρώματος κίτρινου. Σε όλες τις περιπτώσεις ανεξαρτήτου σύστασης το πολυμερές που συντέθηκε είχε το ίδιο χρώμα και την ίδια υφή.



**Σχήμα 4.21: Αντίδραση τεταρτοταγοποίησης της αμίνης του τμήματος PDMAEMA (Quaternization reaction)**

Τα μοριακά βάρη και οι κατά βάρος συστάσεις των QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA συμπολυμερών προσδιορίστηκαν με βάση τα μοριακά βάρη των P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA συμπολυμερών όπως καθορίστηκαν μέσω της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC) και τις κατά βάρος συστάσεις των P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA όπως υπολογίστηκαν με τη βοήθεια της φασματοσκοπίας  $^1\text{H-NMR}$  και παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.7.

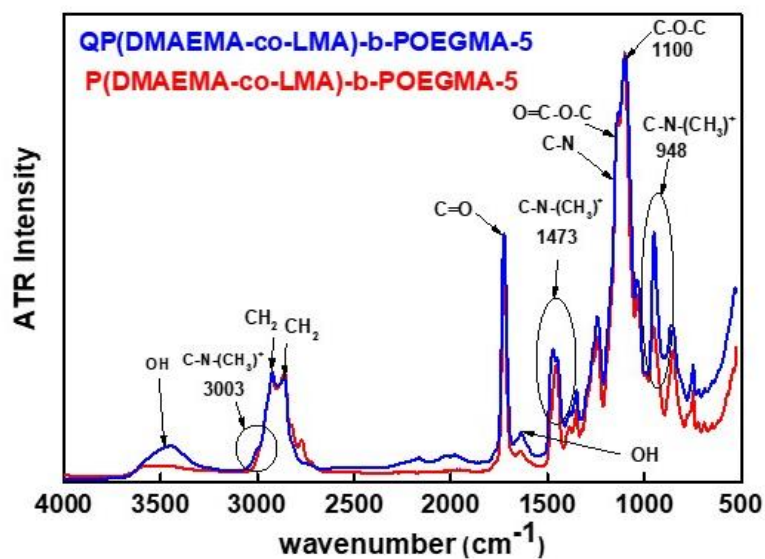
**Πίνακας 4.7: Τα μοριακά βάρη και οι % κατά βάρος συστάσεις των συμπολυμερών QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA**

Δείγμα Συμπολυμερούς	$M_w \times 10^4$ (g/mol)	$M_w$ QPDMAEMA $\times 10^4$ (g/mol)	Σύσταση %wt QPDMAEMA	Σύσταση %wt PLMA	Σύσταση %wt POEGMA
QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-3	2.4	0.98	40	11	49
QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4	1.54	0.62	40	15	45
QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5	0.7	0.36	51	14	35
QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6	1.46	0.33	22	6	72

Ο τρόπος υπολογισμού των συστάσεων και των μοριακών βαρών είναι ο εξής. Το μοριακό βάρος του συμπολυμερούς P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA πολλαπλασιάζεται με το ποσοστό της σύστασης του τμήματος PDMAEMA που περιέχεται σε αυτό και προκύπτει το μοριακό βάρος του τμήματος PDMAEMA. Στη συνέχεια το μοριακό βάρος του τμήματος PDMAEMA διαιρείται με το μοριακό βάρος της μονομερικής μονάδας του DMAEMA και έτσι προκύπτει ο αριθμός των δομικών μονάδων DMAEMA που υπάρχουν στο συμπολυμερές. Θεωρώντας ότι η αντίδραση τεταρτοταγοποίησης έχει πραγματοποιηθεί στο 100% (προστέθηκε περίσσεια  $CH_3I$ ), τότε σε κάθε αμινομάδα του τμήματος PDMAEMA έχει ενσωματωθεί ένα μεθύλιο ( $CH_3$ ) και το ιώδιο ως αντισταθμιστικό ιόν. Συνεπώς,

πολλαπλασιάζοντας τον αριθμό των δομικών μονάδων DMAEMA με το μοριακό βάρος του  $\text{CH}_3\text{I}$  και προσθέτοντας το αποτέλεσμα στο μοριακό βάρος του τμήματος PDMAEMA προκύπτει το μοριακό βάρος της του τμήματος QPDMAEMA. Το μοριακό βάρος των υπόλοιπων συστατικών LMA και POEGMA δεν αλλάζει. Το μοριακό βάρος του τμήματος QPDMAEMA και τα μοριακά βάρη των PLMA και POEGMA προστίθενται και προκύπτει το μοριακό βάρος του συμπολυμερούς QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA. Το ποσοστό της σύστασης των συμπολυμερών υπολογίζεται μέσω του μοριακού βάρους του τμήματος QPDMAEMA, των συμπολυμερών QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA. Η μετατροπή της τριτοταγούς αμίνης σε τεταρτοταγή εξακριβώθηκε μέσω της φασματοσκοπίας υπερύθρου. Στο παρακάτω Σχήμα 4.22 παρατίθενται τα φάσματα ATR-FTIR για το συμπολυμερές πριν την αντίδραση τεταρτοταγοποίησης της αμίνης και αφού που έχει υποστεί τεταρτοταγοποίηση της αμινομάδας του τμήματος PDMAEMA. Σύμφωνα με την αποτίμηση των κορυφών, παρατηρείται η εμφάνιση νέων κορυφών στο φάσμα των QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 συμπολυμερών που στο φάσμα των συμπολυμερών P(DMAEMA-co-PLMA)-b-POEGMA-5 δεν ήταν ορατές. Συγκεκριμένα οι κορυφές στα  $3003\text{ cm}^{-1}$ ,  $1473\text{ cm}^{-1}$  και  $948\text{ cm}^{-1}$  σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αποδίδεται σε τεταρτοταγή αμίνη. [86,87,88] Η εμφάνιση των κορυφών της τεταρτοταγούς αμίνης στο αποτύπωμα του φάσματος FT-IR υποδηλώνει την επιτυχή μετατροπή της αμίνης.





Σχήμα 4.22: Συγκριτικά φάσματα ATR-FTIR για τα συμπολυμερή QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5

#### 4.5 Φυσικοχημική μελέτη των υδατικών διαλυμάτων των συμπολυμερών QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA

Οι ιδιότητες των υδατικών διαλυμάτων των συμπολυμερών QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA μελετήθηκαν για τα δείγματα QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-3, QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 και QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 μέσω δυναμικής σκέδασης φώτος (DLS). Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν με απευθείας διαλυτοποίηση του πολυμερούς σε διαλύτη NaCl 0.01M με pH 7. Τα αποτελέσματα της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, της υδροδυναμικής ακτίνας και του δείκτη πολυδιασποράς (PD.I) των σωματιδίων όπως μετρήθηκαν μέσω της δυναμικής σκέδασης φώτος, στις 90° και για τα τρία δείγματα παρουσιάζονται στο Πίνακα 4.8.

**Πίνακας 4.8: Αποτελέσματα μέτρησεων δυναμικής σκέδασης φωτός για τα δείγματα QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-3, QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 και QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6**

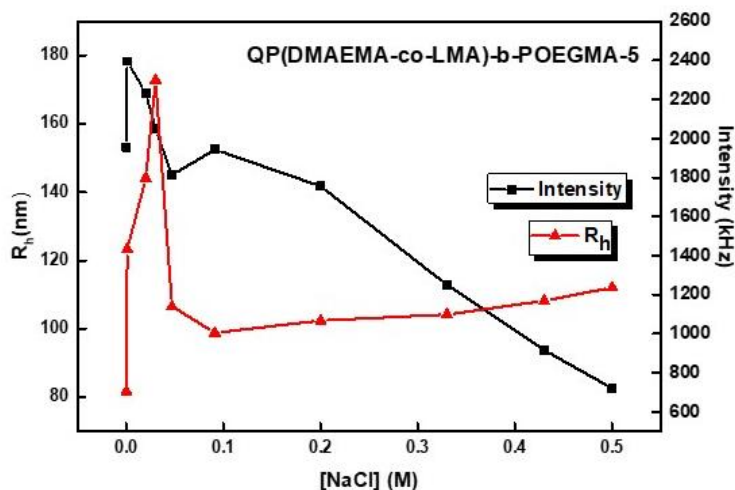
Δείγμα Συμπολυμερούς	Intensity (kHz)	R <sub>h</sub> (nm)	PD.I
QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-3	3452	75	0.291
QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5	1955	87.	0.348
QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6	13516	107	0.212

Μέσω της αντίδρασης χημικής μετατροπής ο ασθενής κατιοντικός πολυηλεκτρολύτης PDMAEMA μετατρέπεται σε ισχυρό κατιοντικό πολυηλεκτρολύτη QPDMAEMA με αποτέλεσμα να γίνεται μόνιμα υδρόφιλο το τμήμα QPDMAEMA λόγω του μόνιμου θετικού φορτίου που φέρει. Συνεπώς σε σύγκριση με τα υδατικά διαλύματα των συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA, παρατηρούνται συσσωματώματα μικρότερης ακτίνας, διότι αυξάνεται η διαλυτότητα του συμπολυμερούς λόγω των θετικά φορτισμένων ομάδων του QPDMAEMA. Οι διαφοροποιήσεις που υπάρχουν μεταξύ των δειγμάτων οφείλονται στη διαφορετική σύστασή τους.

#### **4.5.1 Επίδραση ιοντικής ισχύος στα διαλύματα των συμπολυμερών QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA**

Η μελέτη της ιοντικής ισχύος στα υδατικά διαλύματα των συμπολυμερών QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 και QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 πραγματοποιήθηκε με προσθήκη NaCl 1M. Πραγματοποιήθηκαν εννέα προσθήκες (από 0.01 M έως 0.5 M) διαφορετικών συγκεντρώσεων άλατος στο υδατικό διάλυμα και μέσω της δυναμικής σκέδασης φωτός μετρήθηκαν οι μεταβολές της έντασης και της ακτίνας R<sub>h</sub> με την αύξηση της αλατότητας του διαλύματος. Οι μετρήσεις έγιναν υπό γωνία 90°, συγκέντρωση διαλύματος της τάξης των 10<sup>-3</sup> g/ml με pH 7 και σε θερμοκρασία 25°C. Τα

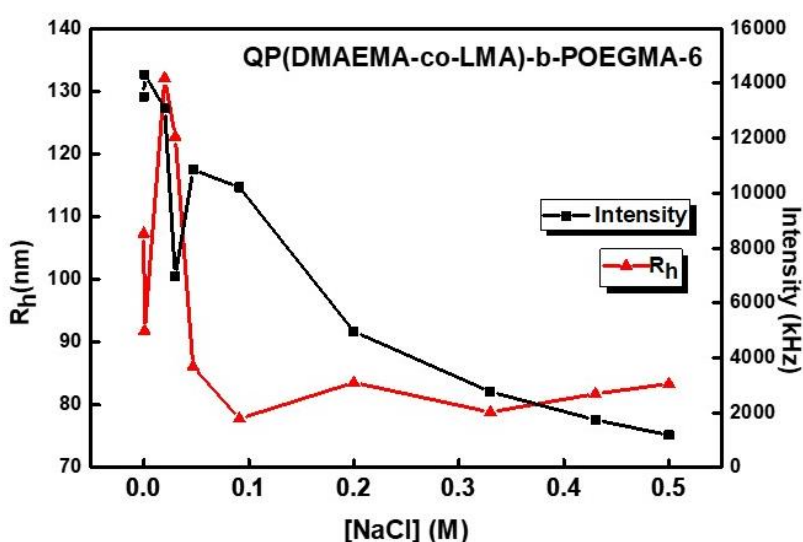
αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 4.23 για το δείγμα QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 και 4.24 για το δείγμα QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6.



