



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
« ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ »**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Στατιστικά αμφίφιλα τριπολυμερή αποκρινόμενα σε pH και
θερμοκρασία με πολυμερισμό RAFT:
Σύνθεση, ιδιότητες αυτο-οργάνωσης σε υδατικά διαλύματα και
εγκλωβισμός φαρμάκων»**

**ΤΟΜΑΡΑ ΜΑΡΙΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2022

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Στατιστικά αμφίφιλα τριπολυμερή αποκρινόμενα σε pH και θερμοκρασία με πολυμερισμό RAFT: Σύνθεση, ιδιότητες αυτο-οργάνωσης σε υδατικά διαλύματα και εγκλωβισμός φαρμάκων»

ΤΟΜΑΡΑ ΜΑΡΙΑ

A.M.: 202316

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

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ερμόλαος Ιατρού, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

Μαρίνος Πιτσικάλης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ

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

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

18/02/2022

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα αμφίφιλα στατιστικά συμπολυμερή παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της ικανότητάς τους να αυτο-οργανώνονται σε νανοδομές όταν βρεθούν σε υδατικά διαλύματα, ιδιότητα που τα καθιστά ελκυστικά σε βιομηχανικό επίπεδο και πολύ χρήσιμα ως μεταφορείς φαρμάκων και για εφαρμογές σε γονιδιακή θεραπεία.

Η συγκεκριμένη μελέτη αφορά στη σύνθεση πέντε στατιστικών τριπολυμερών του τύπου πολυ(μεθακρυλικός εστέρας της διμεθυλαμινοαιθανόλης – co – μεθακρυλικός εστέρας της δωδεκανόλης – co – μεθακρυλικός εστέρας της ολιγοαιθυλενογλυκόλης) διαφορετικής σύστασης, με τη μέθοδο ελεγχόμενου ριζικού πολυμερισμού RAFT.

Ακολούθησε ο μοριακός χαρακτηρισμός των συμπολυμερών με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC) για τον προσδιορισμό μοριακών βαρών και κατανομών μοριακών βαρών και με φασματοσκοπικές μεθόδους ¹H-NMR και FTIR, προκειμένου να γίνει προσδιορισμός της σύστασης και ταυτοποίηση των χαρακτηριστικών ομάδων των συμπολυμερών. Οι ιδιότητες της αυτο-οργάνωσής τους μελετήθηκαν σαν συνάρτηση μεταβολών στο pH, στη θερμοκρασία και στην ιοντική ισχύ, με τη χρήση μεθόδων δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) και φθορισμομετρίας (FS).

Σε επόμενο στάδιο, παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα των συμπολυμερών και έγινε εγκλωβισμός κουρκουμίνης ως υδρόφοβο φάρμακο στον υδρόφοβο πυρήνα τους. Μελετήθηκαν με τεχνικές δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS), φασματοσκοπίας φθορισμού (FS) και υπεριώδους – ορατού (UV-Vis) όσον αφορά τη δομή και τις ιδιότητες των σχηματιζόμενων συσσωματωμάτων.

Τέλος, μελετήθηκαν τα συστήματα πολυμερούς-κουρκουμίνης και ως προς την αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες του ορού εμβρύου βοοειδούς (FBS), μέσω δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS), ως προς τη σταθερότητά τους σε βιολογικά μέσα.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Σύνθεση πολυμερών και χαρακτηρισμός

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Αμφίφιλα στατιστικά συμπολυμερή, πολυμερισμός RAFT, σχηματισμός νανοσωματιδίων, εγκλωβισμός φαρμάκου, αλληλεπίδραση με FBS

ABSTRACT

Amphiphilic statistical copolymers are of great interest due to their ability to self-assemble into nanoparticles when inserted in aqueous media, which makes them particularly attractive at industrial level and very useful as drug and gene carriers.

The current study is about the synthesis of five statistical terpolymers, of the type poly(2-dimethylamino ethyl methacrylate – co – lauryl methacrylate – co – oligo ethyl methacrylate) having different compositions via RAFT polymerization.

The synthesis was followed by the molecular characterization of the terpolymers via size exclusion chromatography (SEC) for the determination of molecular weights and the molecular weight distribution and spectroscopic characterization techniques such as ¹H-NMR and FTIR, in order to identify the composition of the terpolymers and the feature groups. Their self-assembling behavior was studied as well under the effect of different pH, temperature and ionic strength changes, using dynamic light scattering and fluorescence spectroscopy (FS).

Aqueous solutions of the terpolymers were prepared and curcumin was encapsulated as a hydrophobic drug into the hydrophobic domain of the aggregates formed. These aggregates were studied by dynamic light scattering (DLS), fluorescence spectroscopy (FS) and ultraviolet – visible spectroscopy (UV-Vis).

Finally, the polymer-curcumin complexes were studied for their interaction with proteins of fetal bovine serum (FBS) via dynamic light scattering (DLS).

SUBJECT AREA: Polymer synthesis and characterization

KEYWORDS: Amphiphilic statistical copolymers, RAFT polymerization, nanoparticles, drug encapsulation, interaction with FBS

Στην οικογένειά μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, στα πλαίσια απόκτησης του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης στην Επιστήμη Πολυμερών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα ερευνητή Δρ. Αστέριο Πίσπα, Διευθυντή Ερευνών στο Ινστιτούτο Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, για την καθοδήγηση, τη βοήθεια και την υποστήριξη που μου παρείχε ανά πάσα στιγμή κατά την εκπόνηση της εργασίας.

Καθοριστική ήταν και η συμβολή των υπόλοιπων διδασκόντων του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Επιστήμη Πολυμερών και Εφαρμογές της στη Βιομηχανία», για τις πολύτιμες γνώσεις που αποκόμισα παρακολουθώντας το συγκεκριμένο πρόγραμμα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στον υποψήφιο διδάκτορα Δημήτρη Σελιανίτη, για την υπέροχη συνεργασία που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, το χρόνο που ανιδιοτελώς αφιέρωσε για να με κατευθύνει, τις συμβουλές και την υποστήριξή του.

Τέλος, αξίζει να αναφερθώ και στους υπόλοιπους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου, καθώς και στο υπόλοιπο ερευνητικό προσωπικό του Ινστιτούτου Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας, για την ηθική υποστήριξη και τη διασφάλιση ενός ευχάριστου κλίματος συνεργασίας.

Ένα θερμό ευχαριστώ και στην οικογένειά μου και στους ανθρώπους που με στήριξαν με την εμπιστοσύνη και τη συμπαράσταση που μου παρείχαν όλη αυτή την περίοδο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1° ΕΙΣΑΓΩΓΗ	18
1.1 Αμφίφιλα συμπολυμερή	18
1.1.1 Αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες.....	20
1.1.2 Αμφίφιλα στατιστικά (τυχαία) συμπολυμερή.....	20
1.2 Αυτο-οργάνωση αμφίφιλων συμπολυμερών	21
1.2.1 Αυτο-οργάνωση κατά συστάδες συμπολυμερών	21
1.2.2 Αυτο-οργάνωση στατιστικών συμπολυμερών.....	22
1.3 Παρασκευή διαλυμάτων μικκυλίων	23
1.4 Χαρακτηρισμός μικκυλίων	25
1.5 Αποκρίσιμα πολυμερή	26
1.5.1 Απόκριση σε pH.....	27
1.5.2 Απόκριση σε θερμοκρασία	27
1.5.3 Επίδραση ιοντικής ισχύος	29
1.6 Εγκλωβισμός φαρμάκων σε συσσωματώματα πολυμερικών συστημάτων	30
1.6.1 Κουρκουμίνη	31
1.7 Πολυμερισμός Αντιστρεπτής Προσθήκης – Μεταφοράς Αλυσίδας με Απόσπαση (RAFT)	32
1.7.1 Μηχανισμός RAFT	33
1.7.2 Έλεγχος μοριακού βάρους και κατάλληλη επιλογή CTA.....	35
1.8 Σκοπός της παρούσας εργασίας	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2° ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ	38
2.1 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών	38

2.2	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού	41
2.3	Φασματοσκοπία Υπερύθρου.....	43
2.4	Σκέδαση φωτός	46
2.4.1	Στατική σκέδαση φωτός	47
2.4.2	Δυναμική σκέδαση φωτός.....	50
2.5	Φασματοσκοπία Φθορισμού	52
2.6	Φασματοσκοπία Απορρόφησης Υπεριώδους – Ορατού.....	55
2.7	Ηλεκτροφορητική Σκέδαση Φωτός / ζ – δυναμικό	57
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3° ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	60
3.1	Υλικά και αντιδραστήρια.....	60
3.2	Οργανολογία και Μέθοδοι Χαρακτηρισμού.....	60
3.3	Σύνθεση P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA).....	63
3.4	Αυτο-οργάνωση των P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) σε υδατικά διαλύματα	64
3.5	Εγκλωβισμός κourκουμίνης στα συσσωματώματα των P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA).....	65
3.6	Μελέτη αλληλεπίδρασης με FBS.....	66
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4° ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	68
4.1	Σύνθεση συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA).....	68
4.2	Μοριακός χαρακτηρισμός.....	69
4.3	Μελέτη αυτο-οργάνωσης των συμπολυμερών σε υδατικά διαλύματα	74
4.3.1	Επίδραση pH και θερμοκρασίας	78
4.3.2	Επίδραση ιοντικής ισχύος	88
4.4	Εγκλωβισμός κourκουμίνης στα συσσωματώματα των P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) τριπολυμερών.....	90
4.5	Μελέτη αλληλεπίδρασης με FBS.....	105
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5° ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	108
	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	112

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Στάδια μηχανισμού πολυμερισμού RAFT	34
Σχήμα 1.2: Δομικά χαρακτηριστικά του τριθειοκαρβονυλθείο CTA και το ενδιάμεσο προϊόν που σχηματίζεται κατά την προσθήκη ριζών	36
Σχήμα 2.1: Διάγραμμα Jablonski	54
Σχήμα 4.1: Αντίδραση σύνθεσης των συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA)	69
Σχήμα 4.2: Διάγραμμα GPC για το TER-1 συμπολυμερές.....	70
Σχήμα 4.3: Φάσμα ¹ H-NMR για το TER-3 συμπολυμερές σε CDCl ₃	71
Σχήμα 4.4: Φάσμα ¹ H-NMR για το TER-5 συμπολυμερές σε CDCl ₃	71
Σχήμα 4.5: Φάσμα IR για το TER-1 συμπολυμερές.....	73
Σχήμα 4.6: Διαγράμματα CAC για το TER-2 συμπολυμερές σε PBS (αριστερά) και σε pH=10 (δεξιά)	75
Σχήμα 4.7: Διαγράμματα CAC για το συμπολυμερές TER-4 σε PBS (αριστερά) και σε pH=10 (δεξιά)	75
Σχήμα 4.8: Διαγράμματα CONTIN για το TER-1 συμπολυμερές στις διαφορετικές τιμές pH συναρτήσει της θερμοκρασίας	80
Σχήμα 4.9: Διαγράμματα έντασης σκεδάσεως (I) και υδροδυναμικής ακτίνας (R _h) συναρτήσει της θερμοκρασίας για το TER-1 συμπολυμερές	82
Σχήμα 4.10: Διαγράμματα CONTIN για το TER-3 συμπολυμερές στις διαφορετικές τιμές pH συναρτήσει της θερμοκρασίας	83
Σχήμα 4.11: Διαγράμματα έντασης σκεδάσεως (I) και υδροδυναμικής ακτίνας (R _h) συναρτήσει της θερμοκρασίας για το TER-3 συμπολυμερές	84
Σχήμα 4.12: Διάγραμμα ιοντικής ισχύος για το TER-4 συμπολυμερές.....	88
Σχήμα 4.13: Διάγραμμα ιοντικής ισχύος για το TER-5 συμπολυμερές.....	89
Σχήμα 4.14: Σχηματική αναπαράσταση εγκλωβισμού της κουρκουμίνης από τα πολυμερικά συσσωματώματα (πάνω) και οι δομές πολυμερούς (κάτω αριστερά) και κουρκουμίνης (κάτω δεξιά)	91

Σχήμα 4.15: Καμπύλη βαθμονόμησης κουρκουμίνης σε THF	93
Σχήμα 4.16: Διαγράμματα απορρόφησης UV-Vis για τα TER-1 (CUR) (αριστερά) και TER-2 (CUR) (δεξιά).....	94
Σχήμα 4.17: Διαγράμματα απορρόφησης UV-Vis για τα TER-3 (CUR) (αριστερά) και TER-5 (CUR) (δεξιά).....	95
Σχήμα 4.18: Διαγράμματα CONTIN για το TER-1 (CUR) (αριστερά) και το TER-2 (CUR) (δεξιά) σε πρωτόκολλο οργανικού διαλύτη	99
Σχήμα 4.19: Διαγράμματα CONTIN για το TER-3 (CUR) (αριστερά) και το TER-5 (CUR) (δεξιά) σε πρωτόκολλο οργανικού διαλύτη	99
Σχήμα 4.20: Διαγράμματα CONTIN για το TER-1 (CUR) (αριστερά) και το TER-2 (CUR) (δεξιά) σε πρωτόκολλο λεπτού υμενίου	101
Σχήμα 4.21: Διαγράμματα CONTIN για το TER-3 (CUR) (αριστερά) και το TER-5 (CUR) (δεξιά) σε πρωτόκολλο λεπτού υμενίου	101
Σχήμα 4.22: Διάγραμμα φθορισμού κουρκουμίνης σε THF στους 25°C.....	103
Σχήμα 4.23: Διαγράμματα φθορισμού των συμπολυμερών TER-3 (CUR) (αριστερά) και TER-5 (CUR) (δεξιά) συναρτήσει της θερμοκρασίας	103
Σχήμα 4.24: Διάγραμμα κατανομής μεγεθών για FBS από DLS.....	106
Σχήμα 4.25: Διαγράμματα CONTIN του TER-2 (CUR) συμπολυμερούς σε διαλύματα FBS:PBS (1:1) (αριστερά) και FBS:PBS (1:9) (αριστερά).....	106
Σχήμα 4.26: Διαγράμματα CONTIN του TER-5 (CUR) συμπολυμερούς σε διαλύματα FBS:PBS (1:1) (αριστερά) και FBS:PBS (1:9) (αριστερά).....	107

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Αριστερά: κατά συστάδες συμπολυμερές (πάνω), εμβολιασμένο συμπολυμερές (κάτω), Δεξιά: στατιστικό συμπολυμερές (πάνω), εναλλασσόμενο συμπολυμερές (κάτω).....	19
Εικόνα 1.2: Αυτο-οργάνωση σε μικκύλια ενός αμφίφιλου δισυσταδικού συμπολυμερούς	22
Εικόνα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση μετάπτωσης φάσης ανάλογα με την εξάρτηση από τη θερμοκρασία	28
Εικόνα 1.4: Αυτο-οργάνωση συσταδικού συμπολυμερούς και δέσμευση φαρμάκου.....	31
Εικόνα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση του διαχωρισμού με χρήση της χρωματογραφίας SEC	39
Εικόνα 2.2: Σχηματικό διάγραμμα συσκευής SEC	40
Εικόνα 2.3: Σχηματικό διάγραμμα NMR φασματοφωτομέτρου	43
Εικόνα 2.4: Σχηματική αναπαράσταση ATR	46
Εικόνα 2.5: Διάγραμμα Zimm.....	50
Εικόνα 2.6: Σχηματική αναπαράσταση διάταξης DLS (αριστερά), ενδεικτικά αποτελέσματα μέτρησης (δεξιά)	52
Εικόνα 2.7: Διάγραμμα φασματοσκοπίας UV-Vis	56
Εικόνα 2.8: Σχηματική αναπαράσταση μέτρησης ζ-δυναμικού	58
Εικόνα 4.1: Σταθερά διαλύματα τριπολυμερών – κουρκουμίνης	92
Εικόνα 4.2: Διάλυμα TER-4 τριπολυμερούς – κουρκουμίνης.....	92
Εικόνα 4.3: Διαλύματα TER-3 και TER-5 με κουρκουμίνη 20% w/w.....	94

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1: Πίνακας περιοχών φασματοσκοπίας IR	44
Πίνακας 4.1: Μοριακά χαρακτηριστικά συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA)	72
Πίνακας 4.2: Τιμές CAC και λόγοι I_1/I_3 για τα στατιστικά συμπολυμερή P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) στους 25 °C και 55°C	77
Πίνακας 4.3: Αποτελέσματα από DLS και ζ-δυναμικό για τα συσσωματώματα των στατιστικών συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) στους 25°C.....	86
Πίνακας 4.4: Αποτελέσματα από DLS για τα συσσωματώματα των στατιστικών συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) στους 55°C	87
Πίνακας 4.5: Αποτελέσματα υπολογισμού απόδοσης εγκλωβισμού της κουρκουμίνης για τα τριπολυμερή P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) σε πρωτόκολλο οργανικού διαλύτη.	96
Πίνακας 4.6: Αποτελέσματα υπολογισμού απόδοσης εγκλωβισμού της κουρκουμίνης για τα τριπολυμερή P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) σε πρωτόκολλο λεπτού υμενίου.	97
Πίνακας 4.7: Αποτελέσματα DLS την πρώτη και τη δέκατη μέρα από την παρασκευή των διαλυμάτων συμπολυμερούς – κουρκουμίνης.	98
Πίνακας 4.8: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων DLS πριν και μετά τον εγκλωβισμό της κουρκουμίνης στα τριπολυμερή P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) σε πρωτόκολλο οργανικού διαλύτη.	100
Πίνακας 4.9: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων DLS πριν και μετά τον εγκλωβισμό της κουρκουμίνης στα τριπολυμερή P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) σε πρωτόκολλο λεπτού υμενίου.	102

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία έχει ως αντικείμενο μελέτης τη σύνθεση αμφίφιλων στατιστικών συμπολυμερών με τη χρήση της τεχνικής πολυμερισμού RAFT, το μοριακό χαρακτηρισμό τους και τη μελέτη της αυτο-οργάνωσής τους σε υδατικά διαλύματα. Χωρίζεται σε πέντε επιμέρους κεφάλαια.

Στο πρώτο κεφάλαιο παρουσιάζονται βασικές πληροφορίες και έννοιες όσον αφορά τα αμφίφιλα συμπολυμερή, τις ιδιότητες αυτο-οργάνωσής τους σε υδατικά διαλύματα και τεχνικές που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό μικκυλίων και τον εγκλωβισμό φαρμακευτικών ουσιών στο εσωτερικό τους. Παράλληλα, περιγράφεται η μεθοδολογία του ελεγχόμενου/ζωντανού πολυμερισμού RAFT. Τέλος, παρουσιάζεται ο σκοπός της παρούσας εργασίας.

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

Στο τρίτο κεφάλαιο περιγράφεται η πειραματική διαδικασία που ακολουθήσαμε για την παρασκευή των συμπολυμερών και το χαρακτηρισμό τους, καθώς και για τον εγκλωβισμό φαρμάκου.

Ακολουθεί το τέταρτο κεφάλαιο με την παρουσίαση των αποτελεσμάτων και την αντίστοιχη ανάλυση/συζήτηση αυτών, παραθέτοντας ανάλογα διαγράμματα, πίνακες, σχήματα, εικόνες.

Στο πέμπτο και τελευταίο κεφάλαιο, παρουσιάζονται τα συμπεράσματα που προέκυψαν μέσω των πειραμάτων και την ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από αυτά.

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

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

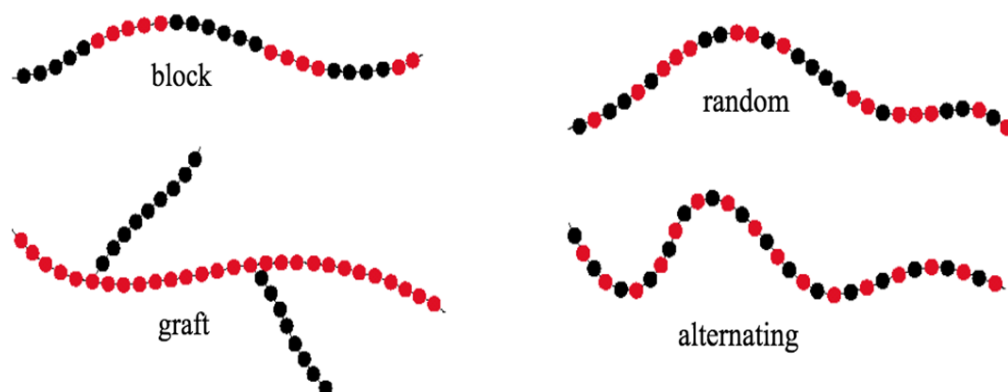
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αμφίφιλα συμπολυμερή^[1-5]

Ως πολυμερές ορίζεται ένα μακρομόριο, το οποίο αποτελείται από σειρά επαναλαμβανόμενων δομικών μονάδων, τα μονομερή, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με ομοιοπολικό δεσμό. Σημαντικά πολυμερή για τα οποία είναι υπεύθυνη η ίδια η φύση είναι το DNA, οι πρωτεΐνες, η κυτταρίνη κ.ά. Πολλά περισσότερα όμως, όπως το πολυστυρένιο, το πολυαιθυλένιο, τα πολυαμίδια, οι πολυεστέρες παράγονται μόνο μέσω συνθετικών διαδικασιών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, πολυμερή τα οποία προέρχονται από τη φύση μπορούν επίσης να παραχθούν συνθετικά.

Δυνατή είναι και η σύνθεση πολυμερών 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). Σε αυτή την περίπτωση, η πιθανότητα πρόσδεση μιας νέας μονομερικής μονάδας σε μια συγκεκριμένη θέση στο πολυμερές είναι ανεξάρτητη από τη φύση των ήδη προσδεδεμένων μονομερών. 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 μονομερικών ομάδων. Άλλες κατηγορίες συμπολυμερών είναι τα εμβολιασμένα συμπολυμερή, τα εναλλασσόμενα και τα αστεροειδή.



Εικόνα 1.1: Αριστερά: κατά συστάδες συμπολυμερές (πάνω), εμβολιασμένο συμπολυμερές (κάτω), Δεξιά: στατιστικό συμπολυμερές (πάνω), εναλλασσόμενο συμπολυμερές (κάτω)

Υπάρχουν και συμπολυμερή που αποτελούνται από μονομερικές μονάδες οι οποίες διαλύονται σε δύο είδη διαλυτών και ονομάζονται αμφίφιλα (amphiphilic copolymers < amphi: of both kinds, philic< having an affinity for). Την επιστημονική κοινότητα έχουν απασχολήσει έντονα τα αμφίφιλα συμπολυμερή με υδρόφιλα και υδρόφοβα μονομερή, λόγω των εξαιρετικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν, τόσο σε στερεή κατάσταση όσο και σε υδατικό διάλυμα. Η ασυμβατότητα των συστάδων μεταξύ τους έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενδιαφερουσών μορφολογιών, με πιο χαρακτηριστική την ιδιότητά τους να αυτο-οργανώνονται σε διάλυμα, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό οργανωμένων δομών, συνήθως μικκυλίων, ανάλογα με το διαλύτη στον οποίο είναι διαλυμένα.

1.1.1 Αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες^[4-6]

Τα αμφίφιλα κατά συστάδες συμπολυμερή (ABCs) έχουν μελετηθεί και χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε φαρμακευτικές εφαρμογές, από μελέτες μεταφοράς φαρμάκων έως και γονιδιακή θεραπεία. Το έντονο ενδιαφέρον για τα ABCs σε συστήματα μεταφοράς προκύπτει από τη μοναδική χημική τους σύσταση, η οποία χαρακτηρίζεται από μια λυόφιλη συστάδα άμεσα συνδεδεμένη με μια λυόφοβη. Η λυόφιλη συστάδα είναι αυτή που έρχεται σε επαφή με το διαλύτη. Σε αυτή την περίπτωση, το σύστημα υπόκειται σε μικροφασικό διαχωρισμό σαν αποτέλεσμα της οργάνωσης των αλυσίδων, με εκλεκτική διάλυση της ανάλογης συστάδας.

Όταν διαλύτης είναι το νερό, οι συστάδες καλούνται υδρόφιλες και υδρόφοβες, αντίστοιχα. Η ασυμβατότητα μεταξύ τους έχει σαν συνέπεια την αυτο-οργάνωση τους σε διαλύματα, σχηματίζοντας μικκύλια. Η μικκυλιοποίηση είναι αυτή στην οποία οφείλονται οι κολλοειδείς ιδιότητες των συστημάτων αυτών.

Γενικά, τα αμφίφιλα συμπολυμερή παρουσιάζουν πληθώρα εφαρμογών. Χρησιμοποιούνται ως γαλακτωματοποιητές, λόγω κολλοειδών ιδιοτήτων και ως τροποποιητές ιξώδους σε πολλές βιομηχανικές εφαρμογές. Ακόμα, μπορούν να υποκαταστήσουν επιφανειοδραστικά χαμηλού μοριακού βάρους ή να επεκτείνουν τις εφαρμογές επιφανειοδραστικών σε πολλά προβλήματα σταθεροποίησης ετεροφάσης, για παράδειγμα στη σταθεροποίηση χρωστικών ή και στη σύνθεση καλλυντικών και φαρμάκων. Αξίζει να αναφερθεί ότι, ακόμα και η ίδια η φύση για να λύσει προβλήματα σταθεροποίησης ετεροφάσης, χρησιμοποιεί πρακτικά πολυμερικά αμφίφιλα, όπως είναι οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες.

1.1.2 Αμφίφιλα στατιστικά (τυχαία) συμπολυμερή^[7-14]

Μέχρι πρόσφατα, έχει δοθεί μεγάλη έμφαση στην κατανόηση της αυτο-οργάνωσης των κατά συστάδες συμπολυμερών, λόγω της μοναδικής και εξαιρετικής συμπεριφοράς τους να αλλάζουν διαμόρφωση, ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Ωστόσο, η συνθετική τους πορεία μπορεί να είναι χρονοβόρα, καθώς περιλαμβάνει διαδοχικό, ελεγχόμενο πολυμερισμό

ή επεξεργασίες μετά το πέρας του, όπως εμβολιασμό, υποκατάσταση, υδρόλυση, αντιδράσεις «κλικ».

Συγκριτικά, λοιπόν, με τα κατά συστάδες συμπολυμερή, τα στατιστικά παρουσιάζουν πολύ πιο εύκολη συνθετική πορεία, αφού η σύνθεσή τους επιτυγχάνεται σε ένα στάδιο με συμπολυμερισμό δύο ή περισσότερων μονομερών, καθιστώντας τα ιδιαίτερα ελκυστικά σε βιομηχανικό επίπεδο. Ως εκ τούτου, αξίζει να μελετήσουμε τις ικανότητές τους ως προς την αυτο-οργάνωση.

Τα μικκύλια που σχηματίζουν τα στατιστικά συμπολυμερή μέσω αυτο-οργάνωσης σε έναν εκλεκτικό διαλύτη παρουσιάζουν επίσης πλεονεκτήματα, σε σύγκριση με τα μικκύλια των κατά συστάδες συμπολυμερών. Πιο συγκεκριμένα, μπορούν να επωφεληθούν από μια ασθενή αλληλεπίδραση, παράγοντας με αυτόν τον τρόπο περισσότερο δυναμικά αναστρέψιμες νανοδομές. Αντίθετα, οι δομές των κατά συστάδες μικκυλίων είναι συνήθως κινητικά «παγωμένες».

Τα στατιστικά συμπολυμερή μπορούν να συντεθούν είτε με μερική χημική τροποποίηση μιας συστάδας ομοπολυμερούς, είτε με συμπολυμερισμό, όπως αναφέρθηκε, μίγματος μονομερών. Το μειονέκτημα σε αυτή την περίπτωση είναι ο μικρός έλεγχος στα μακρομοριακά χαρακτηριστικά, όπως είναι το μοριακό βάρος και οι πιο πλατιές κατανομές που προκύπτουν. Ωστόσο, μέσω βελτιστοποίησης των μεθόδων «ζωντανού»/ελεγχόμενου ριζικού πολυμερισμού, έχει γίνει δυνατός ο έλεγχος των παραπάνω χαρακτηριστικών σε μεγάλο βαθμό.

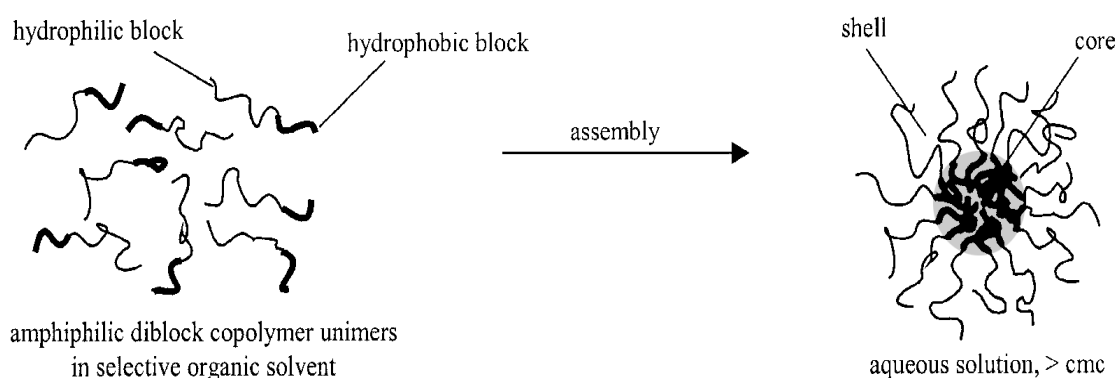
1.2 Αυτο-οργάνωση αμφίφιλων συμπολυμερών^[37-39]

1.2.1 Αυτο-οργάνωση κατά συστάδες συμπολυμερών^[2,4,4,15]

Σε διαλύτες στους οποίους παρουσιάζει προτίμηση η μία εκ των δύο συστάδων, σε αμφίφιλα συμπολυμερή, τα τελευταία σχηματίζουν καλά καθορισμένες δομές, τα μικκύλια. Αυτά διαθέτουν έναν πυρήνα, αποτελούμενο από μόρια μη διαλυτής συστάδας και από την κορώνα, την οποία δομεί η διαλυτή συστάδα, αποτρέποντας την καθίζηση των

συσσωματωμάτων και σταθεροποιώντας τα σχηματιζόμενα νανοσωματίδια. Επιπλέον, σφαιρικά και κυλινδρικά μικκύλια, καθώς και πιο περίπλοκες δομές, τα κυστίδια, έχουν περιγραφεί.

Όταν διαλύτης είναι το νερό, τα υδρόφοβα τμήματα είναι αυτά που συνιστούν τον πυρήνα και τα υδρόφιλα την κορώνα. 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. Η αυτοοργάνωση των αμφίφιλων συμπολυμερών προς το σχηματισμό μικκυλίων σε υδατικό διάλυμα έχει μελετηθεί λεπτομερώς και συνήθως πραγματοποιείται στην/ ή και πάνω από την κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση (CMC). Κατά τη μικκυλιοποίηση, τα υδρόφοβα τμήματα λειτουργούν ως «δοχεία» για τον εγκλωβισμό υδρόφοβων φαρμάκων.



Εικόνα 1.2: Αυτο-οργάνωση σε μικκύλια ενός αμφίφιλου δισυσταδικού συμπολυμερούς

1.2.2 Αυτο-οργάνωση στατιστικών συμπολυμερών^[7,16]

Στα στατιστικά συμπολυμερή, σε αντίθεση με τα προηγούμενα συστήματα, δεν υπάρχει διακριτή υδρόφιλη και υδρόφοβη συστάδα, αντίστοιχα. Συνεπώς, η αυτο-οργάνωσή τους εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την υδρόφιλη/υδρόφοβη ισορροπία όταν ως διαλύτης χρησιμοποιείται το νερό (αναφέρεται συχνά και ως υδρόφιλη/λιπόφιλη ισορροπία). Έτσι, οι μορφολογίες μπορεί να ποικίλουν πολύ, ανάλογα με την αναλογία υδρόφιλων

πλευρικών αλυσίδων προς υδρόφοβων ομάδων, καθώς και βάσει του μήκους των αλυσίδων.

Η αυτο-οργάνωση των πολυμερών αυτών βασίζεται, δηλαδή, σε ενδομοριακή αλλαγή της διαμόρφωσης της αλυσίδας τους (ενδομοριακή αναδίπλωση – intramolecular self-folding) δημιουργώντας μονομοριακά μικκύλια (unimer micelles), ενώ στα συσταδικά παρουσιάζονται πολυμοριακά μικκύλια.

Πιο αναλυτικά, όταν το υδρόφοβο ποσοστό είναι αρκετά μικρότερο από το υδρόφιλο, τότε τα στατιστικά συμπολυμερή αναδιπλώνονται ενδομοριακά, σχηματίζοντας μονομοριακά μικκύλια με υδρόφοβους πυρήνες. Αυτό συμβαίνει διότι, δεν μπορούν να ανταγωνιστούν τους δεσμούς υδρογόνου με το περιβάλλον νερό. Αντίθετα, αυξάνοντας το ποσοστό του υδρόφοβου μονομερούς, επιτυγχάνεται διαμοριακή αυτο-οργάνωση και σχηματίζονται με αυτόν τον τρόπο συσσωματώματα πολλαπλών αλυσίδων (multichain aggregates).

Για κάθε σύστημα στατιστικού συμπολυμερούς υπάρχει ένας συγκεκριμένος βαθμός πολυμερισμού που εξαρτάται από τη σύστασή του και θεωρείται ως κατώφλι (composition-dependent threshold degree of polymerization, DP_{th}). Στατιστικά συμπολυμερή με μικρότερο DP του DP_{th} αυτο-οργανώνονται διαμοριακά σχηματίζοντας συσσωματώματα, με το μέγεθος τους να αυξάνεται όσο αυξάνεται το υδρόφοβο ποσοστό. Λόγω της αλληλεξάρτησης του μοριακού βάρους από τη σύσταση των συμπολυμερών, στατιστικά συμπολυμερή με ευρεία κατανομή μοριακών βαρών αυτο-οργανώνονται σε νανο-συσσωματώματα εξαιτίας της ταυτόχρονης ενδομοριακής αναδίπλωσης των πολυμερικών αλυσίδων με DP μεγαλύτερο του DP_{th} και της διαμοριακής αυτο-οργάνωσης των πολυμερικών αλυσίδων με DP μικρότερο του DP_{th} .

1.3 Παρασκευή διαλυμάτων μικκυλίων^[6]

Δύο είναι οι γενικές μέθοδοι για την παρασκευή διαλυμάτων μικκυλίων, με την πρώτη να μη χρησιμοποιείται τόσο συχνά, λόγω μειονεκτημάτων που προκύπτουν.