Σχήμα 4.23: Διάγραμμα εξάρτησης της I και της R<sub>h</sub> από την επίδραση της ιοντικής ισχύος για το δείγμα QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5

Με βάση το παραπάνω διάγραμμα για το κατιοντικό συμπολυμερές-5 παρατηρούμε την αύξηση της έντασης σκεδάσης κατά την πρώτη προσθήκη άλατος, ενώ οι τιμές της υδροδυναμικής ακτίνας αυξάνονται κατά τις τρεις πρώτες προσθήκες άλατος. Κατά την πρώτη προσθήκη το σύστημα επιδεικνύει τάση προς συσσωμάτωση, η οποία συνοδεύεται και με αύξηση του μεγέθους. Όμως κατά τις επόμενες προσθήκες άλατος η μάζα του συστήματος μειώνεται λόγω της διάσπασης των σωματιδίων. Οι τιμές της υδροδυναμικής ακτίνας αυξάνονται κατά τις δύο επόμενες προσθήκες διότι καθώς τα σωματίδια αποσυσσωματώνονται γίνονται πιο χαλαρά με αποτέλεσμα διαλύτης να εισχωρήσει στο εσωτερικό τους (*swelling*). Μετά την τέταρτη προσθήκη η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας μειώνεται λόγω της συνεχούς αποσυσσωμάτωσης του συστήματος. Κατά τις υπόλοιπες προσθήκες άλατος η ένταση της ακτινοβολίας συνεχίζει να μειώνεται εκφράζοντας περαιτέρω αποσυσσωμάτωση του συστήματος, ενώ η υδροδυναμική ακτίνα παραμένει μέσα σε γενικά πλαίσια σταθερή δηλώνοντας την διόγκωση του σωματιδίου καθώς εισέρχεται διαλύτης στο πυρήνα του και

οπότε γίνεται δομικά πιο χαλαρό (*swelling*). Το QPDMAEMA τμήμα είναι ισχυρός κατιονικός πολυηλεκτρολύτης και κατά τη προσθήκη επέρχεται προάσπιση των φορτίων και άρα εξασθένιση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων του συστήματος με αποτέλεσμα οι πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες να μεταβαίνουν σε λιγότερο εκτεταμένες διαμορφώσεις, παρόμοιες με αυτές των ουδέτερων πολυμερών σε συνθήκες καλού διαλύτη. Αυτή η συσπίρωση των αλυσίδων μπορεί να οδηγήσει σε διάσπαση των συσσωματωμάτων. Παρόμοια συμπεριφορά έχει και το δείγμα QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 με την αύξηση του άλατος, όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.24.



Σχήμα 4.24: Διάγραμμα εξάρτησης της I και της R<sub>h</sub> από την επίδραση της ιοντικής ισχύος για το δείγμα QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6

#### 4.6 Σύμπλεξη των QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA με DNA

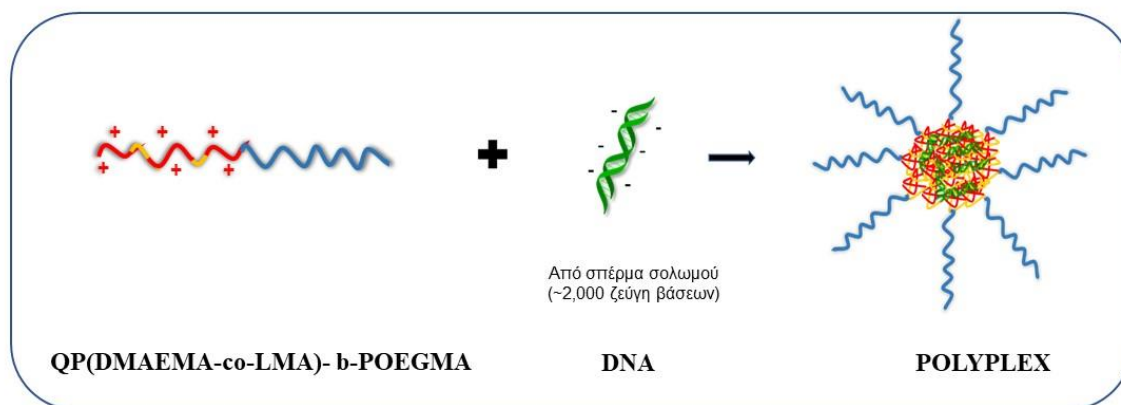
Οι κατιονικοί πολυηλεκτρολύτες συμπλέκονται με μόρια DNA προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως φορείς γονιδιακής θεραπείας. Η σύμπλεξη των μορίων γίνεται μέσω της ηλεκτροστατικής σύζευξης των θετικά φορισμένων αμινομάδων του πολυμερούς και των αρνητικά φορισμένων φωσφορικών ομάδων του DNA. Τα κατιονικά πολυμερή χρησιμοποιούνται ως φορείς γονιδιακής θεραπείας, καθώς έχουν τα εξής χαρακτηριστικά. Συμπυκνώνουν γονίδια σε πολύ μικρές δομές μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων των

θετικά φορτισμένων αλυσίδων τους με το αρνητικά φορτισμένο DNA και καλύπτουν το αρνητικό φορτίο επιτυχώς και το μεταφέρουν στα κύτταρα. Στην περίπτωση που έχουμε αμφίφιλα συσταδικά συμπολυμερή που φέρουν μια συστάδα θετικά φορτισμένου πολυηλεκτρολύτη, η σύμπλεξή τους επηρεάζεται από τη σύσταση του πολυμερούς και το είδος των άλλων συστάδων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [44], η εισαγωγή υδρόφοβων συστάδων συμβάλλει στη σταθερότητα του συμπλόκου και οι συστάδες αυτές επηρεάζουν το σχήμα, το μέγεθος και τη δομή του συμπλόκου. Το μοριακό βάρος του συμπολυμερούς και η σύστασή του επίσης συμβάλλουν στον σχεδιασμό και στην επιτυχημένη προετοιμασία των συμπλόκων. Το μέγεθος των σωματιδίων καθορίζεται ανάλογα με το μήκος της αλυσίδας του πολυηλεκτρολύτη και το μοριακό βάρος του DNA.

Εξετάστηκαν λοιπόν τα πολυμερή Q(PDMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA ως πιθανοί φορείς για γονιδιακή θεραπεία μέσω της σύμπλεξής τους με DNA που προέρχεται από σπέρμα σολωμού. Στο σύστημα Q(PDMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA, η Q(PDMAEMA-co-LMA) συστάδα αποτελεί τον θετικά φορτισμένο πολυηλεκτρολύτη, έχοντας όμως και το LMA σαν υδρόφοβο συστατικό που επηρεάζει και προστατεύει τα σωματίδια και η συστάδα του POEGMA, που βρίσκεται στο εξωτερικό μέρος των σωματιδίων, ενισχύει την βιοσυμβατότητα του συστήματος και προστατεύει τα σωματίδια από πιθανή καταβύθιση. Επίσης η παρουσία μονομερών LMA μπορεί να ενισχύσει τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις συμπολυμερούς-DNA. Σχηματίστηκαν σύμπλοκα με διαφορετικούς N/P λόγους και εξετάστηκαν μέσω της Στατικής, Δυναμικής και Ηλεκτροφορετικής σκέδασης φωτός, μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού και φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους και τέλος συμπεράσματα για τη μορφολογία των συμπλόκων εξήχθησαν με τη χρήση της μεθόδου AFM.

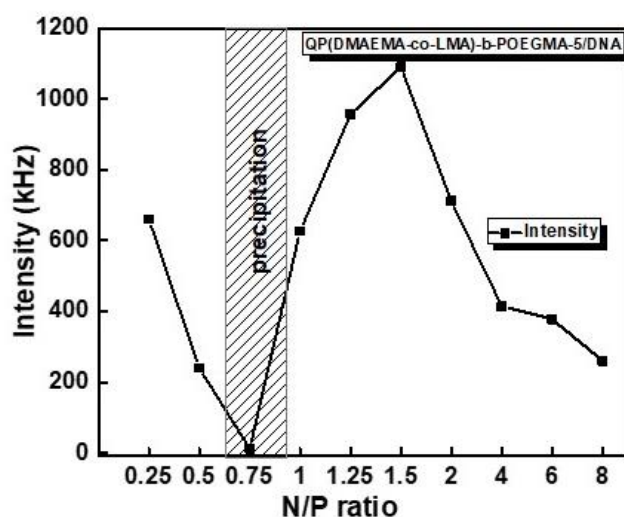
Το συμπολυμερές που επιλέξαμε να μελετήσουμε είναι το Q(PDMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 διότι έχει τη μεγαλύτερη κατά βάρος σύσταση σε QDMAEMA τμήμα και επέδειξε μεγαλύτερη κολλοειδή σταθερότητα σε υδατικά διαλύματα με το πέρασ του χρόνου σε σχέση με τα υπόλοιπα. Τα διαλύματα των συμπλόκων έγιναν σε NaCl 0.01 M, η συγκέντρωση του διαλύματος του πολυμερούς ήταν  $1 \times 10^{-3}$  g/ml και του DNA  $2 \times 10^{-4}$  g/ml.

Παρακάτω παρουσιάζεται η σχηματική απεικόνιση της συναρμογής του QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA με το DNA προς σχηματισμό συμπλόκων με διαφορετικές αναλογίες N/P.

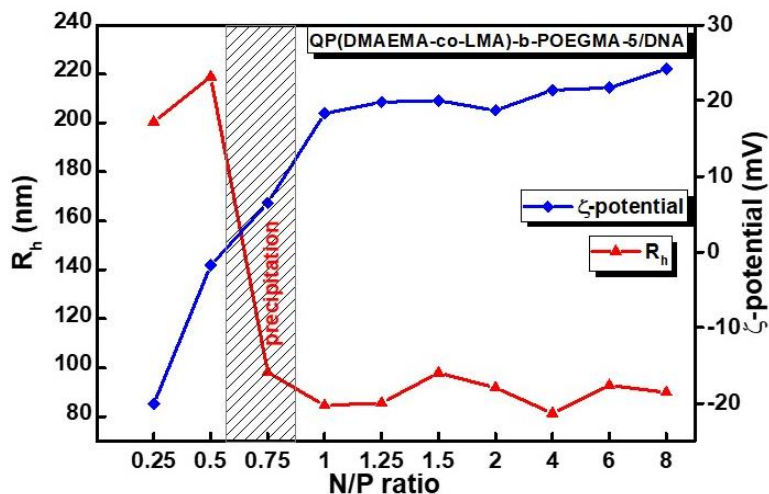


**Σχήμα 4.25: Σχηματική απεικόνιση της συναρμογής του QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA με το DNA προς σχηματισμό συμπλόκων**

Στα Σχήματα 4.26 και 4.27 παρουσιάζεται η επίδραση της μεταβολής του λόγου N/P, στην ένταση I, στην ακτίνα  $R_h$  και στο ζ-δυναμικό για τα σύμπλοκα QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5/DNA.



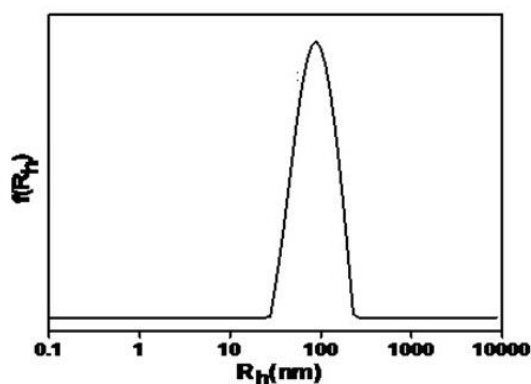
**Σχήμα 4.26: Διάγραμμα εξάρτησης της έντασης από τη μεταβολή του λόγου N/P για το σύστημα QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5/DNA**



**Σχήμα 4.27:** Διάγραμμα εξάρτησης της υδροδυναμικής ακτίνας και του ζ-δυναμικού από τη μεταβολή του λόγου N/P για το σύστημα QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5/DNA

Η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.26 μειώνεται από τον λόγο N/P=0.25 έως τον λόγο N/P=0.5. Η ύπαρξη περισσότερων φωσφορικών ομάδων στο διάλυμα από ότι αμινομάδων έχει ως συνέπεια τα σύμπλοκα που σχηματίζονται να μην είναι καλά οργανωμένα, καθώς ορισμένα τμήματα DNA δεν έχουν συμπλεχθεί εφόσον δεν υπάρχει ο απαιτούμενος αριθμός αμινομάδων στο διάλυμα. Η πεποίθηση αυτή ενισχύεται και από την αύξηση της τιμής της υδροδυναμικής ακτίνας από N/P=0.25 έως τον λόγο N/P=0.5. Όπως φαίνεται και από τα δύο διαγράμματα τα σύμπλοκα που σχηματίζονται στην αναλογία N/P=0.75 δεν είναι σταθερά και καθιζάνουν. Αυτό οφείλεται σε πλήρη εξουδετέρωση των θετικών φορτίων των κατιοντικών μονάδων, που είναι προσβάσιμα, από τα αρνητικά φορτία των φωσφορικών ομάδων του DNA αλλά και στην παρουσία του υδρόφοβου συστατικού LMA, με αποτέλεσμα την καθίζηση των σωματιδίων. Αύξηση της έντασης σκεδάσεως παρατηρείται από τον λόγο N/P=1 όπου ο αριθμός των φορτίων των φωσφορικών ομάδων του DNA είναι ίσος με τον αριθμό των θετικών φορτίων του QPDMAEMA που υπάρχουν στο διάλυμα, έως τον λόγο N/P=1.5. Αύξηση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας συνεπάγεται αύξηση στη μάζα των συμπλόκων διότι υπάρχουν περισσότερα θετικά φορτία που αλληλεπιδρούν με τα αρνητικά φορτία των φωσφορικών ομάδων και άρα

επιτυγχάνεται καλύτερη σύμπλεξη μεταξύ DNA και πολυμερούς. Η τιμή της υδροδυναμικής ακτίνας από τον λόγο  $N/P=0.5$  έως  $N/P=1.5$  κατά κύριο λόγο μειώνεται διότι η αύξηση των θετικών φορτίων στο διάλυμα έχουν ως συνέπεια τον σχηματισμό πιο συμπαγών σωματιδίων καθώς ο αριθμός των θετικών φορτίων που αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με τα αρνητικά είναι μεγαλύτερος και συνεπώς σχηματίζονται πιο σφιχτές υπερδομές. Η τιμή της έντασης σκεδάσεως από  $N/P=2$  έως και  $N/P=8$  μεώνεται καθώς σχηματίζονται υπερμοριακές δομές μικρότερης μάζας από ότι σε αναλογίες  $N/P=1.25$  και  $1.5$ , οι οποίες όμως δεν διαφοροποιούνται έντονα όσον αφορά το μέγεθος τους και γι'αυτό το λόγο η τιμή της υδροδυναμικής ακτίνας από τον λόγο  $N/P=2$  έως και  $N/P=8$  παραμένει σχεδόν σταθερή. Η τιμή του ζ-δυναμικού αυξάνεται όσο αυξάνεται ο αριθμός των θετικών αμινομάδων στο διάλυμα. Για τους λόγους  $N/P=0.25$  και  $0.5$  η τιμή του είναι αρνητική καθώς υπάρχουν περισσότερες αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες στο διάλυμα, ενώ σε αναλογίες  $N/P=1$  και άνω η τιμή του είναι θετική λόγω του μεγαλύτερου αριθμού θετικά φορτισμένων αμινομάδων στο διάλυμα. Σε όλες τις περιπτώσεις σύμφωνα με την ανάλυση των αποτελεσμάτων δυναμικής σκέδασης με τη χρήση του αλγορίθμου CONTIN, υπήρχε μία μόνο κορυφή κατανομής μεγέθους υποδεικνύοντας την ύπαρξη ενός είδους υπερμοριακών δομών. Παρουσιάζεται παρακάτω ενδεικτικά το διάγραμμα κατανομής μεγεθών των σωματιδίων του δείγματος QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA/DNA-5 σε αναλογία φορτίων  $N/P=1$



Σχήμα 4.28: Καμπύλη κατανομής μεγεθών για το δείγμα QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5/DNA σε αναλογία φορτίων  $N/P=1$



Μέσω της τεχνικής ELS προσδιορίστηκε η τιμή του ζ-δυναμικού για όλες τις αναλογίες φορτίων N/P, όπως παρουσιάζεται στο *Σχήμα 4.27*. Παρατηρούμε ότι οι τιμές του ζ-δυναμικού αυξάνονται με την αύξηση της αναλογίας N/P. Σε χαμηλές τιμές N/P τα σωματίδια είναι φορτισμένα αρνητικά λόγω της παρουσίας περισσότερων φωσφορικών ομάδων, ενώ σε μεγαλύτερες τιμές N/P όπου υπερισχύουν οι θετικά φορτισμένες αμινομάδες το ζ-δυναμικό έχει θετικό φορτίο.

Μέσω της τεχνικής SLS προσδιορίστηκε ο λόγος  $R_g/R_{h0}$  για τους λόγους N/P από 0.25 έως 8. Τα αποτελέσματα των τεχνικών SLS και DLS παρουσιάζονται στον *Πίνακα 4.9*.

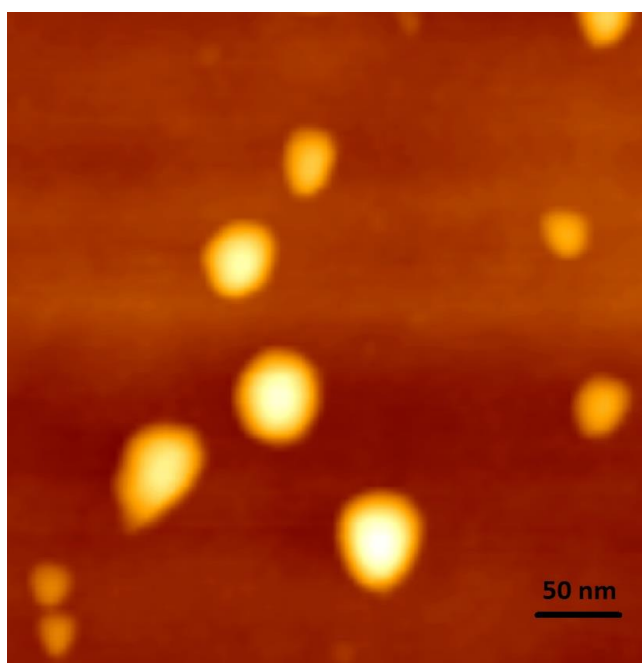
**Πίνακας 4.9: Αποτελέσματα τεχνικών SLS και DLS, με βάση την αναλογία N/P για το δείγμα QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5/DNA**

N/P ratio	$R_h$ (nm) (DLS)	$R_g/R_{h0}$ (SLS)
0.25	200	0.8
0.5	219	0.5
0.75	99	N/A
1	85	1.1
1.25	86	1.1
1.5	90	1.2
2	92	1
4	81	1
6	92	0.9
8	90	0.9

Οι υπερμοριακές δομές που σχηματίζονται από την σύμπλεξη του DNA με το QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 έχουν σφαιρική γεωμετρία και για N/P=1 έως 1.5 μάλλον παρουσιάζουν μια πιο χαλαρή εσωτερική δομή σε σχέση με τις αναλογίες N/P=2 έως 8 όπου φαίνεται πως τα σωματίδια έχουν μια πιο συμπαγή δομή, όπως και στις αναλογίες N/P= 0.25 και 0.5. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές οι τιμές  $R_g/R_{h0}$  για τις αναλογίες N/P=1 έως 1.5

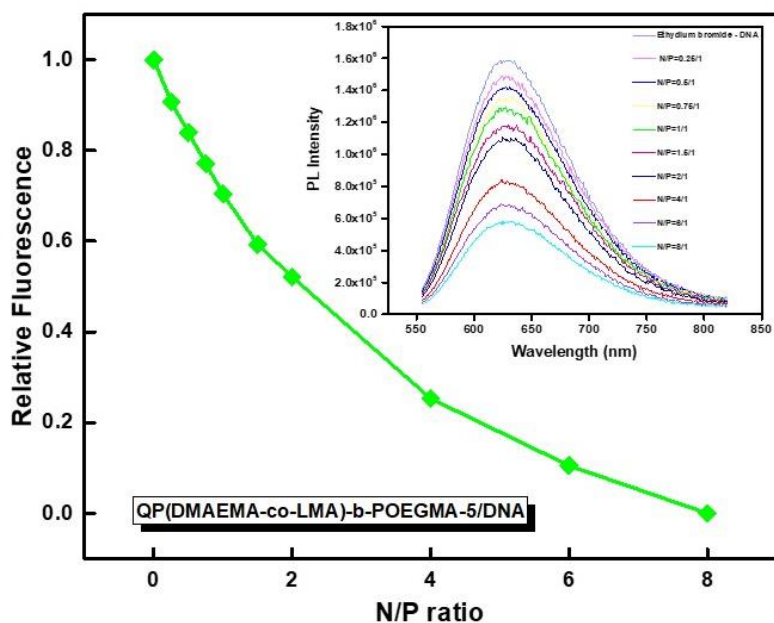
αντιστοιχούν σε μορφολογία κυστιδίων, όμως οι τιμές αυτές αποδίδονται σε μείωση της πυκνότητας των υπερμοριακών δομών η οποία οφείλεται στη σύμπλεξη των μονομερών με τα μόρια DNA. Η πεποίθηση αυτή ενισχύεται και μέσω των αποτελεσμάτων της τεχνικής AFM.