Σύμφωνα με την πρώτη μέθοδο, λοιπόν, το στερεό πολυμερές διαλύεται απ' ευθείας σε έναν εκλεκτικό διαλύτη. Για την υποβοήθηση της διαλυτοποίησης το διάλυμα αναδεύεται για μεγάλο χρονικό διάστημα, θερμαίνεται ή υπόκειται σε κατεργασία εντός λουτρού υπερήχων. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται συνήθως σε συμπολυμερή με μικρό μοριακό βάρος και μικρή περιεκτικότητα στο αδιάλυτο συστατικό του συμπολυμερούς. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή δεν εξασφαλίζει απαραίτητα την ύπαρξη μικκυλιακών δομών ισορροπίας, ιδίως στην περίπτωση κατά την οποία η συστάδα του συμπολυμερούς που βρίσκεται στον πυρήνα του μικκυλίου χαρακτηρίζεται από μεγάλη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g). Στην περίπτωση αυτή, τα χαρακτηριστικά των μικκυλίων που θα ληφθούν αντανακλούν τη μορφολογία του συμπολυμερούς στη στερεά κατάσταση. Με άλλα λόγια, το διάλυμα θα είναι μια διασπορά σωματιδίων με μορφολογία όμοια με αυτή του αρχικού στερεού δείγματος, παρά μια πραγματική ισορροπία ανάμεσα στις ελεύθερες αλυσίδες συμπολυμερούς και των μικκυλίων.

Στη δεύτερη μέθοδο περιλαμβάνεται η διαλυτοποίηση του δείγματος σε κοινό καλό διαλύτη για όλες τις συστάδες του συμπολυμερούς. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται σχηματισμός των μικκυλίων με αλλαγή του pH του διαλύματος, με μεταβολή της θερμοκρασίας ή και με σταδιακή προσθήκη εκλεκτικού διαλύτη. Στην τελευταία περίπτωση θα πρέπει με κάποιο τρόπο να εκδιωχθεί ο κοινός καλός διαλύτης. Αυτό γίνεται είτε με εξάτμιση του διαλύτη, εφόσον αυτός είναι πτητικός και ο εκλεκτικός έχει σαφώς πολύ μεγαλύτερο σημείο ζέσεως. Ωστόσο, η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι αυτή της σταδιακής αντικατάστασης του καλού διαλύτη με τον εκλεκτικό με χρήση μεμβράνης διαπήδησης (dialysis). Μέσα στη μεμβράνη εγκλωβίζεται το διάλυμα του συμπολυμερούς στον καλό διαλύτη και τοποθετείται σε λουτρό που περιέχει μεγάλη περίσσεια εκλεκτικού διαλύτη. Σταδιακά, λόγω ώσμωσης, ο εκλεκτικός διαλύτης εισέρχεται δια μέσου των πόρων της μεμβράνης και αντικαθιστά τον καλό διαλύτη. Κατά διαστήματα ανανεώνεται το λουτρό με νέα ποσότητα καθαρού εκλεκτικού διαλύτη, έτσι ώστε να βρίσκεται πάντα σε περίσσεια σε σχέση με τον καλό διαλύτη που απομακρύνεται από το δείγμα συμπολυμερούς, με σκοπό να έχουμε ταχεία

και ποσοτική ανταλλαγή διαλυτών. Αυτή είναι και η προτιμώμενη διαδικασία όταν ως διαλύτης χρησιμοποιείται το νερό.

Ακόμα και με αυτή τη μέθοδο δεν μπορούμε να αποφύγουμε εξολοκλήρου το σχηματισμό «παγωμένων» και πολυμοριακών μικκυλιακών δομών, καθώς πάντα υπάρχει εξάρτηση από το μοριακό βάρος και τη σύσταση. Παρ' όλα αυτά, η μέθοδος αυτή μας εξασφαλίζει το σχηματισμό δομών ισορροπίας μικρότερου μεγέθους, όπως επίσης και τη σταθεροποίηση μικκυλιακών δομών από ασύμμετρα συμπολυμερή, δηλαδή συμπολυμερή με μεγάλο ποσοστό ως προς το αδιάλυτο συστατικό (crew-cut micelles). Διυσταδικά πολυμερή με μεγάλο μήκος διαλυτών συστάδων και μικρό μήκος αδιάλυτων συστάδων σχηματίζουν αστεροειδή μικκύλια (star-like micelles), ενώ στην αντίθετη περίπτωση τα σχηματιζόμενα μικκύλια αποτελούνται από μεγάλο πυρήνα και κοντή κορώνα (crew-cut micelles). Τέλος, εκτός από τη σφαιρική μορφολογία, η αυτο-οργάνωση των αμφίφιλων συμπολυμερών κατά συστάδες ενδέχεται να οδηγήσει στο σχηματισμό ραβδοειδών μικκυλίων (rod-like micelles) και κυστιδίων (vesicles).

1.4 Χαρακτηρισμός μικκυλίων^[6]

Τα χαρακτηριστικά μεγέθη και οι παράμετροι που μετρώνται μελετώντας τα φαινόμενα μικκυλίωσης περιλαμβάνουν τα ακόλουθα:

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

Τα παραπάνω, παρουσιάζουν εξάρτηση από πολλούς παράγοντες, όπως είναι η θερμοκρασία, η εκλεκτικότητα του διαλύτη, η σύσταση και η αρχιτεκτονική του συμπολυμερούς.

Ο βαθμός συσσωμάτωσης N_w επηρεάζεται σημαντικά από την αλλαγή της θερμοκρασίας. Σε χαμηλές θερμοκρασίες, η ισορροπία ευνοεί τα πολυμοριακά μικκύλια οδηγώντας σε αύξηση του N_w . Σε ενδιάμεσες θερμοκρασιακές τιμές, το μοριακό βάρος των μικκυλίων μειώνεται, καθώς και ο βαθμός συσσωμάτωσης, ενώ όσο αυξάνεται η θερμοκρασία σε υψηλότερες τιμές, η ισορροπία μετατοπίζεται προς τα μονομοριακά μικκύλια. Φυσικά, υπάρχουν και μικκύλια τα οποία παρουσιάζουν σταθερότητα σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, χωρίς να υφίστανται σημαντικές μεταβολές στα μοριακά και γεωμετρικά χαρακτηριστικά τους.

Οι διάφορες πειραματικές μέθοδοι χαρακτηρισμού περιγράφονται αναλυτικά στο επόμενο κεφάλαιο.

1.5 Αποκρίσιμα πολυμερή^[17,18]

Εκτός από τον αμφίφιλο χαρακτήρα που μπορεί να παρουσιάζουν τα συστήματα συμπολυμερών και τις ειδικές αλληλεπιδράσεις με υδρόφοβες ενώσεις (και άλλα αμφίφιλα), είναι δυνατό, με χρήση κατάλληλων μονομερών να αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα. Αυτά μπορεί να είναι η θερμοκρασία, το pH, καθώς και η ιοντική ισχύς.

Το κύριο πλεονέκτημα ενός συστήματος που αποκρίνεται σε ερεθίσματα για μια στρατηγική στόχευσης φαρμάκων, είναι η απόκριση σε ερέθισμα, μοναδικό σε μια παθολογία ασθένειας, επιτρέποντας στο σύστημα χορήγησης φαρμάκου ή και γονιδίου να αποκρίνεται ειδικά στα συγκεκριμένα παθολογικά ερεθίσματα.

Τέτοιου είδους «έξυπνοι» φορείς που βασίζονται σε αμφίφιλα συμπολυμερή, μπορούν να θεωρηθούν ως ενεργά συστήματα στόχευσης, αφού ενσωματώνουν φάρμακα, τα οποία απελευθερώνονται από τους φορείς ως απόκριση σε εξωτερικές ή περιβαλλοντικές αλλαγές.

Οι αποκρίσεις ποικίλουν και παρουσιάζονται ως μεταπτώσεις κολλοειδούς – πηκτώματος, μικκυλιοποίηση, συσσωμάτωση, διαλυτοποίηση, υδροδυναμική

αλλαγή όγκου, ακόμα και διάσπαση των επιμέρους συστάδων σε κατά συστάδες συμπολυμερή.

1.5.1 Απόκριση σε pH^[17-19]

Τα πολυμερή που περιέχουν αλκαλικές ή όξινες λειτουργικές ομάδες αποκρίνονται σε αλλαγές στο pH. Λόγω της παρουσίας όξινων καρβοξυλικών ομάδων ή βασικών αμινομάδων, αυτές οι δομές είναι ικανές να απελευθερώνουν ή να λαμβάνουν πρωτόνια, ως απόκριση στις διακυμάνσεις του pH.

Σε αντίθεση με τα όξινα, «έξυπνα» πολυμερή που ιονίζονται σε υψηλό pH, τα βασικά πολυμερή ιονίζονται σε χαμηλότερες τιμές pH. Για παράδειγμα, το πολυ(ακρυλικό οξύ) (PAA) ιονίζεται και διαλύεται σε υψηλό pH, ενώ ο πολυ(μεθακρυλικός διαιθυλάμινο αιθυλεστέρας) (PDEAEMA) ιονίζεται και διαλύεται σε χαμηλό pH, όμοια με τον πολυ(μεθακρυλικό διαμεθυλαμινο αιθυλεστέρα) (PDMAEMA).

Τα συμπολυμερή που είναι ευαίσθητα σε αλλαγές pH μπορεί να αποκρίνονται σε αλλαγές στο pH μέσω μιας μετάβασης διαλυτής – αδιάλυτης φάσης ή αλλαγές διόγκωσης – συρρίκνωσης. Παραδείγματα των πιο αποκρινόμενων στο pH πολυμερών περιλαμβάνουν: PAA, PMAA (πολυ(μεθακρυλικό οξύ)), πολυ(αιθυλενοϊμίνη), πολυ(L-ιστιδίνη), πολυ(L-λυσίνη), χιτοζάνη.

Χρήσιμη εφαρμογή τέτοιων πολυμερικών συστημάτων είναι η αντιμετώπιση καρκινικών κυττάρων – στόχων. Το pH σε αυτούς τους ιστούς κυμαίνεται από 6.5 – 7.2, οπότε μπορούμε να έχουμε εκλεκτική αποδέσμευση φαρμάκου και αντιμετώπιση των κυττάρων – στόχων.

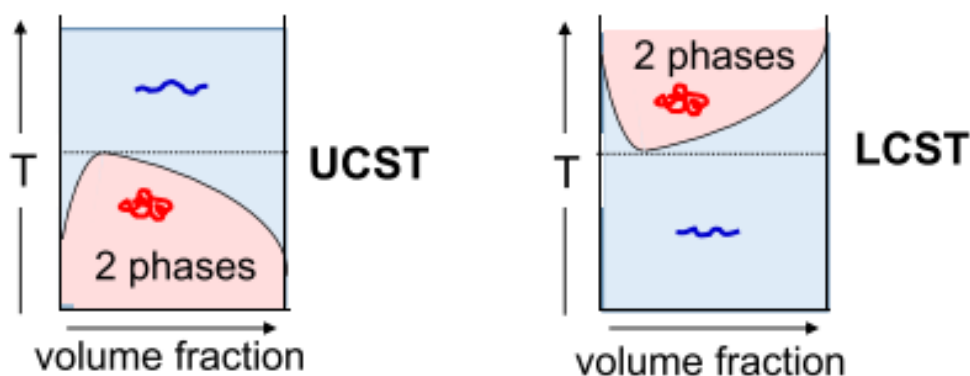
1.5.2 Απόκριση σε θερμοκρασία^[18-23]

Μια άλλη παράμετρος που είναι πιο εύκολο να ελεγχθεί, σε σχέση με το pH, είναι η θερμοκρασία. Τα θερμοαποκρινόμενα πολυμερή είναι ικανά να παρουσιάζουν μετάπτωση φάσης σε μια ορισμένη θερμοκρασία, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο σε αλλαγές στη διαμόρφωση, στη διαλυτότητα και στην υδρόφιλη/υδρόφοβη ισορροπία.

Τα πολυμερή που καταρρέουν και γίνονται αδιάλυτα σε υδατικό περιβάλλον κατά τη θέρμανση, έχουν τη λεγόμενη κατώτερη κρίσιμη θερμοκρασία

διαλύματος (LCST), ενώ τα πολυμερή που γίνονται διαλυτά κατά τη θέρμανση χαρακτηρίζονται από την ανώτερη κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος (UCST) (Εικόνα 1.3).

Για να περιγράψουμε την εξάρτηση από το LCST ή την αντίστροφη θερμοκρασία, σε χαμηλότερες θερμοκρασίες τα υδρόφιλα τμήματα ενός συμπολυμερούς και τα μόρια του νερού αλληλεπιδρούν με δεσμό υδρογόνου που οδηγεί σε μεγαλύτερη διάλυση. Καθώς, όμως, η θερμοκρασία αυξάνεται, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υδρόφοβων τμημάτων γίνονται κυρίαρχες και ισχυρότερες σε σύγκριση με τους δεσμούς υδρογόνου, οι οποίοι γίνονται πιο αδύναμοι, οδηγώντας σε συρρίκνωση των πολυμερών λόγω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αλυσίδων.



Εικόνα 1.3: Σχηματική αναπαράσταση μετάπτωσης φάσης ανάλογα με την εξάρτηση από τη θερμοκρασία

Σε κατά συστάδες συμπολυμερή, η θερμοευαισθησία και το LCST των νανοδομών μπορούν να ρυθμιστούν αλλάζοντας τη συγκέντρωση του υδατικού διαλύματος, τη σύνθεση των συμπολυμερών κ. ά. Για παράδειγμα, το LCST μειώνεται χρησιμοποιώντας περισσότερα υδρόφοβα μονομερή ή αυξάνοντας το μοριακό βάρος του πολυμερούς. Αντίθετα, αύξηση των υδρόφιλων μονομερών που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα θερμοευαίσθητα μονομερή θα οδηγήσει σε αύξηση του LCST.

Ένα από τα πιο σημαντικά μονομερή σε θερμοαποκρινόμενα συμπολυμερή είναι το πολυ(N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο) (PNIPAM) με $LCST=32^{\circ}C$, κοντά στην φυσιολογική ανθρώπινη θερμοκρασία των $37^{\circ}C$.

1.5.3 Επίδραση ιοντικής ισχύος^[24-27]

Μια ακόμη τυπική ιδιότητα των πολυμερών είναι η απόκριση στην ιοντική ισχύ, όταν πρόκειται για πολυμερή που περιέχουν ιοντικές ομάδες. Αλλαγές στην ιοντική ισχύ, σε συνδυασμό με μεταβολές στο pH, μπορεί να προκαλέσουν αλλαγές στο μέγεθος των πολυμερικών νανοσωματιδίων, στη διαλυτότητα και στην κινητική απόσβεσης φθορισμού χρωμοφόρων που είναι δεσμευμένες.

Οι πολυαμφολύτες περιέχουν ανιοντικά ή/και κατιοντικά φορτία κατά μήκος την πολυμερικής αλυσίδας και γι' αυτό το λόγο η συμπεριφορά τους σε διαλύματα εξαρτάται από την αναλογία των ιόντων που είναι ενσωματωμένα στο πολυμερές. Η αναλογία αυτή μπορεί να τροποποιηθεί, είτε μέσω συνθετικών πορειών είτε μέσω εξωγενών αλλαγών στο υδατικό περιβάλλον, συγκεκριμένα μεταβάλλοντας το pH. Η προσθήκη άλατος στο σύστημα πολυμερούς – διαλύτη μπορεί να επηρεάσει τη θέση μετάπτωσης φάσης. Η παρουσία αλάτων διαταράσσει τη δομή ενυδάτωσης γύρω από τις πολυμερικές αλυσίδες, με αποτέλεσμα τη μείωση της θερμοκρασίας διαχωρισμού φάσεων, επιφέροντας αλλαγές στη διαλυτότητα.

Η συμπεριφορά αυτή εξαρτάται από το είδος των ιόντων. Λόγω του ανταγωνισμού των πολυμερικών μορίων με τα ιόντα του άλατος για τα μόρια του νερού που απαιτούνται για την επιδιαιλύτωσή τους, η διαλυτότητα μειώνεται (φαινόμενο εξαλάτωσης – salting out). Σε αυξημένες συγκεντρώσεις αλάτων, τα μόρια του νερού που είναι διαθέσιμα για τη διαλυτοποίηση των πολυμερών δεν είναι αρκετά, καθώς η πλειονότητά τους συνδέεται ισχυρά με τα άλατα. Έτσι, οι αλληλεπιδράσεις πολυμερούς – πολυμερούς υπερτερούν των αλληλεπιδράσεων πολυμερούς – διαλύτη (νερό), οπότε σχηματίζονται συσσωματώματα και οδηγούμαστε ακόμα και σε καταβύθιση των πολυμερικών μορίων. Συγκεκριμένα, τα περισσότερα συστήματα που δρουν ως δέκτες πρωτονίων (κατιοντικοί πολυηλεκτρολύτες) σχηματίζουν συσσωματώματα όσο αυξάνεται η ιοντική ισχύς του διαλύματος.

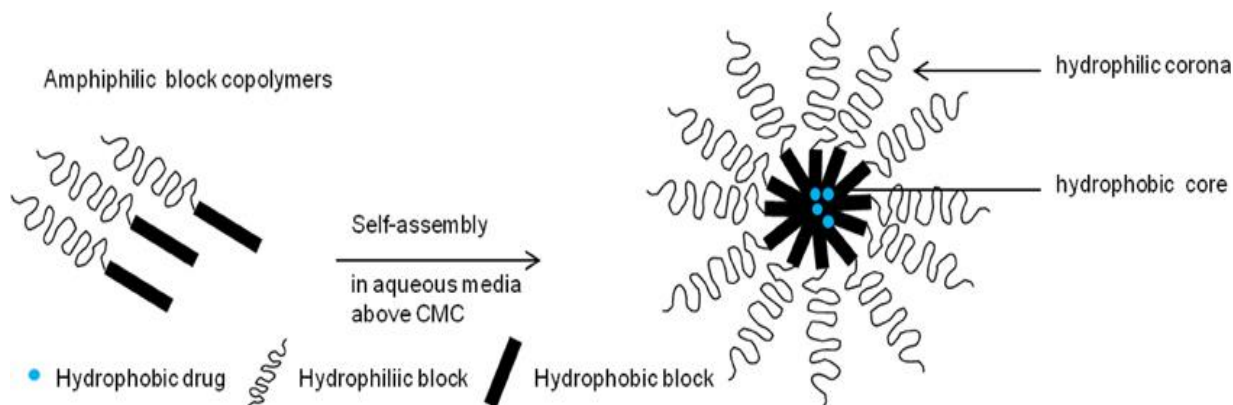
Σε πολλά συστήματα, όπως οι «ωσμωτικές βούρτσες», έχει αποδειχθεί ότι από μια ορισμένη τιμή ιοντικής ισχύος και πάνω τα συστήματα παρουσιάζουν

κατάρρευση. Αντίστοιχη συμπεριφορά παρουσιάζουν και ασθενή πολυοξέα ή πολυβάσεις (πολυαμίνες), όπου έχουμε φορτία τα οποία προκύπτουν μέσω μιας δυναμικής ισορροπίας οξέος – βάσης. Για παράδειγμα, σε συμπολυμερή με PDMAEMA ως συστατικό, σε χαμηλή ιοντική ισχύ οι αλυσίδες βρίσκονται πλήρως εκτεταμένες στο διάλυμα, ενώ με αύξηση της έχουμε αύξηση και του βαθμού συσσωμάτωσης με παράλληλη συρρίκνωση της κορώνας, αφού το διαλυμένο άλας «προστατεύει» από τις ηλεκτροστατικές απωθήσεις των αλυσίδων.

1.6 Εγκλωβισμός φαρμάκων σε συσσωματώματα πολυμερικών συστημάτων^[18,19,28]

Τα συμπολυμερή είναι μία από τις κατηγορίες των πολλά υποσχόμενων ουσιών για χρήση ως φορείς φαρμάκων και γονιδιακής θεραπείας. Μια μεγάλη κατηγορία νανοδομών, όπως πολυμερικά μικκύλια, πολυμεροσώματα και υδρογέλες έχουν ήδη μελετηθεί επιτυχώς ως συστήματα μεταφοράς. Ο πιο πρόσφατος τομέας ενδιαφέροντος είναι οι «έξυπνες» νανοδομές, οι οποίες επωφελούνται από τις ιδιότητες των αποκρινόμενων μονομερικών συστατικών των συμπολυμερών, δίνοντας με αυτόν τον τρόπο νέα στοχευμένα συστήματα χορήγησης φαρμάκων.

Τα υδρόφοβα φάρμακα, όπως είναι η κουρκουμίνη που θα αναλυθεί εκτενώς στην επόμενη υποενότητα, μπορούν να εγκλωβιστούν στον υδρόφοβο πυρήνα των νανοδομών και να μεταφερθούν σε συγκεντρώσεις που ξεπερνούν την εγγενή διαλυτότητά τους στο νερό. Τα αμφίφιλα κατά συστάδες συμπολυμερή ήταν τα πρώτα που παρουσίασαν αυτή την ικανότητα, δημιουργώντας διακριτές περιοχές σε μια δομή μικκυλίου μέσω αυθόρμητης αυτο-οργάνωσης, ως αποτέλεσμα υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων σε υδατικά διαλύματα. Ευρέως έχει χρησιμοποιηθεί το πολυαιθυλενοξειδίο (PEO/PEG) ως υδατοδιαλυτή, βιοσυμβατή και μη τοξική συστάδα.



Εικόνα 1.4: Αυτο-οργάνωση συσταδικού συμπολυμερούς και δέσμευση φαρμάκου

Μπορούν να εφαρμοστούν διαφορετικές διαδικασίες για τον εγκλωβισμό, οι οποίες εξαρτώνται τόσο από την επιλογή φαρμάκου και τις φυσικοχημικές ιδιότητές του, καθώς και από τα συμπολυμερή. Στα αμφίφιλα συμπολυμερή, τα οποία δεν είναι άμεσα διαλυτά στο νερό, γίνεται διάλυση σε οργανικό διαλύτη, κοινό για το φάρμακο και το πολυμερές. Ο μηχανισμός σχηματισμού των νανοδομών βασίζεται στη μέθοδο απομάκρυνσης του διαλύτη.

Για οργανικούς διαλύτες αναμίξιμους με το νερό, όπως είναι το THF, το DMF, το DMSO, το διάλυμα μπορεί να διαχωριστεί μέσω διαπήδησης (dialysis). Μέσω ημιπερατής μεμβράνης και καθώς απομακρύνεται η οργανική φάση, σχηματίζεται ο πυρήνας, μέσα στον οποίο εγκλωβίζεται το υδρόφοβο φάρμακο.

Εναλλακτική τεχνική περιλαμβάνει την αρχική διάλυση του πολυμερούς και του φαρμάκου σε κοινό, οργανικό διαλύτη και στη συνέχεια την εξάτμισή του με σκοπό το σχηματισμό της πολυμερικής μήτρας, μέσα στην οποία υπερισχύουν οι αλληλεπιδράσεις πολυμερούς – φαρμάκου. Προσθέτοντας νερό, επιτυγχάνεται ο τελικός εγκλωβισμός στους σχηματιζόμενους πυρήνες.

1.6.1 Κουρκουμίνη^[29-31]

Η κουρκουμίνη είναι μια χρωστική πολυφαινόλη που απομονώνεται από το φυτό *Curcuma Longa*, κοινώς γνωστό ως κουρκουμά, με ποικίλες

φαρμακολογικές εφαρμογές. Παρουσιάζει γενικά αυξημένη υδροφοβικότητα και σχετικά μικρή διαλυτότητα στο νερό.

Τα τελευταία χρόνια έχει μελετηθεί εκτενώς για τις αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές της, καθώς και για τη δράση της στην πρόληψη καρκίνου και τις χημειοθεραπευτικές ιδιότητές της. Η αντιοξειδωτική της ικανότητα παρουσιάζεται σε ουδέτερο και όξινο pH, ενώ οι μηχανισμοί δράσης της περιλαμβάνουν και την αναστολή πολλών οδών κυτταρικής σηματοδότησης. Παράλληλα, επιδρά σε κυτταρικά ένζυμα, όπως οι κυκλοοξυγενάσες (COX) που εμπλέκονται στη φλεγμονή και οι S-τρανσφεράσες της γλουταθειόνης. Τέλος, συμβάλει στην ανοσορρύθμιση και επιδρά στην αγγειογένεση και τα κύτταρα. Έχει δείξει αξιόλογη δράση στη γονιδιακή μεταγραφή, με αποτέλεσμα να είναι ιδιαίτερα σημαντική για την αντιμετώπιση του καρκίνου τη χημειοθεραπεία ασθενών, καθώς και στην αντιμετώπιση παθήσεων του γαστρεντερικού. Ευεργετική δράση έχει παρουσιάσει και σε παθήσεις των νεφρών, ενώ βελτιώνει τους συστηματικούς δείκτες του οξειδωτικού στρες.

Συνίσταται τόσο για τοπική χρήση, όσο και δια του στόματος. Ωστόσο, παρουσιάζει χαμηλή συστηματική βιοδιαθεσιμότητα μετά τη χορήγηση από το στόμα, περιορίζοντας την πρόσβαση σε επαρκείς συγκεντρώσεις για φαρμακολογική δράση σε ορισμένους ιστούς. Η δυνατότητα μεταφοράς της, συνεπώς, μέσω λιποσωμάτων ή πολυμερικών συστημάτων θα άνοιγε νέους δρόμους στη θεραπεία ασθενειών.

1.7 Πολυμερισμός Αντιστρεπτής Προσθήκης – Μεταφοράς Αλυσίδας με Απόσπαση (RAFT)^[32-36]

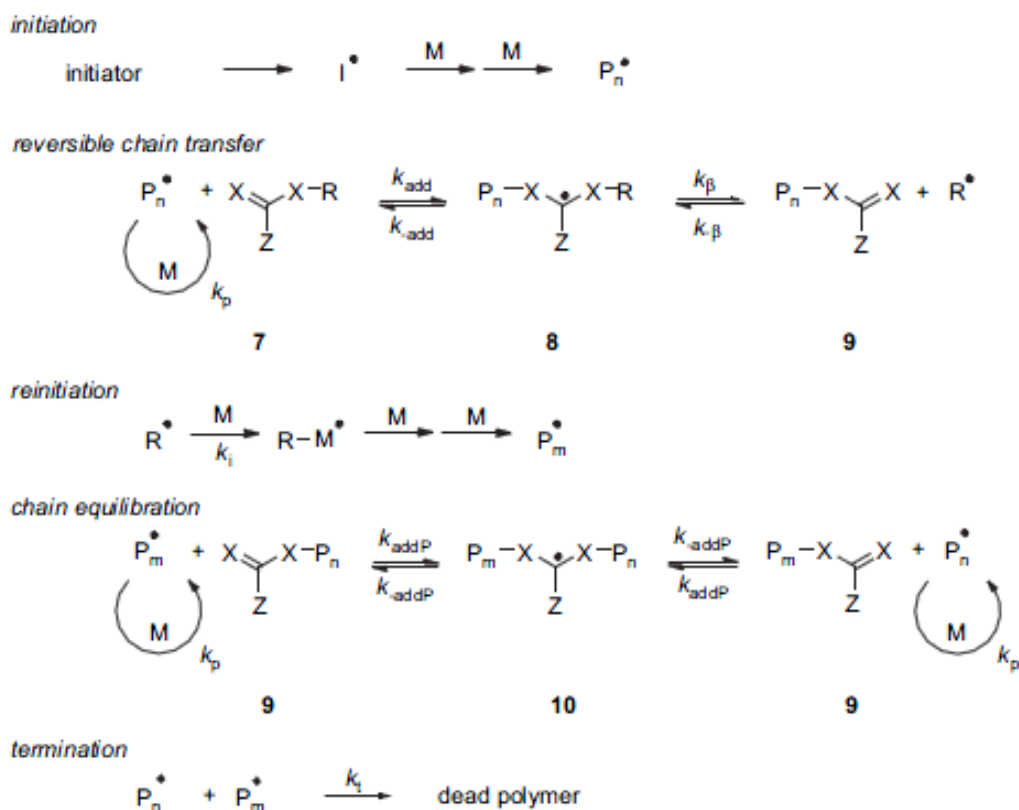
Οι πρώτες συνθετικές πορείες που βασίστηκαν στη λογική του RAFT ξεκίνησαν ήδη από το 1970, ενώ η πρώτη επίσημη αναφορά στον RAFT έγινε το 1998 και σήμερα αποτελεί μία από τις πιο ευέλικτες και ισχυρές τεχνικές πολυμερισμού για πολύπλοκες αρχιτεκτονικές. Είναι ευέλικτη μέθοδος για τη σύνθεση «ζωντανών» πολυμερών, προσδίδοντας έλεγχο του μοριακού βάρους, της κατανομής μοριακών βαρών, της σύνθεσης και της αρχιτεκτονικής. Είναι κατάλληλος για τα περισσότερα μονομερή που

πολυμερίζονται με ριζικό πολυμερισμό και παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε ένα αρκετά ευρύ φάσμα συνθηκών αντίδρασης. Σε σύγκριση με άλλες τεχνικές πολυμερισμού, όπως είναι ο ανιοντικός, μπορεί να πραγματοποιηθεί ακόμα και σε θερμοκρασία δωματίου, με διαλύτη νερό και χωρίς να είναι απαραίτητη η χρήση προστατευτικών ομάδων για τα επιμέρους μονομερή. Δίνει δυνατότητα για σύνθεση συμπολυμερών κατά συστάδες, αστεροειδών, κυκλικών πολυμερών, λειτουργικών πολυμερών κ.ά. Επιπλέον, η ενσωμάτωση λειτουργικών μονομερών και η επιλογή του κατάλληλου CTA (Chain Transfer Agent), επιτρέπει την εύκολη τροποποίηση των πλευρικών ή ακραίων ομάδων μετά το πέρας του πολυμερισμού.

1.7.1 Μηχανισμός RAFT

Ο πολυμερισμός RAFT, καθώς αποτελεί ένα είδος ριζικού πολυμερισμού, διαχωρίζεται σε τρία στάδια: έναρξη, διάδοση και τερματισμό, με μεγάλης σημασίας ένα ενδιάμεσο στάδιο, την προ-ισορροπία. Η έναρξη μπορεί να επιτευχθεί με χρήση κλασικών απαρχητών, όπως αζωενώσεις (AIBN), υπεροξειδία, οξειδοαναγωγικά συστήματα κ.ά. Συνήθως, η αναλογία CTA:απαρχητής είναι μεγαλύτερη της μονάδας, έτσι ώστε να διασφαλίζεται η έναρξη της πλειοψηφίας των αλυσίδων από θραύσματα CTA για καλύτερο έλεγχο του μοριακού βάρους.

Πιο αναλυτικά, όπως απεικονίζεται και στο σχήμα 1.1, μετά την ενεργοποίηση και την αντίδραση την αρχικής ρίζας $I\bullet$ με το μονομερές, που έχει ως αποτέλεσμα μία διαδιδόμενη ολιγομερική αλυσίδα ($P_n\bullet$), το CTA αντιδρά με την $P_n\bullet$ για να δώσει μια ενδιάμεση ρίζα. Αυτή η ενδιάμεση ρίζα, αν έχει γίνει σωστή επιλογή CTA, διασπάται και δημιουργείται ένα νέο είδος ρίζας $R\bullet$. 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 διαδιδόμενες αλυσίδες $P_m\bullet$ και διέπεται από τις τέσσερις σταθερές k_{add} , k_{-add} , k_β και $k_{-\beta}$. Σε μια αποτελεσματική διαδικασία, ο ρυθμός της ισορροπίας προσθήκης/απόσπασης είναι υψηλότερος από εκείνον της διάδοσης, επομένως θα πρέπει να προστίθεται λιγότερο από μία μονομερική μονάδα ανά κύκλο ενεργοποίησης.



Σχήμα 1.1: Στάδια μηχανισμού πολυμερισμού RAFT

Έτσι, όλες οι αλυσίδες θα έχουν παρόμοιο βαθμό πολυμερισμού (DP) σε μια δεδομένη στιγμή. Επιτυγχάνεται με αυτόν τον τρόπο ομοιόμορφη ανάπτυξη των αλυσίδων και στενές κατανομές και όλες οι αλυσίδες μπαίνουν στο στάδιο κυρίως ισορροπίας την ίδια στιγμή.

Τα βήματα μεταφοράς αλυσίδας που αποτελούν τη βάση του μηχανισμού RAFT είναι εκφυλισμένα, καθώς περιλαμβάνουν μια αναστρέψιμη μεταφορά της τελικής λειτουργικής αλυσίδας (συνήθως θειοκαρβονυλοθειο ομάδα (Z-C(=S)-S-R)) μεταξύ αδρανών αλυσίδων (macroCTA) και τις αναπτυσσόμενες ρίζες.

Η συνολική διαδικασία αποτελείται από την εισαγωγή μονομερών μεταξύ των ομάδων R- και Z-C(=S)-S-R ενός CTA, σχηματίζοντας την α- και ω- τελική ομάδα στην πλειονότητα των αλυσίδων που προκύπτουν. Επομένως, τα προϊόντα RAFT είναι αλυσίδες με ή χωρίς τη θειοκαρβονυλοθειο τελική ομάδα στο ω- άκρο (ζωντανές και αδρανείς αλυσίδες). Επίσης, υπάρχουν δύο τύποι

αλυσίδων ανάλογα με τη φύση της εκκίνησης (α- άκρο): αλυσίδες που ξεκινούν από την πηγή ριζών (θραύσμα απαρχητή) και αλυσίδες που ξεκινούν από την ομάδα R- του CTA.

Όπως σε όλες τις διαδικασίες ελευθέρων ριζών, αντιδράσεις τερματισμού λαμβάνουν χώρα εξαιτίας της σύζευξης των ελευθέρων ριζών και η δυσαναλογία μπορεί να συσχετιστεί άμεσα με την αρχική συγκέντρωση του απαρχητή. Όταν ο αρχικός τρόπος τερματισμού είναι διμοριακός συνδυασμός (bimolecular combination), ο αριθμός των νεκρών αλυσίδων δημιουργείται με το μισό των αλυσίδων να προέρχονται από τον απαρχητή. Στην περίπτωση όπου η δυσαναλογία (disproportionation) είναι ο κυρίαρχος τρόπος τερματισμού, ο αριθμός των νεκρών αλυσίδων δημιουργείται με το συνολικό αριθμό των αλυσίδων που προέρχονται από τον απαρχητή.

1.7.2 Έλεγχος μοριακού βάρους και κατάλληλη επιλογή CTA

Όπως ήδη έχει αναφερθεί και παραπάνω, δύο είναι τα πιο σημαντικά κριτήρια ώστε να υπάρχει έλεγχος του μοριακού βάρους σε έναν πολυμερισμό RAFT. 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 το μηχανισμό RAFT, οι πιθανές πηγές παραγωγής πολυμερικών αλυσίδων είναι δύο: τα θραύσματα απαρχητή και η αποχωρούσα ομάδα -R του CTA.