Για τον προσδιορισμό της δομής των συμπλόκων στην αναλογία N/P=1 και την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη μορφολογία αυτών, εφαρμόστηκε η τεχνική AFM για τα σύμπλοκα. Οι εικόνες που ελήφθησαν αποκαλύπτουν την ύπαρξη καλοσχηματισμένων νανοδομών, σφαιρικού σχήματος πάνω σε επιφάνεια SiO<sub>2</sub>. Η μέση διάμετρος των συμπλόκων σύμφωνα με το AFM είναι 40 nm σε αντίθεση με τα 170 nm σύμφωνα με το DLS. Θα πρέπει να τονιστεί ότι οι μετρήσεις AFM έγιναν απουσία διαλύτη, ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στη διόγκωση των συμπλόκων επηρεάζοντας το μέγεθος τους όταν βρίσκονται σε διάλυμα. Η διάμετρος που υπολογίζεται από το AFM είναι η διάμετρος των συμπλόκων σε ξηρή μορφή. Επιπρόσθετα μέσω της τεχνικής AFM συμπεραίνουμε ότι τα σύμπλοκα δεν έχουν μορφολογία κυστιδίων καθώς η διάμετρος των σωματιδίων συμπίπτει και στις τρεις διαστάσεις και άρα τα σύμπλοκα σε αναλογία N/P=1 μάλλον έχουν σφαιρική μορφολογία με χαλαρή εσωτερική δομή.



**Εικόνα 4.2:** Εικόνα από AFM των συμπλόκων του δείγματος Q(PDMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5/DNA σε αναλογία N/P= 1

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν μελέτες απόσβεσης φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια φθορίζουσα ένωση που αλληλεπιδρά με το DNA παρεμβάλλοντας ανάμεσα στα ζεύξη βάσεων και λόγω της παρεμβολής του παρουσιάζει έντονο φθορισμό. Κατά τη σύμπλεξη όμως του DNA με το κατιοντικό πολυμερές το παρεμβαλλόμενο βρωμιούχο αιθίδιο εκτοπίζεται από τη διπλή έλικα του DNA και η ένταση φθορισμού μειώνεται, υποδηλώνοντας την ικανότητα του κατιοντικού πολυμερούς να σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με το DNA. Η τεχνική απόσβεσης φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου χρησιμοποιείται κατά κόρον στη μέλετη συστημάτων σύμπλεξης κατιοντικών πολυμερών με το DNA, καθώς μέσω του φάσματος φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου καταγράφεται η ικανότητα σχηματισμού συμπλόκων ως αποτέλεσμα των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του κατιοντικού πολυμερούς και του γενετικού υλικού [89]. Παρακάτω παρατίθεται το διάγραμμα απόσβεσης φθορισμού, καθώς και τα αντίστοιχα φάσματα για το σύμπλοκο EtBr/DNA υπό αλληλεπίδραση με το συμπολυμερές QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 σε διαφορετικούς λόγους N/P, Σχήμα 4.28.

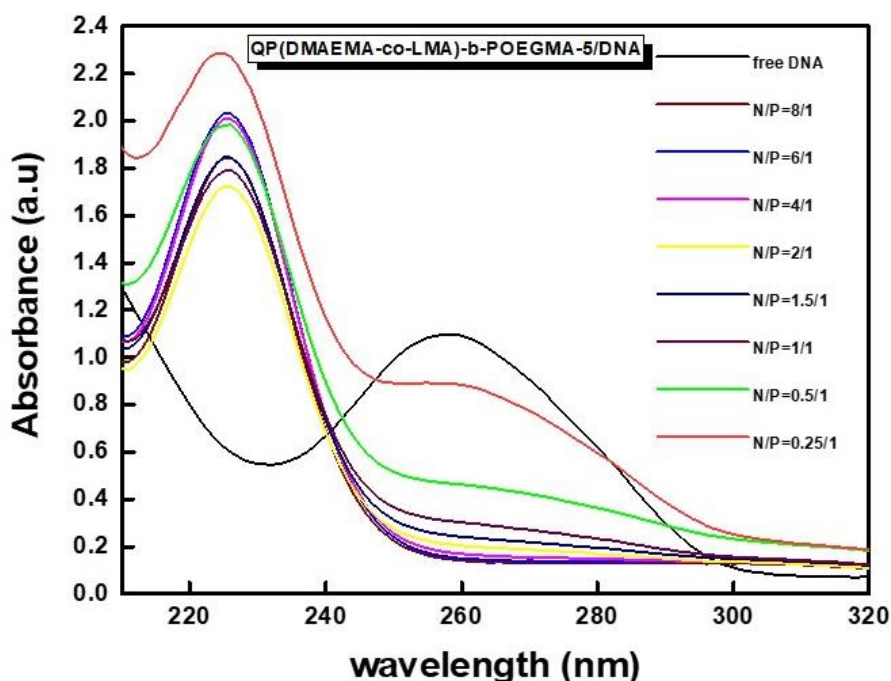


**Σχήμα 4.29: Διάγραμμα απόσβεσης φθορισμού και αντίστοιχα φάσματα που περιγράφει την αλληλεπίδραση EtBr/DNA με το συμπολυμερές QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5**

Παρατηρούμε πως στην περίπτωση του δείγματος QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5/DNA, με την αύξηση των N/P αναλογιών μειώνεται η ένταση φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου και συνεπώς επιβεβαιώνεται η ικανότητα του δείγματος QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5 να συμπλέκεται με το DNA και να σχηματίζει υπερμοριακές δομές (σύμπλοκα μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων). Πρέπει να σημειωθεί ότι μετρήσεις εκπομπής φθορισμού πραγματοποιούνται αμέσως μετά τη παρασκευή των συμπλόκων και άρα οι δομές αυτές μπορεί να μην είναι δομές ισορροπίας. Το διάγραμμα ενισχύει το συμπέρασμα που διεξήχθη μέσω των τεχνικών σκέδασης φωτός, δηλαδή ότι τα συμπολυμερή μπορούν να συμπλεχθούν αποδοτικά με DNA.

Η τεχνική της φασματοσκοπίας απορρόφησης στο ορατό-υπεριώδες είναι επίσης μια μέθοδος που χρησιμοποιείται συχνά κατά τη μελέτη σύμπλεξης κατιοντικών πολυμερών με μόρια DNA. Οι μελέτες στο ορατό υπερύφωδες προσφέρουν πληροφορίες για το είδος της αλληλεπίδρασης μεταξύ του DNA και του κατιοντικού πολυμερούς και ειδικότερα για αλλαγές στη διαμόρφωση και στην κατάσταση σύμπλεξης του DNA, αφού παρακολουθείται η

απορρόφηση των βάσεων του νουκλεϊκού οξέος [90]. Στο Σχήμα 4.29 παρατίθεται τα φάσματα απορρόφησης του δείγματος QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5/DNA σε αναλογίες N/P από 0.25 έως 8.



Σχήμα 4.30: Φάσματα απορρόφησης υπερϊώδους για το δείγμα QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA- 5/DNA σε αναλογίες N/P από 0.25 έως 8

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το μη δεσμευμένο DNA παρουσιάζει χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης  $\lambda_{max}$ , η ένταση της οποίας μειώνεται και εμφανίζεται μια νέα κορυφή σε μικρότερα μήκη κύματος όταν αυτό συμπλέκεται με κατιοντικά πολυμερή που αποδίδεται στο συμπλεγμένο DNA. Η ύπαρξη και των δυο κορυφών οφείλεται μάλλον στην ταυτόχρονη παρουσία δεσμευμένου και μη συμπλεγμένου DNA. Η αλλαγή στην ένταση της κορυφής απορρόφησης αλλά και η εμφάνιση της νέας κορυφής σε μικρότερα μήκη κύματος αποδίδεται στην αλλαγής της διαμόρφωσης του DNA όταν συμπλέκεται με κατιοντικό πολυμερές.[90] Προκειμένου να καθορίσουμε το  $\lambda_{max}$  του μη δεσμευμένου DNA που διαθέτουμε (DNA από σπέρμα σολωμού) διαλύσαμε ποσότητα DNA σε διάλυμα NaCl 0.01 M και καθορίσαμε τη συγκέντρωση του έτσι ώστε η απορρόφηση του να είναι κάτω του δύο, με τον τρόπο αυτό βρέθηκε το  $\lambda_{max}$  του ελεύθερου DNA είναι 260 nm.

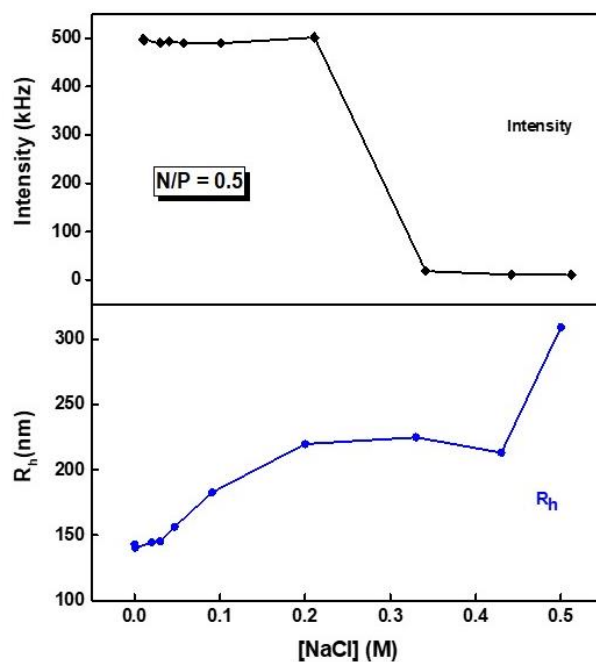
Στη συνέχεια μετρήσαμε τα διαλύματα του δείγματος QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5/DNA σε αναλογίες N/P από 0.25 έως 8. Με βάση το Σχήμα 4.29 παρατηρούμε ότι η ένταση της κορυφής στα 260 nm μειώνεται για τους λόγους N/P=0.25 και 0.5, ενώ παρατηρείται και μια κορυφή απορρόφησης στα 225 nm.

Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην ταυτόχρονη παρουσία ελεύθερου και του δεσμευμένου DNA στο διάλυμα που έχει σαν συνέπεια την αλλαγή στη διαμόρφωση του. Όμως για αναλογίες N/P από 1 έως 8 παρατηρείται μόνο η κορυφή στα 225 nm, μάλλον διότι το DNA είναι πλήρως συμπλεγμένο καθώς η αύξηση των φορτίων που προέρχεται από την αύξηση της συγκέντρωσης του πολυμερούς οδηγεί στην εξουδετέρωση των φορτίων του DNA. Επιβεβαιώνεται επομένως και με αυτή την τεχνική ο σχηματισμός συμπλόκων μεταξύ των συμπολυμερών QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA και DNA.

#### **4.6.1 Μελέτη επίδρασης της ιοντικής ισχύος στα σύμπλοκα Q(PDMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA/DNA**

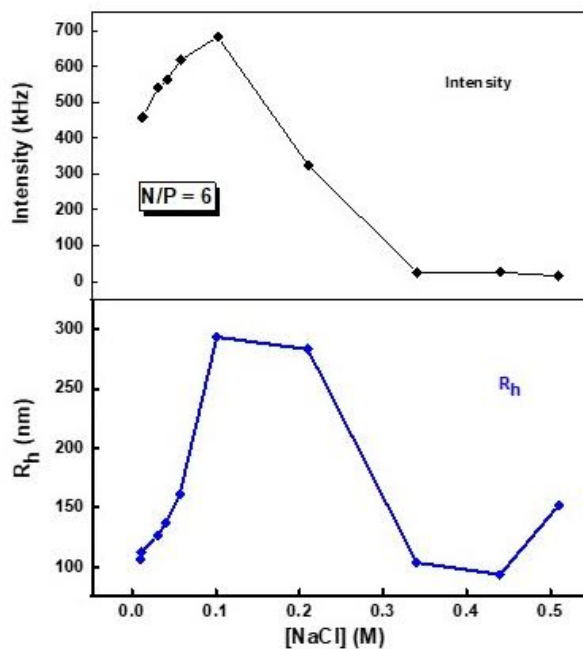
Το δείγμα QP(DMAEA-co-PLMA)-b-POEGMA-5/DNA με διαφορετικούς λόγους N/P μελετήθηκε και ως προς την επίδραση που έχει η αύξηση της ιοντικής ισχύος στη συμπεριφορά του στο διάλυμα. Στο δείγμα QP(DMAEA-co-PLMA)-b-POEGMA-5/DNA που ήταν διαλυμένο σε 0.01M NaCl πραγματοποιήθηκαν 9 προσθήκες NaCl 1 M συγκεντρώσεων από 0,01M (αρχική συγκέντρωση) έως 0.5M και στη συνέχεια μέσω της δυναμικής σκέδασης φωτός μετρήθηκαν οι μεταβολές της έντασης και της ακτίνας  $R_h$  με την αύξηση της αλατότητας του διαλύματος. Οι μετρήσεις έγιναν σε γωνία  $90^\circ$ , σε αρχική συγκέντρωση διαλύματος της τάξης των  $10^{-3} \text{ g/ml}$ , σε pH 7 και σε θερμοκρασία  $25^\circ\text{C}$ . Για τις μετρήσεις επίδρασης της ιοντικής ισχύος επιλέχθηκαν διαλύματα δυο διαφορετικών λόγων N/P για την κάθε σειρά συμπλόκων από αυτά που εμφάνιζαν μεγαλύτερη σταθερότητα με το πέρασμα του χρόνου. Στα Σχήματα 4.30 και 4.31 παρουσιάζονται οι μεταβολές έντασης και ακτίνας  $R_h$  με την αύξηση της ιοντικής ισχύος του συμπλόκου QP(DMAEA-co-PLMA)-b-POEGMA-5/DNA για τους λόγους φορτίων N/P =0.5 και N/P= 6.

QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5/DNA



Σχήμα 4.31: Διαγράμματα μεταβολής της I και R<sub>h</sub> με αύξηση της ιοντικής ισχύος για το δείγμα QP(DMAEA-co-PLMA)-b-POEGMA-5/DNA σε N/P=0.5

QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-5/DNA



Σχήμα 4.32: Διαγράμματα μεταβολής της I και R<sub>h</sub> με αύξηση της ιοντικής ισχύος για το δείγμα QP(DMAEA-co-PLMA)-b-POEGMA-5/DNA σε N/P=6

Από τα διαγράμματα μεταβολής της έντασης σκεδάσεως και για τις περιπτώσεις αναλογιών, παρατηρούμε ότι η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας μειώνεται με την προσθήκη άλατος, σηματοδοτώντας τη μείωση του συμπλόκου σε μάζα και άρα την απόσυνθεσή του. Στην αναλογία N/P=0.5 η υδροδυναμική ακτίνα αυξάνεται με την προσθήκη άλατος καθώς απελευθερώνονται τα φορτία που ήταν αρχικά συμπλεγμένα καθώς το σύστημα τώρα είναι πιο διαλυτό και μπορεί να εγκλωβίσει περισσότερο νερό. Στην περίπτωση του διαλύματος με N/P=6 αρχικά η υδροδυναμική ακτίνα αυξάνεται λόγω της αποσύμπλεξης των φορτίων με αποτέλεσμα τη εισχώρηση νερού στο εσωτερικό των συμπλόκων. Στη συνέχεια όμως η υδροδυναμική ακτίνα μειώνεται λόγω της πλήρους διάσπασης των συμπλόκων.

#### **4.7 Εγκλωβισμός κουρκουμίνης στα συσσωματώματα των P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA**

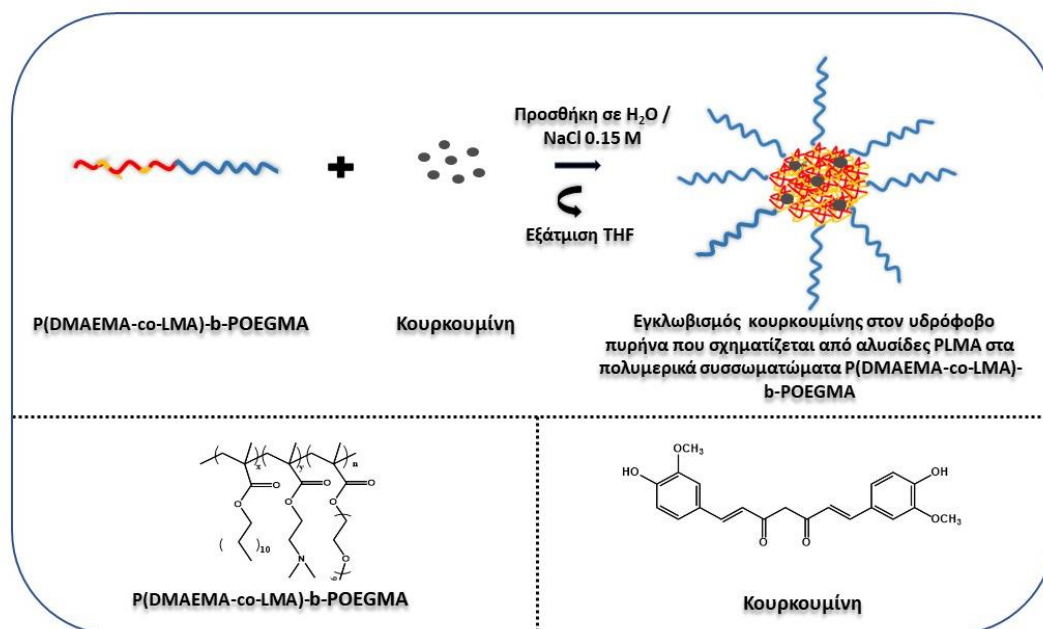
Η κουρκουμίνη είναι μια πολυφαινολική ένωση και προέρχεται από το φυτό *Curcuma longa*. Αποτελεί φαρμακευτική ουσία με αυξημένη υδροφοβικότητα και έχει αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ικανότητες. Λόγω της υδροφοβικότητας που παρουσιάζει χρησιμοποιείται για μελέτες εγκλωβισμού στους υδρόφοβους πυρήνες των πολυμερικών μικκυλίων.

Προκειμένου να μελετήσουμε την ικανότητα των P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA συμπολυμερών ως φορείς φαρμακευτικών ουσιών εγκλωβίστηκε κουρκουμίνη στο υδρόφοβο τμήμα των αυτο-οργανώμενων συσσωματωμάτων των συμπολυμερών και μελετήθηκαν οι ιδιότητες των μικτών νανοδομών που προκύπτουν μέσω των τεχνικών σκέδασης φωτός DLS και ELS και φασματοσκοπίας απορρόφησης ορατού-υπεριώδους.

Τα συμπολυμερή που επιλέξαμε να μελετήσουμε ήταν τα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4 και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6. Το πρώτο έχει τη μεγαλύτερη κατά βάρος σύσταση υδρόφοβου συστατικού LMA και το δεύτερο την μικρότερη κατά βάρος σύσταση σε LMA. Η διαδικασία παρασκευής των δειγμάτων έγινε μέσω της πειραματικής διαδικασίας που περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 3.8. Παρακάτω παρατίθεται η σχηματική



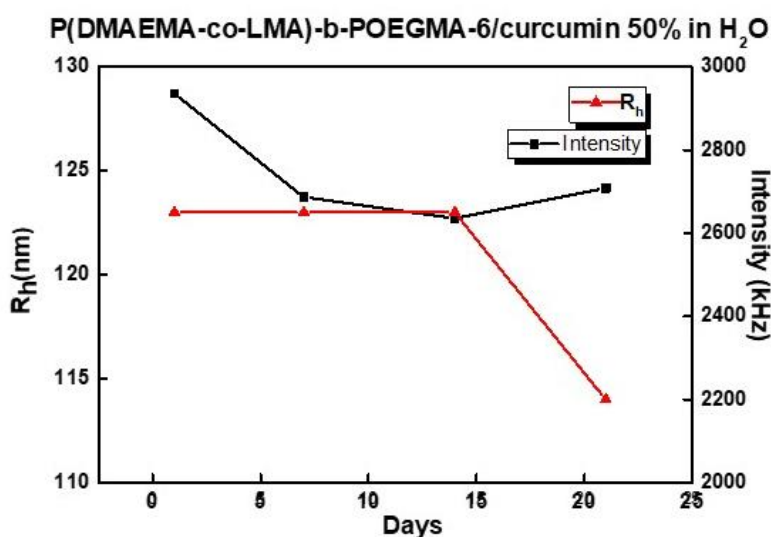
απεικόνιση του εγκλωβισμού της κουρκουμίνης στα νανοσυσσωματώματα των P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA συμπολυμερών καθώς και η χημική δομή της κουρκουμίνης και του πολυμερούς. (Σχήμα 4.32)



**Σχήμα 4.33: Σχηματική απεικόνιση του εγκλωβισμού της κουρκουμίνης και των χημικών δομών της κουρκουμίνης και του πολυμερούς**

Το ποσοστό της κουρκουμίνης που εγκλωβίστηκε υπολογίστηκε με βάση την κατά βάρος χημική σύσταση των συμπολυμερών σε LMA και το ποσοστό κατά βάρος της κουρκουμίνης που θέλουμε να εγκλωβίσουμε. Συνεπώς παρασκευάστηκαν δείγματα με μέγιστο ποσοστό εγκλωβισμού 50% w/w και για τα δύο συμπολυμερή. Τέλος παρασκευάστηκαν δείγματα με μέγιστο ποσοστό εγκλωβισμού κουρκουμίνης 50% w/w και για τα δύο συμπολυμερή έχοντας ως διαλύτη NaCl 0.15M. Η τελική συγκέντρωση των διαλυμάτων ως προς το συμπολυμερές μετά την εξάτμιση του THF ήταν  $1 \times 10^{-3}$  g/ml. Τα δείγματα μετρήθηκαν μέσω δυναμικής σκέδασης σε pH 7, σε θερμοκρασία 25°C και υπό γωνία 90°, την πρώτη μέρα παρασκευής τους και στη συνέχεια μετά από επτά, δεκατέσσερις και είκοσι μία ημέρες προκειμένου να εξακριβωθεί η σταθερότητά τους σε σχέση με το χρόνο. Παρακάτω

παρουσιάζεται με τα αποτελέσματα της δυναμικής σκέδασης του φωτός για κάθε ένα δείγμα και ενδεικτικά παρατίθεται το διάγραμμα μεταβολής της έντασης σκεδάσεως και της υδροδυναμικής ακτίνας σε σχέση με χρόνο του δείγματος P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6/curcumin50% σε νερό, Σχήμα 4.33.