Έτσι, το θεωρητικό μέσο μοριακό βάρος κατ' αριθμό $\langle M_n \rangle$ μπορεί να προσδιοριστεί σύμφωνα με την εξίσωση:

$$M_{n,th} = \frac{[M]_0 M_{MW} \rho}{[CTA]_0 + 2f[I]_0(1 - e^{-k_d t})} + CTA_{MW} \quad (1.1)$$

Όπου $[M]_0$ η αρχική συγκέντρωση μονομερούς, M_{MW} το μοριακό βάρος του μονομερούς, ρ είναι η μετατροπή του μονομερούς, $[CTA]_0$ η αρχική συγκέντρωση του CTA, f η αποδοτικότητα του απαρχητή, $[I]_0$ η αρχική

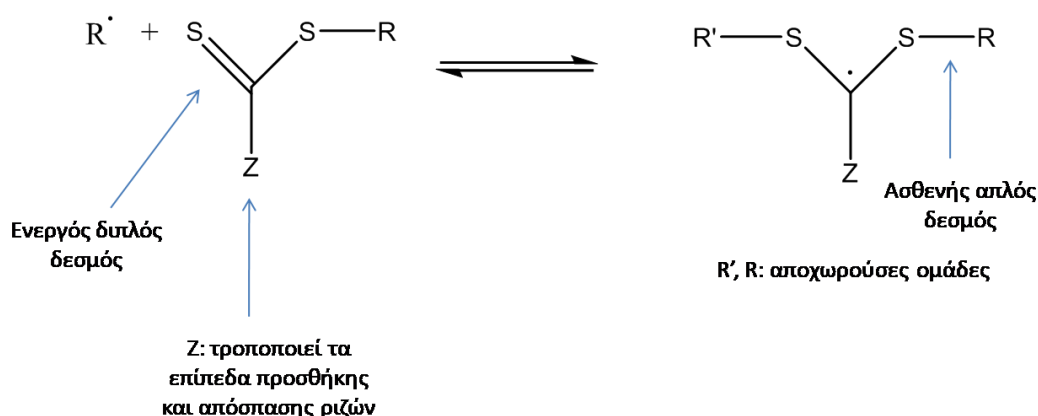
συγκέντρωση του απαρχητή, k_d η σταθερά ρυθμού αποσύνθεσης του απαρχητή και CTA_{MW} είναι το μοριακό βάρος του αντιδραστηρίου μεταφοράς.

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:

$$M_{n,th} = \frac{[M]_0 M_{MW} \rho}{[CTA]_0} + CTA_{MW} \quad (1.2)$$

Από αυτή τη σχέση, το μοριακό βάρος αυξάνεται γραμμικά με τη μετατροπή του μονομερούς, επιτρέποντας τη σύνθεση πολυμερών με προκαθορισμένο μοριακό βάρος και χαμηλές τιμές πολυδιασποράς.

Γενικά, το CTA αποτελείται από μια σταθεροποιητική ή αποσταθεροποιητική ομάδα $-Z$ και την ομάδα $-R$. Η επιλογή των δύο αυτών ομάδων και του μονομερούς δεν είναι αυθαίρετη, αλλά πρέπει να γίνει προσεκτικά ώστε να έχει επιτυχία ο πολυμερισμός.



Σχήμα 1.2: Δομικά χαρακτηριστικά του τριθειοκαρβονυλθείο CTA και το ενδιάμεσο προϊόν που σχηματίζεται κατά την προσθήκη ριζών

Για να επιτευχθούν όλα τα παραπάνω, είναι πολύ σημαντικό η ομάδα $-R$ να μπορεί εύκολα να αποσπαστεί και να επανεκκινήσει τον πολυμερισμό. Άρα,

χρειαζόμαστε ασθενή δεσμό S – R για να παραμείνει υψηλή η k_b . Επιπλέον, πρέπει να περιέχεται ένας ενεργός διπλός δεσμός C=S, ώστε η k_{add} να παραμένει επίσης υψηλή και οι ενδιάμεσες ρίζες να διασπώνται εύκολα. Τέλος, πρέπει οι ελεύθερες ρίζες που έχουν αποσπαστεί να είναι ικανές να επανεκκινήσουν τον πολυμερισμό, δηλαδή η k_i να είναι επαρκώς μεγαλύτερη από την k_p .

1.8 Σκοπός της παρούσας εργασίας

Πρωταρχικός στόχος της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η επιτυχής σύνθεση καινοτόμων αμφίφιλων στατιστικών συμπολυμερών, του τύπου πολυ(μεθακρυλικού εστέρα της διμεθυλοαμινοαιθανόλης – co – μεθακρυλικού εστέρα της δωδεκανόλης – co – μεθακρυλικού εστέρα της αιθυνογλυκόλης) (poly(2 – dimethylamino ethyl methacrylate – co – lauryl methacrylate – co – oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate), P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA).

Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε με ταυτόχρονη προσθήκη και των τριών μονομερών στο διάλυμα πολυμερισμού. Κάθε συμπολυμερές είχε διαφορετική σύσταση ως προς το κάθε μονομερές. Με την επίτευξη του πρωταρχικού στόχου, ακολούθησε η μελέτη αυτο-οργάνωσης των συμπολυμερών σε υδατικά διαλύματα, τα οποία παρουσιάζουν απόκριση σε μεταβολές pH, θερμοκρασίας και ιοντικής ισχύος. Ακολούθως, μελετήθηκε η δυνατότητα χρήσης των πολυμερικών συσσωματωμάτων ως φαρμακευτικών φορέων για τον εγκλωβισμό φαρμάκων, όπως η υδρόφοβη κουρκουμίνη.

Σε τελικό στάδιο έγινε και μελέτη αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες του ορού εμβρύου βοοειδούς (FBS).

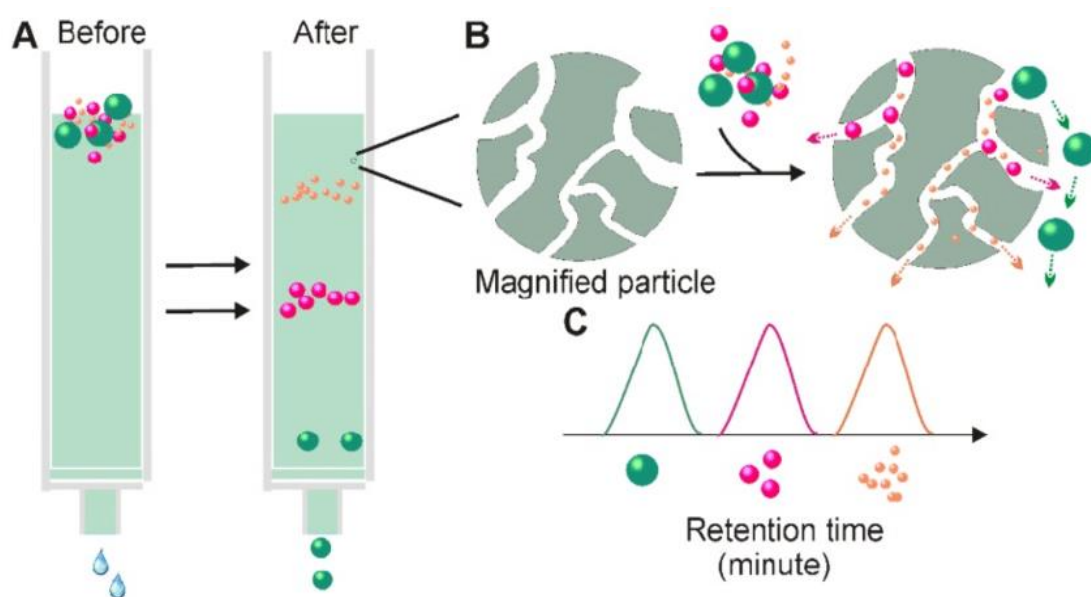
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2°

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ

2.1 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών^[40-44,52]

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (size exclusion chromatography, SEC) είναι μια πανίσχυρη τεχνική, ιδιαίτερα κατάλληλη για διαχωρισμούς ενώσεων μεγάλου μοριακού βάρους. Τα υλικά πλήρωσης αποτελούνται από μικρά (~ 10μm) σωματίδια πυριτίας ή πολυμερούς που περιέχουν ένα δίκτυο ομοιόμορφων πόρων, μέσω των οποίων διαχέονται μόρια διαλύτη και διαλυμένων σωματιδίων. Όσο βρίσκονται στους πόρους, τα μόρια είναι πρακτικώς παγιδευμένα και απομακρύνονται από τη ρέουσα κινητή φάση. Ο μέσος χρόνος παραμονής στους πόρους εξαρτάται από το πραγματικό μέγεθος των μορίων του αναλύτη. Μόρια, τα οποία είναι μεγαλύτερα από το μέσο μέγεθος των πόρων του υλικού πλήρωσης, δεν κατακρατούνται και εκλούνται πρώτα από τη στήλη. Μόρια με διάμετρο σημαντικά μικρότερη από τους πόρους μπορούν να διεισδύσουν ή να διαπεράσουν στο λαβυρινθώδες περιβάλλον τους κι έτσι παγιδεύονται για μεγαλύτερο χρόνο. Τα μόρια αυτά εκλούνται τελευταία από τη στήλη. Μεταξύ αυτών των δύο ακραίων περιπτώσεων υπάρχουν μόρια ενδιάμεσου μεγέθους, των οποίων ο μέσος όρος διείσδυσης στους πόρους του υλικού πλήρωσης της στήλης εξαρτάται από τη διάμετρό τους. Η ομάδα των μορίων αυτών υφίσταται κλασμάτωση, η οποία σχετίζεται άμεσα με το μέγεθος των μορίων και εν μέρει με το σχήμα τους. Σημειώνεται ότι δεν υπάρχει καμία αλληλεπίδραση μεταξύ αναλύτη και στατικής φάσης, καθώς καταβάλλεται κάθε προσπάθεια αποφυγής τέτοιων αλληλεπιδράσεων, επειδή οδηγούν σε μείωση της απόδοσης της στήλης. Επίσης, στη χρωματογραφία αυτού του τύπου υπάρχει ένα ανώτερο όριο χρόνου κατακράτησης, επειδή καμιά ουσία δεν παραμένει στη στήλη περισσότερο από αυτές που διαπερνούν πλήρως τους πόρους της στατικής φάσης.

Οι μέθοδοι αποκλεισμού μεγεθών υποδιαιρούνται σε χρωματογραφία διήθησης με πηκτή (gel filtration) και χρωματογραφία διέλευσης μέσω πηκτής (gel permeation). Σπουδαία εφαρμογή της μεθόδου είναι ο ταχύς προσδιορισμός του μοριακού βάρους και της κατανομής των μοριακών βαρών πολυμερών και φυσικών μεγαλομοριακών προϊόντων. Η επιτυχία των προσδιορισμών βασίζεται στην ακριβή βαθμονόμηση των μοριακών βαρών. Η βαθμονόμηση μπορεί να γίνει με πρότυπα γνωστού μοριακού βάρους ή με μια μέθοδο γενικής χρήσης. Στην τελευταία περίπτωση, η μέθοδος βασίζεται στην αρχή ότι το γινόμενο του εσωτερικού ιξώδους η και του μοριακού βάρους MB είναι ανάλογο προς τον υδροδυναμικό όγκο, V_h (δραστικό όγκο που περιλαμβάνει και το κέλυφος επιδιαλύτωσης). Στην ιδανική περίπτωση, ο διαχωρισμός των μορίων γίνεται με βάση τον υδροδυναμικό όγκο. Έτσι, η αποδεκτή καμπύλη αναφοράς μπορεί να χαραχθεί ως $\log(\eta \times MB)$ ως προς τον όγκο κατακράτησης V_R .



Εικόνα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση του διαχωρισμού με χρήση της χρωματογραφίας SEC

Ο τρόπος με τον οποίο διαχωρίζονται τα μόρια αναλόγως του μεγέθους τους φαίνεται στην Εικόνα 2.1. Όταν τα μόρια εξέλθουν της στήλης κατευθύνονται στον αναλυτή, ο οποίος μετρά τη συγκέντρωση του πολυμερούς ως συνάρτηση του χρόνου ή του όγκου έκλουσης (V_e).

Ο όγκος έκλουσης δίνεται από τις εξισώσεις 2.1.1 και 2.1.2. Για πολύ μεγάλα μόρια, τα οποία δεν εισέρχονται καθόλου στο εσωτερικό του πληρωτικού υλικού της στήλης, ισχύει η εξίσωση 2.1:

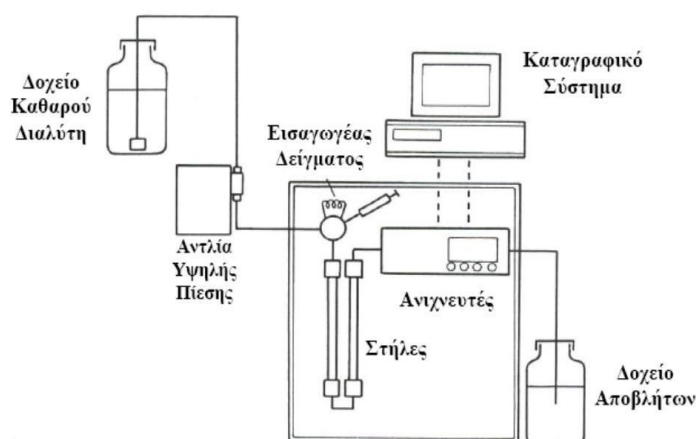
$$V_e = V_o \quad (2.1.1)$$

όπου V_o είναι ο λεγόμενος αποκλειόμενος όγκος, ο οποίος είναι ο συνολικός όγκος των διάκενων μεταξύ των σφαιρικών σωματιδίων της στήλης.

Για μικρότερα μόρια, τα οποία εισχωρούν στους πόρους του πληρωτικού υλικού της στήλης ισχύει η εξίσωση 2.2:

$$V_e = V_o + k_{sec}V_i \quad (2.1.2)$$

όπου V_i είναι ο συνολικός όγκος των πόρων και k_{SEC} είναι ο συντελεστής κατανομής του δείγματος μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού των πόρων (δηλαδή του όγκου των διάκενων μεταξύ των σωματιδίων).



Εικόνα 2.2: Σχηματικό διάγραμμα συσκευής SEC

Διάφοροι ανιχνευτές έχουν ανακαλυφθεί για τη συνεχή παρακολούθηση των μορίων που εκλούνται. Αυτοί μπορούν να χωριστούν στις εξής κατηγορίες:

1. Ανιχνευτές μάζας (διαφορικό διαθλασίμετρο, πυκνόμετρο)

2. Ειδικοί ανιχνευτές (ανιχνευτές απορρόφησης)
3. Ανιχνευτές ευαίσθητοι σε μοριακή μάζα (φωτόμετρο σκέδασης φωτός λέιζερ σε μικρές γωνίες)
4. Ανιχνευτής ιζώδους

2.2 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού^[41]

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance, NMR) βασίζεται στη μέτρηση απορρόφησης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων, από 4 – 900 MHz. Σε αντίθεση με την απορρόφηση υπεριώδους, ορατής και υπέρυθρης ακτινοβολίας, σε αυτή την περίπτωση μετέχουν οι πυρήνες των ατόμων και όχι τα ηλεκτρόνια. Επιπλέον, για τη δημιουργία των πυρηνικών ενεργειακών καταστάσεων που απαιτούνται για να υπάρξει απορρόφηση, είναι απαραίτητη η τοποθέτηση του αναλύτη εντός ισχυρού μαγνητικού πεδίου.

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. Αποτελεί ένα από τα αποτελεσματικότερα εργαλεία που διαθέτει ένας χημικός ή βιοχημικός για τον προσδιορισμό της δομής χημικών ουσιών, καθώς επίσης και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων που απορροφούν.

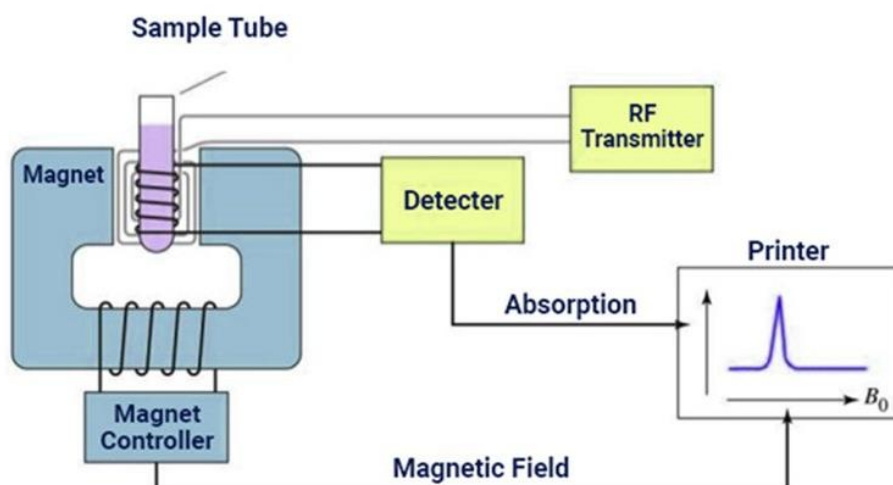
Η θεωρητική βάση για τη φασματοσκοπία NMR παρουσιάσθηκε από τον W. Pauli (1924), ο οποίος πρότεινε ότι ορισμένοι ατομικοί πυρήνες θα πρέπει να έχουν ιδιότητες αυτοστροφορμής (spin) και μαγνητικής ροπής και συνεπώς η έκθεσή τους σε μαγνητικό πεδίο θα οδηγούσε σε διαχωρισμό των ενεργειακών τους επιπέδων. Οι υποθέσεις αυτές αργότερα επιβεβαιώθηκαν και πειραματικά. Οι Felix Bloch, στο Stanford και ο Edward Purcell στο Harvard, εργαζόμενοι ανεξάρτητα, έδειξαν ότι οι πυρήνες απορροφούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία όταν βρίσκονται εντός ισχυρού μαγνητικού πεδίου, ως συνέπεια του μαγνητικώς επαγόμενου διαχωρισμού των ενεργειακών επιπέδων τους.

Περισσότερα από 200 ισότοπα έχουν μαγνητικές ροπές και μπορούν να μελετηθούν με NMR, όπως ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P , με το υδρογόνο και τον άνθρακα να αποτελούν τα πιο χρήσιμα, αφού είναι τα κύρια συστατικά των οργανικών ενώσεων.

Σήμερα, χρησιμοποιούνται δύο τύποι οργάνων NMR: τα φασματομέτρα συνεχούς κύματος (continuous wave, CW) και τα παλμικά (pulsed) ή φασματομέτρα μετασχηματισμού Fourier (FT-NMR). Και στα δύο είδη οργάνων το δείγμα τοποθετείται εντός ισχυρού μαγνητικού πεδίου, το οποίο έχει ένταση αρκετών tesla. Σε μερικά όργανα, η συχνότητα της πηγής διατηρείται σταθερή, ενώ μεταβάλλεται η ένταση του πεδίου. Στα παλμικά όργανα το δείγμα ακτινοβολείται με περιοδικούς παλμούς ενέργειας στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων (RF), οι οποίοι κατευθύνονται μέσα στα δείγματα, σε διεύθυνση κάθετη στο μαγνητικό πεδίο. Αυτοί οι παλμοί προκαλούν αποσβενόμενο σήμα στο χρονικό διάστημα μεταξύ των παλμών. Στη συνέχεια, με μετασχηματισμό Fourier, το σήμα παρέχει φάσμα όμοιο με αυτό που λαμβάνεται με όργανο συνεχούς κύματος (ένταση ως προς συχνότητα).

Ο απλούστερος τύπος φασματομέτρου NMR αποτελείται από τέσσερα μέρη:

- i. Έναν σταθερό μαγνήτη με ευαίσθητο ελεγκτή, για την παραγωγή μαγνητικού πεδίου ακριβείας.
- ii. Μια γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων (RF), η οποία εκπέμπει σε σταθερή συχνότητα.
- iii. Έναν ανιχνευτή για την μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος, ενέργειας RF.
- iv. Έναν καταγραφέα/υπολογιστή για τη σχεδίαση του γραφήματος των ευρημάτων του ανιχνευτή συναρτήσει του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου.



Εικόνα 2.3: Σχηματικό διάγραμμα NMR φασματοφωτομέτρου

Ο καταγραφέας καταγράφει το γράφημα της απορρόφησης (άξονας y) σε σχέση με το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο (άξονας x). Οι μεγαλύτερες τιμές του μαγνητικού πεδίου εντοπίζονται προς τα δεξιά, δηλαδή προς την πλευρά υψηλού πεδίου (*upfield*), ενώ οι μικρότερες προς τα αριστερά, προς την πλευρά χαμηλού πεδίου (*downfield*). Οι απορροφήσεις των περισσότερο προστατευμένων πρωτονίων εμφανίζονται προς το υψηλότερο πεδίο, ενώ των περισσότερο αποπροστατευμένων, προς το χαμηλότερο πεδίο.

2.3 Φασματοσκοπία Υπερύθρου^[41,53]

Η υπέρυθη ακτινοβολία του φάσματος (IR) περιλαμβάνει ακτινοβολίες των οποίων οι κυματαριθμοί κυμαίνονται από $12800 - 10 \text{ cm}^{-1}$ ή τα μήκη κύματός τους από $0.78 - 1000 \mu\text{m}$. Από την πλευρά τόσο των εφαρμογών όσο και της οργανολογίας, το φάσμα υπερύθρου χωρίζεται σε εγγύς, μέσο και άπω υπέρυθρο. Οι τεχνικές και οι εφαρμογές των μεθόδων που στηρίζονται στις τρεις φασματικές περιοχές IR διαφέρουν σημαντικά.

Τα φάσματα απορρόφησης, εκπομπής και ανάκλασης υπερύθρου των διαφόρων ουσιών μπορούν να ερμηνευτούν θεωρώντας ότι οφείλονται σε μια ποικιλία ενεργειακών μεταβολών. Οι μεταβολές αυτές είναι αποτέλεσμα

μεταπτώσεων των μορίων από μια δονητική ή μια περιστροφική ενεργειακή κατάσταση σε μια άλλη.

Πίνακας 2.1: Πίνακας περιοχών φασματοσκοπίας IR

Περιοχή	Περιοχή μήκους κύματος (λ), μm	Περιοχή κυματαριθμών (ν), cm ⁻¹
Εγγύς (near)	0.78 – 2.5	12800 – 4000
Μέση (middle)	2.5 – 50	4000 – 200
Άπω (far)	50 – 1000	200 – 10
Περισσότερο χρησιμοποιούμενη	2.5 – 15	4000 – 670

Πιο αναλυτικά, όταν μια ποσότητα ύλης ακτινοβολείται με υπέρυθρη 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 συμπέσει με την συχνότητα δόνησης των ατόμων του δεσμού. Οι συχνότητες με τις οποίες δονούνται τα άτομα στο μόριο εξαρτώνται 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 τη διάρκεια της δόνησης, διαφορετικά η δόνηση θεωρείται ανενεργή στο IR.

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 δονήσεις κάμψης.

- 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 τα άτομα πλησιάζουν ή απομακρύνονται

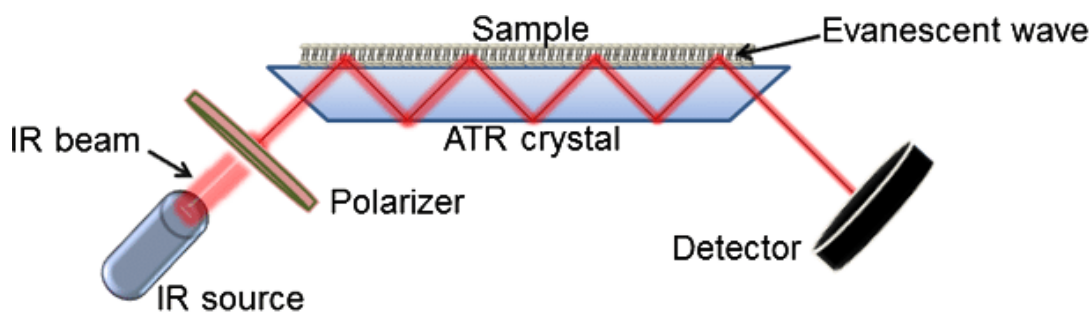
συγχρόνως και η αντισυμμετρική, όπου το ένα άτομο πλησιάζει όταν το άλλο απομακρύνεται.

- Δονήσεις κάμψης: μόρια με περισσότερα από δύο άτομα σχηματίζουν γωνίες δεσμών 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 στο IR.

Στην περίπτωση των πολυμερών βρίσκει μεγάλη εφαρμογή η τεχνική εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance, ATR), η οποία χρησιμοποιείται για δύσκολα στο χειρισμό δείγματα, όπως στερεά μικρής διαλυτότητας, λεπτά υμένια, ίνες, πάστες, κolloειδή και σκόνες. 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 μία κρίσιμη γωνία η ανάκλαση γίνεται ολική. Έχει αποδειχθεί θεωρητικά και πειραματικά ότι κατά την ανάκλαση η δέσμη στην πραγματικότητα συμπεριφέρεται σα να διεισδύει σε μικρό βάθος στο αραιότερο μέσο πριν συμβεί η ανάκλαση. Το βάθος αυτό κυμαίνεται από κλάσμα του μήκους κύματος μέχρι αρκετά μήκη κύματος, εξαρτάται από το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, το δείκτη διάθλασης των δύο υλικών και τη γωνία που σχηματίζει η προσπίπτουσα δέσμη με τη διεπιφάνεια των δύο υλικών. Η ακτινοβολία που διεισδύει καλείται *αποσβενόμενο κύμα* (evanescent wave). Εάν το αραιότερο μέσο απορροφά την αποσβενόμενη ακτινοβολία, η δέσμη εξασθενεί στα μήκη κύματος των ζωνών απορρόφησης. Το φαινόμενο αυτό καλείται *εξασθενημένη ολική ανάκλαση* (attenuated total reflectance, ATR). Το προκύπτον φάσμα ATR παρομοιάζει με αυτό του συμβατικού IR, με μερικές όμως διαφορές.

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.



Εικόνα 2.4: Σχηματική αναπαράσταση ATR

Πλεονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι τα φάσματα απορρόφησης μιας μεγάλης ποικιλίας δειγμάτων λαμβάνονται άμεσα και με ελάχιστη προετοιμασία, με πίεση άμεσα πάνω στον στερεό κρύσταλλο.

2.4 Σκέδαση φωτός^[41-45,56]

Η σκέδαση του φωτός είναι μια βασική πειραματική τεχνική στην επιστήμη πολυμερών που μας παρέχει σημαντικές πληροφορίες αναφορικά με τις στατικές, υδροδυναμικές και θερμοδυναμικές ιδιότητες των πολυμερικών μορίων στο διάλυμα. Αρχικά, εξασφαλίζει άμεση, απόλυτη μέτρηση του κατά βάρος μέσου μοριακού βάρους, M_w . Δίνει πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις πολυμερούς – πολυμερούς και πολυμερούς – διαλύτη, μέσου του δεύτερου συντελεστή virial, A_2 . Επιπλέον, η σκέδαση φωτός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό της γυροσκοπικής ακτίνας, R_g (στατική σκέδαση φωτός) χωρίς καμία προηγούμενη γνώση για τη μορφή του μορίου (δηλαδή αν είναι σπείρωμα, ράβδος ή σφαιρίδιο), καθώς και της υδροδυναμικής ακτίνας R_h (δυναμική σκέδαση φωτός).

Οι πρώτες προσπάθειες για συστηματική μελέτη της σκέδασης φωτός από διαλύματα έγιναν από τον M. Faraday τον 19^ο αιώνα κατά τη μελέτη των κολλοειδών διασπορών του χρυσού. Οι μελέτες συνεχίστηκαν από τον Tyndall, ενώ η θεμελίωση της θεωρίας της σκέδασης του φωτός από μικρά σωματίδια, σε σχέση με το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας,

έγινε από το Λόρδο Rayleigh το 1871 κατά τη μελέτη αερίων στην προσπάθειά του να απαντήσει το απλό ερώτημα «γιατί ο ουρανός είναι γαλανός;».

Το φως είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, παραγόμενη από την αλληλεπίδραση ενός ηλεκτρικού και ενός μαγνητικού πεδίου κάθετων μεταξύ τους κατά τη διεύθυνση διάδοσης. Όταν δέσμη φωτός προσπέσει σε άτομα ή μόρια, τα ηλεκτρόνια διαταράσσονται ή μετατοπίζονται και δονούνται περί τις θέσεις ισορροπίας με την ίδια συχνότητα, όπως και η προσπίπτουσα ακτινοβολία. Η διαταραχή αυτή επάγει μεταβατική πολωσιμότητα στα άτομα ή τα μόρια, τα οποία συμπεριφέρονται με τη σειρά τους ως δευτερογενείς πηγές φωτός, επανεκπέμποντας την προσροφημένη ενέργεια προς όλες τις κατευθύνσεις, δηλαδή λαμβάνει χώρα σκέδαση (διασκορπισμός) του φωτός.

Στην περίπτωση των διαλυμάτων μακρομορίων το ποσοστό της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι πολύ μεγαλύτερο από εκείνο των διαλυμάτων πιο μικρών μορίων.

Η όλη τεχνική της σκέδασης βασίζεται στη μέτρηση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από το διάλυμα σε διάφορες κατευθύνσεις, σε σχέση με την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Είναι γενικά 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 δύο μειονεκτήματα: το δείγμα/διάλυμα θα πρέπει να μην έχει καθόλου σκόνη, γιατί τα σωματίδια σκόνης αποτελούν και αυτά με τη σειρά τους κέντρα σκέδασης και δε θα πρέπει να είναι πολύ πυκνό για να μην γίνεται πολλαπλή σκέδαση.

2.4.1 Στατική σκέδαση φωτός

Στην στατική σκέδασης φωτός (Static Light Scattering, SLS), η μέση χρονική τιμή της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, μετράται συναρτήσει της γωνίας σκέδασης θ και της συγκέντρωσης του διαλύματος c και εκφράζεται μέσω του λόγου Rayleigh, R_θ , ο οποίος ορίζεται ως:

$$R_\theta = \frac{d^2 I_s}{V f I_o} \quad (2.4.1.1)$$

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 (λόγω κίνησης Brown). Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, η συνεισφορά των διακυμάνσεων συγκέντρωσης στη σκέδαση εκφράζεται μέσω της σχέσης:

$$\Delta R_\theta = R_{\theta (\text{διαλύματος})} - R_{\theta (\text{διαλύτη})} \quad (2.4.1.2)$$

Όπως φαίνεται στη σχέση (2.4.1.1), ο λόγος R_θ εξαρτάται από τη γεωμετρία της πειραματικής διάταξης. Για το λόγο αυτό στην πράξη υπολογίζεται ο απόλυτος λόγος R_θ , ο οποίος κανονικοποιείται ως προς πρότυπους διαλύτες όπως το τολουόλιο, ως εξής:

$$R_\theta = R_T \frac{n_o^2 I_S}{n_T^2 I_{S,T}} \quad (2.4.1.3)$$

όπου R_T ο λόγος Rayleigh του τολουολίου, n_o 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 ΔR_θ συνδέεται με τα μοριακά χαρακτηριστικά του πολυμερούς και τις θερμοδυναμικές ιδιότητες του διαλύματος μέσω της εξίσωσης Zimm:

$$\frac{K_c}{\Delta R_\theta} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{1}{3} R_g^2 q^2 \right) + 2A_2 C \quad (2.4.1.4)$$

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 οποίο ορίζεται ως:

$$q = \frac{4\pi n_o}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2.4.1.5)$$

όπου λ το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

Η σταθερά K δίνεται από τη σχέση:

$$K = \frac{4\pi^2 n_o^2}{\lambda^4 N_A} \left(\frac{\partial n}{\partial c} \right)^2 \quad (2.4.1.6)$$

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

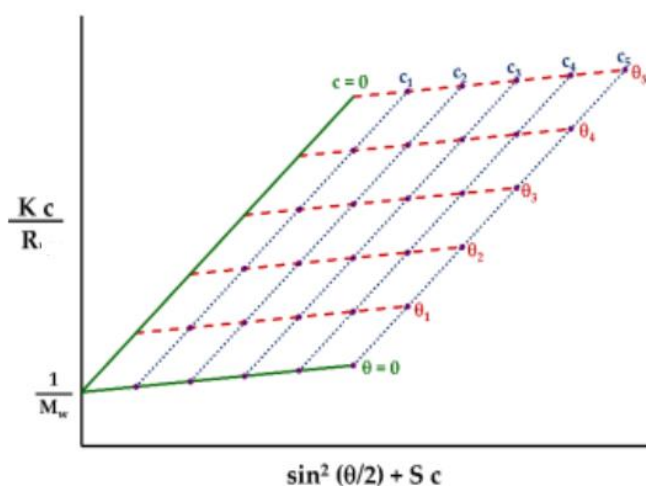
Μέσω της εξίσωσης (2.4.1.4) και για μετρήσεις σε πολλαπλές γωνίες θ και συγκεντρώσεις c , προκύπτει το διάγραμμα Zimm. Από το διάγραμμα αυτό με διπλή προέκταση των μετρούμενων τιμών του λόγου $K_c / \Delta R_\theta$ σε μηδενική γωνία σκέδασης και μηδενική συγκέντρωση, εξάγεται το μοριακό βάρος M_w ως 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.

Όπως φαίνεται από τη σχέση (2.4.1.4), 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 συστατικά, τα οποία δεν παρουσιάζουν ειδική αλληλεπίδραση

μεταξύ τους, ο διαφορικός δείκτης διάθλασης του διαλύματος $(\partial n/\partial c)_{ολικό}$ μπορεί να υπολογιστεί ως ο σταθμισμένος μέσος όρος των διαφορικών δεικτών διάθλασης $(\partial n/\partial c)_1$ και $(\partial n/\partial c)_2$ των επιμέρους συστατικών, ως εξής:

$$\left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)_{ολικό} = w_1 \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)_1 + w_2 \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)_2 \quad (2.4.1.7)$$

όπου w_1 και w_2 τα κλάσματα βάρους των δύο συστατικών.



Εικόνα 2.5: Διάγραμμα Zimm

2.4.2 Δυναμική σκέδαση φωτός

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 να μεταβάλλεται με τον χρόνο. Η μεταβολή της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε σχέση με το χρόνο περιγράφεται από μία χρονική συνάρτηση

αυτοσυσχέτισης. Γενικά, μια συνάρτηση αυτοσυσχέτισης μεταξύ δύο σφαιρικών σωμάτων που δεν αλληλεπιδρούν έχει τη μορφή:

$$G_{2(t)} = \langle I_{(0)}I_{(t)} \rangle = A + Be^{-\Gamma t} = A + Be^{Dq^2t} \quad (2.4.2.1)$$

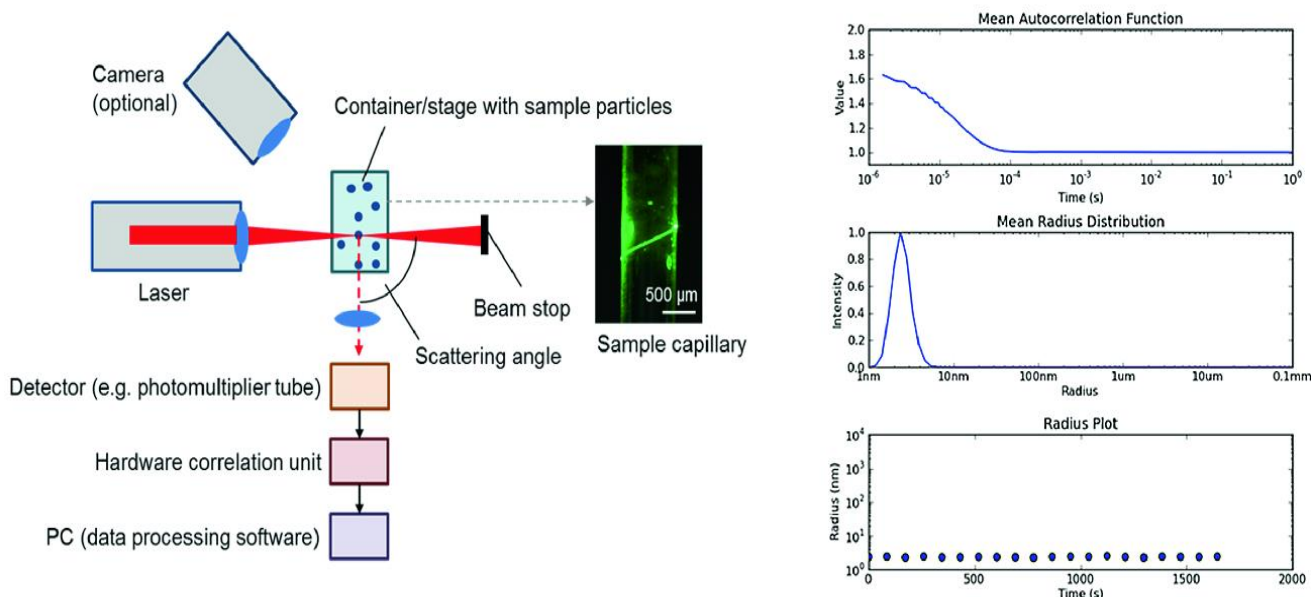
όπου A και B πειραματικές σταθερές, Γ η ταχύτητα με την οποία φθίνει η συνάρτηση, D ο μεταφορικός συντελεστής διάχυσης και q το διάνυσμα σκέδασης όπως ορίζεται στην εξίσωση (2.4.1.5).

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 του ακτίνας:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad (2.4.2.2)$$

όπου k η σταθερά Boltzmann, T η απόλυτη θερμοκρασία, η το ιξώδες του διαλύματος και R_h η υδροδυναμική ακτίνα του πολυμερούς.

Ο υπολογισμός της υδροδυναμικής ακτίνας από τη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης προκύπτει έπειτα από ανάλυση μέσω μαθηματικού αλγορίθμου. Δυο 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 2ης ή 3ης τάξης και από τους συντελεστές του πολυωνύμου προκύπτουν ο συντελεστής διάχυσης (1^{ος} cumulant) και η πολυδιασπορά του συστήματος (2^{ος} cumulant). Μέσω του προγράμματος CONTIN, η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης έχει σαν αποτέλεσμα μία πληθώρα πιθανών λύσεων από τις οποίες απορρίπτονται οι πιο περίπλοκες λύσεις ως οι λιγότερο πιθανές να υπάρξουν σε πραγματικά συστήματα. Η ανάλυση μέσω του προγράμματος CONTIN οδηγεί στον προσδιορισμό της συνάρτησης κατανομής μεγεθών των σωματιδίων στο διάλυμα.



Εικόνα 2.6: Σχηματική αναπαράσταση διάταξης DLS (αριστερά), ενδεικτικά αποτελέσματα μέτρησης (δεξιά)

2.5 Φασματοσκοπία Φθορισμού^[41,47,54]

Ο μοριακός φθορισμός, ο φωσφορισμός και η χημειοφωταύγεια αποτελούν τρεις συγγενικούς τύπους οπτικών τεχνικών. Ο φθορισμός και ο φωσφορισμός μοιάζουν, καθώς η διέγερση προκαλείται με απορρόφηση φωτονίων, με τη διαφορά ότι στο φωσφορισμό έχουμε μεταβολή του ενεργειακού spin.

Το φαινόμενο του φθορισμού απεικονίζεται παρακάτω στο διάγραμμα Jablonski (σχήμα 2.1) και διακρίνεται σε τρία στάδια:

Το πρώτο στάδιο αντιστοιχεί στη διέγερση. Το μόριο απορροφά φωτόνιο (υπεριώδης ή ορατή ακτινοβολία) όσο βρίσκεται στη θεμελιώδη κατάσταση S_0 . Αποτέλεσμα της απορρόφησης είναι η μετάβαση του ηλεκτρονίου σε διεγερμένη κατάσταση (S_1 , S_2). Κάθε ηλεκτρονιακή κατάσταση χωρίζεται σε επιμέρους δονητικές στάθμες και συνήθως, η μετάβαση γίνεται στο υψηλότερο ενεργειακά δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης κατάστασης S_1 .

Το δεύτερο στάδιο βασίζεται στη διάρκεια ζωής της διεγερμένης κατάστασης. Συνήθως διαρκεί από 1 – 10 ns. Σε αυτό το διάστημα το μόριο χάνει ενέργεια, καθώς υποβάλλεται σε αλλαγές στη διαμόρφωση και υπόκειται σε πολλαπλές αλληλεπιδράσεις με το περιβάλλον του. Σαν αποτέλεσμα, έχουμε μετάβαση ηλεκτρονίου από το υψηλότερο στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης κατάστασης S_1 , μια διαδικασία που ονομάζεται δονητική επαναφορά.

Στο τρίτο στάδιο παρατηρείται η 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.

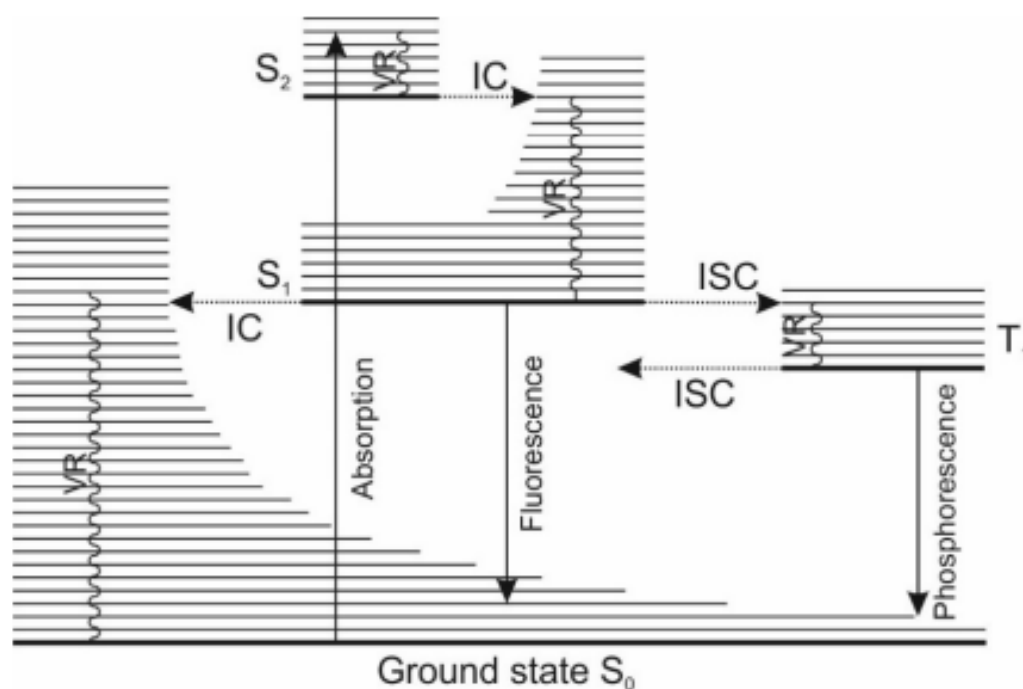
Η διαδικασία φθορισμού είναι κυκλική και επαναλαμβανόμενη όταν το μόριο δεν έχει καταστραφεί μη αντιστρεπτά κατά τη διέγερση (αν δηλαδή παράγονται πολλά ανιχνεύσιμα φωτόνια).

Στην περίπτωση που το προς μελέτη μόριο δεν είναι φθορίζον, είναι δυνατό να προστεθεί στο διάλυμα αυτού κάποιο άλλο φθορίζον μόριο, το οποίο μέσω φυσικής ή χημικής αλληλεπίδρασης να δώσει την απαραίτητη πληροφορία για το σύστημα. Μία από τις πλέον χρησιμοποιούμενες ενώσεις – ανιχνευτές στην επιστήμη πολυμερών είναι το πυρένιο, ένας πολυκυκλικός αρωματικός υδρογονάνθρακας.

Το πυρένιο είναι ένα φθορίζον μόριο, με φθορισμό ευαίσθητο στην αλλαγή της πολικότητας του περιβάλλοντός του. Όταν προστίθεται σε διάλυμα πολυμερούς, κατά το σχηματισμό μικκυλίων, δεσμεύεται στον υδρόφοβο πυρήνα τους. Συνεπώς, καθιστά δυνατό τον υπολογισμό της κρίσιμης μικκυλιακής συγκέντρωσης (CMC) του συστήματος, δηλαδή τη συγκέντρωση στην οποία παρατηρείται για πρώτη φορά ο σχηματισμός των μικκυλίων.

Αυτό γίνεται λαμβάνοντας υπ' όψη το λόγο της πρώτης και της τρίτης δονητικής μπάντας, I_1/I_3 . Η μπάντα I_1 εμφανίζεται στα 372 nm περίπου, είναι ευαίσθητη σε αλλαγή της πολικότητας και η έντασής της μειώνεται όσο το περιβάλλον μετατρέπεται από πολικό σε άπολο. Αντίθετα, η μπάντα I_3 εμφανίζεται κατά τα 381 nm και παραμένει αμετάβλητη σε αλλαγές της πολικότητας. Συνεπώς, μέσω της μεταβολής του λόγου I_1/I_3 μπορούν να

εξαχθούν συμπεράσματα για το μικροπεριβάλλον του πυρενίου και αντίστοιχα για την κατάσταση που βρίσκεται το πολυμερές στο διάλυμα. Τιμές από 0.9-1.3 αντιπροσωπεύουν υδρόφοβο μικροπεριβάλλον.



Σχήμα 2.1: Διάγραμμα Jablonski

Τα βασικά μέρη της οργανολογίας ενός φθορισμομέτρου είναι:

- πηγή φωτός (λάμπα δευτερίου ή ξένου που παρέχει ακτινοβολία στην περιοχή 250-700 nm)
- επιλογείς μηκών κύματος (μονοχρωμάτορας διέγερσης και μονοχρωμάτορας εκπομπής)
- ανιχνευτής – φωτοπολλαπλασιαστής
- καταγραφέας – υπολογιστής

Ένα μεγάλο εύρος φωτός περνάει από τη λάμπα στον πρώτο μονοχρωμάτορα, όπου επιτρέπει την δίοδο μόνο σε ορισμένα μήκη κύματος. Ο φθορισμός διασπείρεται από ένα δεύτερο μονοχρωμάτορα και ανιχνεύεται από ένα φωτοπολλαπλασιαστή. Σαρώνοντας τη διέγερση, ο πρώτος

μονοχρωμάτορας δίνει το φάσμα της διέγερσης και σαρώνοντας το φθορισμό, ο δεύτερος μονοχρωμάτορας δίνει το φάσμα φθορισμού.

2.6 Φασματοσκοπία Απορρόφησης Υπεριώδους – Ορατού^[41,48,49,55]

Η φασματοσκοπία μοριακής απορρόφησης στις φασματικές περιοχές υπεριώδους και ορατού χρησιμοποιείται ευρέως στον ποσοτικό προσδιορισμό μεγάλου αριθμού ανόργανων, οργανικών και βιολογικών ουσιών. Βασίζεται στην αλληλεπίδραση της ύλης με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, στην περιοχή μήκους κύματος 190 – 800 nm.

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην μέτρηση της διαπερατότητας T ή της απορρόφησης A διαλυμάτων που τοποθετούνται σε διαφανείς κυψελίδες οπτικής διαδρομής b (cm). Συνήθως, η συγκέντρωση c (mol / L) ενός αναλύτη που απορροφά συνδέεται γραμμικά με την απορρόφηση σύμφωνα με την εξίσωση (2.6.1):

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc \quad (2.6.1)$$

όπου P_0 η ακτινοβολούμενη ισχύς, P η διερχόμενη ακτινοβολία και ϵ η γραμμομοριακή απορροφητικότητα ($\text{mol}^{-1}\text{L cm}^{-1}$ ή $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

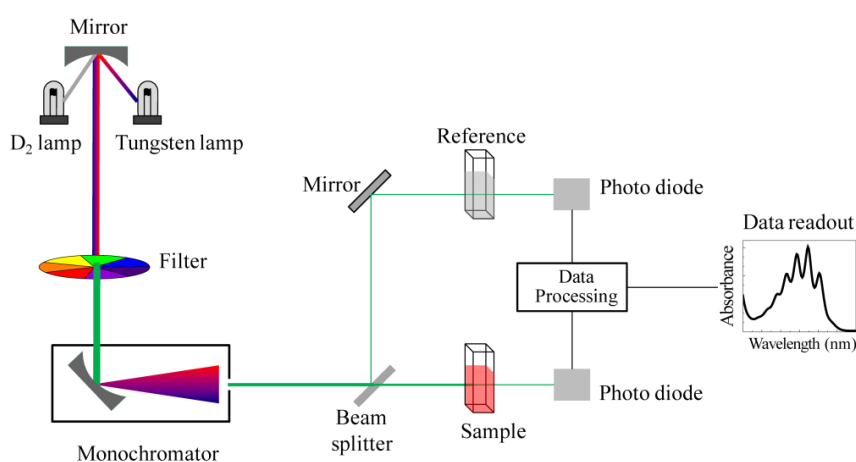
Η εξίσωση αυτή αποτελεί τη μαθηματική έκφραση του νόμου του Beer. Όταν μονοχρωματική ακτινοβολία διέρχεται από διάλυμα ικανό να την απορροφήσει, τότε η ισχύς της ακτινοβολίας ελαττώνεται προοδευτικά κατά μήκος της διαδρομής. Η ελάττωση της ισχύος εξαρτάται από την συγκέντρωση της ουσίας που την απορροφά και από την απόσταση που διήνυσε η δέσμη μέσα στο διάλυμα. Πιο συγκεκριμένα, περνώντας η ακτινοβολία από το διάλυμα γίνεται εκλεκτική απορρόφηση εκείνων των συχνοτήτων που οδηγούν σε κατάσταση υψηλότερης εσωτερικής ενέργειας των μορίων. Στο είδος της φασματοσκοπίας αυτής, τα εξωτερικά ηλεκτρόνια είναι εκείνα που με την ανύψωση ή πτώση από τη μία ενεργειακή κατάσταση σε μία άλλη προκαλούν απορρόφηση ενέργειας σε διακεκριμένες (κβαντισμένες) ποσότητες. Οι ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις μπορούν δηλαδή, να συνίστανται είτε σε διέγερση ηλεκτρονίων σε υψηλότερες ενεργειακές στάθμες, άρα έχουμε απορρόφηση ακτινοβολίας είτε σε αποδιέγερση

ηλεκτρονίων, οπότε παρατηρείται εκπομπή φωτός και λαμβάνονται αντίστοιχα φάσματα απορρόφησης και φάσματα εκπομπής. Αν υφίσταται απορρόφηση στην ορατή περιοχή παρατηρείται χρώμα, συμπληρωματικό του απορροφούμενου. Αναλυτικότερα, ηλεκτρόνια σε μοριακά δεσμικά τροχιακά χαμηλής ενέργειας (n , σ , π) μεταπηδούν στα αντίστοιχα αντιδεσμικά υψηλότερης ενέργειας (σ^* , π^*). Οι αλλαγές της ηλεκτρονιακής ενέργειας του μορίου μιας χημικής ένωσης προκαλούν μεταβολές της διπολικής ροπής του και ακριβώς αυτή η μεταβολή είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση του μορίου και της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

Ένα φασματοφωτόμετρο UV-Vis αποτελείται από:

- i. μία πηγή φωτός
- ii. ένα ρυθμιστή έντασης της ακτινοβολίας
- iii. έναν επιλογέα μήκους κύματος (μονοχρωμάτορας ή φίλτρο)
- iv. έναν ανιχνευτή της ακτινοβολίας
- v. ένα καταγραφέα/υπολογιστή

Ουσιαστικά, με το φασματοφωτόμετρο UV-Vis επιτυγχάνεται η μέτρηση του φασματικού συντελεστή ανάκλασης, υπολογίζοντας το λόγο της ανακλώμενης (ή διερχόμενης) ισχύος ακτινοβολίας από το αντικείμενο προς την προσπίπτουσα σε αυτό, για κάθε μήκος κύματος της φασματικής περιοχής που καλύπτεται.



Εικόνα 2.7: Διάγραμμα φασματοσκοπίας UV-Vis

2.7 Ηλεκτροφορητική Σκέδαση Φωτός / ζ – δυναμικό^[51,57]

Το ζ-δυναμικό είναι μια φυσική ιδιότητα, η οποία παρατηρείται από οποιοδήποτε σωματίδιο σε εναιώρημα. Έχει αναγνωρισθεί ότι είναι ένας πολύ καλός δείκτης του μεγέθους της αλληλεπίδρασης μεταξύ κολλοειδών σωματιδίων και οι μετρήσεις του χρησιμοποιούνται συνήθως για την αξιολόγηση της σταθερότητας κολλοειδών συστημάτων, όπως γαλακτώματα, εναιωρήματα, αερολύματα.

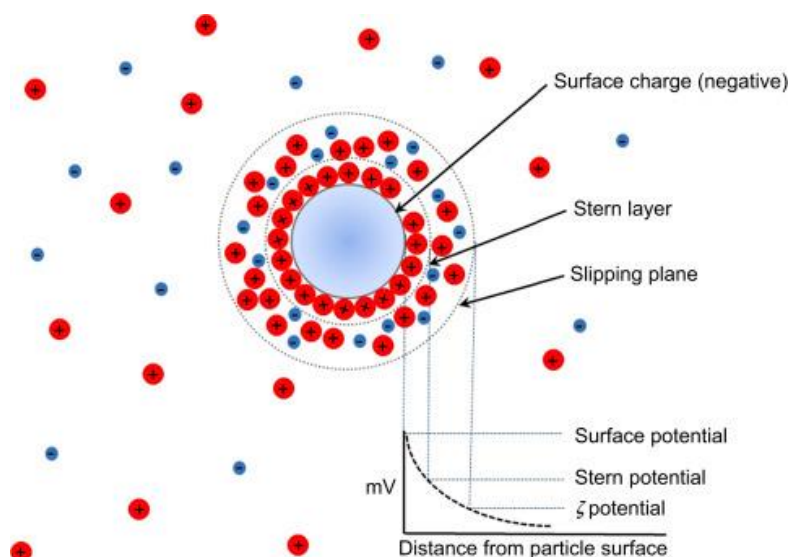
Όταν ένα φορτισμένο σωματίδιο ή μακρομόριο βρεθεί σε περιβάλλον πολικού διαλύτη, τα επιφανειακά φορτία του αλληλεπιδρούν με τα ιόντα του διαλύτη, μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Αποτέλεσμα, ο σχηματισμός γύρω από το σωματίδιο μιας ηλεκτρικής διπλοστιβάδας (electrical double layer, EDL), η οποία καλείται στιβάδα Debye. Η διπλοστιβάδα αυτή αποτελείται κυρίως από ιόντα αντίθετου φορτίου ως προς το επιφανειακό φορτίο του σωματιδίου, των οποίων η συγκέντρωση μειώνεται καθώς αυξάνεται η απόσταση από την επιφάνεια του φορτίου.

Η διπλοστιβάδα μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από δύο τμήματα. Η εσωτερική περιοχή ονομάζεται στρώμα Stern, όπου τα ιόντα είναι ισχυρά συνδεδεμένα μεταξύ τους και η εξωτερική περιοχή (διάχυτη), όπου συνδέονται λιγότερο σταθερά. Η εξωτερική περιοχή ονομάζεται Gouy – Chapman. Μέσα στη διάχυτη περιοχή υπάρχει ένα νοητό όριο στο οποίο τα ιόντα και τα σωματίδια σχηματίζουν μια σταθερή οντότητα. Όταν ένα σωματίδιο κινείται (πχ. λόγω βαρύτητας), τα ιόντα εντός του ορίου μετακινούνται μαζί του. Τα ιόντα πέρα από το όριο παραμένουν με τον όγκο διασποράς. Το δυναμικό σε αυτό το όριο (επιφάνεια υδροδυναμικής διάτμησης) είναι το ζ-δυναμικό. Το μέγεθος του δίνει μια ένδειξη της δυναμικής σταθερότητας του κολλοειδούς συστήματος.

Εάν όλα τα σωματίδια στο εναιώρημα έχουν μεγάλο αρνητικό ή θετικό δυναμικό ζ, τότε θα τείνουν να απωθούν το ένα το άλλο και δε θα υπάρχει καμία τάση να συγκεντρωθούν μεταξύ τους. Όταν οι ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις μεταξύ των σωματιδίων (οι οποίες προέρχονται από το καθαρό φορτίο στην επιφάνεια των σωματιδίων), είναι ισχυρότερες από τις

ελκτικές δυνάμεις Van der Waals μεταξύ των όμοιων σωματιδίων παρατηρούνται σταθερά συστήματα. Η γενική διαχωριστική γραμμή μεταξύ σταθερών και ασταθών εναιωρημάτων φορτισμένων σωματιδίων λαμβάνεται είτε στα +30 mV είτε στα -30 mV. Τα σωματίδια με ζ πιο θετικά από +30 mV ή πιο αρνητικά από -30 mV θεωρούνται γενικά σταθερά. Αντίθετα, όταν το ζ-δυναμικό είναι κοντά στο μηδέν η συσσωμάτωση είναι πολύ γρήγορη και προκαλείται καταβύθιση. Ωστόσο, εάν τα σωματίδια έχουν διαφορετική πυκνότητα από το μέσο διασποράς θα παρατηρηθεί και πάλι καταβύθιση.

Η αρχή για τον προσδιορισμό του ζ-δυναμικού είναι πολύ απλή. Δύο ηλεκτρόδια εμβαπτίζονται στο δείγμα του κολλοειδούς και εφαρμόζεται σταθερό ηλεκτρικό πεδίο, το οποίο προκαλεί την κίνηση των σωματιδίων προς το ηλεκτρόδιο με την αντίθετη πολικότητα. Οι 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 το ζ-δυναμικό του σωματιδίου.



Εικόνα 2.8: Σχηματική αναπαράσταση μέτρησης ζ-δυναμικού

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 κινούνται. Σε μια τυπική μέτρηση ζ-δυναμικού ή ηλεκτροφορητικής σκέδασης του φωτός, όπως αλλιώς λέγεται, ένα μέρος του δείγματος 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 απευθείας στον ανιχνευτή χωρίς να προσπίπτει πάνω στο δείγμα. Συσχετίζοντας τις δύο διαφορετικές ακτινοβολίες που φτάνουν στον ανιχνευτή (προσπίπτουσα και σκεδαζόμενη) είναι εύκολο να προσδιοριστεί η μετατόπιση Doppler, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ταχύτητας των σωματιδίων.

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

$$\zeta = \frac{\eta}{\varepsilon} u_e \quad (2.7.1)$$

όπου η το ιξώδες, ε η διηλεκτρική σταθερά του μέσου και u_e η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των σωματιδίων.

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των σωματιδίων υπολογίζεται όπως φαίνεται παρακάτω:

$$u_e = \frac{v}{V/L} \quad (2.7.2)$$

όπου v η ταχύτητα των σωματιδίων, V η εφαρμοζόμενη τάση και L η απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων.

Με γνωστά όλα τα παραπάνω καθίσταται εύκολος ο υπολογισμός του ζ-δυναμικού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Υλικά και αντιδραστήρια

Τα υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία ήταν τα εξής:

Μονομερή: μεθακρυλικός εστέρας της διμεθυλοαμινοαιθανόλης με $M_w=157.21$ (n-dimethylamino ethyl methacrylate, DMAEMA), μεθακρυλικός εστέρας της δωδεκανόλης με $M_w=254.41$ (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)

Κουρκουμίνη: (Curcumin), κετονική μορφή (Merck)

Διαλύτες: τετραϋδροφουράνιο (tetrahydrofuran, THF), κανονικό εξάνιο (n-Hexane), 1-4-διοξάνιο (1,4-dioxane), δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (deuterated chloroform, CDCL₃), ακετόνη (acetone, CH₃COCH₃) (Sigma Aldrich)

PBS: Phosphate-Buffered Saline tablets (Sigma-Aldrich)

FBS: Fetal Bovine Serum (Sigma-Aldrich)

3.2 Οργανολογία και Μέθοδοι Χαρακτηρισμού

Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (GPC)

Τα μοριακά βάρη και οι κατανομές μοριακών βαρών των πολυμερών που συντέθηκαν προσδιορίστηκαν με τη χρήση χρωματογραφίας αποκλεισμού

μεγεθών, με χρήση οργάνου Waters, αποτελούμενο από μια ισοκρατική αντλία Waters 1515, ένα σετ από τρεις στήλες διαχωρισμού μεικτής σύστασης μ-Styragel (εύρος πόρων 102-106 Å), έναν ανιχνευτή δείκτη διάθλασης Waters 2414 (ισορροπημένος στους 40°C) και ελεγχόμενο από το λογισμικό Breeze. Στην κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης τετραϋδροφουράνιο, το οποίο περιέχει 5% v/v τριαιθυλαμίνη, με ρυθμό ροής 1 mL/min στους 30°C. Η βαθμονόμηση του οργάνου έγινε με πρότυπα δείγματα πολυστυρενίου με στενές κατανομές μοριακών βαρών και μέσα μοριακά βάρη στο εύρος 2.500 έως 123.000 g/mol. Τα δείγματα ήταν ήδη διαλυμένα σε διαλύτη τετραϋδροφουράνιο, σε συγκεντρώσεις της κλίμακας των 2-4 mg/mL.

Φασματοσκοπία ¹H-NMR

Τα φάσματα ¹H-NMR ελήφθησαν από φασματόμετρο Bruker AC 600 FT-NMR. Οι χημικές μετατοπίσεις παρουσιάζονται σε ppm με σημείο αναφοράς το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS). Η προετοιμασία των δειγμάτων για τις μετρήσεις ¹H-NMR ήταν η εξής: διάλυση 10 mg δείγματος σε 0.7 ml δευτεριωμένο χλωροφόρμιο και εισαγωγή του διαλύματος σε σωληνάκια NMR (NMR tubes). Η ανάλυση των φασμάτων έγινε με χρήση του λογισμικού MestReNova της εταιρίας MestRelabs.

Φασματοσκοπία ATR-FTIR

Οι μετρήσεις στην περιοχή του εγγύς υπερύθρου (550–4000 cm⁻¹) πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ενός φασματομέτρου μετασχηματισμού Fourier (Equinox 55 από την Bruker Optics), εξοπλισμένο με κρύσταλλο γερμανίου ATR μονής αντανάκλασης (Dura-Samp1IR II της εταιρίας SensIR Technologies).

Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)

Οι μετρήσεις δυναμικής σκέδαση 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 καταγράφηκαν πέντε φορές και αναλύθηκαν με τη μέθοδο των αθροισμάτων (cumulants) και τον αλγόριθμο CONTIN, ο οποίος παρέχει τις κατανομές για την φαινόμενη υδροδυναμική ακτίνα με χρήση αντιστρόφου μετασχηματισμού Laplace της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης με τη βοήθεια της σχέσης Stokes – Einstein.

Όλα τα διαλύματα διηθήθηκαν με υδρόφιλο φίλτρο PVDF πορώδους 0.45μm πριν τη μέτρηση.

Φασματοσκοπία Φθορισμού

Τα φάσματα καταγράφηκαν με 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. Αρχικά, έγινε προετοιμασία μικκυλιακών διαλυμάτων σε εύρος συγκεντρώσεων από 10^{-3} - 10^{-8} g/mL και ιχνηθέτηση των διαλυμάτων αυτών με πυρένιο σε αναλογία 1 μL/mL. Τα δείγματα παρέμειναν σε ηρεμία για 24 ώρες ώστε να γίνει εγκλωβισμός του πυρενίου στον υδρόφοβο πυρήνα των μικκυλίων. Έπειτα μετρήθηκαν και έγινε αποτίμηση του λόγου I_1 / I_3 σε σχέση με τη συγκέντρωση.

Φασματοσκοπία UV-Vis-NIR

Τα φάσματα UV-Vis-NIR καταγράφηκαν με φασματοφωτόμετρο Perkin-Elmer (Lambda 19) UV-Vis-NIR. Χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες χαλαζία, στις οποίες τοποθετούνται 3 mL από το προς μέτρηση διάλυμα.

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 $\lambda = 633$ nm. Χρησιμοποιεί

μία φωτοδίοδο ως ανιχνευτή και η σκεδαζόμενη ακτινοβολία μετρείται σε γωνία 173°. Οι ηλεκτροκινητικές μετρήσεις για τον προσδιορισμό της κινητικότητας και των τιμών ζ-δυναμικού των κολλοειδών, πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της τεχνικής LDV (Laser Doppler Velocimetry) και με την προσέγγιση κατά Smoluchowski. Οι αναφερόμενες τιμές ζ-δυναμικού είναι η μέση τιμή 100 μετρήσεων.

3.3 Σύνθεση P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA)

Οι συνθέσεις των αμφίφιλων στατιστικών συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) έγιναν με τη χρήση της τεχνικής αντιστρεπτής προσθήκης – μεταφοράς αλυσίδας με απόσπαση (RAFT). Παρακάτω περιγράφεται η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση των πέντε συμπολυμερών.

Συντέθηκαν πέντε (5) στατιστικά συμπολυμερή P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA). Τα συμπολυμερή αυτά διαφέρουν ως προς το μοριακό βάρος (M_w), την κατανομή μοριακών βαρών (I), τη σύσταση κατά βάρος (wt %) και συνεπώς την περιεκτικότητα σε κάθε μονομερές. Ακολουθεί η γενική πειραματική πορεία της σύνθεσης:

Αρχικά, έγινε απομάκρυνση των παρεμποδιστών (μονομεθυλαιθέρας της υδροκινόνης και τριτοταγής βουτυλική κατεχόλη) από τα επιμέρους μονομερή, διαπερνώντας τα από στήλη, η οποία είχε προηγουμένως πληρωθεί με κατάλληλη ρητίνη. Στη συνέχεια, προστέθηκαν σε σφαιρική φιάλη, σε κατάλληλη ποσότητα, το αντιδραστήριο μεταφοράς (CTA), ο απαρχητής (AIBN), τα μονομερή και 1,4-διοξάνιο ως διαλύτης για τον πολυμερισμό. Το αντιδραστήριο μεταφοράς και ο απαρχητής προστέθηκαν σε αναλογία 5:1 (σε mol). Η φιάλη σφραγίστηκε με septum σιλικόνης. Ακολούθησε απαέρωση του διαλύματος με συνεχή ροή αζώτου για 20 λεπτά. Μετά το τέλος της απαέρωσης, η φιάλη τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο στους 70 °C, για 24 ώρες. Εν συνεχεία, το διάλυμα ψύχθηκε για περίπου 10 λεπτά στο ψυγείο και ανοίχθηκε η φιάλη προκειμένου να επέλθει τερματισμός του πολυμερισμού με το οξυγόνο της ατμόσφαιρας. Σε τελικό στάδιο, έγινε καταβύθιση του προϊόντος της αντίδρασης σε κανονικό εξάνιο. Εξαίρεση αποτέλεσε το

P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA)-4 προϊόν, όπου είχαμε αυξημένη περιεκτικότητα σε υδρόφοβο LMA (50%) και δεν παρουσιάστηκε καταβύθιση του προϊόντος. Έγινε, λοιπόν, εξάτμιση του μίγματος κανονικού εξανίου – 1,4-διοξανίου με τη χρήση περιστροφικού εξατμιστή (rotary evaporator). Συλλέχθηκε το ίζημα και τοποθετήθηκε σε φούρνο κενού για 48 ώρες προκειμένου να ξηρανθεί, όπως και τα υπόλοιπα συμπολυμερή.

Αναλυτικά για κάθε ένα από τα συμπολυμερή χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ποσότητες αντιδραστηρίων και προέκυψαν οι αντίστοιχες τιμές απόδοσης, α.

Πίνακας 3.1: Ποσότητες αντιδραστηρίων για κάθε συμπολυμερές και οι αντίστοιχες αποδόσεις τελικού προϊόντος

Δείγμα	DMAEMA (mL)	LMA (mL)	OEGMA (mL)	CTA (mg)	AIBN (mg)	α %
TER-1	1.29	0.23	0.58	28	3.3	66.7
TER-2	1.29	0.23	0.58	56	6.6	70.5
TER-3	0.67	0.72	0.815	28	3.3	53.3
TER-4	0.45	1.21	0.61	28	3.3	92.4
TER-5	0.9	0.48	0.82	28	3.3	76.7

3.4 Αυτο-οργάνωση των P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) σε υδατικά διαλύματα

Τα αμφίφιλα συμπολυμερή που παρασκευάστηκαν μελετήθηκαν σε μοριακό επίπεδο και ως προς την ικανότητά τους να αυτο-οργανώνονται σχηματίζοντας συσσωματώματα, όταν βρεθούν σε υδατικά διαλύματα.

Ακολουθήσαμε δύο πρωτόκολλα. Στο πρώτο έγινε απευθείας διαλυτοποίηση του πολυμερούς σε υδατικό μέσο (απιοντισμένο νερό). Προσθέσαμε απιοντισμένο νερό, περίπου 10 mL, σε φιαλίδιο (vial) και μικρή ποσότητα πολυμερούς, περίπου 10 mg. Ακολούθησε ανάδευση κατά περιόδους μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση του πολυμερούς σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Τα διαλύματα αφέθηκαν τυπικά για 24 ώρες για πλήρη διαλυτοποίηση και εξισορρόπηση. Για το P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA)-4 προϊόν, χρειάστηκε και η χρήση υπερήχων για περίπου 5 λεπτά, έτσι ώστε να έχουμε πλήρη διαλυτοποίηση.