**Σχήμα 4.34:** Διάγραμμα μεταβολής της έντασης σκεδάσεως και της υδροδυναμικής ακτίνας σε σχέση με χρόνο του δείγματος P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6/curcumin50% σε H<sub>2</sub>O

Με βάση το παραπάνω διάγραμμα του Σχήματος 4.33 και τον Πίνακα 4.10 παρατηρείται ότι τα κολλοειδή διαλύματα των P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 με % 50 w/w εγκλωβισμένη κουρκουμίνη παρουσιάζουν μεγαλύτερη σταθερότητα με το πέρασμα του χρόνου τόσο στην ένταση σκεδάσεως, που είναι μέτρο της μάζας στο διάλυμα, όσο και στην υδροδυναμική ακτίνα. Το αποτέλεσμα αυτό δεν ήταν αναμενόμενο καθώς το πολυμερές P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 περιέχει μικρότερο ποσοστό υδρόφοβου συστατικού από ότι το P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4 και περιμέναμε τα κολλοειδή διαλύματα του P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4 να επιδεικνύουν μεγαλύτερη σταθερότητα λόγω του μεγαλύτερου ποσοστού σύστασης τους σε υδρόφοβο συστατικό. Το γεγονός της μη αναμενόμενης συμπεριφοράς των κολλοειδών διαλυμάτων μπορεί να αποδοθεί στο μεγάλο

ποσοστό της POEGMA συστάδας που περιέχεται στα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 συμπολυμερή και προσφέρει σταθερότητα στο σύστημα και προστατεύει τα σωματίδια από το να καταβυθιστούν.

**Πίνακας 4.10: Αποτελέσματα Δυναμικής Σκέδασης Φωτός για τα δείγματα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4 και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 με μέγιστο δυνατό ποσοστό εγκλωβισμένης κουρκουμίνης % 50w/w σε διαλύτη H<sub>2</sub>O και NaCl 0.15 M**

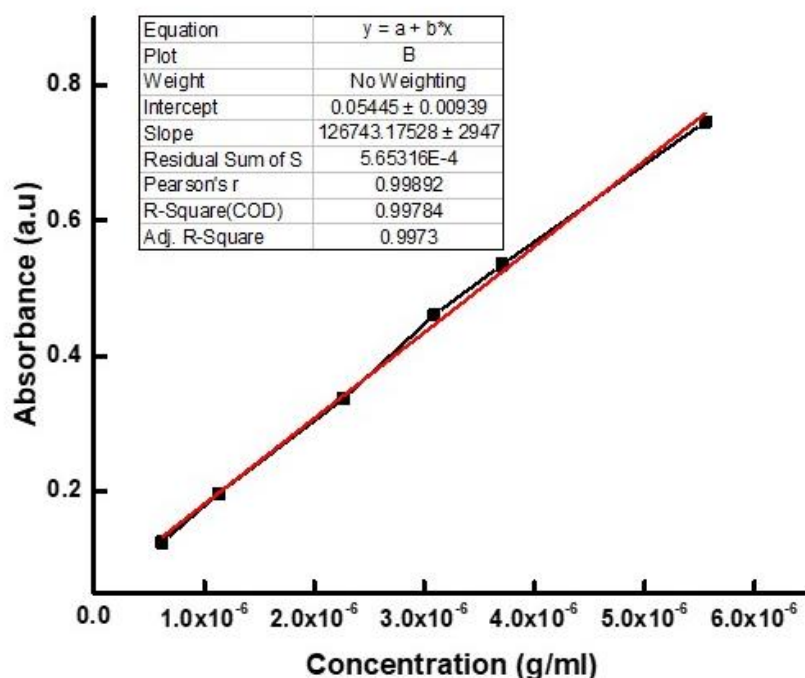
P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4/curcumin 50% in H <sub>2</sub> O			P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6/curcumin 50% in H <sub>2</sub> O			P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4/curcumin 50% in NaCl 0.15M			P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6/curcumin 50% in NaCl 0.15M		
Day	Intensity (kHz)	R <sub>h</sub> (nm)	Day	Intensity (kHz)	R <sub>h</sub> (nm)	Day	Intensity (kHz)	R <sub>h</sub> (nm)	Day	Intensity (kHz)	R <sub>h</sub> (nm)
1	29800	97	1	2936	123	1	3400	120	1	4860	167
7	18419	100	7	2687	123	7	1290	185	7	4230	177
14	16936	101	14	2636	123	14	723	180	14	4360	182
21	15387	100	21	2709	114	21	546	161	21	4390	173

Την πρώτη ημέρα παρασκευής των κολλοειδών διαλυμάτων μετρήθηκε το ζ-δυναμικό τους μέσω της τεχνικής ELS. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων ήταν αναμενόμενα. Σε όλες τις περιπτώσεις οι τιμές του ζ-δυναμικού φορτίου ήταν θετικές καθώς η κουρκουμίνη είναι εγκλωβισμένη στον υδρόφοβο πυρήνα και η τεχνική ELS ανιχνεύει το φορτίο στην επιφάνεια του σωματίδιου. Το ζ-δυναμικό έχει μικρότερες τιμές όταν χρησιμοποιείται ως διαλύτης το NaCl 0.15 M, διότι επέρχεται προάσπιση φορτίων και άρα μείωση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων του συστήματος. Οι τιμές του ζ-δυναμικού παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας 4.11)

Πίνακας 4.11: Αποτελέσματα ELS για τα δείγματα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4 και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6 με μέγιστο δυνατό ποσοστό εγκλωβισμένης κουρκουμίνης 50%w/w σε διαλύτη H<sub>2</sub>O και NaCl 0.15

ζ-δυναμικό (mV)			
P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4/curcumin 50% in H <sub>2</sub> O	P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6/curcumin 50% in H <sub>2</sub> O	P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4/curcumin 50% in NaCl 0.15M	P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6/curcumin 50% in NaCl 0.15M
22.6	18.2	3.73	2.62

Τέλος μέσω της φασματοσκοπίας ορατού υπεριώδους υπολογίστηκε το ποσοστό εγκλωβισμού φαρμάκου όλων των δειγμάτων. Κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς της κουρκουμίνης, μετρώντας την απορρόφηση σε  $\lambda_{max} = 420$  nm, έξι διαφορετικών συγκεντρώσεων κουρκουμίνης σε THF με φασματοσκοπία Uv-Vis (Σχήμα 4.34).



Σχήμα 4.35: Καμπύλη αναφοράς της κουρκουμίνης σε THF

Τα αποτελέσματα του % εγκλωβισμού για τα δείγματα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4/curcumin και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6/curcumin συνοψίζονται στον Πίνακα 4. 12.

**Πίνακας 4.12: Αποτελέσματα υπολογισμού απόδοσης εγκλωβισμού της κουρκουμίνης για τα δείγματα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-4/curcumin και P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA-6/curcumin**

<b>Δείγμα P(DMAEMA- co-LMA)-b- POEGMA</b>	<b>Μέγιστο ποσοστό εγκλωβισμού (% w/w)</b>	<b>Ποσότητα κουρκουμίνης που χρησιμοποιήθηκε (mg)</b>	<b>% Απόδοση εγκλωβισμού</b>
<b>Sample 4</b>	<b>50</b>	<b>0.95</b>	<b>10</b>
<b>Sample 4 (0.15 M NaCl)</b>	<b>50</b>	<b>0.95</b>	<b>14</b>
<b>Sample 6</b>	<b>50</b>	<b>0.35</b>	<b>9</b>
<b>Sample 6 (0.15 M NaCl)</b>	<b>50</b>	<b>0.35</b>	<b>29</b>

Τα αποτελέσματα της % απόδοσης εγκλωβισμού διαφέρουν αρκετά από το μέγιστο αναμενόμενο ποσοστό εγκλωβισμού. Εικάζεται ότι αυτό συμβαίνει κυρίως λόγω της αρχιτεκτονικής του πολυμερούς καθώς δεν υπάρχει μια καθαρά υδρόφοβη συστάδα που θα αποτελέσει τον πυρήνα στον οποίο θα εγκλωβιστεί το φάρμακο. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση που έχουμε ως διαλύτη το υδατικό διάλυμα NaCl 0.15M το ποσοστό του φαρμάκου που έχει εγκλωβιστεί είναι μεγαλύτερο από ότι σε νερό καθώς παρουσία NaCl 0.15 M τα νανοσωματίδια αναμένεται να έχουν πιο σφιχτή δομή (λόγω της προάσπισης των φορτίων του DMAEMA) και συγκρατούν ορισμένο ποσοστό της κουρκουμίνης αποτρέποντας την καταβύθιση του φαρμάκου.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η σύνθεση τεσσάρων αμφίφιλων κατά συστάδες συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA με τη χρήση της τεχνικής πολυμερισμού RAFT. Τα συμπολυμερή διέφεραν ως προς την κατά βάρος σύσταση τους σε PDMAEMA, PLMA και POEGMA. Τα μοριακά τους χαρακτηριστικά προσδιορίστηκαν μέσω της χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών, της φασματοσκοπίας  $^1\text{H-NMR}$  και της φασματοσκοπίας FT-IR. Τα αποτελέσματα των οποίων συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι η σύνθεση των πολυμερών ήταν επιτυχής. Ακολούθησε η σύνθεση των συμπολυμερών QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA, η οποία επιτεύχθηκε μέσω της αντίδρασης τεταρτοταγοποίησης της PDMAEMA συστάδας σε QPDMAEMA. Με τον τρόπο αυτόν η PDMAEMA συστάδα από ασθενής κατιοντικός πολυηλεκτρολύτης μετατράπηκε σε ισχυρό. Η επιτυχής μετατροπή της τριτοταγούς αμινομάδας σε τεταρτοταγές άλας αμμωνίου επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία FT-IR. Ο καθορισμός του μοριακού τους βάρους και της κατά βάρος σύστασής τους καθορίστηκαν με βάση τα μοριακά χαρακτηριστικά των P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA πολυμερών.

Στη συνέχεια μελετήθηκαν οι ιδιότητες αυτοοργάνωσής τους σε υδατικά διαλύματα και η εξάρτηση των ιδιοτήτων αυτών από τις μεταβολές της θερμοκρασίας, του pH και της ιοντικής ισχύος. Το πρωτόκολλο παρασκευής που ακολουθήθηκε προκειμένου να σχηματιστούν νανοσωματίδια ήταν η απευθείας διάλυση των συμπολυμερών σε υδατικό μέσο. Οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν με την εφαρμογή των μεθόδων SLS, DLS, ELS και FS, τα αποτελέσματα των οποίων τείνουν στο συμπέρασμα ότι τα συμπολυμερή αυτοοργανώνονται στο νερό σχηματίζοντας συσσωματώματα των οποίων οι ιδιότητες εξαρτώνται από τις αλλαγές στο pH, στη θερμοκρασία και στην ιοντική ισχύ. Επίσης, εφαρμόστηκε η τεχνική AFM η οποία σε συνδυασμό με την SLS κατέδειξαν ότι τα συσσωματώματα έχουν σφαιρική γεωμετρία και σφιχτή εσωτερική δομή.