Λόγω της θερμοαποκρινόμενης και pH-αποκρίσιμης φύσης του μονομερούς DMAEMA, τα πολυμερή διαλύθηκαν αρχικά σε pH=7 και στη συνέχεια ρυθμίστηκαν σε pH=3 με χρήση HCl 1M και σε pH=10 με χρήση NaOH 0.1M. Επιπλέον, κάθε πολυμερές διαλύθηκε και σε PBS (pH=7.4, NaCl 0.15M), το οποίο προσομοιάζει τις συνθήκες αλατότητας και οξύτητας στο αίμα.

Στο δεύτερο πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε ενυδάτωση λεπτού υμενίου (Thin Film Hydration). Το πολυμερές διαλύθηκε πρώτα σε καλό οργανικό διαλύτη για όλα τα συστατικά, THF και στη συνέχεια έγινε εξάτμιση αυτού σε περιστροφικό εξατμιστή (rotary evaporator). Τέλος, πραγματοποιήθηκε ενυδάτωση του υμενίου που σχηματίστηκε προκειμένου να αυτο-οργανωθεί το σύστημα σε υδατικό περιβάλλον.

3.5 Εγκλωβισμός κουρκουμίνης στα συσσωματώματα των P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA)

Αρχικά, έγινε παρασκευή δύο διαφορετικών διαλυμάτων, πολυμερούς σε THF (για κάθε πολυμερές) και κουρκουμίνης σε THF. Ζυγίστηκαν 10 mg από κάθε πολυμερές και προστέθηκαν σε vials με 1 mL THF στο καθένα μέχρι να διαλυθούν. Σε άλλο vial προστέθηκε ποσότητα κουρκουμίνης και διαλύθηκε και αυτή σε 1 mL THF. Τα διαλύματα αφέθηκαν σε ηρεμία για μία μέρα, έτσι ώστε να διαλυθούν μοριακά. Την επόμενη ημέρα, έγινε ανάμιξη κάθε διαλύματος πολυμερούς με την αντίστοιχη ποσότητα διαλύματος κουρκουμίνης και ένεση αυτών σε νέα vial, τα οποία περιείχαν 10 mL PBS, υπό έντονη ανάδευση. Έχοντας σε ισορροπία το διάλυμα και θερμαίνοντάς το στους ~68 °C, εξατμίστηκε το THF. Για την εξάτμιση ακολουθήθηκε και δεύτερο πρωτόκολλο, αυτό του λεπτού υμενίου (Thin Film Hydration Method). Το δείγμα πολυμερούς – κουρκουμίνης (διαλυμένα σε THF) τοποθετήθηκε σε σφαιρική φιάλη και ακολούθησε εξάτμιση του διαλύτη με τη βοήθεια

περιστροφικού εξατμιστή. Μετά την πλήρη εξάτμιση του διαλύτη, σχηματίστηκε περιμετρικά, στα τοιχώματα της σφαιρικής φιάλης, ένα λεπτό υμένιο (thin film), το οποίο ενυδατώθηκε με μικρή ποσότητα (10 mL) PBS. Ακολούθησε ήπια ανάδευση προκειμένου να επαναδιαλυτοποιηθεί το υμένιο και να αυτο-οργανωθεί το σύστημα στο υδατικό, πλέον, διάλυμα.

Οι υπολογισμοί των ποσοτήτων της κουρκουμίνης πραγματοποιήθηκαν με βάση το ποσοστό του υδρόφοβου τμήματος (% LMA) σε κάθε συμπολυμερές, καθώς και το επιθυμητό ποσοστό κουρκουμίνης που θέλαμε να εγκλωβιστεί στα νανοσωματίδια.

Τα τελικά συστήματα μελετήθηκαν με δυναμική σκέδαση φωτός, με φασματοσκοπία υπεριώθρου-ορατού, καθώς και με φασματοσκοπία φθορισμού. Κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς της κουρκουμίνης, μετρώντας σε $\lambda_{\max}=420$ nm την απορρόφηση εννέα διαφορετικών συγκεντρώσεων κουρκουμίνης σε THF, μέσω φασματοσκοπίας UV-Vis. Με βάση την καμπύλη αναφοράς και την τιμή απορρόφησης του κάθε δείγματος, έγινε υπολογισμός του ποσοστού κουρκουμίνης που εγκλωβίστηκε από κάθε ένα συμπολυμερές.

3.6 Μελέτη αλληλεπίδρασης με FBS

Τον εγκλωβισμό κουρκουμίνης στα πολυμερικά συστήματα ακολούθησε η μελέτη αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες του ορού εμβρύου βοοειδούς (FBS).

Αρχικά, την πρώτη μέρα, έγινε διαλυτοποίηση 3 mg πολυμερούς σε 1 mL PBS. Την επόμενη, βγάλαμε από την ψύξη το FBS, σε θερμοκρασία 37°C, προκειμένου να ρευστοποιηθεί και μετά από ελαφριά ανακίνηση, φιλτραρίστηκαν 4 mL του διαλύματος.

Ακολουθήθηκαν δύο πρωτόκολλα. Στο πρώτο, έγινε προσθήκη 50 μ L δείγματος πολυμερούς-κουρκουμίνης σε 3 mL διαλύματος FBS:PBS σε αναλογία (1:9) (10% v/v – 90% v/v) και προσθήκη 50 μ L δείγματος του ίδιου συστήματος σε 3 mL διαλύματος FBS:PBS σε αναλογία (1:1) (50% v/v – 50% v/v)

Στο δεύτερο πρωτόκολλο, έγινε προσθήκη 100 μ L δείγματος πολυμερούς-κουρκουμίνης σε 3 mL διαλύματος FBS:PBS σε αναλογία (1:9) και

ακολουθως, ίδια ποσότητα του ίδιου συστήματος προστέθηκε σε 3 mL διαλύματος FBS:PBS σε αναλογία (1:1).

Τα δείγματα που παρασκευάστηκαν αφέθηκαν σε ηρεμία και μετρήθηκαν μετά από 3 ώρες μέσω δυναμικής σκέδασης φωτός. Έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα αντίστοιχα φιλτραρισμένου διαλύματος FBS.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται η πορεία σύνθεσης των πέντε (5) στατιστικών συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA), καθώς και τα αποτελέσματα από το μοριακό και φυσικοχημικό χαρακτηρισμό τους. Για συντομία, για την ονομασία κάθε δείγματος χρησιμοποιήθηκε το πρόθεμα TER- (terpolymer) και ο αντίστοιχος αριθμός δείγματος.

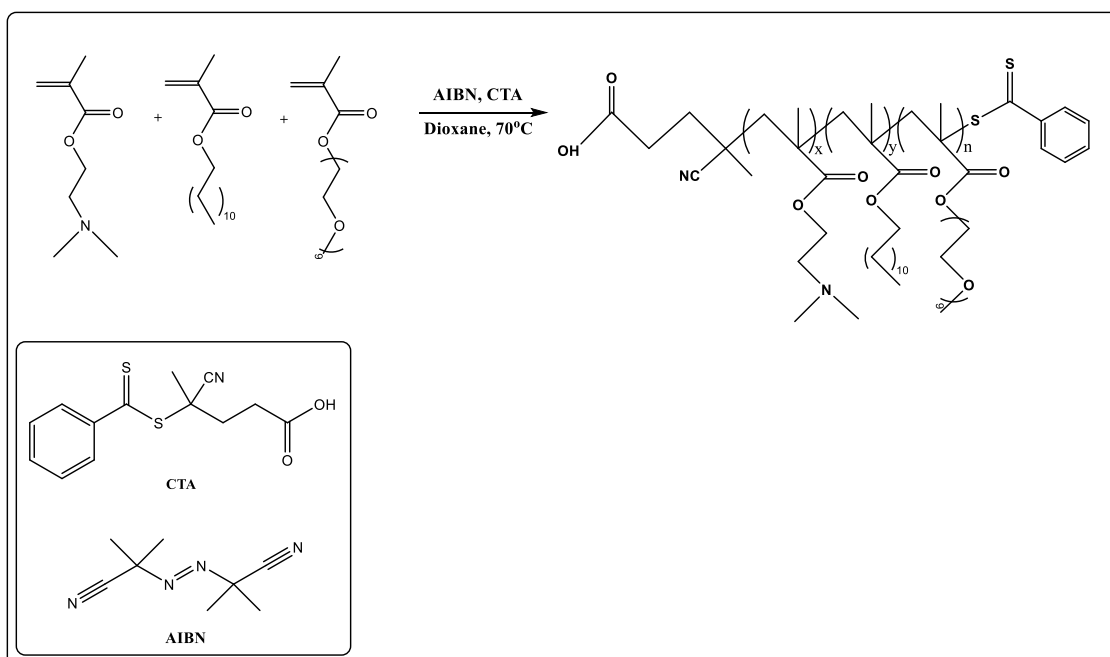
Ο χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε με χρήση των τεχνικών: χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών (SEC), φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (¹H-NMR) και φασματοσκοπίας υπερύθρου (ATR-FTIR).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η συμπεριφορά τους σε υδατικά διαλύματα και καθώς το μονομερές DMAEMA είναι θερμοαποκρινόμενο και pH-αποκρίσιμο, εξετάστηκε η συμπεριφορά των συμπολυμερών υπό την επίδραση pH και θερμοκρασίας, μέσω τεχνικών φασματοσκοπίας φθορισμού, δυναμικής σκέδασης φωτός και ηλεκτροφορετικής σκέδασης φωτός. Επίσης, υπολογίστηκε η κρίσιμη συγκέντρωση συσσωματωμάτων (CAC), πάλι μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού.

Τέλος, έγινε εγκλωβισμός κουρκουμίνης ως πρότυπο αντικαρκινικό και υδρόφοβο φάρμακο στα συσσωματώματα των συμπολυμερών. Τα συστήματα μελετήθηκαν με δυναμική σκέδαση φωτός, φασματοσκοπία UV-Vis και φασματοσκοπία φθορισμού.

4.1 Σύνθεση συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA)

Η σύνθεση των στατιστικών συμπολυμερών έγινε με την τεχνική πολυμερισμού RAFT, στους 70 °C για 24 ώρες. Η αντίδραση σύνθεσης περιγράφεται παρακάτω:



Σχήμα 4.1: Αντίδραση σύνθεσης των συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA)

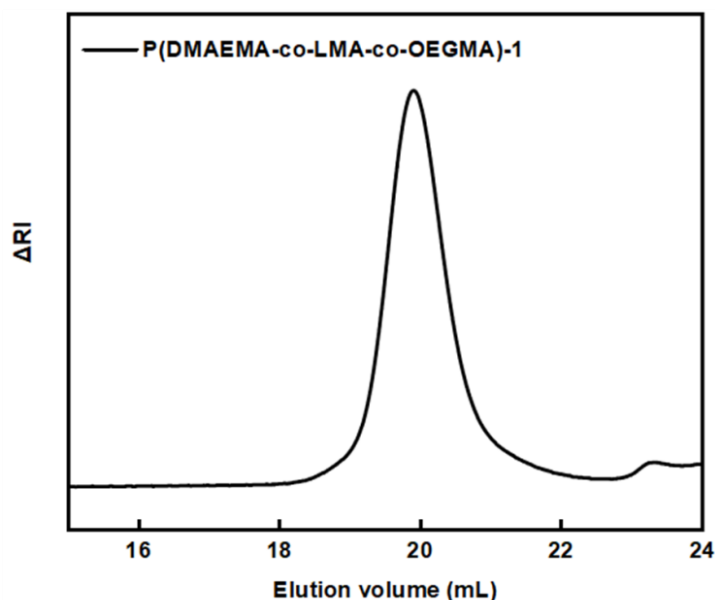
Τα διαλύματα του πολυμερισμού ήταν ομογενή καθ' όλη τη διάρκεια. Μετά τον καθαρισμό τους από μονομερή που μπορεί να μην είχαν αντιδράσει και την ξήρανσή τους, παραλήφθηκαν σε μορφή γέλης με ερυθρό χρώμα, ανάλογο του χρώματος του CTA.

4.2 Μοριακός χαρακτηρισμός^[58,59]

Τα μοριακά βάρη και οι κατανομές μοριακών βαρών των πολυμερών που συντέθηκαν προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC). Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα συμπολυμερούς παρατίθεται ενδεικτικά παρακάτω. Ανάλογα ήταν και τα χρωματογραφήματα των υπόλοιπων συμπολυμερών.

Από τα χρωματογραφήματα και την ανάλυσή τους, διαπιστώνουμε τον επιτυχή έλεγχο του μοριακού βάρους των συμπολυμερών που συντέθηκαν, γεγονός που επιτεύχθηκε μέσω των συνθηκών πολυμερισμού που επιλέχθηκαν. Επίσης, οι τιμές των κατανομών των μοριακών βαρών

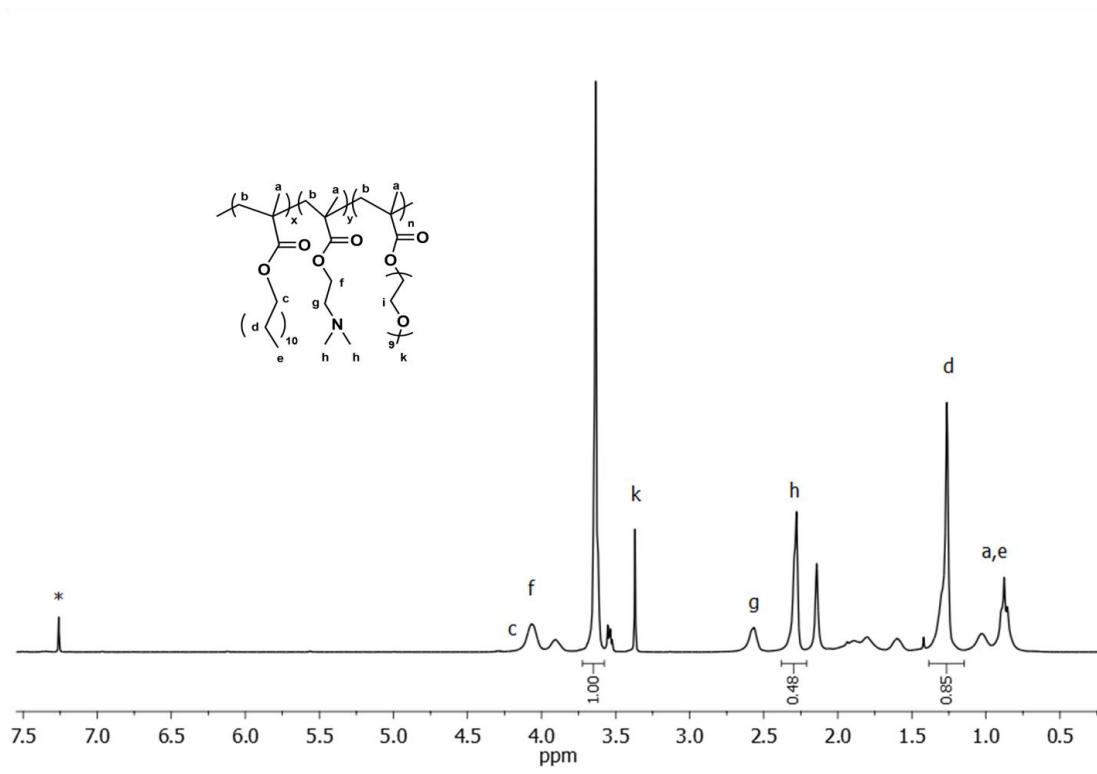
προέκυψαν αρκετά μικρές ($I < 1.2$) όπως επιβάλλει το θεωρητικό υπόβαθρο της τεχνικής πολυμερισμού RAFT και συμφωνούν με τα αναμενόμενα στη σχετική βιβλιογραφία.



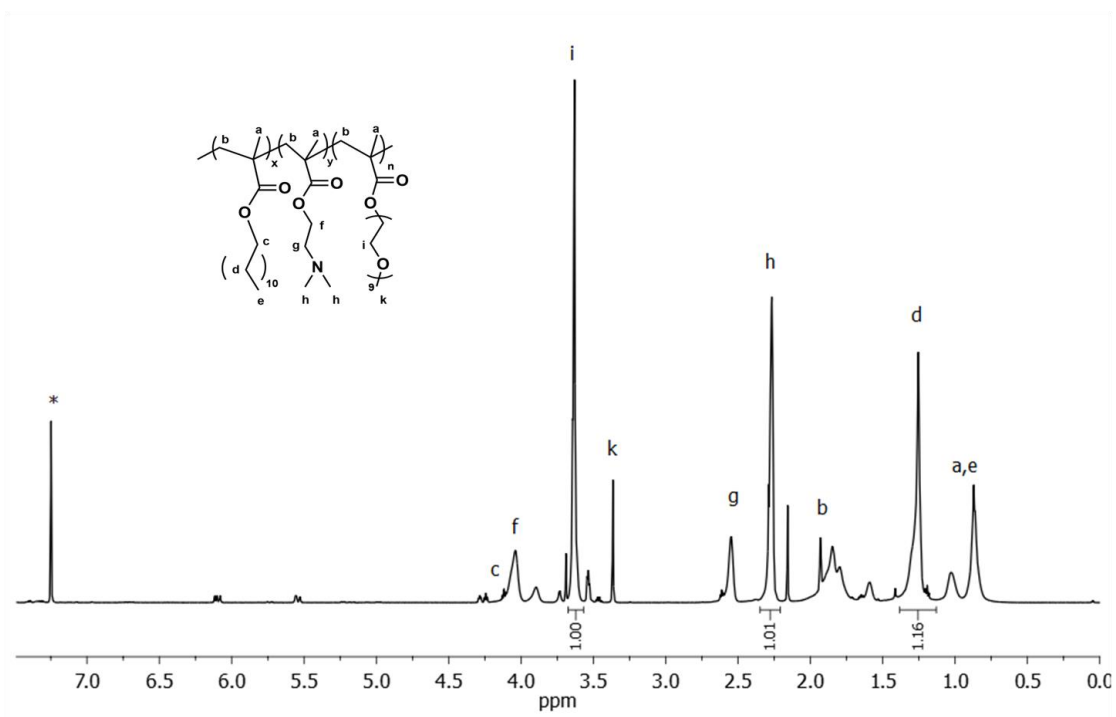
Σχήμα 4.2: Διάγραμμα GPC για το TER-1 συμπολυμερές

Η ταυτοποίηση της αναμενόμενης χημικής δομής και ο προσδιορισμός της σύστασης των συμπολυμερών πραγματοποιήθηκαν με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$. Χαρακτηριστικά φάσματα παρουσιάζονται παρακάτω, μαζί με την αποτίμηση των χαρακτηριστικών κορυφών.

Τα παρακάτω ενδεικτικά φάσματα δείχνουν ότι υπάρχει διαφορά στην ένταση και το πλάτος των κορυφών, ανάλογα με τη σύσταση των συμπολυμερών. Συγκρίνοντας τις κορυφές d και h στα δύο σχήματα βλέπουμε πως υπάρχει έντονη διαφορά στην ένταση και το πλάτος, η οποία είναι χαρακτηριστική της διαφορετικής σύστασης ως προς τα δύο μονομερή, DMAEMA και LMA, στα δύο συμπολυμερή που παρουσιάζονται. Για τον υπολογισμό της σύστασης κάθε συμπολυμερούς επιλέχθηκαν τα $-\text{CH}_2$ υδρογόνα που αντιστοιχούν στο LMA και εμφανίζονται στα 1.25 ppm, τα $-\text{CH}_2$ υδρογόνα του OEGMA που εμφανίζονται στα 3.63 ppm και τα $-\text{CH}_3$ υδρογόνα των δύο μεθυλιών της αμινομάδας του DMAEMA, τα οποία εμφανίζονται στα 2.27 ppm.



Σχήμα 4.3: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ για το TER-3 συμπολυμερές σε CDCl_3



Σχήμα 4.4: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ για το TER-5 συμπολυμερές σε CDCl_3

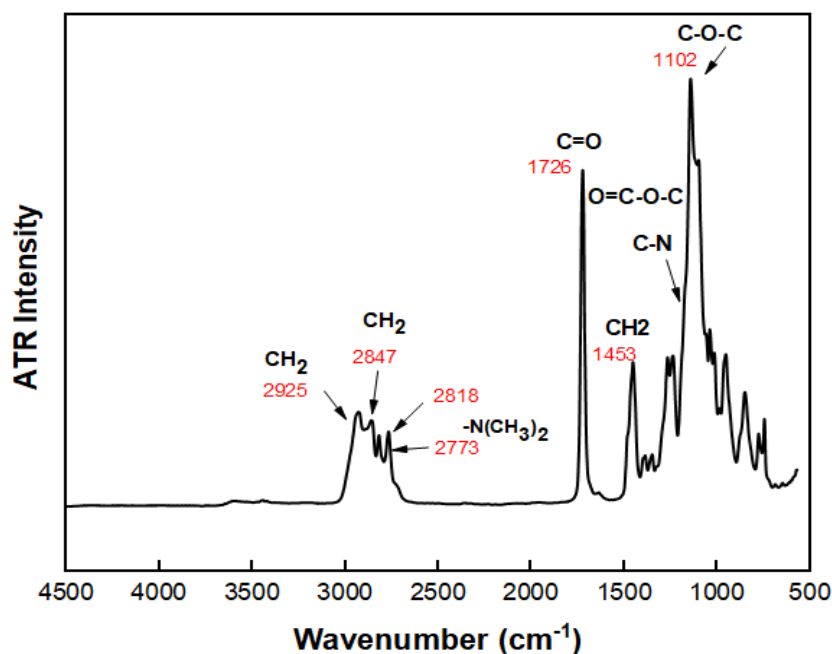
Στη συνέχεια, έγινε διαίρεση του εμβαδού κάθε κορυφής με τον αριθμό των υδρογόνων που αντιστοιχούν σε αυτή και πολλαπλασιασμός του αριθμού που προέκυψε με το μοριακό βάρος της κάθε μονομερικής μονάδας. Η κατά βάρος σύσταση ως προς κάθε μονομερές προέκυψε διαιρώντας τον παραπάνω αριθμό με το άθροισμα αυτού και για τις τρεις κορυφές. Οι πειραματικά προσδιοριζόμενες τιμές των συστάσεων συμφωνούν αρκετά καλά με τις στοιχειομετρικά επιδιωκόμενες, επιβεβαιώνοντας τον έλεγχο της διαδικασίας πολυμερισμού στα συγκεκριμένα συστήματα.

Πίνακας 4.1: Μοριακά χαρακτηριστικά συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA)

Δείγμα	M _w (x10 ⁴) (g/mol) (SEC)	M _w / M _n (SEC)	Σύσταση %wt DMAEMA (¹ H-NMR)	Σύσταση %wt LMA (¹ H-NMR)	Σύσταση %wt OEGMA (¹ H-NMR)
P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) – 1	1.8	1.09	66	10	24
P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) – 2	1.1	1.16	62	11	27
P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) – 3	1.72	1.1	35	29	36
P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) – 4	1.67	1.09	20	48	32
P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) – 5	1.4	1.1	49	27	24

Για τη χημική ταυτοποίηση των συμπολυμερών χρησιμοποιήθηκε και η τεχνική ATR-FTIR. Χαρακτηριστικό φάσμα παρουσιάζεται παρακάτω, μαζί με

την αποτίμηση των κορυφών για τις χαρακτηριστικές χημικές ομάδες κάθε μονομερούς.



Σχήμα 4.5: Φάσμα IR για το TER-1 συμπολυμερές

Οι μπάντες απορρόφησης στα 2925 cm⁻¹ αντιστοιχούν σε δονήσεις έκτασης δεσμών C-H των -CH₂ (ασύμμετρη έκταση), ενώ αυτή στα 2847 cm⁻¹ αντιστοιχεί στις ίδιες ομάδες, αλλά σε συμμετρική έκταση του δεσμού. Οι δονήσεις αυτές είναι αποτέλεσμα των ομάδων -CH₂ του DMAEMA, του LMA και του OEGMA. Οι κορυφές στους κυματ αριθμούς 2818 cm⁻¹ και 2773 cm⁻¹ αντιστοιχούν σε δονήσεις έκτασης δεσμών της ομάδας της τριτοταγούς αμίνης -N(CH₃)₂ του DMAEMA. Η κορυφή που εμφανίζεται στα 1726 cm⁻¹ αντιστοιχεί σε δονήσεις έκτασης του καρβονυλίου της εστερικής ομάδας των τριών μονομερών. Στα 1453 cm⁻¹ παρατηρείται μια ασύμμετρη κάμψη που αντιστοιχεί στους δεσμούς C-H των CH₂. Στα 1102 cm⁻¹ παρατηρείται μια δόνηση έκτασης δεσμών της ομάδας O=C-O. Ωστόσο, σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, σε αυτούς τους κυματ αριθμούς αναμένεται και η δόνηση έκτασης δεσμού του C-N. Θεωρούμε, λοιπόν, ότι υπάρχει αλληλοεπικάλυψη των κορυφών, με αποτέλεσμα να μην μπορούμε να διακρίνουμε ποια μπάντα αντιστοιχεί σε κάθε μία από τις δύο χημικές ομάδες.

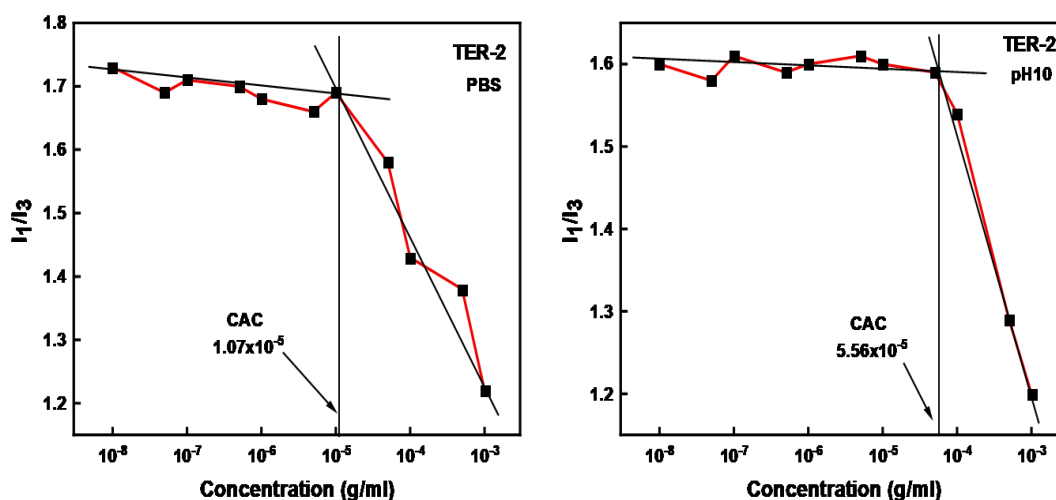
Με βάση και πάλι τα βιβλιογραφικά στοιχεία, θεωρούμε ότι είναι πιο ισχυρή η κορυφή δόνησης O=C-O.

4.3 Μελέτη αυτο-οργάνωσης των συμπολυμερών σε υδατικά διαλύματα

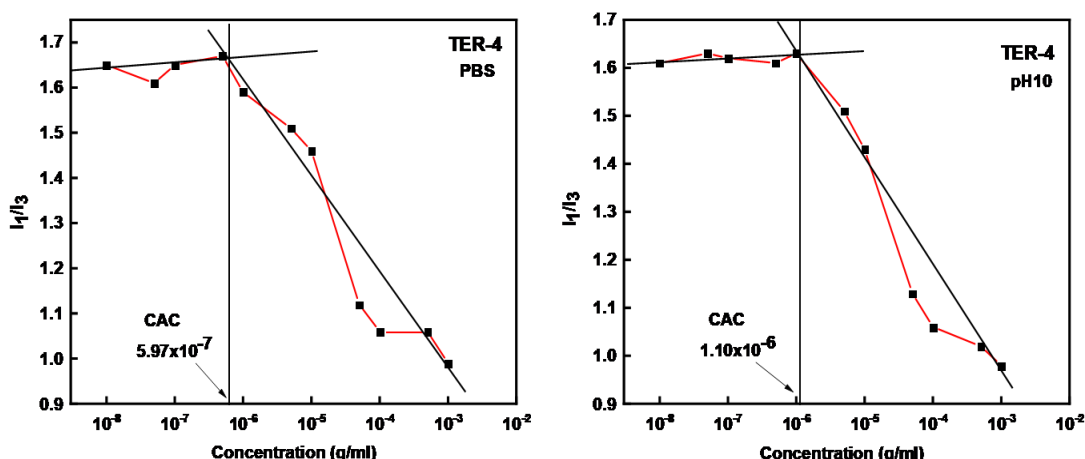
Η αυτο-οργάνωση των αμφίφιλων συμπολυμερών σε υδατικά μέσα πραγματοποιήθηκε με την απευθείας διάλυση των συμπολυμερών σε νερό σε pH=7 και περαιτέρω ρύθμιση του pH σε pH=3 και pH=10, καθώς και σε PBS (pH=7.4).

Το πρωτόκολλο σχηματισμού συσσωματωμάτων ήταν κοινό και για τα πέντε συμπολυμερή. Τα διαλύματα μετρήθηκαν την επόμενη ημέρα από την παρασκευή τους, έτσι ώστε να βρίσκονται σε μεγαλύτερη ισορροπία. Μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού διερευνήθηκε αν τα υδατικά διαλύματα σχημάτισαν συσσωματώματα, υπολογίζοντας την κρίσιμη συγκέντρωση σχηματισμού συσσωματωμάτων (CAC). Η μελέτη αυτή έγινε για να βρεθεί πως επηρεάζει η τυχαία διευθέτηση των μονομερών το σχηματισμό συσσωματωμάτων. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με εγκλωβισμό πυρενίου στο υδρόφοβο τμήμα των συμπολυμερών. Αύξηση του υδρόφοβου συστατικού σημαίνει και μεγαλύτερο ποσοστό εγκλωβισμού πυρενίου στα συσσωματώματα και άρα μικρότερο λόγο I_1/I_3 .

Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά τα διαγράμματα δύο εκ των πέντε συμπολυμερών, ενός με αυξημένο ποσοστό υδρόφοβου μονομερούς (TER-4) και ενός με μικρότερο ποσοστό (TER-2), σε PBS και σε pH=10.



Σχήμα 4.6: Διαγράμματα CAC για το TER-2 συμπολυμερές σε PBS (αριστερά) και σε pH=10 (δεξιά)



Σχήμα 4.7: Διαγράμματα CAC για το συμπολυμερές TER-4 σε PBS (αριστερά) και σε pH=10 (δεξιά)

Στα διαγράμματα παρατηρούμε καθαρά το πλατό σε χαμηλές συγκεντρώσεις, όπου δεν έχουν σχηματιστεί συσσωματώματα, περιοχές μετάβασης σε ενδιάμεσες συγκεντρώσεις και περιοχές σε υψηλές συγκεντρώσεις, όπου έχουμε σχηματισμό συσσωματωμάτων. Από το πρώτο σημείο καμπής των δύο νοητών ευθειών, όπως φαίνεται και στα διαγράμματα, προσδιορίζεται η CAC. Βλέπουμε πως οι τιμές CAC στο TER-2 συμπολυμερές είναι μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες του TER-4, κάτι που οφείλεται στο ποσοστό του υδρόφοβου μονομερούς.

Οι τιμές CAC για κάθε συμπολυμερές δίνονται στον Πίνακα 4.2. Χαρακτηριστικά μικρότερη τιμή CAC παρουσιάζει το TER-4 συμπολυμερές, με το μεγαλύτερο ποσοστό σε υδρόφοβο LMA. Αντίστοιχες μειώσεις παρατηρούμε και στο λόγο I_1/I_3 ανάλογα με το ποσοστό του LMA.

Εκτός από τη σύσταση σε υδρόφοβο συστατικό, σημαντική είναι και η απόκριση του pH – αποκρίσιμου PDMAEMA.

- Σε pH=10 η αποπρωτονίωση του PDMAEMA έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της υδροφοβικότητας των συμπολυμερών και την παράλληλη μείωση της πολικότητας στο μέσο (η οποία εκφράζεται με μείωση στο λόγο I_1/I_3). Συνεπώς, το πυρένιο εγκλωβίζεται στα συσσωματώματα και η ένταση εκπομπής μειώνεται.
- Σε PBS έχουμε μερική πρωτονίωση του PDMAEMA και μετάβαση σε αρκετά υδρόφιλη κατάσταση. Ως εκ τούτου, ο λόγος εντάσεων θα παρουσιάσει αύξηση.
- Σε pH=3 έχουμε πλήρη πρωτονίωση, με αποτέλεσμα το PDMAEMA να γίνεται ακόμα πιο υδρόφιλο και άρα να έχουμε σημαντική αύξηση στο λόγο I_1/I_3 .

Στον Πίνακα 4.2 φαίνεται ξεκάθαρα αυτή η μεταβολή και είναι ανάλογη της σύστασης του κάθε συμπολυμερούς ως προς το υδρόφιλο DMAEMA, σε συνδυασμό πάντα και με το αντίστοιχο ποσοστό σε υδρόφοβο LMA. Στην επόμενη ενότητα αναλύεται εκτενέστερα η συμπεριφορά του συστήματος συναρτήσει θερμοκρασίας και pH.

Οι μετρήσεις φασματοσκοπίας φθορισμού έγιναν στους 25°C που προηγείται της θερμοκρασίας μετάβασης του PDMAEMA σε υδρόφοβη κατάσταση και στους 55°C, μια θερμοκρασία μετά τη θερμοκρασία μετάβασής του. Με βάση αυτά θα περιμέναμε ο λόγος I_1/I_3 να είναι μικρότερος στους 55°C απ' ό τι στους 25°C, υποδεικνύοντας την αύξηση της υδροφοβικότητας του PDMAEMA. Ωστόσο, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 4.2 δεν παρατηρήθηκαν αντίστοιχες διακυμάνσεις στις τιμές σε όλες τις περιπτώσεις συμπολυμερών και pH και αυτό οφείλεται και στην ύπαρξη του υδρόφοβου LMA.

Πίνακας 4.2: Τιμές CAC και λόγοι I_1/I_3 για τα στατιστικά συμπολυμερή P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) στους 25 °C και 55°C

Δείγμα	pH	I_1/I_3		CAC
		25 °C	55 °C	
TER-1 (66-10-24)	pH3	1.39	1.41	-
	PBS	1.17	1.24	9.24×10^{-6}
	pH10	1.15	1.21	1.04×10^{-5}
TER-2 (62-11-27)	pH3	1.38	1.35	-
	PBS	1.22	1.28	1.07×10^{-5}
	pH10	1.20	1.23	5.56×10^{-5}
TER-3 (35-29-36)	pH3	1.17	1.19	-
	PBS	1.01	0.94	4.46×10^{-6}
	pH10	1.00	1.00	4.26×10^{-6}
TER-4 (20-48-32)	pH3	1.05	1.03	-
	PBS	0.99	0.92	5.97×10^{-7}
	pH10	0.98	0.99	1.10×10^{-6}
TER-5 (49-27-24)	pH3	1.23	1.20	-
	PBS	1.00	1.03	1.17×10^{-5}
	pH10	1.01	1.00	7.53×10^{-6}

4.3.1 Επίδραση pH και θερμοκρασίας

Το PDMAEMA σύμφωνα με τη βιβλιογραφία^[60, 61] είναι μια ασθενής πολυβάση και συμπεριφέρεται ως αποκρινόμενος κατιοντικός πολυηλεκτρολύτης, λόγω της ισορροπίας μεταξύ πρωτονίωσης – αποπρωτονίωσης της αμινομάδας, η οποία εξαρτάται από την τιμή του pH.