Έπειτα τα QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA συμπολυμερή εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να σχηματίζουν σύμπλοκα με το DNA μέσω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των θετικά φορτισμένων αμινομάδων της QPDMAEMA μονάδας του συμπολυμερούς και των αρνητικά φορτισμένων φωσφωρικών ομάδων του DNA. Παρασκευάστηκαν λοιπόν σύμπλοκα με διαφορετικές αναλογίες N/P, τα οποία διερευνήθηκαν με τις μεθόδους DLS, SLS, ELS, FS και φασματοσκοπίας UV-Vis. Αποδείχθηκε ότι η μάζα, το μέγεθος, το ζ-δυναμικό και η ικανότητα σύμπλεξης του πολυμερούς με το DNA εξαρτώνται από την αναλογία N/P.

Τέλος τα συμπολυμερή P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA χρησιμοποιήθηκαν ως φαρμακευτικοί νανοφορείς για τον εγκλωβισμό της κουρκουμίνης. Παρασκευάστηκαν διαλύματα πολυμερούς με μέγιστο ποσοστό εγκλωβισμένης κουρκουμίνης 50 % w/w. Οι μικτές νανοδομές που προέκυψαν μελετήθηκαν μέσω των τεχνικών DLS, ELS και φασματοσκοπίας UV-Vis. Μέσω της δυναμικής σκέδασης φωτός εξήχθη το συμπέρασμα ότι η σταθερότητα των κολλοειδών διαλυμάτων εξαρτάται από την κατά βάρος σύσταση της POEGMA συστάδας. Ενώ μέσω της φασματοσκοπίας UV-Vis υπολογίστηκε το ποσοστό εγκλωβισμού της κουρκουμίνης, το οποίο διέφερε σημαντικά από το αναμενόμενο εξαιτίας της αρχιτεκτονικής του πολυμερούς καθώς δεν υπάρχει μια καθαρά υδρόφοβη συστάδα που θα αποτελέσει τον πυρήνα στον οποίο θα εγκλωβιστεί το φάρμακο.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις μελέτες που διεξήχθησαν από την παρούσα ερευνητική εργασία είναι πως τα αμφίφιλα συμπολυμερή QP(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς ως φορείς γονιδιακής θεραπείας και τα P(DMAEMA-co-LMA)-b-POEGMA συμπολυμερή μπορούν να διατεθούν ως νανοφορείς φαρμάκων.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate)	πολυ(μεθακρυλικός εστέρας της διμεθυλοαμινοαιθανόλης)
poly(lauryl methacrylate)	πολυ(μεθακρυλικός εστέρας της δωδεκανόλης)
Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer	Πολυμερισμός Αντιστρεπτής Προσθήκης-Μεταφοράς Αλυσίδας με Απόσπαση
Chain Transfer Agent	Μέσο Μεταφοράς Αλυσίδας
Quaternization	Τεταρτοταγοποίηση
Polyelectrolytes	Πολυηλεκτρολύτες
Critical aggregation concentration	Κρίσιμη Συγκέντρωση Συσσωμάτωσης
Lower Critical Solution Temperature	Κατώτερη Κρίσιμη Θερμοκρασία Διαλύματος
Size Exclusion Chromatography	Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών
Nuclear Magnetic Resonance	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
Dynamic Light Scattering	Δυναμική Σκέδαση Φωτός
Static Light Scattering	Στατική Σκέδαση Φωτός
Zeta-Potential	ζ-δυναμικό
Atomic Force Microscopy	Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης



## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

### Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

PDMAEMA	poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate)
POEGMA	poly(oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate)
PLMA	poly(lauryl methacrylate)
QPDMAEMA	Quaternized poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate)
RAFT	Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer
AIBN	Αζω-διισοβουτυρονιτρίλιο
SEC	Size Exclusion Chromatography
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
<sup>1</sup> HNR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
CDCl <sub>3</sub>	Deuterium Chloroform
FT-IR	Fourier Transmission Infra Red
DLS	Dynamic Light Scattering
SLS	Static Light Scattering
FS	Fluorescence

ELS	Electrophoretic Light Scattering
$R_h$	Υδροδυναμική Ακτίνα
$R_g$	Γυροσκοπική Ακτίνα
THF	Τετραϋδροφουράνιο
LCST	Lower Critical Solution Temperature, LCST
CAC	Critical Aggregation Concentration
AFM	Atomic Force Microscopy

## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Ιατρίδη Ζαχαρούλα, Μελέτη αποδέσμευσης δισθενών ιόντων χαλκού από πολυμερή τύπου κτένας, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, 2009
2. Κοτζαμάνης Ιωάννης, Ανάπτυξη νέων "ευφυών" κατά συστάδες συμπολυμερών τύπου ομοπολυμερές – στατιτικό συμπολυμερές, Πανεπιστήμιο Πατρών, 2007
3. Σφήκα Βασιλική, Πρότυπα αμφίφιλα συμπολυμερή τριών συσταδών πρότυπα διασύνδεσης, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, 2003
4. Dicker, I.B., Cohen, G. M, Farnham, W.B., Hertler, W.R, Laganis , E.D., Sogah, D.Y., Oxyanions catalyse group-transfer polymerization to give living polymers, *Macromolecules* , vol.23, pp. 4034-4041, 1990
5. Πισικάλης Μαρίνος, Ειδικά θέματα επιστήμης πολυμερών, Σημειώσεις Μαθήματος, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2010
6. Förster, S., & Antonietti, M., Amphiphilic Block Copolymers in Structure-Controlled Nanomaterials Hybrids, *Advanced Materials*, vol.10(3), pp. 195-207, 1998
7. Li, L., Raghupathi, K., Song, C., Prasad, P., Thayumanavan, S., Self-assembly of random copolymers, *Chemical Communications*, vol.50, pp. 13417-13432, 2014
8. Hadjichristidis, N., Pispas, S., & Floudas, G., Block copolymers: synthetic strategies, physical properties, and applications, Wiley Interscience, 2003

9. Mai, Y., Eisenberg, A., Self-assembly of block copolymers, *Chemical Communications*, vol.41, pp. 5969-5985, 2012
10. Blanz, A., Armes, S. P., & Ryan, A. J., Self-assembled block copolymer aggregates: from micelles to vesicles and their biological applications, *Macromolecular Rapid Communications*, vol.30, pp.267-277, 2009
11. Kataoka, K., Harada, A., Nagasaki, Y., *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol.47, pp.113, 2001
12. Kabanov, A., Alakhof, V., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, vol.19, pp. 1, 2002
13. Kabanov, A., Batrakova, E., Bronich, T., Vetro, J., M., Nanoparticulates as Drug Carriers, vol.57, 2006
14. Kwon, G., Adams, A., Lavasanifae, A., *Amphiphilic block copolymers for drug delivery*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol.92, pp.1343-1355, 2003
15. Gohy, J.F, Block copolymer micelles, *Advances in Polymer Science*.
16. Kimura, Y., Terashima, T., Sawamoto., M., Self-Assembly of Amphiphilic Random Copolyacrylamides into Uniform and Necklace Micelles in Water, *Macromolecular Chemistry and Physics*, vol.208(18), pp.1700230, 2017
17. Schärftl, W. Light scattering from polymer solutions and nanoparticle dispersions, Springer Science & Business Media, 2007
18. Καραγιάννη Μαρία, Αυτοοργάνωση Πολυμερών: Πολυηλεκτρολύτες και Σύμπλοκά τους με Πρωτεΐνες, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ, 2012
19. Οικονόμου Ευδοκία, Μελέτη αποδέσμευσης ιόντων δισθενούς χαλκού από σύμπλοκα πολυηλεκτρολυτών με αντίθετα φορισμένες επιφανειοδραστικές ενώσεις, Πανεπιστήμιο Πατρών, 2009

20. Radeva, T., *Physical Chemistry of Polyelectrolytes*, Marcel & Dekker, 2001
21. Moffit, M., Khougaz, K., Eisenberg, A., Micellization of Ionic Block copolymers, *Accounts of Chemical Research*, vol.29, pp. 95-102, 1996
22. Förster, S., Abetz, V., & Müller, A. H. Polyelectrolyte block copolymer micelles, *Advanced Polymer Science*, vol.166, pp.173-210, 2004
23. Canning, S. L., Neal, T.J, Armes, S.P., pH-Responsive Schizophrenic Diblock Copolymers Prepared by Polymerization-Induces Self Assembly
24. Kopecek, J., *Biodegradation of Polymers for Biomedical Use*, IUPAC, Macromolecules, Pergamon: Oxford, England, pp. 305, 1982
25. Moradi-Araghi, A., Beardmore, D. H.,Stahl, G.A, The application of gels in enganced oil recover: In *Water Soluble Polymers for Petroleum Recovery*, Plenum: New York, pp. 299-312, Spinger US, 1988
26. *Polymeric Materials Encyclopedia*, vol.17, Water Soluble Polymers,
27. Van Durme, K., P , Rahier, H., & Van Mele, B., Influence of additives on the thermoresponsive behavior of polymers in aqueous solution”, *Macromolecules*, vol.38(24),pp.10155-10163, 2005
28. Morandi--Araghi, A., Beardmore, D. H., & Stahl, G. A. The application of gels in enhanced oil recovery: theory, polymers and crosslinker systems In *Water-Soluble Polymers for Petroleum Recovery*, pp.299-312, Springer US, 1988
29. Gupta, P. Gupta, P., Vermani, K., & Garg, S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery, *Drug Discovery Today*, vol. 7(10), pp.569-579, 2002
30. Schmalijonan, D., Thermo-and pH-responsive polymers in drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 58(15),pp.1655-1670, 2006
31. Gan, L. H., Gan, Y. Y., & Deen, G. R. Poly(N-acryloyl-N ‘-propylpiperazine): A new stimuli-responsive polymer”,*Macromolecules*, vol.33(21), pp.7893-7897, 2000