Σε ουδέτερο pH πραγματοποιείται μερική πρωτονίωση της αμινομάδας, με αποτέλεσμα το ομοπολυμερές να παρουσιάζει υδρόφιλο χαρακτήρα και τα σωματίδια που υπάρχουν στο διάλυμα να βρίσκονται σε μορφή ελεύθερων αλυσίδων (unimers). Αυξάνοντας το pH σε τιμές κοντά στο 10 έχουμε πλήρη αποπρωτονίωση των αμινομάδων, με αποτέλεσμα τη μείωση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και το σχηματισμό συσσωματωμάτων (aggregates). Μείωση του pH σε όξινες τιμές (~ 3) έχει σαν αποτέλεσμα την πλήρη πρωτονίωση των αμινομάδων και ακολούθως την αύξηση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και την περαιτέρω αύξηση της υδροφιλικότητας του ομοπολυμερούς. Συνεπώς, σε όξινες τιμές pH, το PDMAEMA θα είναι περισσότερο διαλυτό απ' ότι σε βασικές τιμές και άρα αναμένονται σωματίδια μικρότερης μάζας.

Στην περίπτωση των τριπολυμερών, όπου υπάρχει DMAEMA ως συστατικό τους, αναμένεται ανάλογη εξάρτηση των ιδιοτήτων των συστημάτων ως προς την αυτο-οργάνωση, ανάλογα με τις μεταβολές στο pH και την πρωτονίωση – αποπρωτονίωση των αμινομάδων.^[60, 61]

Φυσικά, στην περίπτωση των συμπολυμερών η εξάρτηση αυτή από το pH επηρεάζεται και από άλλες παραμέτρους, όπως είναι το μοριακό βάρος η συγκέντρωση, η σύσταση, η αρχιτεκτονική, καθώς και τα υδρόφοβα τμήματα που μπορεί να υπάρχουν.

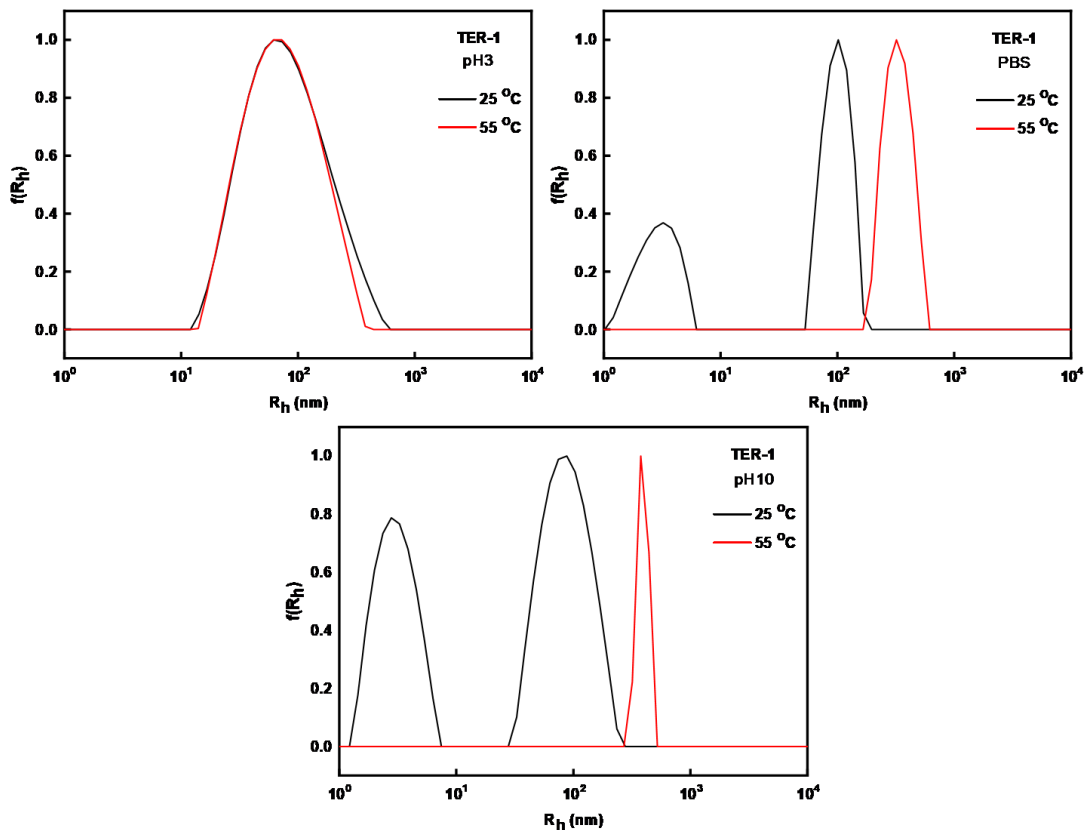
Επιπρόσθετα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, το PDMAEMA αποτελεί και ένα θερμοαποκρινόμενο ομοπολυμερές με βάση τη βιβλιογραφία.^[62] Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζει LCST στην περιοχή 32-50°C στο νερό. Επομένως, σε θερμοκρασίες κάτω από της LCST θα είναι υδρόφιλο, με τις αλυσίδες διαλυμένες στο νερό και κυρίαρχες τις αλληλεπιδράσεις πολυμερούς – διαλύτη, έναντι αυτών πολυμερούς – πολυμερούς (δεν παρουσιάζονται συσσωματώματα). Αντίθετα, σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες το PDMAEMA

αποκτά μερικώς υδρόφοβη συμπεριφορά. Με αύξηση της θερμοκρασίας διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ πολυμερούς και διαλύτη και υπερισχύουν οι αλληλεπιδράσεις πολυμερούς – πολυμερούς. Η ακριβής τιμή της LCST εξαρτάται από το μοριακό βάρος, τη συγκέντρωση, την ιοντική ισχύ αλλά και το pH, αφού σε ορισμένες τιμές pH (σημαντικά όξινη περιοχή) ενδέχεται να μην υπάρχει θερμοκρασιακή απόκριση. [63]

Αξίζει να σημειωθεί πως το LMA αποτελεί το υδρόφοβο συστατικό των συμπολυμερών, δεν είναι θερμοαποκρινόμενο, όμως συμβάλλει στην αυτο-οργάνωση των συσσωματωμάτων. Επιπλέον, το OEGMA είναι το υδρόφιλο συστατικό που επίσης δεν αποκρίνεται σε θερμοκρασιακές μεταβολές. Διαδραματίζει, ωστόσο, σημαντικό ρόλο στην αυτο-οργάνωση, αφού αποτελεί το εξωτερικό τμήμα των συσσωματωμάτων, περικλείει το υδρόφοβο τμήμα, το σταθεροποιεί και το αποτρέπει από την καταβύθιση. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ο σημαντικός ρόλος της αρχιτεκτονικής των συσσωματωμάτων. Πρόκειται για συστήματα με τυχαία διευθέτηση των μονομερικών μονάδων κατά μήκος της πολυμερικής αλυσίδας, οπότε δεν μπορεί να είναι απόλυτα ξεκάθαρη η τελική μορφολογία τους.

Για τον προσδιορισμό της φαινόμενης υδροδυναμικής ακτίνας (R_h) και του δείκτη πολυδιασποράς μεγεθών (PDI) των συσσωματωμάτων έγιναν μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη χρήση του αλγορίθμου CONTIN και τη μέθοδο των αθροισμάτων. Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά διαγράμματα κατανομής μεγεθών των συσσωματωμάτων (CONTIN) για δύο από τα πολυμερή που συντέθηκαν σε διαφορετικά pH (σχήμα 4.8).

Για το TER-1 συμπολυμερές σε pH=3 παρατηρούμε, τόσο στους 25°C όσο και στους 55°C, μια σχετικά πλατιά κατανομή που υποδεικνύει έναν πληθυσμό στο διάλυμα, ο οποίος οφείλεται στην ύπαρξη ελεύθερων αλυσίδων, πλήρως πρωτονιωμένων. Η αύξηση της θερμοκρασίας σε αυτή την κατάσταση δε δείχνει να επηρεάζει το R_h . Σε PBS στους 25°C παρατηρούμε δύο πληθυσμούς, διαφορετικού μεγέθους. Ένα μέρος του συστήματος βρίσκεται ακόμα υπό τη μορφή ελεύθερων αλυσίδων, ενώ το υπόλοιπο υπό τη μορφή συσσωματωμάτων που έχουν σχηματιστεί λόγω της μερικής αποπρωτονίωσης του PDMAEMA.



Σχήμα 4.8: Διαγράμματα CONTIN για το TER-1 συμπολυμερές στις διαφορετικές τιμές pH συναρτήσει της θερμοκρασίας

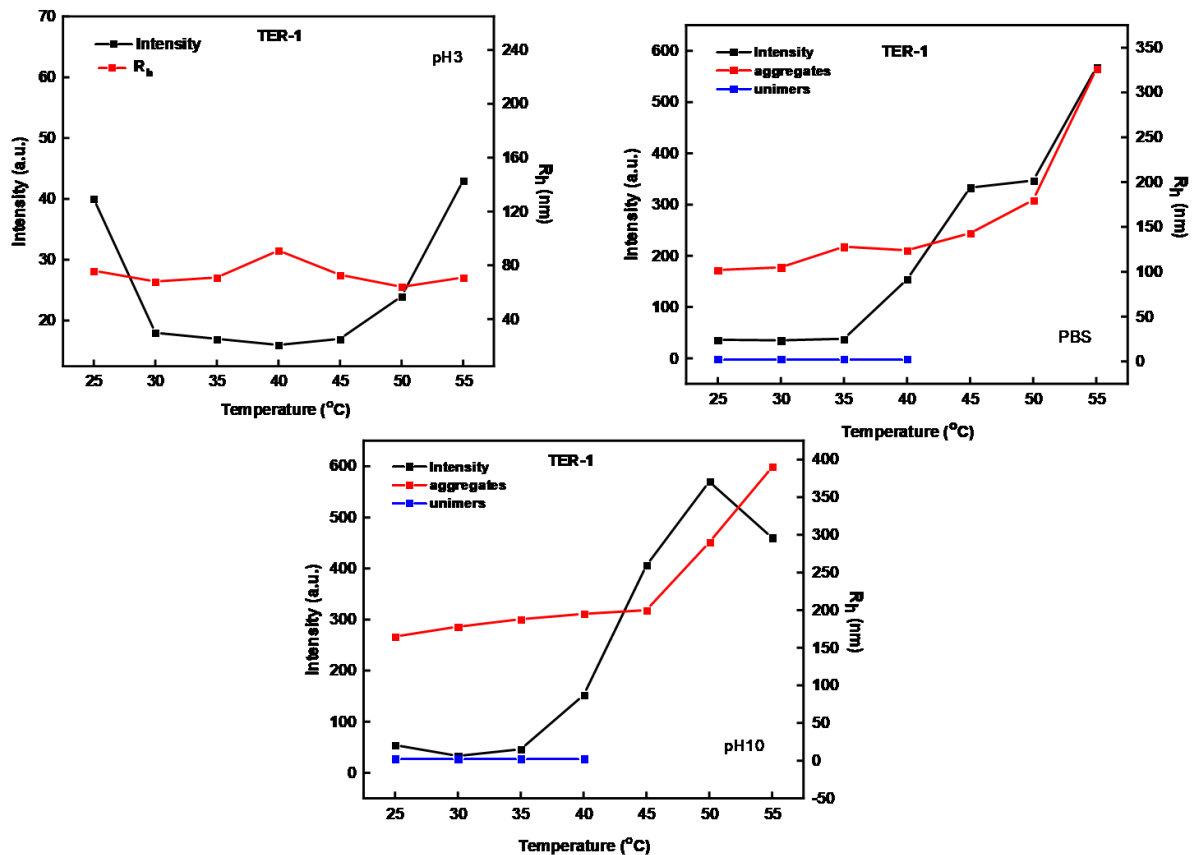
Στους 55°C το σύστημα μεταβαίνει σε έναν πλέον πληθυσμό, με μέγεθος μεγαλύτερο των δύο προηγούμενων. Αυτό οφείλεται σε περαιτέρω συσσωμάτωση των σωματιδίων, η οποία είναι αποτέλεσμα της μείωσης της υδροφιλικότητας του PDMAEMA με αύξηση της θερμοκρασίας. Σε pH=10 παρατηρούνται πάλι δύο πληθυσμοί στους 25°C, με μετάβαση σε ένα πληθυσμό και πάλι στους 55°C. Προφανώς, η αύξηση της θερμοκρασίας και εδώ ευνοεί τη συσσωμάτωση των σωματιδίων προς μεγαλύτερα συσσωματώματα. Η πρώτη κορυφή σε PBS παραμένει και αυξάνεται σε pH=10 πιθανώς λόγω συσσωμάτωσης και εδώ των ελεύθερων αλυσίδων που ίσως είχαν απομείνει, δίνοντας συσσωματώματα μικρότερου μεγέθους. Το περιβάλλον είναι πλέον αλκαλικό, με πλήρως αποπρωτονιωμένο το

PDMAEMA και ως εκ τούτου θα έχουμε αύξηση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.

Ακολουθούν τα αντίστοιχα διαγράμματα της έντασης σκεδάσεως (I) και της υδροδυναμικής ακτίνας (R_h) συναρτήσει της θερμοκρασίας (σχήμα 4.9).

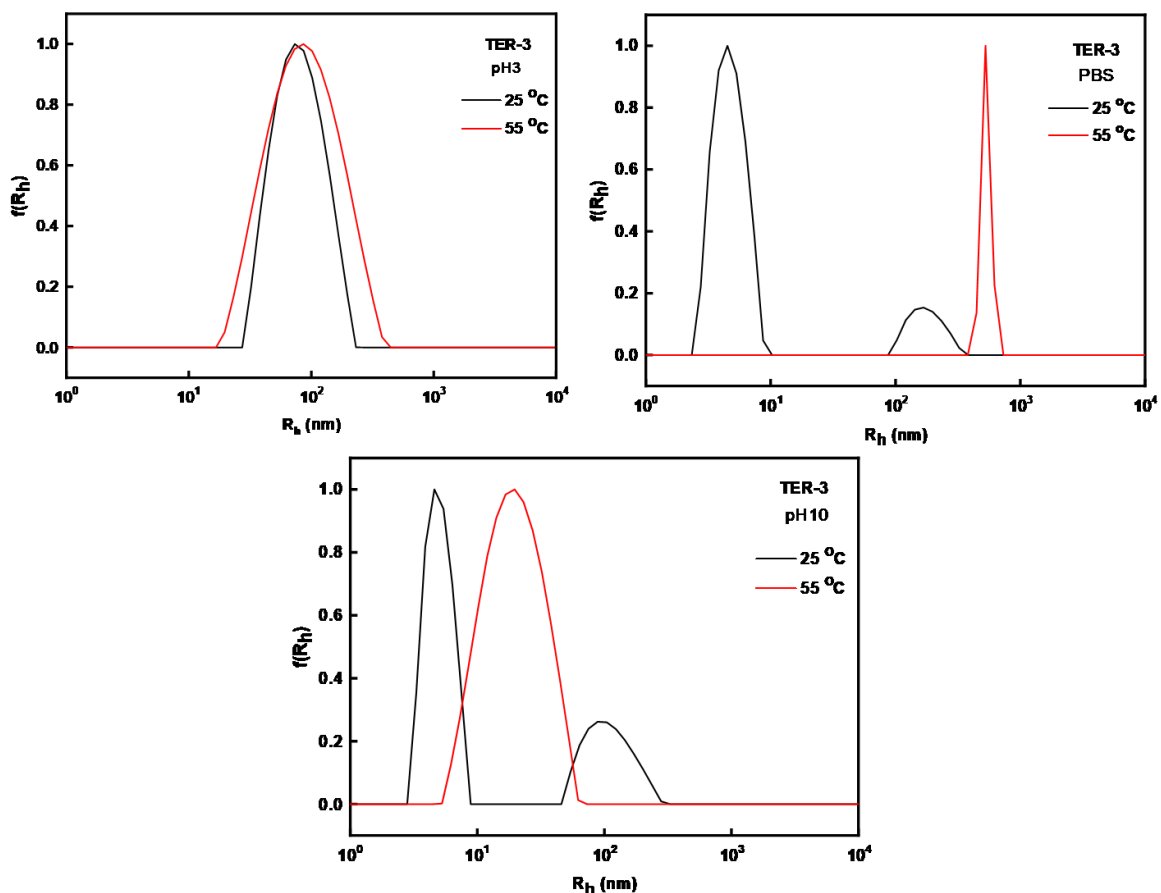
Σημαντική είναι η συμπεριφορά του συστήματος όταν μεταβαίνει από $pH=3$ σε PBS. Στο διάλυμα συνυπάρχουν οι δύο πληθυσμοί, ελεύθερες αλυσίδες (unimers) και συσσωματώματα (aggregates). Σταδιακά, με αύξηση της θερμοκρασίας, κυριαρχούν τα συσσωματώματα, όπως και ήταν άλλωστε αναμενόμενο αφού αυξάνεται η υδροφοβικότητα του συστήματος. Αντίστοιχα, αυξάνεται η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, κάτι το οποίο υποδηλώνει αύξηση της μάζας των σχηματιζόμενων σωματιδίων. Αυτό σχετίζεται και με την ύπαρξη άλατος στο διάλυμα. Ανάλογη συμπεριφορά παρουσιάζει το σύστημα και σε $pH=10$, πάλι με επικράτηση συσσωματωμάτων και αύξηση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία.

Όπως φαίνεται και στα διαγράμματα, η θερμοκρασία των $35^\circ C$ είναι θερμοκρασία μετάβασης για το σύστημα για διαλύματα σε PBS και σε $pH=10$. Έχουμε απότομη αύξηση της έντασης σκεδαζόμενης ακτινοβολίας και άρα αύξηση στη μάζα των σχηματιζόμενων συσσωματωμάτων με παράλληλη αύξηση στο R_h .



Σχήμα 4.9: Διαγράμματα έντασης σκεδάσεως (I) και υδροδυναμικής ακτίνας (R_h) συναρτήσει της θερμοκρασίας για το TER-1 συμπολυμερές

Στην περίπτωση του TER-3 συμπολυμερούς έχουμε μείωση της περιεκτικότητας σε DMAEMA σχεδόν στο μισό και αύξηση τόσο του υδρόφοβου LMA όσο και του υδρόφιλου OEGMA (και τα δύο μη αποκρινόμενα σε θερμοκρασία και pH).

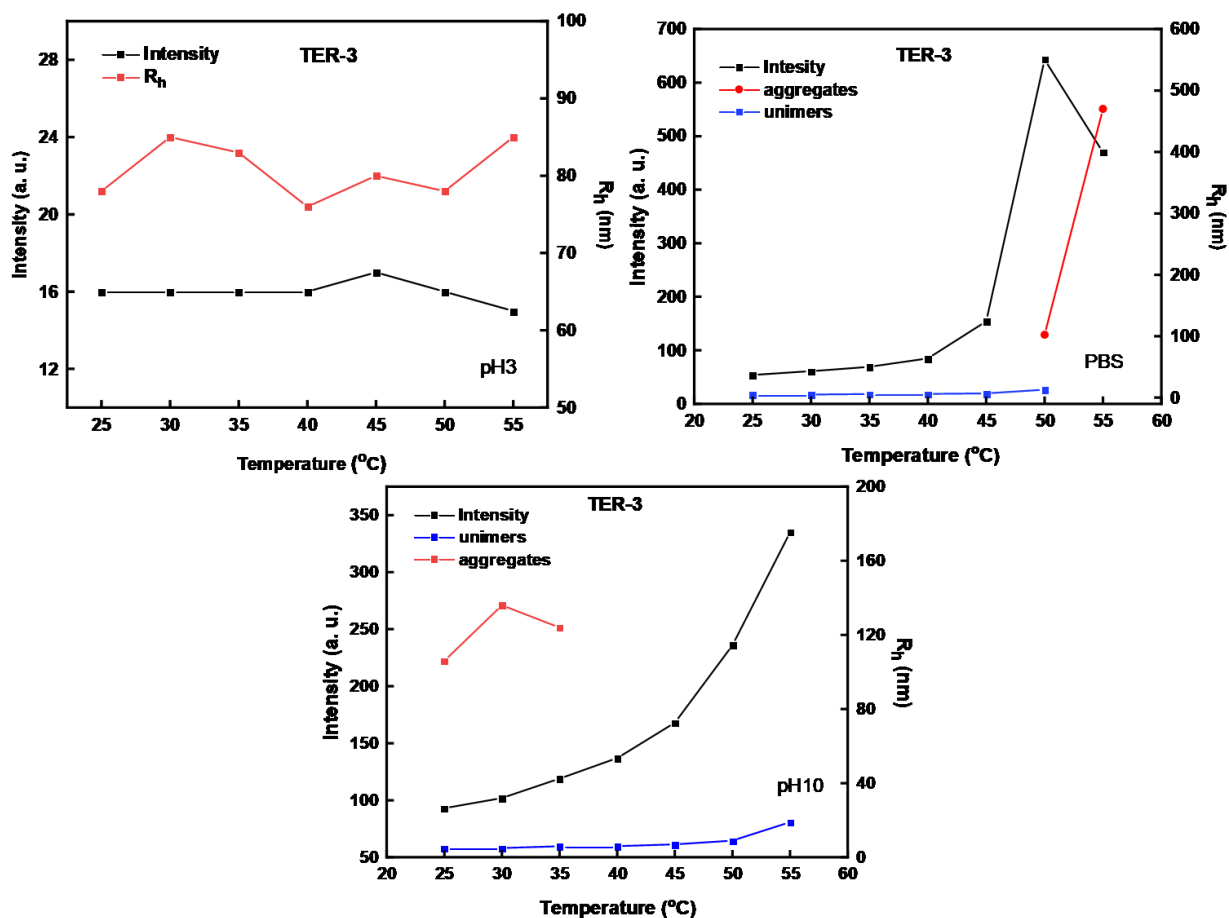


Σχήμα 4.10: Διαγράμματα CONTIN για το TER-3 συμπολυμερές στις διαφορετικές τιμές pH συναρτήσει της θερμοκρασίας

Αρχικά, σε $\text{pH}=3$ έχουμε έναν πληθυσμό, όπως και προηγουμένως, με σχετικά πλατιά κατανομή και στις δύο θερμοκρασίες. Σε PBS στους 25°C παρατηρούμε δύο πληθυσμούς που ακολούθως, με αύξηση θερμοκρασίας στους 55°C , μεταβαίνουν σε έναν πληθυσμό, με επικράτηση σωματιδίων με μεγαλύτερες διαστάσεις. Σε $\text{pH}=10$ και πάλι παρουσιάζονται δύο πληθυσμοί στους 25°C και στους 55°C επικρατεί τελικά ένας με ενδιάμεσες διαστάσεις.

Παρατηρώντας και τα διαγράμματα έντασης και υδροδυναμικής ακτίνας συναρτήσει της θερμοκρασίας (σχήμα 4.11) βλέπουμε πως το σύστημα δείχνει σταθερότητα σε $\text{pH}=3$, ενώ σε PBS μετά τους 35°C είναι σημαντική τόσο η αύξηση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας όσο και η επικράτηση συσσωματωμάτων, έναντι των unimers. Συνεπώς, έχουμε και

αύξηση στη μάζα. Σε pH=10, ωστόσο, απουσία πλέον άλατος, καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, τα συσσωματώματα παύουν να επικρατούν και δίνουν τη θέση τους σε σωματίδια με μικρότερες διαστάσεις, ενώ παράλληλα συνεχίζει να αυξάνεται η ένταση. Η μείωση της υδροδυναμικής ακτίνας σχετίζεται και με τη συρρίκνωση των αλυσίδων καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία.



Σχήμα 4.11: Διαγράμματα έντασης σκεδάσεως (I) και υδροδυναμικής ακτίνας (R_h) συναρτήσει της θερμοκρασίας για το TER-3 συμπολυμερές

Ακολουθώς, μέσω ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός έγιναν μετρήσεις του ζ-δυναμικού, σε pH=3 και σε pH=10.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, σε όξινο περιβάλλον το PDMAEMA είναι πρωτονιωμένο και βρίσκεται σε κατιοντική μορφή, συνεπώς οι τιμές ζ_p που θα παρουσιάζει θα είναι θετικές, γεγονός το οποίο συμπίπτει και με τα

αποτελέσματά μας (Πίνακας 4.3). Αντιθέτως, σε αλκαλικό περιβάλλον που είναι πλήρως αποπρωτονιωμένο αναμέναμε μείωση στις τιμές ζ_p . Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές που προέκυψαν ήταν αρνητικές και αρκετά μακριά από το μηδέν. Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στις ακραίες ομάδες $-\text{COOH}$ του μέσου μεταφοράς αλυσίδας, οι οποίες λόγω της τυχαίας διευθέτησης εκτίθενται στην επιφάνεια των σωματιδίων και αποπρωτονιώνονται, εμφανίζοντας αρνητικά φορτισμένες ομάδες $-\text{COO}^-$. Παράλληλα, υπάρχει και η πιθανότητα τα αρνητικά φορτία σε $\text{pH}=10$ να οφείλονται σε προσρόφηση ιόντων OH^- στην επιφάνεια των σωματιδίων.

Συγκεντρωτικά για όλα τα συμπολυμερή που συντέθηκαν παρατίθενται πίνακες με όλα τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά στα διαφορετικά pH , καθώς και συναρτήσει της θερμοκρασίας.

Πίνακας 4.3: Αποτελέσματα από DLS και ζ-δυναμικό για τα συσσωματώματα των στατιστικών συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) στους 25°C

Δείγμα	Θ (°C)	pH	Intensity	R _h (nm)	PDI	ζ- δυναμικό (mV)
TER-1 (66-10-24)	25 °C	pH3	40	76	0.6	26.5
		PBS	36	3 / 102	0.6	-
		pH10	54	3 / 165	0.6	-35.5
TER-2 (62-11-27)	25 °C	pH3	22	113	0.6	12.5
		PBS	37	3 / 108	0.5	-
		pH10	21	3	0.6	-30.0
TER-3 (35-29-36)	25 °C	pH3	16	78	0.7	5.0
		PBS	54	5 / 173	0.4	-
		pH10	93	5 / 106	0.4	-18.0
TER-4 (20-48-32)	25 °C	pH3	67	5	0.4	7.0
		PBS	5360	98	0.4	-
		pH10	1016	11	0.2	-29.4
TER-5 (49-27-24)	25 °C	pH3	612	131	0.2	74.2
		PBS	107	5 / 156	0.5	-
		pH10	94	6	0.4	-32.0

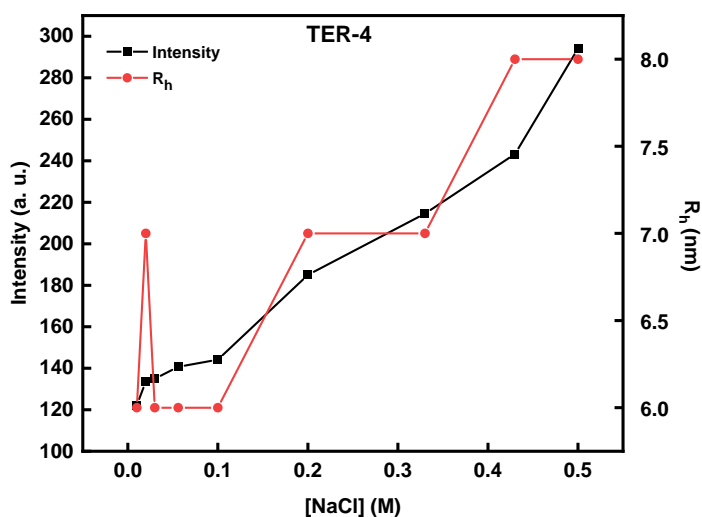
Πίνακας 4.4: Αποτελέσματα από DLS για τα συσσωματώματα των στατιστικών συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) στους 55°C

Δείγμα	Θ (°C)	pH	Intensity	R _h (nm)	PDI
TER-1 (66-10-24)	55 °C	pH3	43	71	0.5
		PBS	567	326	0.3
		pH10	460	390	0.2
TER-2 (62-11-27)	55 °C	pH3	568	112	0.2
		PBS	6340	284	9
		pH10	3940	423	0.07
TER-3 (35-29-36)	55 °C	pH3	15	85	0.6
		PBS	470	532	3
		pH10	335	19	0.2
TER-4 (20-48-32)	55 °C	pH3	60	4	0.4
		PBS	41500	502	0.3
		pH10	1661	12 / 99	0.3
TER-5 (49-27-24)	55 °C	pH3	231	139	0.2
		PBS	12580	124	21
		pH10	911	13	0.11

4.3.2 Επίδραση ιοντικής ισχύος

Η μελέτη επίδρασης ιοντικής ισχύος πραγματοποιήθηκε με προσθήκη NaCl 1M. Έγιναν εννέα προσθήκες διαφορετικών συγκεντρώσεων άλατος στα υδατικά διαλύματα και μέσω δυναμικής σκέδασης φωτός μετρήθηκαν οι μεταβολές της έντασης σκεδάσεως ακτινοβολίας και του R_h με αύξηση της αλατότητας του διαλύματος. Οι μετρήσεις έγιναν και πάλι υπό γωνία 90° , συγκέντρωση πολυμερούς 10^{-3} g/mL, σε pH=7 και σε θερμοκρασία 25°C .

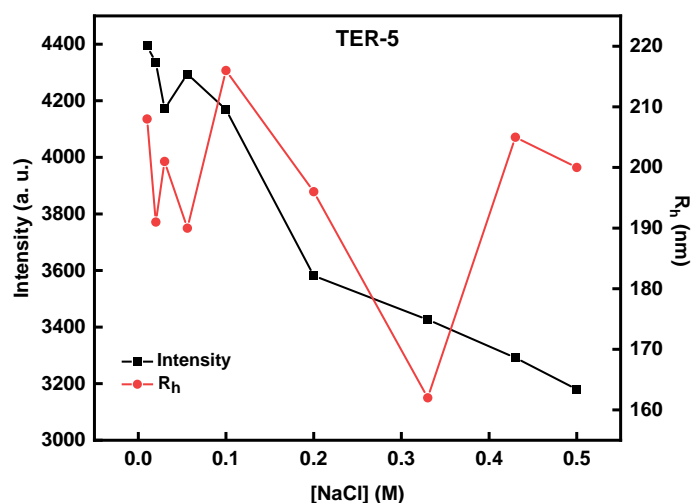
Στο TER-4 συμπολυμερές, που κυριαρχεί το υδρόφοβο συστατικό, παρατηρούμε πως με αύξηση της συγκέντρωσης άλατος παρατηρείται και αύξηση της έντασης σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, καθώς και αύξηση του R_h μετά τις πέντε πρώτες προσθήκες. Λόγω αύξησης της έντασης σκεδαζόμενης ακτινοβολίας γίνεται αντιληπτό ότι υπάρχει και αύξηση του μεγέθους και της μάζας των συσσωματωμάτων. Δεν ευνοούνται οι αλληλεπιδράσεις πολυμερούς – νερού, αντιθέτως υπάρχουν κυρίως αλληλεπιδράσεις πολυμερούς – πολυμερούς.



Σχήμα 4.12: Διάγραμμα ιοντικής ισχύος για το TER-4 συμπολυμερές

Ωστόσο, στο TER-5 συμπολυμερές, το οποίο έχει μεγαλύτερο ποσοστό DMAEMA και μικρότερο σε LMA δεν παρατηρείται η ίδια τάση. Αρχικά, το σύστημα παρουσιάζει μια τάση για συσσωμάτωση με αύξηση του R_h , όμως μετά τις πέντε πρώτες προσθήκες έχουμε μείωση της έντασης σκεδαζόμενης

ακτινοβολίας που συμπίπτει και με μείωση του R_h , συνεπώς έχουμε μείωση του μεγέθους των σωματιδίων.



Σχήμα 4.13: Διάγραμμα ιοντικής ισχύος για το TER-5 συμπολυμερές

Το PDMAEMA ως ασθενής πολυβάση και όσο μειώνεται το pH βρίσκεται σε κατιοντική μορφή, παρουσιάζοντας ασθενείς ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων του πολυμερούς όσο αυξάνεται η συγκέντρωση άλατος. Σαν αποτέλεσμα, συμβαίνει «κατάρρευση» του συστήματος, αποσυσσωμάτωση δηλαδή κι εκεί οφείλεται και η μείωση στο μέγεθος και την σκεδαζόμενη ένταση φωτός. Οι τελικές τιμές R_h , οι οποίες φαίνονται σχετικά μεγαλύτερες, πιθανόν να οφείλονται σε διαλύτη, ο οποίος έχει εισχωρήσει στο εσωτερικό των συσσωματωμάτων (swelling) λόγω χαλάρωσης των δομών παρουσία άλατος.

Ανάλογη μελέτη έχει γίνει στο εργαστήριο από το διδάκτορα Αθανάσιο Σκανδάλη, ο οποίος συνέθεσε αντίστοιχα τριπολυμερή κατά συστάδες, P(DMAEMA-*b*-LMA-*b*-OEGMA). Έγιναν ομοίως μελέτες δυναμικής σκέδασης φωτός, φασματοσκοπίας φθορισμού και ζ_p .

Οι κατανομές και εδώ ήταν κοντά στη μονάδα, ωστόσο, μεγαλύτερες απ' ότι στα στατιστικά συμπολυμερή που συνθέσαμε. Όπως και στην παρούσα περίπτωση, έγινε σύνθεση συμπολυμερών με διαφορετική σύσταση σε κάθε μονομερές και μελέτη ιδιοτήτων. Στα κατά συστάδες συμπολυμερή

παρατηρήθηκε σε όλα αυστηρά ένας πληθυσμός και σημαντικά χαμηλότερο PDI, ενώ οι τιμές ζ_p ήταν σε όλες τις περιπτώσεις θετικές. Συγκρίνοντας με τα στατιστικά συμπολυμερή, οι τιμές R_h ήταν σημαντικά μεγαλύτερες. Αξίζει να αναφερθεί, ωστόσο, ότι οι μελέτες συναρτήσει pH και θερμοκρασίας στα κατά συστάδες συμπολυμερή δεν έδωσαν σημαντικές μεταβολές ως προς τη μάζα των συσσωματωμάτων και το μέγεθός τους. Πιθανώς, λόγω μίξης στην κορόνα του DMAEMA με το OEGMA και καλύτερης οργάνωσης των αλυσίδων στα μικκυλιακά συσσωματώματα.

Συμπεραίνουμε, λοιπόν, πως η μακρομοριακή αρχιτεκτονική είναι καθοριστικός παράγοντας για τη συμπεριφορά αυτο-οργάνωσης των διάφορων συστημάτων σε εξωτερικά φυσικοχημικά ερεθίσματα, όπως το pH και η θερμοκρασία.

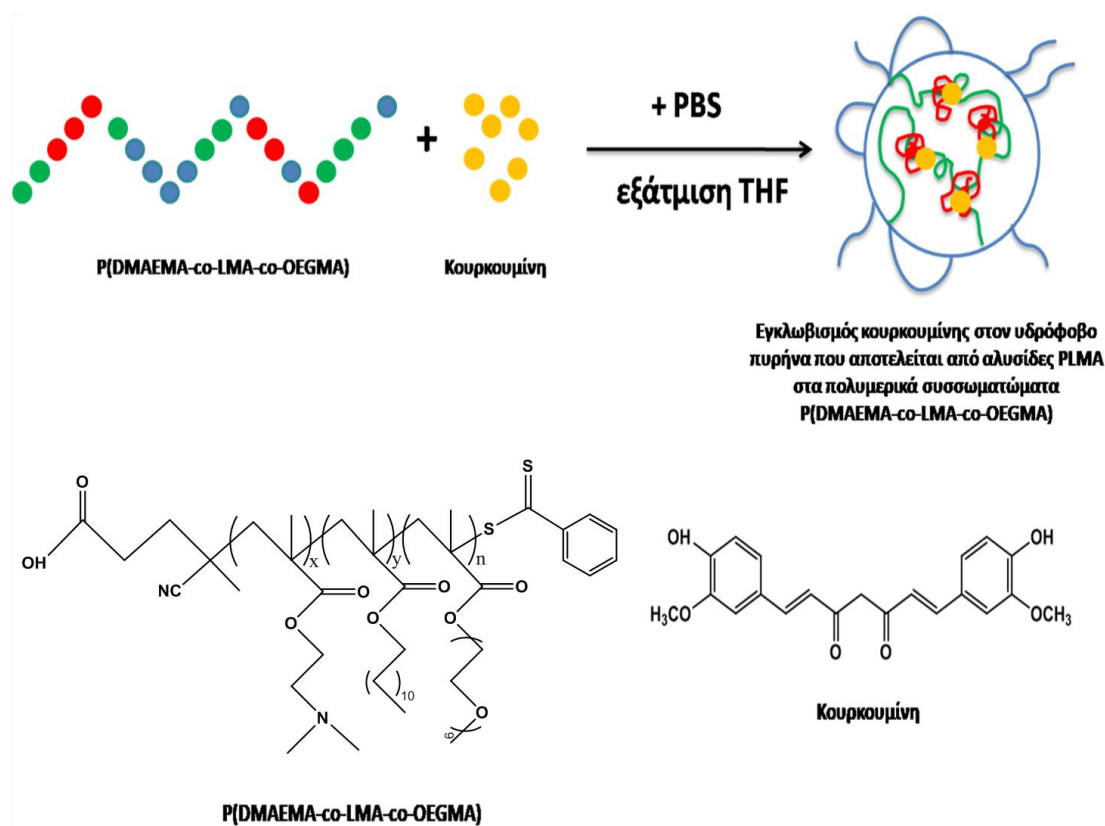
4.4 Εγκλωβισμός κουρκουμίνης στα συσσωματώματα των P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) τριπολυμερών ^[30,31,64,65]

Η κουρκουμίνη είναι μια πολυφαινολική ένωση, προερχόμενη ως δευτερογενής μεταβολίτης από το φυτό *Curcuma longa*. Έχει δείξει θεραπευτικές ιδιότητες, αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση. Ταυτόχρονα, έχει πολύ μικρή διαλυτότητα στο νερό, χαρακτηριστικό που την καθιστά αρκετά υδρόφοβη.

Στην προσπάθειά να μελετηθεί η ικανότητα των τριπολυμερών να δρουν ως φορείς φαρμακευτικών ουσιών, επιχειρήθηκε να εγκλωβιστεί κουρκουμίνη στον υδρόφοβο πυρήνα των συσσωματωμάτων. Μελετήθηκαν εκ νέου οι ιδιότητες των συστημάτων που προέκυψαν, όπως και στα κενά νανοσωματίδια, με δυναμική σκέδαση φωτός, φασματοσκοπία φθορισμού και φασματοσκοπία UV-Vis.

Ο εγκλωβισμός δοκιμάστηκε αρχικά και στα πέντε συμπολυμερή, καθώς λόγω διαφορετικής σύστασης και στατιστικής διευθέτησης των μονομερών, δεν είναι δυνατό να προβλεφθεί με σιγουριά η συμπεριφορά των συστημάτων. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 3.5. Εφαρμόστηκαν δύο πρωτόκολλα για να διευκρινιστεί σε ποιο αποκρίνονται καλύτερα τα συστήματα. Παρατίθεται σχηματική απεικόνιση του

εγκλωβισμού της κουρκουμίνης στα συσσωματώματα, καθώς και οι χημικές δομές του πολυμερούς και της κουρκουμίνης.

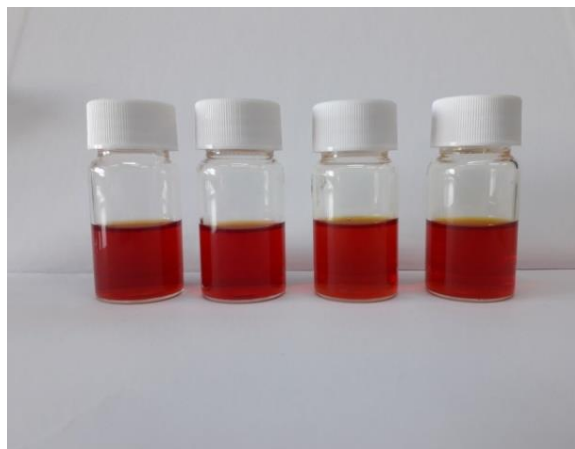


Σχήμα 4.14: Σχηματική αναπαράσταση εγκλωβισμού της κουρκουμίνης από τα πολυμερικά συσσωματώματα (πάνω) και οι δομές πολυμερούς (κάτω αριστερά) και κουρκουμίνης (κάτω δεξιά)

Το ποσοστό της κουρκουμίνης που εγκλωβίστηκε υπολογίστηκε με βάση την κατά βάρος χημική σύσταση των συμπολυμερών σε LMA και το ποσοστό της κουρκουμίνης που επιχειρήθηκε να εγκλωβιστεί, κατά βάρος. Παρασκευάστηκαν δείγματα με μέγιστο ποσοστό εγκλωβισμού 10% w/w και 20% w/w, για όλα τα συμπολυμερή σε PBS. Η τελική συγκέντρωση των διαλυμάτων ως προς το συμπολυμερές, μετά την εξάτμιση του διαλύτη (THF), ήταν 10^{-3} g/mL.

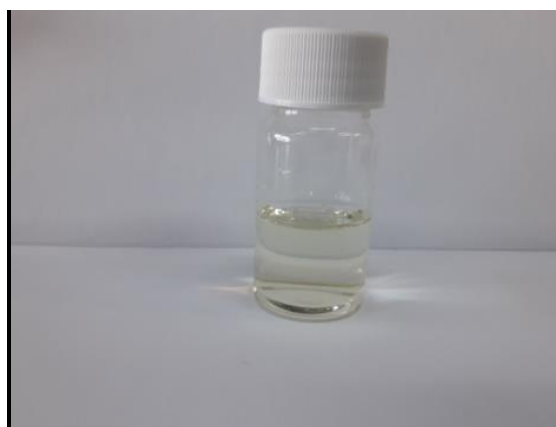
Σαν πρώτη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία UV-Vis για να μελετηθεί το σήμα απορρόφησης της κουρκουμίνης. Αυτό ήταν βέβαια ορατό

και με γυμνό μάτι, καθώς τα διαλύματα είχαν χρωματιστεί σε σκούρο πορτοκαλί – ερυθρό χρώμα (εικόνα 4.1).



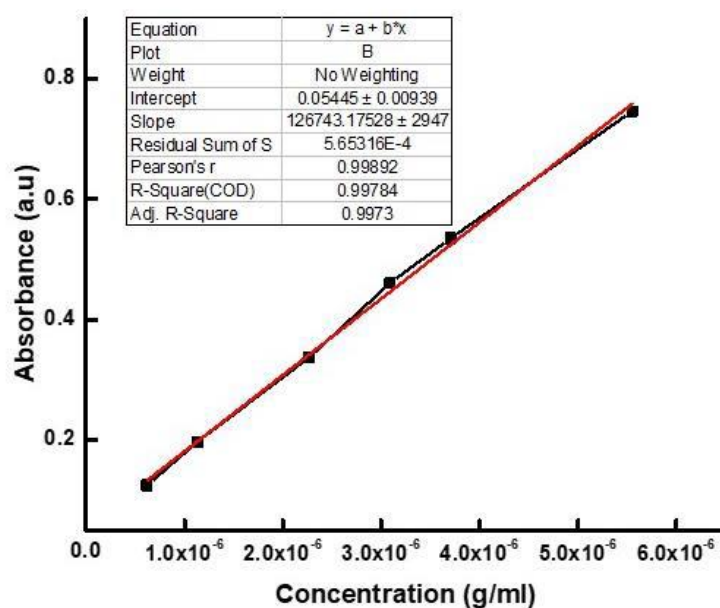
Εικόνα 4.1: Σταθερά διαλύματα τριπολυμερών – κουρκουμίνης

Γενικά, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι με αύξηση του ποσοστού του LMA μονομερούς θα υπήρχε και αύξηση του ποσοστού εγκλωβισμού στον υδρόφοβο πυρήνα. Ωστόσο, αυτό δεν αποτελεί μοναδική προϋπόθεση, καθώς η δομή και η σταθερότητα του συστήματος εξαρτώνται σημαντικά και από το ποσοστό του OEGMA μονομερούς. Έτσι, μπορεί να εξηγηθεί το γεγονός ότι το TER-4 συμπολυμερές δεν παρουσίασε σταθερότητα και συνεπώς δεν εγκλώβισε κουρκουμίνη. Μοναδική μέτρηση που πραγματοποιήθηκε στο συγκεκριμένο δείγμα ήταν μέσω φασματοσκοπίας UV-Vis, όπου καταγράφηκε σχεδόν μηδενικό σήμα απορρόφησης της κουρκουμίνης στο διάλυμα (εικόνα 4.2).



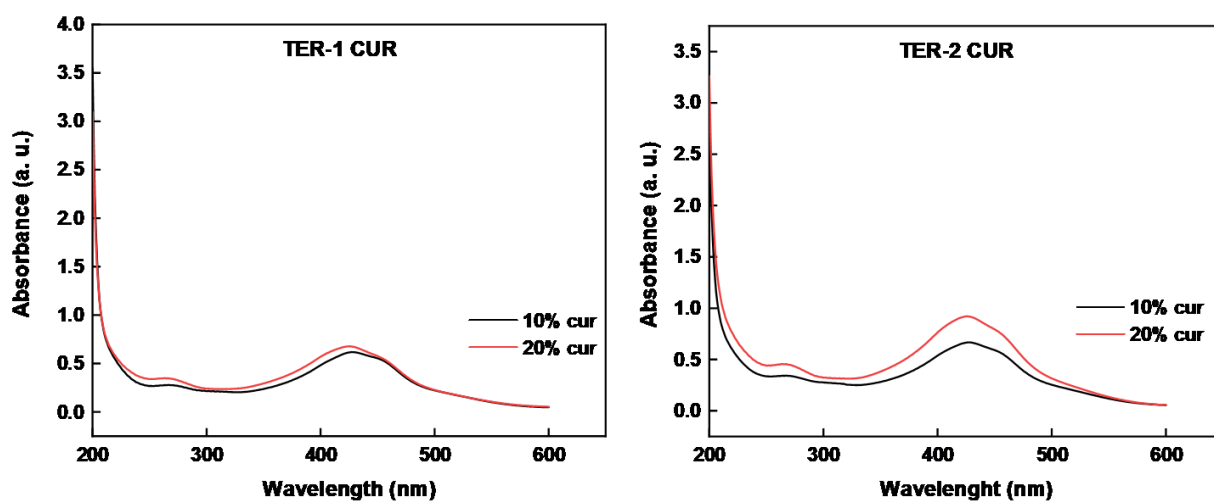
Εικόνα 4.2: Διάλυμα TER-4 τριπολυμερούς – κουρκουμίνης

Για τα υπόλοιπα δείγματα, λάβαμε τα σήματα απορρόφησης UV-Vis, από τα οποία και υπολογίστηκε το ποσοστό εγκλωβισμού του φαρμάκου σε κάθε τριπολυμερές, με τη χρήση καμπύλης αναφοράς. Η καμπύλη αναφοράς της κουρκουμίνης σε διαλύτη THF (σχήμα 4.15) κατασκευάστηκε μετρώντας την απορρόφηση σε $\lambda_{\max}=420$ nm για έξι δείγματα κουρκουμίνης διαφορετικών συγκεντρώσεων όπως φαίνεται παρακάτω.



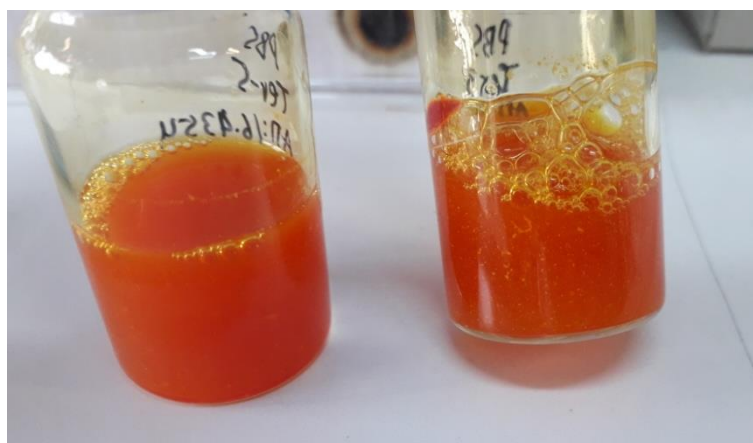
Σχήμα 4.15: Καμπύλη βαθμονόμησης κουρκουμίνης σε THF

Στα φάσματα UV-Vis για το TER-1 και το TER-2 συμπολυμερές παρατηρούμε πως η αύξηση στο ποσοστό της κουρκουμίνης δεν οδηγεί σε ανάλογη αύξηση στο σήμα απορρόφησης. Στο TER-2 τριπολυμερές, ωστόσο, υπάρχει μια μεγαλύτερη μεταβολή (σχήμα 4.16).

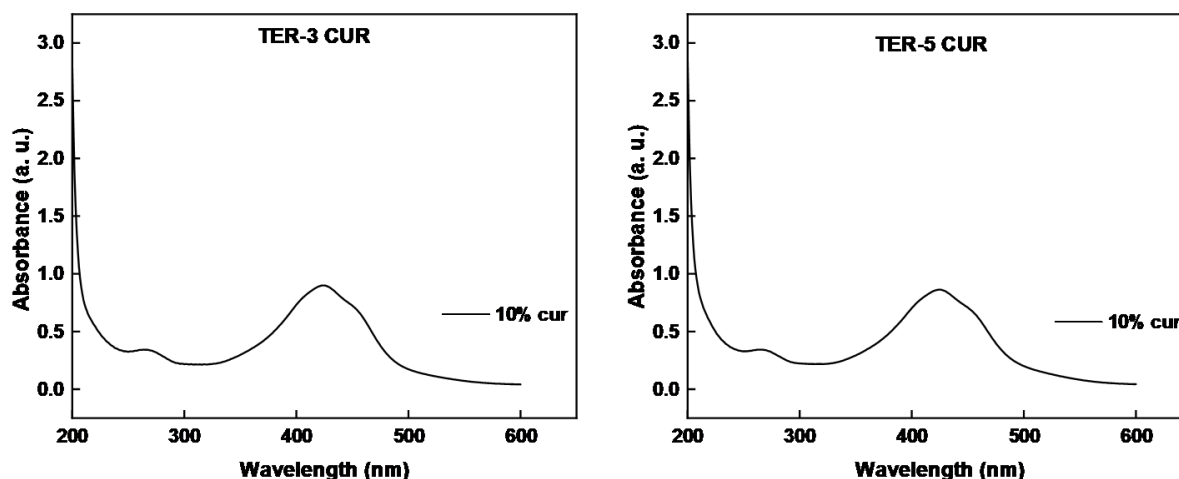


Σχήμα 4.16: Διαγράμματα απορρόφησης UV-Vis για τα TER-1 (CUR) (αριστερά) και TER-2 (CUR) (δεξιά)

Παρατίθενται και τα φάσματα των τριπολυμερών TER-3 και TER-5 (σχήμα 4.17), στα οποία έγινε εγκλωβισμός μόνο σε ποσοστό 10%. Τα συστήματα με ποσοστό κουρκουμίνης 20% για αυτά τα πολυμερή δεν παρουσίασαν σταθερότητα και δε συνεχίστηκε η περαιτέρω μελέτη τους (εικόνα 4.3).



Εικόνα 4.3: Διαλύματα TER-3 και TER-5 με κουρκουμίνη 20% w/w



Σχήμα 4.17: Διαγράμματα απορρόφησης UV-Vis για τα TER-3 (CUR) (αριστερά) και TER-5 (CUR) (δεξιά)

Στον Πίνακα 4.5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των διαφορετικών ποσοστών εγκλωβισμού για το πρωτόκολλο οργανικού διαλύτη.

Στο πρωτόκολλο του λεπτού υμενίου, όπου το σύστημα δεν υποβλήθηκε σε θέρμανση για την εξάτμιση του διαλύτη, πραγματοποιήθηκε και εγκλωβισμός 20% στο TER-3 συμπολυμερές, αν και σε πολύ μικρό ποσοστό. Προφανώς, χωρίς επίδραση στη θερμοαποκρινόμενη φύση του συστήματος προκύπτει πιο σταθερό σύστημα.

Τα φάσματα UV-Vis ήταν ανάλογα, δίνοντας όμως διαφορετικά ποσοστά εγκλωβισμού σε κάθε περίπτωση και ειδικότερα, υψηλότερα ποσοστά % απόδοση εγκλωβισμού (drug encapsulation efficiency, EE).

Πίνακας 4.5: Αποτελέσματα υπολογισμού απόδοσης εγκλωβισμού της κουρκουμίνης για τα τριπολυμερή P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) σε πρωτόκολλο οργανικού διαλύτη.

Δείγμα*	Πρωτόκολλο	Ποσότητα CUR που χρησιμοποιήθηκε (mg)	Μέγιστο ποσοστό εγκλωβισμού (% w/w)	% απόδοση εγκλωβισμού (EE)	% απόδοση φόρτωσης (DL)
TER – 1	THF	0.1	10	55.2	0.55
		0.2	20	49.7	0.99
TER – 2	THF	0.11	10	68.0	0.75
		0.22	20	47.4	1.04
TER – 3	THF	0.29	10	69.9	2.03
TER – 5	THF	0.27	10	72.0	1.95

* Για κάθε παρασκευή χρησιμοποιήθηκαν 10 mg συμπολυμερούς

Πίνακας 4.6: Αποτελέσματα υπολογισμού απόδοσης εγκλωβισμού της κουρκουμίνης για τα τριπολυμερή P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) σε πρωτόκολλο λεπτού υμενίου.

Δείγμα*	Πρωτόκολλο	Ποσότητα CUR που χρησιμοποιήθηκε (mg)	Μέγιστο ποσοστό εγκλωβισμού (% w/w)	% απόδοση εγκλωβισμού (EE)	% απόδοση φόρτωσης (DL)
TER – 1	Thin film	0.1	10	83.4	0.83
		0.2	20	92.2	1.8
TER – 2	Thin film	0.11	10	70.9	0.78
		0.22	20	95.7	2.11
TER – 3	Thin film	0.29	10	71.7	2.08
		0.58	20	12.5	0.72
TER – 5	Thin film	0.27	10	78.2	2.11

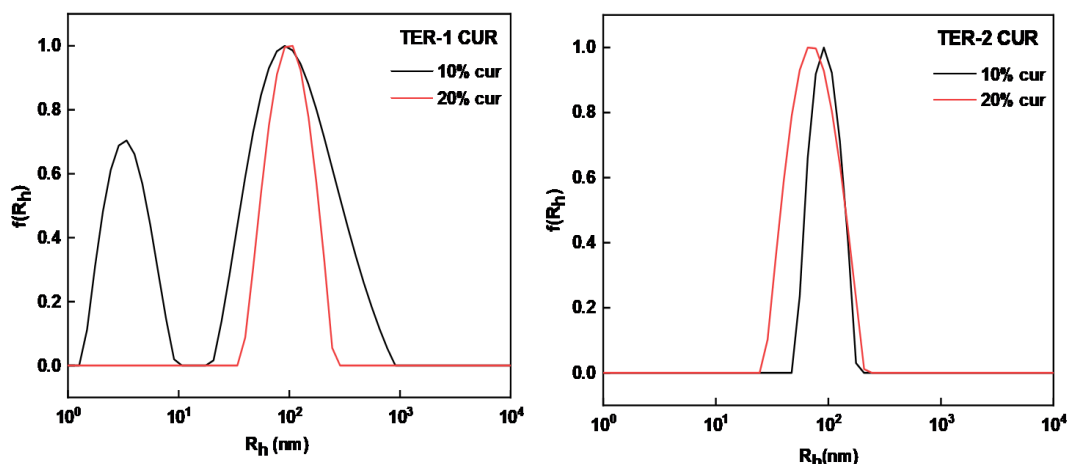
* Για κάθε παρασκευή χρησιμοποιήθηκαν 10 mg συμπολυμερούς

Ακολούθησαν μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός για τα σταθερά συστήματα. Τα διαλύματα μετρήθηκαν σε θερμοκρασία 25°C, την πρώτη και τη δέκατη μέρα από την παρασκευή τους, προκειμένου να ελεγχθεί η σταθερότητά τους με το χρόνο. Τα αποτελέσματα για όλα τα συστήματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.7. Σε γενικές γραμμές, η εικόνα που δίνουν είναι πως παρουσιάζουν σχετική καλή σταθερότητα σε συνάρτηση με το χρόνο.

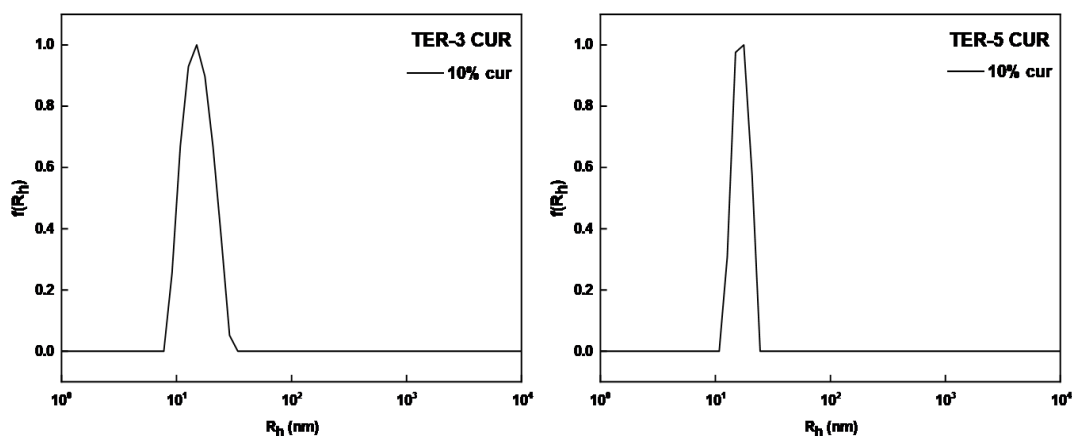
Πίνακας 4.7: Αποτελέσματα DLS την πρώτη και τη δέκατη μέρα από την παρασκευή των διαλυμάτων συμπολυμερούς – κουρκουμίνης.

Δείγμα	Πρωτόκολλο	R _h (nm) χωρίς CUR	R _h (nm) με CUR (1 st day)	PDI (1 st day)	R _h (nm) με CUR (10 th day)	PDI (10 th day)
TER – 1	THF	3/102	3/112	0.5	4/104	0.5
			99	0.5	4/95	0.6
TER – 2	THF	3/108	93	0.3	104	0.5
			73	0.2	81	0.3
TER – 3	THF	3/157	152	0.3	182	0.3
TER – 5	THF	5/156	156	0.2	173	0.2

Μία κορυφή, με σχετικά καλή κατανομή, δείχνει πως τα πολυμερικά συσσωματώματα που έχουν εγκλωβίσει το φάρμακο παρουσιάζουν κολλοειδή σταθερότητα, χωρίς να αποδιατάσσονται σε υπερσυσσωματώματα. Από τα παρακάτω διαγράμματα (σχήμα 4.18) φαίνεται πως γενικά παρουσιάζουν ένα πληθυσμό. Εξαίρεση αποτελεί το TER-1 με 10% κουρκουμίνη, όπου εμφανίζονται δύο κορυφές, ενώ με αύξηση του ποσοστού κουρκουμίνης το σύστημα οδηγείται τελικά σε έναν πληθυσμό. Πιθανώς, η αύξηση του υδρόφοβου φαρμάκου βοηθάει και στην καλύτερη οργάνωση του υδρόφοβου πυρήνα. Αυτό μπορεί να επιβεβαιωθεί σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα του R_h στον επόμενο πίνακα (Πίνακας 4.8).



Σχήμα 4.18: Διαγράμματα CONTIN για το TER-1 (CUR) (αριστερά) και το TER-2 (CUR) (δεξιά) σε πρωτόκολλο οργανικού διαλύτη



Σχήμα 4.19: Διαγράμματα CONTIN για το TER-3 (CUR) (αριστερά) και το TER-5 (CUR) (δεξιά) σε πρωτόκολλο οργανικού διαλύτη

Παρατηρείται πως, με εξαίρεση το TER-1 (10% CUR), τα υπόλοιπα συστήματα μετά τον εγκλωβισμό της κουρκουμίνης οδηγούνται σε έναν πληθυσμό, με τιμές R_h σχετικά μικρότερες από τα κενά νανοσωματίδια. Αυτό δείχνει πως η κουρκουμίνη πράγματι βοηθάει στην καλύτερη συσσωμάτωση και οργάνωση των συστημάτων. Συγκριτικά καλύτερη οργάνωση παρουσιάζει το TER-2 συμπολυμερές, το οποίο και με τα δύο ποσοστά δέσμευσης έδωσε στενές κορυφές, χαμηλές τιμές PDI και σχετικά μικρότερες τιμές R_h .

Πίνακας 4.8: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων DLS πριν και μετά τον εγκλωβισμό της κουρκουμίνης στα τριπολυμερή P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) σε πρωτόκολλο οργανικού διαλύτη.

Δείγμα*	Πρωτόκολλο	% CUR	R _h (nm) χωρίς CUR	R _h (nm) με CUR	PDI με CUR
TER – 1	THF	10	3/102	3/112	0.5
		20		99	0.5
TER – 2	THF	10	3/108	93	0.3
		20		73	0.2
TER – 3	THF	10	3/157	152	0.3
TER – 5	THF	10	5/156	156	0.2

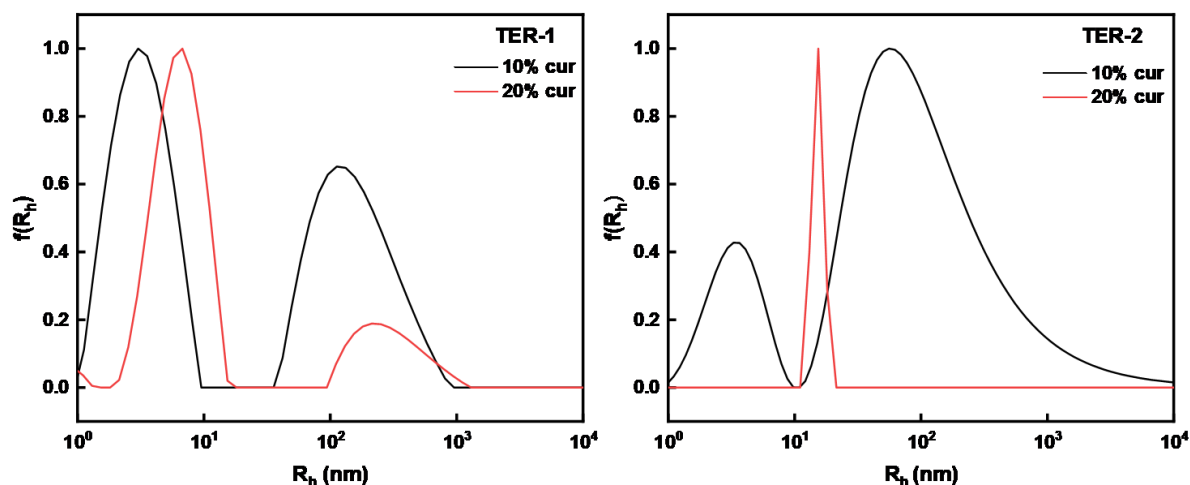
* Για κάθε παρασκευή χρησιμοποιήθηκαν 10 mg συμπολυμερούς.

Αξίζει να σημειωθεί, πως η αύξηση της θερμοκρασίας προκειμένου να εξατμιστεί ο διαλύτης στους 68°C και ακολούθως η μείωση της μέχρι να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, ίσως επιδρά στο σύστημα, καθώς είναι θερμοαποκρινόμενο, οδηγώντας σε πιο καλά οργανωμένες δομές με την δεσμευμένη πλέον κουρκουμίνη στο εσωτερικό των υδρόφοβων νανοπεριοχών.

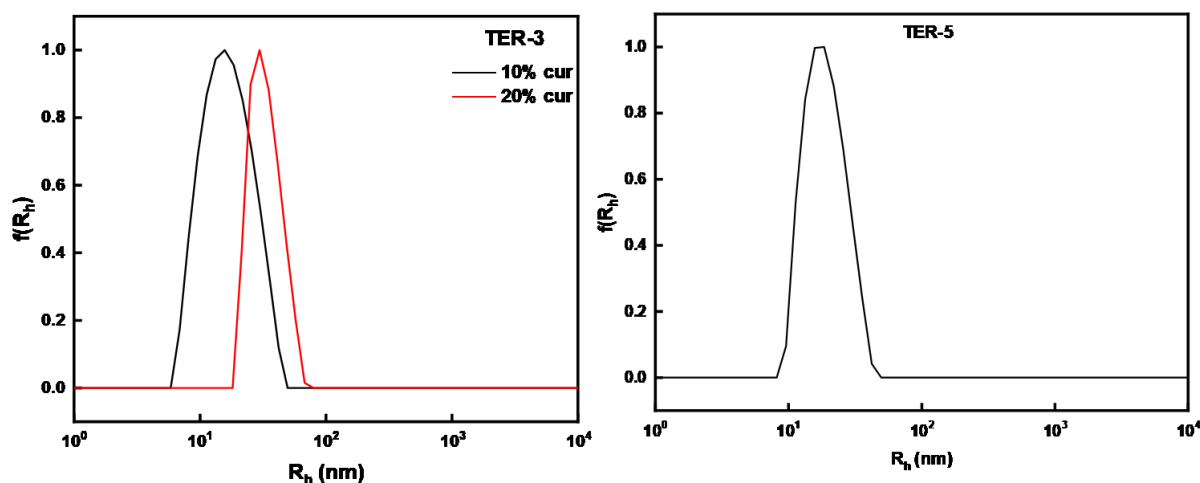
Στο πρωτόκολλο του λεπτού υμενίου παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες μεταβολές στις μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός, με έντονες διαφορές σε R_h και PDI.

Στα ακόλουθα σχήματα βλέπουμε πως το TER-1 (10% CUR) και το TER-2 (10% CUR) δίνουν γενικά αρκετά πλατιές κατανομές, παρουσιάζοντας «ώμους» και «ουρές». Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το TER-1 συμπολυμερές, ωστόσο, στο οποίο με διπλασιασμό του ποσοστού κουρκουμίνης παρουσιάζει και διπλασιασμό στις τιμές R_h, αποτελώντας το συμπολυμερές με το δεύτερο μεγαλύτερο ποσοστό % απόδοσης

εγκλωβισμού, μετά το TER-2. Στο TER-2 (20% CUR), βλέπουμε επίσης μια πολύ ενδιαφέρουσα μεταβολή, με έναν πληθυσμό, οξεία κορυφή και πολύ χαμηλό PDI < 0.1. Το R_h σε αυτήν την περίπτωση, είναι ιδιαίτερα χαμηλό (σχήμα 4.20).



Σχήμα 4.20: Διαγράμματα CONTIN για το TER-1 (CUR) (αριστερά) και το TER-2 (CUR) (δεξιά) σε πρωτόκολλο λεπτού υμενίου



Σχήμα 4.21: Διαγράμματα CONTIN για το TER-3 (CUR) (αριστερά) και το TER-5 (CUR) (δεξιά) σε πρωτόκολλο λεπτού υμενίου

Εξίσου ενδιαφέρον είναι και το TER-3 συμπολυμερές, το οποίο και στις δύο συγκεντρώσεις κουρκουμίνης δίνει έναν πληθυσμό, με αρκετά καλή κατανομή

και χαμηλό PDI (σχήμα 4.21). Ωστόσο, σε 20% CUR οι τιμές % απόδοσης εγκλωβισμού και % απόδοσης φόρτωσης ήταν πολύ χαμηλές, δείχνοντας πως το σύστημα δε λειτούργησε όπως ήταν επιθυμητό.

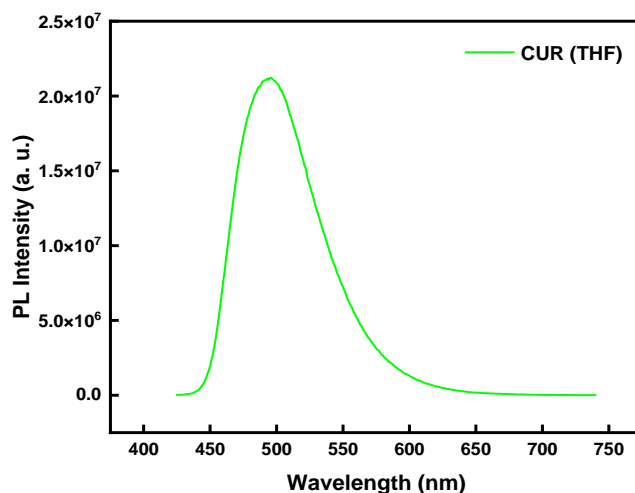
Αναλυτικά τα αποτελέσματα για όλα τα συμπολυμερή, στις διαφορετικές συγκεντρώσεις κουρκουμίνης, παρουσιάζονται στον επόμενο πίνακα (Πίνακας 4.9). Παρατηρώντας τις τιμές R_h , θα μπορούσαμε να πούμε πως το πρωτόκολλο του λεπτού υμενίου παρουσιάζει αύξηση στις τιμές της υδροδυναμικής ακτίνας μετά των εγκλωβισμό της κουρκουμίνης, σε αντίθεση με ότι συνέβαινε στο πρωτόκολλο του οργανικού διαλύτη. Μια υπόθεση θα μπορούσε να είναι πως τελικά η θέρμανση για την εξάτμιση του διαλύτη ευνοεί το σύστημα, δίνοντας τη δυνατότητα για καλύτερη οργάνωση.