32. Kurisawa, M., M., & Yui, N., Dual-stimuli-responsive drug release from interpenetrating polymer network-structured hydrogels of gelatin and dextran, *Journal of Controlled Release*, vol. 54(2), pp.191-200, 1998
33. Ward, M. A, Georgiou, T. K., Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications, *Polymers*, 2011, vol.3, pp.1215-1242, 2011
34. Shibayama, M., Tanaka, T., *Advances in Polymer Science*, vol.109, pp.1-62, 1993
35. Chen, G., Hoffman, A., S., Graft copolymers that exhibit temperature-induced phase transitions over a wide range of pH, *Nature*, vol.373 ,pp 49-52, 1995
36. Cammas-Marion., S., Okano, T., Kataoka, K., Functional and site-macromolecular micelles as high potential drug devices, *Colloids and Surfaces*, vol.16, pp.207-215, 1999
37. Bütün, V., Billingham, N.C, Armes, S. P., Unusual Aggregation Behavior of a Novel Tertiary Amine Methacrylate- Based Diblock Copolymer: Formation of Micelles and Reverse Micelles in Aqueous Solution, *Macromolecules*, vol.120(45), pp. 11818-11819, 1998
38. Kocak, G., Tuncer, C., Bütün, V, pH-Responsive Polymers, *Polymer Chemistry*, vol.8, pp. 144-176, 2018
39. Philippova, O. E., Hourdet, D., Audebert, R., & Khokhlov, A. R., pH-responsive gels of hydrophobically modified poly (acrylic acid), *Macromolecules*, vol.30(26), pp.8278-8285, 1997
40. Pinkrah, V. T., Snowden, M. J., Mitchell, J. C., Seidel, J., Chowdhry, B. Z., & Fern, G. R, Physicochemical properties of poly (N-isopropylacrylamide-co-4-vinylpyridine) cationic polyelectrolyte colloidal microgels, *Langmuir*, vol.19(3),pp. 585-590, 2003
41. Lee AS, Butun V, Vamvakaki M, Armes SP, Pople JA, Gast AP, Structure of pH-Dependent Block Copolymer Micelles: Charge and Ionic Strength Dependence, *Macromolecules*, vol.35, pp. 8540–51, 2002

42. Gohy J, Lohmeijer BGG, Varshney SK, Decamps B, Leroy E, Boileau S, Schubert US, *Macromolecules*, vol. 35, pp. 9748–55, 2002
43. Meredith, A. Mintzer and Eric E. Simanek, Nonviral Vector for Gene Delivery, *Chemical Reviews*, vol.109, pp. 259-302, 2009
44. Isik, M., Agirre, M., Zarate, J., Mecerreyes, D., Sardon, H., Pedrazz, J.L, Amine containing cationic methacrylate copolymers as efficient gene delivery vehicles, to retinal epithelial cells, *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, vol.55, pp. 280-287, 2017
45. Rösler, A., Vandermeulen, G. W. M., Klok, H. A., Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers, *Advanced Drug Deliver Reviews*, vol.53, pp.95-108, 2001
46. Lowe, A. B., McCormick, C. L., Reversible addition–fragmentation chain transfer (RAFT) radical polymerization and the synthesis of water-soluble(co)polymers under homogeneous conditions in organic and aqueous media, *Progress in Polymer Science*, vol.32, pp.283–351 2007
47. Moad, G., Rizzardo, E., Thang, S. H., Living Radical Polymerization by the RAFT Process-A First Update, *Australian Journal of Chemistry*, vol.59, pp. 669–692, 2006
48. Perrier, S., 50<sup>th</sup> Anniversary Perspective: RAFT Polymerization A User Guide, *Macromolecules*, vol.50(19), pp. 7433-7447, 2017
49. Smith, A. E., Xu, X., McCormick, C. L., Stimuli-responsive amphiphilic (co)polymers via RAFT polymerization, *Progress in Polymer Science*, vol. 35, pp. 45-93, 2010
50. Pecsok, R. L., Shields L. D., Cairns T., McWilliam I. G., Σύγχρονες Μέθοδοι στη Χημική Ανάλυση, Κεφ. 5, Σελ. 80-88 2η εκδ., Εκδόσεις Πνευματικός, Αθήνα, 1980
51. Hiemenz, P., *Polymer Chemistry: The Basic Concepts*, New York, Chap. 1, pp. 642-652, 1984
52. Gedde, U. W., *Polymer Physics*, Chapman and Hall: UK, Chap. 1, pp. 1-18, 1995

53. Ιατρού Ε, Πίσπας Α, Πισικάλης Μ, Σημειώσεις μεταπτυχιακού μαθήματος: Μέθοδοι χαρακτηρισμού πολυμερών, Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών: Επιστήμη πολυμερών και εφαρμογές της, Πανεπιστήμιο Αθηνών
54. Παναγιώτου Κ., Επιστήμη και Τεχνολογία Πολυμερών, Κεφ. 8, Σελ. 255-258, 2η εκδ., Εκδόσεις Πήγασος, Αθήνα, 2000
55. <http://byjus.com/chemistry/nmr-spectroscopy/>
56. Abraham, P.J., Fisher, J., Loftus, P., Introduction to NMR spectroscopy, New York: Wiley, 1993
57. Wade, L.G., JR Withman College, Οργανική Χημεία, 7η εκδ., Εκδόσεις Τζίολα, 2011
58. Καμίτσος, Ε. Ι., Σημειώσεις Φασματοσκοπίας Υπερύθρου, Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: Επιστήμη Πολυμερών και Εφαρμογές της, 2002
59. Τσιαντός. Κ. Δ., Μεταπτυχιακή εργασία με τίτλο: Μελέτη της χρωστικής Κυανό των Μάγια, με τεχνικές Δονητικής Φασματοσκοπίας, 2011
60. Βαλαβανίδης, Α., Βασικές Αρχές Μοριακής Φασματοσκοπίας και Εφαρμογές στην Οργανική Χημεία, Εκδόσεις Σύγχρονα Θέματα, Αθήνα, 2008
61. Schander, B., Infrared and Raman Spectroscopy, New York: VCH Press, 1995
62. Kortum, G. Reflectance Spectroscopy, New York: Springer, 1969
63. Fahrenfort, J., Spectrochem. Acta, vol.17, pp.698, 1961
64. Χατζηγιάννου, Θ.Π., Κουππάρης, Μ.Α. Ενόργανη Ανάλυση, Εκδόσεις Δ. Μαυρομμάτη, Αθήνα, 2000
65. Bauman, R. P, Absorption Spectroscopy, New York: Wiley, 1962
66. Introduction to Fluorescence Techniques, Molecular Probes



67. Cowie J. M. G., *Polymers: Chemistry & Physics of Modern Materials*, Chap. 9, pp.196-202, 2nd ed., Stanley Thornes Ltd: UK, 1998
68. Heimenz, P., Rajagopalan, R., *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, Chap. 5, pp. 193-247, 3rd ed. Rev. & exp., Markel Dekker: New York, 1997
69. Van Holde, K. E., *Physical Biochemistry*, 2nd ed., Chap. 9, pp. 209-224, Prentice Hall: Englewood Cliffs, 1985
70. Pecora, R., *Dynamic light scattering: Applications of photon correlation spectroscopy*, Plenum Press, 1985
71. Provencher, S.W, *Inverse problems in polymer characterization: Direct analysis of polydispersity with photon correlation spectroscopy*, *Macromolecular Chemistry and Physics*, vol.180, pp.201-209, 1979
72. <http://zeta-potential.sourceforge.net/zeta-potential.shtml>
73. <http://www.brookheaven.co.uk/zeta-potential.html>
74. [http://nition.com/en/products/zeecom\\_s.htm](http://nition.com/en/products/zeecom_s.htm)
75. <http://www.pssnicomp.com/zetatheoty.htm>
76. Binning, G., Quate, C. F., Gerber, Ch., *Atomic Force Microscopy*, *Physical Review Letters*, vol.56, pp. 930-933, 1986
77. Kaditi, E., Mountrichas, G., Pispas, S., *Amphiphilic block copolymers by a combination of anionic polymerization and selective post-polymerization functionalization*, *European Polymer Journal*, vol.47, pp. 415-434, 2011
78. Bütün, V., Armes, S. P., Billingham, N. C., *Selective Quaternization of 2-(Dimethylamino)ethyl Methacrylate Residues in Tertiary Amine Methacrylate Diblock Copolymers*, *Macromolecules*, vol.34(5), pp. 1148-1159, 2001

79. Xu, Y., Bolisetty, M., Fang, B., Yuan, J., Ballauff, M., Müller, A.H.E, pH and salt responsive poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) cylindric brushes and their quaternized derivatives, *Polymer*, vol.49(18), pp. 3957-3964, pp. 3957-3964
80. Wesley, R.D., Dreiss, C.A., Cosgrove, T., Armes, S.P., Thompson, L., Baines, F.L., Bilingham, N.C., *Langmuir*, vol.21(11), pp.4859-4861, 2005
81. Mohammadi, M., Salami-Kalajahi, M., Roghani-Mamaqani, H., Goslan, M., Effect of molecular weight and polymer concentration on the triple temperature/pH/ionic strength-sensitive behavior of poly (2-(dimethylamino)ethyl methacrylate), *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, vol.66(29), pp.455-461, 2016
82. Plamper, F. A., Ruppel, M., Schmalz, A., Borisov, O., Ballauff, M., Müller, A. H. E., Tuning the Thermoresponsive Properties of Weak Polyelectrolytes: Aqueous Solution of Star-Shaped and Linear Poly(N, N-dimethylaminoethyl Methacrylate), *Macromolecules*, vol.40, pp. 8361-8366, 2007
83. Σκανδάλης. Α., Μεταπτυχιακή εργασία με τίτλο: Αμφίφιλα Κατα Συστάδες Συμπολυμερή PLMA-b-POEGMA: Σύνθεση, Χαρακτηρισμός και Ιδιότητες σε Διαλύματα, Αθήνα, 2016
84. Skandalis, A., Pispas, S., PLMA-b-POEGMA amphiphilic block copolymers: Synthesis and self-assembly in aqueous media, *Polymer Chemistry*, vol.55. pp. 155-163, 2017
85. Zhao., C.L., Winnik., M.A., Fluorescence Probe Techniques Used To Study Micelle Formation in Water-Soluble Block Copolymers, *Langmuir*, vol.6, pp. 514-516, 1990
86. Χρυσοστόμου., Β., Μεταπτυχιακή εργασία με τίτλο: Αμφίφιλα Κατά Συστάδες πολυ(Μεθακρυλικού Εστέρα της Διμεθυλοαμινοαιθανόλης)-b-πολυ(Μεθακρυλικού Εστέρα της Δωδεκανόλης): Σύνθεση, Χημική Τροποποίηση, Χαρακτηρισμός, Αυτοοργάνωση σε Διαλύματα και Σύμπλεξη με DNA, Αθήνα, 2017

87. Skandalis., A., Pispas., S., PDMAEMA-b-PLMA-b-POEGMA triblock terpolymers via RAFT polymerization and their self-assembly in aqueous solutions, *polymer chemistry*, vol.8, pp.4538-4547, 2017
88. Chysostomou., V., Pispas., S., Stimuli-responsive amphiphilic PDMAEMA-b-PLMA copolymers and their cationic and zwitterionic analogs, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, vol.56, pp.598-610, 2017
89. Haladjova, E., Mountrichas., G., Pispas., S., Rangelov., S., Poly(vinyl benzyl trimethylammonium chloride) Homo and Block Copolymers Complexation with DNA, *The Journal of Physical Chemistry B*, vol.120, pp.1586-2595, 2016
90. Dey., D., Kumar., S., Banerjee, R., Maiti., S., Dhara., D., Polyplex Formation between PEGlated Linear Cationic Block Copolymers and DNA: Equilibrium and Kinetic Studies, *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 118, pp.7012-7025, 2014