Πίνακας 4.9: Συγκριτικός πίνακας αποτελεσμάτων DLS πριν και μετά τον εγκλωβισμό της κουρκουμίνης στα τριπολυμερή P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) σε πρωτόκολλο λεπτού υμενίου.

Δείγμα*	Πρωτόκολλο	% CUR	R_h (nm) χωρίς CUR	PDI χωρίς CUR	R_h (nm) με CUR	PDI με CUR
TER – 1	Thin film	10	3/100	0.52	3/149	0.4
		20			6/288	0.5
TER – 2	Thin film	10	72	0.24	3/108	0.6
		20			15.2	0.009
TER – 3	Thin film	10	5/124	0.5	16.3	0.2
		20			32.7	0.4
TER – 5	Thin film	10	5/115	0.48	186	0.2

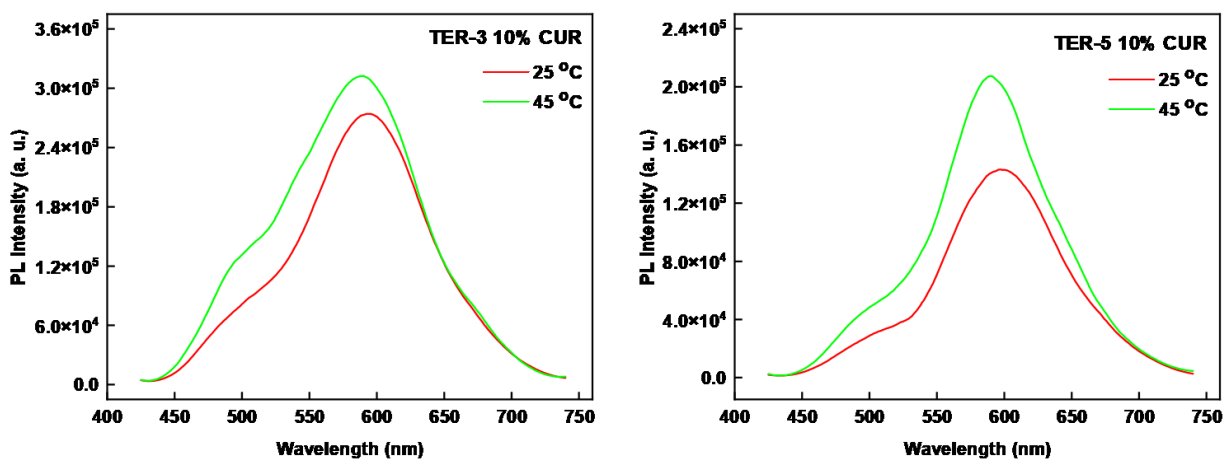
* Για κάθε παρασκευή χρησιμοποιήθηκαν 10 mg συμπολυμερούς.

Τέλος, παρουσιάζονται και τα αποτελέσματα από τη μελέτη φθορισμού. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η κουρκουμίνη σε διαλύματα THF δίνει σήμα φθορισμού στα 500 – 520 nm.



Σχήμα 4.22: Διάγραμμα φθορισμού κουρκουμίνης σε THF στους 25°C

Στα υπό μελέτη συστήματα, ωστόσο, συναντάται το σήμα της κουρκουμίνης και σε μεγαλύτερες τιμές, στα 580-600 nm (σχήμα 4.23).



Σχήμα 4.23: Διαγράμματα φθορισμού των συμπολυμερών TER-3 (CUR) (αριστερά) και TER-5 (CUR) (δεξιά) συναρτήσει της θερμοκρασίας

Με μια ανασκόπηση και σε άλλες μελέτες που έχουν γίνει με χρήση κουρκουμίνης ως φάρμακο και ως φθορίζον ιχνηθέτη, συμπεραίνεται πως

τιμές κοντά στα 570 nm (και μεγαλύτερες) πιθανώς οφείλονται σε συσσωμάτωση της κουρκουμίνης στα πολυμερικά συστήματα. Πιο συγκεκριμένα, τα μόρια της κουρκουμίνης συσσωματώνονται στον υδρόφοβο πυρήνα, με αποτέλεσμα να έχουμε διμερισμό, μαζί με αλληλεπίδρασή τους με τις πολυμερικές αλυσίδες. Η συσσωμάτωση αυτή οδηγεί σε μείωση του κενού μεταξύ π – π* τροχιακών των μορίων της κουρκουμίνης.

Παράλληλα, λόγω των διμεθυλάμινο ομάδων του DMAEMA μονομερούς, υπάρχει η δυνατότητα για αλληλεπίδραση οξέος – βάσης ανάμεσα στις ομάδες $-NH_2$ του DMAEMA και των φαινολικών υδροξυλίων της κουρκουμίνης. Αυτό, θα οδηγούσε σε ιονισμό των διμεθυλάμινο ομάδων του DMAEMA και θα είχαμε περαιτέρω αλληλεπίδραση με το σύστημα, πέρα από το σχηματισμό δεσμών H με τον υδρόφοβο πυρήνα.

Ένα σενάριο, λοιπόν, το οποίο θα εξηγούσε τα φάσματα που λήφθηκαν είναι ότι η κουρκουμίνη δε βρίσκεται αποκλειστικά εγκλωβισμένη σε έναν υδρόφοβο πυρήνα, περιβαλλόμενη από το υπόλοιπο πολυμερές, αλλά διεσπαρμένη στην πολυμερική μήτρα. Σαν αποτέλεσμα, η κουρκουμίνη συμπεριφέρεται περισσότερο σαν συσσωματωμένη κουρκουμίνη και όχι σαν διεσπαρμένα μόρια σε νανοσωματίδια, δίνοντας μεγαλύτερα μήκη κύματος απορρόφησης.

Ολοκληρώνοντας, αξίζει να αναφερθεί και η συμπεριφορά του φθορίζοντος, πλέον, συστήματος TER/CUR συναρτήσει της θερμοκρασίας. Με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 25°C στους 45°C, παρουσιάζεται μεταβολή και στο φάσμα. Συγκεκριμένα, έχουμε αύξηση της έντασης φθορισμού, όπως φαίνεται στο σχήμα 4.23.

Η τάση αυτή παρατηρήθηκε σε όλα τα συστήματα που έγινε ο εγκλωβισμός και στα δύο πρωτόκολλα και στα δύο ποσοστά εγκλωβισμού, επιβεβαιώνοντας για ακόμα μία φορά την απόκριση του συστήματος στη μεταβολή της θερμοκρασίας. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε αύξηση του υδρόφοβου χαρακτήρα του DMAEMA και συνεπώς των νανοδομών πολυμερούς/φαρμάκου του συστήματος συνολικά.

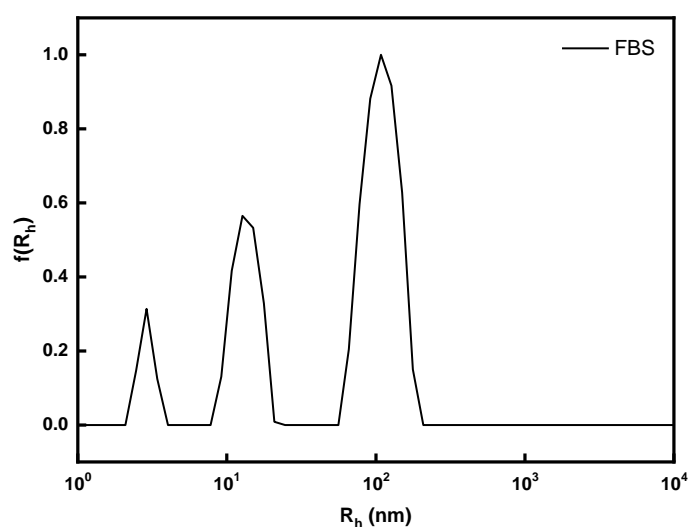
4.5 Μελέτη αλληλεπίδρασης με FBS^[75,76]

Η συμβατότητα πολυμερούς – φαρμάκου είναι ιδιαίτερης σημασίας για το σχεδιασμό φαρμακευτικών σκευασμάτων. Ωστόσο, εξαιρετικής βαρύτητας είναι και η συμπεριφορά του συστήματος πολυμερούς – φαρμάκου όταν εισέρχεται στον οργανισμό. Πιθανή αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες, για παράδειγμα, θα ήταν ανεπιθύμητη. Για να μελετήσουμε και αυτή τη συμπεριφορά έγινε μελέτη αλληλεπίδρασης με FBS (Fetal Bovine Serum).

Σε τελικό στάδιο των πειραμάτων, έγινε μελέτη αλληλεπίδρασης των συστημάτων πολυμερούς-κουρκουμίνης με πρωτεΐνες του ορού εμβρύου βοοειδούς. Ο έλεγχος αυτός είχε ως σκοπό την πιθανή βιοτεχνολογική χρήση των συστημάτων και τη μελέτη ανεπιθύμητης αλληλεπίδρασης με συστατικά του αίματος. Το FBS περιέχει διάφορες πρωτεΐνες, με κύρια την BSA (bovine serum albumin) σε περιεκτικότητα περίπου 2.5 mg/mL.

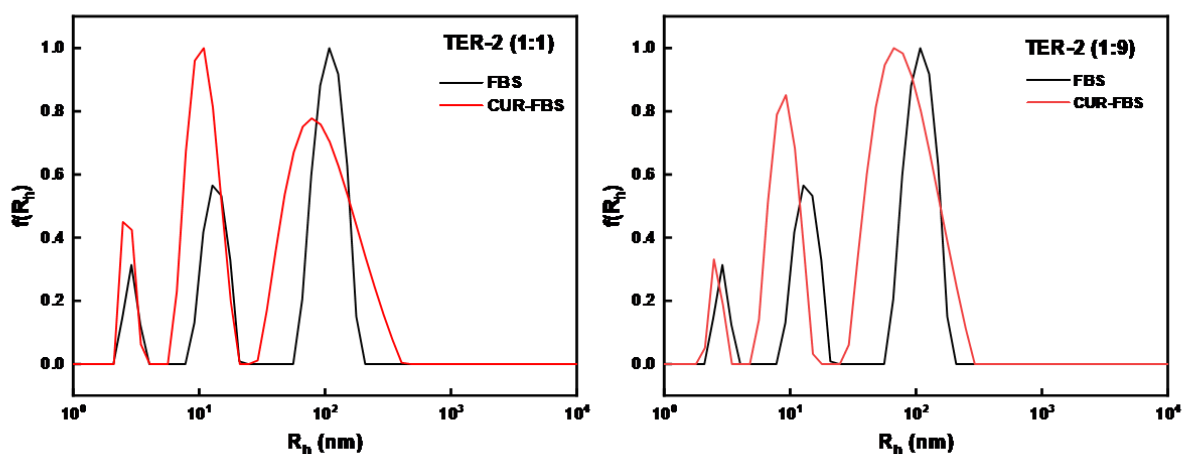
Ο έλεγχος με δυναμική σκέδαση φωτός έγινε σε χαρακτηριστικά και παραμέτρους όπως το R_h , το PDI και την ένταση σκεδάσεως (I). Επιλέχθηκαν δύο από τα συστήματα, το TER-2 (20% CUR) και το TER-5 (10% CUR), καθώς παρουσιάζουν διαφορές, τόσο στο μοριακό βάρος όσο και στην κατά βάρος σύσταση ως προς κάθε μονομερές. Τα διαλύματα πολυμερούς-κουρκουμίνης-FBS σε PBS παρασκευάστηκαν όπως περιγράφηκε στην ενότητα 3.6.

Η FBS παρουσιάζει χαρακτηριστικά 3 κορυφές στα διαγράμματα CONTIN, όπως φαίνεται στο επόμενο σχήμα (σχήμα 4.24) :



Σχήμα 4.24: Διάγραμμα κατανομής μεγεθών για FBS από DLS

Παρακάτω, παρατίθενται και τα αντίστοιχα διαγράμματα των δύο συμπολυμερών με εγκλωβισμένη κουρκουμίνη και FBS, σε αναλογίες διαλυμάτων FBS:PBS ίσες με (1:1) και (1:9) (σχήμα 4.25).

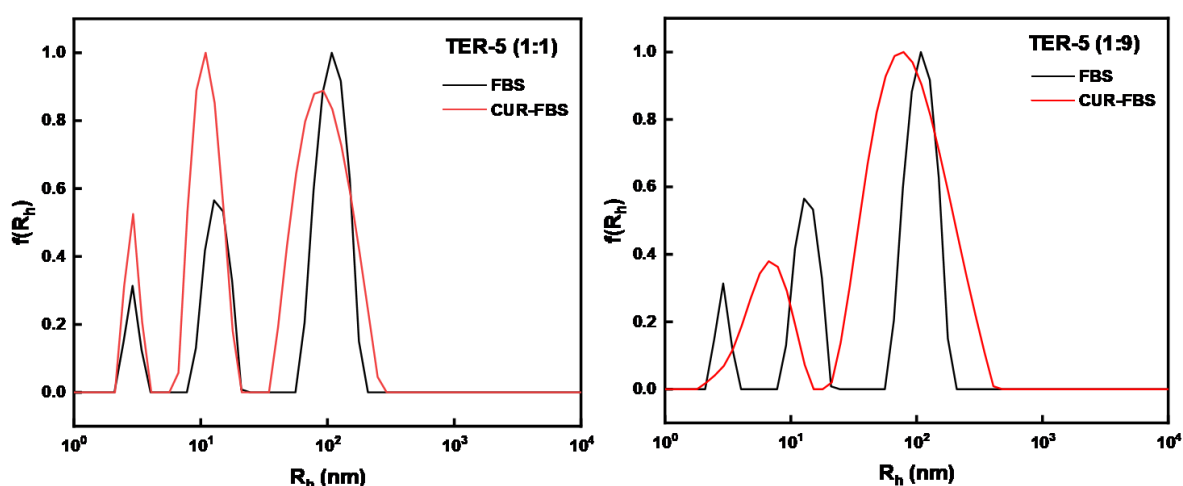


Σχήμα 4.25: Διαγράμματα CONTIN του TER-2 (CUR) συμπολυμερούς σε διαλύματα FBS:PBS (1:1) (αριστερά) και FBS:PBS (1:9) (αριστερά)

Στο σύστημα TER-2 (CUR)/FBS παρατηρείται πως, σε αναλογία (1:9) δε φαίνεται αλληλεπίδραση των μικτών νανοδομών με το FBS και παραμένουν οι

πληθυσμοί ως ήταν. Αντίστοιχα, παρατηρούνται τρεις κορυφές, χωρίς αλληλεπίδραση, σε αναλογία (1:1), με χαμηλότερο το ύψος στην τρίτη κορυφή λόγω αλληλεπικάλυσης πληθυσμών του συστήματος TER-2(CUR).

Στο σύστημα TER-5 (CUR)/FBS και σε αναλογία (1:9), παρατηρούμε πως με προσθήκη του συμπολυμερούς με εγκλωβισμένη κουρκουμίνη έχουμε πιθανή αλληλεπίδραση, καθώς μεταβαίνουμε σε δύο κορυφές. Ωστόσο, σε αναλογία (1:1) δεν παρατηρείται η ίδια τάση και εμφανίζονται κανονικά και οι 3 πληθυσμοί. Βέβαια, στην τελευταία περίπτωση η αναλογία των πρωτεϊνών στα διαλύματα είναι μεγαλύτερη και μπορεί να «κρύβει» κάποιους πληθυσμούς.



Σχήμα 4.26: Διαγράμματα CONTIN του TER-5 (CUR) συμπολυμερούς σε διαλύματα FBS:PBS (1:1) (αριστερά) και FBS:PBS (1:9) (αριστερά)

Συμπερασματικά, με βάση τα αποτελέσματα και από τα δύο συστήματα, φαίνεται πως παρουσιάζουν γενικά σταθερότητα και μικρή αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες του ορού, χωρίς σημαντική αύξηση των διαστάσεων των νανοδομών στα διαλύματα, ιδιότητα ιδιαίτερα σημαντική για συστήματα τα οποία πρόκειται να αξιοποιηθούν ως νανομεταφορείς φαρμάκων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ολοκληρώνοντας την περιγραφή των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν, καθώς και την παρουσίαση των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, συνοψίζονται τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τη σύνθεση των πέντε (5) στατιστικών συμπολυμερών P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA), μια ομάδα pH- και θερμο- αποκρινόμενων πολυμερών.

Σε πρώτη φάση, επιτεύχθηκε η σύνθεση των πέντε τριπολυμερών με χρήση της τεχνικής πολυμερισμού RAFT, σε διαφορετική κατά βάρος σύσταση ως προς το κάθε μονομερές. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μοριακός χαρακτηρισμός, με χρήση χρωματογραφικών και φασματοσκοπικών τεχνικών, μέσω του οποίου επιβεβαιώθηκε η επιτυχής σύνθεση των πολυμερών.

Σε δεύτερη φάση, παρασκευάστηκαν τα υδατικά διαλύματα των πολυμερικών συστημάτων, προκειμένου να γίνει μελέτη αυτο-οργάνωσής τους. Ακολουθήθηκαν δύο πρωτόκολλα, του κοινού οργανικού διαλύτη και του λεπτού υμενίου. Για το χαρακτηρισμό των συστημάτων που προέκυψαν χρησιμοποιήσαμε τεχνικές σκέδασης, όπως DLS και ELS, καθώς επίσης και φασματοσκοπία φθορισμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν επιτυχή αυτο-οργάνωση των πολυμερών σε νερό, ενώ παράλληλα επιβεβαίωσαν την απόκριση τόσο σε διαφορετικές τιμές pH, όσο και θερμοκρασίες, με τα δύο πρωτόκολλα να δίνουν ανάλογα αποτελέσματα, με χαρακτηριστικές, ωστόσο διαφορές.

Σε τελικό στάδιο, τα πολυμερικά συστήματα χρησιμοποιήθηκαν ως νανοφορείς για τη μεταφορά φαρμάκου και συγκεκριμένα της κουρκουμίνης. Στόχος ήταν η δέσμευση κουρκουμίνης σε ποσοστά 10% w/w και 20% w/w ως προς την υδρόφοβη συστάδα. Τα μικτά σωματίδια που προέκυψαν μελετήθηκαν με τεχνικές DLS και φασματοσκοπίας φθορισμού και UV-Vis. Κάθε σύστημα, ανάλογα με τη σύσταση σε κάθε μονομερές είχε και διαφορετική συμπεριφορά και έδωσε διαφορετικό ποσοστό εγκλωβισμού

κουρκουμίνης. Σε αυτό συνέβαλε και η αρχιτεκτονική του συστήματος, αφού δεν υπάρχει μία καθαρά υδρόφοβη συστάδα μέσα στην οποία θα εγκλωβιστεί εύκολα το φάρμακο.

Επιτυχία έδειξε και η μελέτη αλληλεπίδρασης με FBS, καθώς τα συστήματα φάνηκε να μην έχουν τάση αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες του ορού.

Τα τελικά συμπεράσματα που προκύπτουν από την παρούσα ερευνητική εργασία είναι πως, τα αμφίφιλα στατιστικά συμπολυμερή P(DMAEMA-co-LMA-co-OEGMA) μπορούν να αυτο-οργανωθούν σχηματίζοντας συσσωματώματα και εν συνεχεία, να χρησιμοποιηθούν ως νανοφορείς για τη μεταφορά φαρμάκων, καθώς το POEGMA μονομερές προσδίδει ιδιότητες απόκρυψης και κολλοειδούς σταθερότητας ανάλογες του PEG.

Μελλοντικά, είναι επιθυμητό να ολοκληρωθεί η μελέτη αποδέσμευσης της κουρκουμίνης από τα πολυμερικά συστήματα και η εφαρμογή/μελέτη των νανοσυστημάτων σε κυτταρικές σειρές.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
poly(2-dimethylamino ethyl 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
Critical Aggregation Concentration	Κρίσιμη Συγκέντρωση Συσσωμάτωσης
Lower Critical Solution Temperature	Κατώτερη Κρίσιμη Θερμοκρασία Διαλύματος
Gel Permeation 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
Fluorescence Spectroscopy	Φασματοσκοπία Φθορισμού
Infrared Spectroscopy	Φασματοσκοπία Υπερύθρου
Phosphate Buffered Saline	Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικού Άλατος

Fetal Bovine Serum	Ορός Εμβρίου Βοοειδούς
--------------------	------------------------

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

PDMAEMA	poly(2-dimethylamino ethyl methacrylate)
POEGMA	poly(oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate)
PLMA	poly(lauryl methacrylate)
RAFT	Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer
AIBN	Αζω-δισοβουτυρονιτρίλιο
SEC	Size Exclusion Chromatography
CTA	Chain Transfer Agent
UV-Vis	Υπεριώδεις – Ορατό
ATR	Attenuated Total Reflectance
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
¹ HNR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
CDCl ₃	Deuterium Chloroform
FT-IR	Fourier Transmission Infra Red
DLS	Dynamic Light Scattering
FS	Fluorescence
ELS	Electrophoretic Light Scattering
R _h	Υδροδυναμική Ακτίνα
THF	Τετραϋδροφουράνιο
LCST	Lower Critical Solution Temperature, LCST
CAC	Critical Aggregation Concentration
PDI	Polydispersity Index

PBS	Phosphate buffered saline
FBS	Fetal Bovine Serum

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Κοτζαμάνης Ιωάννης, Ανάπτυξη νέων "ευφυών" κατά συστάδες συμπολυμερών τύπου ομοπολυμερές – στατιτικό συμπολυμερές, Πανεπιστήμιο Πατρών, 2007
2. Blanazs, 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
3. Kataoka, K., Harada, A., Nagasaki, Y., *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol.47, pp.113, 2001
4. Gohy, J.F, Block copolymer micelles, *Advances in Polymer Science*
5. Stephan Förster; Markus Antonietti (1998). Amphiphilic Block Copolymers in Structure-Controlled Nanomaterial Hybrids. , 10(3), 195–217.
6. Μ. Πισικάλης, Μ. Χατζηχρηστίδη, Ειδικά θέματα επιστήμης πολυμερών, Σημειώσεις Μαθήματος, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2010
7. Li, Longyu; Raghupathi, Kishore; Song, Cunfeng; Prasad, Priyaa; Thayumanavan, S. (2014). Self-assembly of random copolymers. *Chem. Commun.*, 50(88), 13417–13432
8. Y. Yuya, O. Masahiko, H. Masahir, *Angew. Makromol. Chemie* 1969, 9, 136.
9. C. M. Boussias, R. H. Peters, R. H. Still, *Journal of Applied. Polymer Science* 1980, 25, 855.
10. Q. X. Yu, R. Wilhelm, H. Walter, *Angew. Makromol. Chemie* 1984, 125,69
11. C. Francois, S. Alain, B. Georges, *Journal of Polymer Science, Part B: Polym. Phys.* 1990, 28, 647.
12. R. Bongiovanni, G. Malucelli, M. Messori, F. Pilati, A. Priola, C. Tonelli, M. Toselli, *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 2005, 43, 3588.

13. J.-T. Hong, N.-S. Cho, H.-S. Yoon, T.-H. Kim, D.-H. Lee, W.-G. Kim, *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 2005, 43, 2790.
14. Ting, Jeffrey M.; Navale, Tushar S.; Bates, Frank S.; Reineke, Theresa M. (2013). Precise Compositional Control and Systematic Preparation of Multimonomeric Statistical Copolymers. *ACS Macro Letters*, 2(9), 770–774
15. Monica L. Adams; Afsaneh Lavasanifar; Glen S. Kwon (2003). Amphiphilic block copolymers for drug delivery. , 92(7), 1343–1355
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. Paschalis Alexandridis (1996). Amphiphilic copolymers and their applications. , 1(4), 490–501
18. Mehrdad Hamidi; Mohammad-Ali Shahbazi; Kobra Rostamizadeh (2012). Copolymers: Efficient Carriers for Intelligent Nanoparticulate Drug Targeting and Gene Therapy. , 12(2), 144–164
19. Kanjiro Miyata; R. James Christie; Kazunori Kataoka (2011). Polymeric micelles for nano-scale drug delivery. , 71(3), 227–234
20. Ward, M. A, Georgiou, T. K., *Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications*, *Polymers*, 2011, vol.3, pp.1215-1242, 2011
21. Shibayama, M., Tanaka, T., *Advances in Polymer Science*, vol.109, pp.1-62, 1993
22. 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
23. Christine M. Papadakis, Peter Müller-Buschbaum, André Laschewsky, Switch It Inside-Out: “Schizophrenic” Behavior of All Thermoresponsive UCST–LCST Diblock Copolymers, *Langmuir* 2019, 35, 30, 9660–9676

24. Meredith, A. Mintzer and Eric E. Simanek, Nonviral Vector for Gene Delivery, *Chemical Reviews*, vol.109, pp. 259-302, 2009
25. 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
26. Laaser, Jennifer E.; Jiang, Yaming; Sprouse, Dustin; Reineke, Theresa M.; Lodge, Timothy P. (2015). pH- and Ionic-Strength-Induced Contraction of Polybasic Micelles in Buffered Aqueous Solutions. *Macromolecules*, 48(8), 2677–2685
27. Lee, Albert S.; Bütün, Vural; Vamvakaki, M.; Armes, Steven P.; Pople, John A.; Gast, Alice P. (2002). Structure of pH-Dependent Block Copolymer Micelles: Charge and Ionic Strength Dependence. *Macromolecules*, 35(22), 8540–8551
28. 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
29. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5664031/>
30. R.A. Sharma; A.J. Gescher; W.P. Steward (2005). Curcumin: The story so far. , 41(13), 0–1968
31. Lestari, Maria L.A.D. (2014). [Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology] Volume 39 || *Curcumin.* , (), 113–204
32. Adam E. Smith; Xuwei Xu; Charles L. McCormick (2010). Stimuli-responsive amphiphilic (co)polymers via RAFT polymerization. , 35(1-2), 45–93
33. Adam W. York; Stacey E. Kirkland; Charles L. McCormick (2008). Advances in the synthesis of amphiphilic block copolymers via RAFT polymerization: Stimuli-responsive drug and gene delivery. , 60(9), 1018–1036.
34. 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
35. Perrier, S., 50th Anniversary Perspective: RAFT Polymerization A User Guide, *Macromolecules*, vol.50(19), pp. 7433-7447, 2017

- 36.Ε. Ιατρού, Μ. Πιτσικάλης, Α. Πίσπας, Σύνθεση Πολυμερών με Καθορισμένη Αρχιτεκτονική, Πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών «Επιστήμη πολυμερών και εφαρμογές της στη Βιομηχανία», Αθήνα, 2020
- 37.L. Leibler, Theory of microphase separation in block copolymers, *Macromolecules*, vol. 13, 1980, pp. 1602-1617
38. Bates F.S., Polymer-polymer phase behavior, *Science*, vol. 251, 1991, pp. 898 - 905
- 39.G. Riess, Micellization of block copolymers, *Pro. Pol. Sci.*, vol.28, 2003, pp. 1107-1170
- 40.Ε. Ιατρού, Μ. Πιτσικάλης, Α. Πίσπας, Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Πολυμερών, Πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών «Επιστήμη πολυμερών και εφαρμογές της στη βιομηχανία», 2020
- 41.D. A. Skoog, F. James Holler, S. R. Crouch, Αρχές ενόργανης ανάλυσης, Εκδόσεις Κωσταράκη, 2007
- 42.Θ. Π. Χατζηϊωάννου, Μ. Α. Κουππάρη, Ενόργανη Ανάλυση, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2015
- 43.Κ. Παναγιώτου, Επιστήμη και Τεχνολογία Πολυμερών, Εκδόσεις Πήγασος, 2000
- 44.P. C. Hiemenz, T. P. Lodge, Χημεία Πολυμερών, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2014
- 45.Falke, S., & Betzel, C. (2019). Dynamic Light Scattering (DLS). *Bioanalysis*, 173–193
- 46.L.G. Wade, JR Withman College, Οργανική χημεία, 7η έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλα
- 47.Βαλαβανίδης, Α., Βασικές Αρχές Μοριακής Φασματοσκοπίας και Εφαρμογές στην Οργανική Χημεία, Εκδόσεις Σύγχρονα Θέματα, Αθήνα, 2008
48. Introduction to Fluorescence Techniques, *Molecular Probes*
- 49.R. L. Pecsok, L. D. Shields, T. Cairns, I. G. McWilliam, “Modern Methods of Chemical Analysis”, Εκδόσεις: Γ. Α. Πνευματικός, Αθήνα 1980
- 50.H. G. Barth, J. W. Mays, Eds “Modern Methods of Polymer Characterization”, Wiley-Interscience, New York, 1991

51. McNeil, Scott E. (2011). [Methods in Molecular Biology] Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery Volume 697 || Zeta Potential Measurement. , 10.1007/978-1-60327-198-1(Chapter 6), 63–70
52. Yang, Dongbin; Zhang, Weihong; Zhang, Huanyun; Zhang, Fengqiu; Chen, Lanmei; Ma, Lixia; Larcher, Leon M.; Chen, Suxiang; Liu, Nan; Zhao, Qingxia; Tran, Phuong H.L.; Chen, Changying; Veedu, Rakesh N; Wang, Tao (2020). Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - efforts for efficient exosome-based theranostics. *Theranostics*, 10(8), 3684–3707
53. <https://www.researchgate.net/>
54. ŠÍPOŠ, R.; ŠIMA, J.. Jablonski Diagram Revisited. *Revista Cubana de Física*, [S.l.], v. 37, n. 2, p. 125-130, dec. 2020. ISSN 2224-7939
55. <https://commons.wikimedia.org/>
56. Stetefeld, Jörg; McKenna, Sean A.; Patel, Trushar R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 8(4), 409–427
57. Malvern Instruments, Zeta-potential
58. Σκανδάλης. Α., Μεταπτυχιακή εργασία με τίτλο: Αμφίφιλα Κατά Συστάδες Συμπολυμερή PLMA-b-POEGMA: Σύνθεση, Χαρακτηρισμός και Ιδιότητες σε Διαλύματα, Αθήνα, 2016
59. Καφετζή Μ., Μεταπτυχιακή εργασία με τίτλο: 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, Αθήνα, 2018
60. Xu, Y., Bolisetty, M., Fang, B., Yuan, J., Ballauff, M., Müller, A.H.E, pH and salt responsive poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) cylindrical brushes and their quaternized derivatives, *Polymer*, vol.49(18), pp. 3957-3964, pp. 3957-3964
61. 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

62. Mohammadi, M., Salami-Kalajahi, M., Roghani-Mamaqani., H., Goslan, M., Effect of molecular weight and polymer concebration on the triple temperature/pH/ionic strength-sensitive behavior of poly (2-(dimethylamino)ethyl methacrylate), *International Journval of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, vol.66(29), pp.455-461, 2016
63. 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
64. Digambara Patra, Riwa Aridi, Kamal Bouhadir (2013). Fluorometric sensing of DNA using curcumin encapsulated in nanoparticle-assembled microcapsules prepared from poly(diallylammonium chloride-co-sulfur dioxide). , 180(1-2), 59–64
65. Bechnak, Linda; El Kurdi, Riham; Patra, Digambara (2020). Fluorescence Sensing of Nucleic Acid by Curcumin Encapsulated Poly(Ethylene Oxide)Block-Poly(Propylene Oxide)-Block-Poly(Ethylene Oxide) Based Nanocapsules. *Journal of Fluorescence*.
66. Skandalis A. and Pispas S., *Polym. Chem.*, 2017
67. Kafetzi, M., & Pispas, S. (2021). Multifaceted pH and Temperature Induced Self-Assembly of P(DMAEMA- co -LMA)- b -POEGMA Terpolymers and Their Cationic Analogues in Aqueous Media. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 222(5), 2000358
68. W. Groenewegen, A. Lapp, S. U. Egelhaaf, J. R. C. van der Maarel, Counterion Distribution in the Coronal Layer of Polyelectrolyte Diblock Copolymer Micelles, *Macromolecules*, vol. 33, 2000, pp. 4080-4086
69. J. R. C. van der Maarel, W. Groenewegen, S. U. Egelhaaf, A. Lapp, Salt-Induced Contraction of Polyelectrolyte Diblock Copolymer Micelles, *Langmuir*, vol. 16, pp. 7510-7519
70. H. Schuch, J. Klingler, P. Rossmanith, T. Frechen, M. Gerst, J. Feldthusen, A. H. E. Müller, Characterization of Micelles of

- Polyisobutylene-block-poly(methacrylic acid) in Aqueous Medium, *Macromolecules*, vol. 33, 2000, pp. 1734-1740.
71. E. Eghbali, O. Colombani, M. Drechsler, A. H. E. Müller, H. Hoffmann, Rheology and Phase Behavior of Poly(n-butyl acrylate)-block-poly(acrylic acid) in Aqueous Solution, *Langmuir*, vol.22, 2006, pp. 4766-4776
72. M. Burkhardt, N. Martinez-Castro, S. Tea, M. Drechsler, I. Babin, I. Grishagin, R. Schweins, D. V. Pergushov, M. Gradzielski, A. B. Zezin, A. H. E. Müller, Polyisobutylene-block-poly(methacrylic acid) Diblock Copolymers: Self-Assembly in Aqueous Media, *Langmuir*, vol. 23, pp. 12864-12874
73. M. Almgren, W. Brown, S. Hvidt, Self-aggregation and phase behaviour of PEO-PPO-PEO block copolymers in aqueous solution, *Colloid Polym Sci*, vol. 273, 1995, pp. 2–15
74. J. Huang, J. Xu, K. Chen, T. Wang, C. Cui, X. Wei, R. Zhang, L. Li and X. Guo, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2015, 54, 1564-1575
75. Chroni, A., Mavromoustakos, T., & Pispas, S. (2021). Poly(2-oxazoline)-Based Amphiphilic Gradient Copolymers as Nanocarriers for Losartan: Insights into Drug–Polymer Interactions. *Macromol*, 1(3), 177–200.
76. Vlassi, Eleni; Papagiannopoulos, Aristeidis; Pispas, Stergios (2017). Self-assembly of poly(ethylene glycol-b-phenyl oxazoline) diblock copolymers in aqueous media and their interactions with proteins. *Colloid and Polymer Science*