



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ»**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Διυδρόφιλα Συσταδικά και Τυχαία Συμπολυμερή  
ΡΟΕΓΜΑ-b-ΡΜΕΤΑC και Ρ(ΟΕΓΜΑ-co-ΜΕΤΑC): Σύνθεση,  
Χαρακτηρισμός, Αυτοοργάνωση σε Υδατικά Διαλύματα  
και Σύμπλεξη με DNA**

**ΖΩΓΑ ΔΑΦΝΗ**

**ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ**

**ΜΑΪΟΣ 2021**



## **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Διυδρόφιλα Συσταδικά και Τυχαία Συμπολυμερή ΡΟΕΓΜΑ-b-ΡΜΕΤΑC και Ρ(ΟΕΓΜΑ-co-MΕΤΑC): Σύνθεση, Χαρακτηρισμός, Αυτοοργάνωση σε Υδατικά Διαλύματα και Σύμπλεξη με DNA**

**ΖΩΓΑ ΔΑΦΝΗ**

**A.M.: 191006**

**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 24/5/2021**



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα διυδροφιλα συμπολυμερή έχουν προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, εξαιτίας της ικανότητάς τους να αυτοοργανώνονται σε υδατικά διαλύματα. Στην παρούσα ερευνητική εργασία συντέθηκαν καινοτόμα πολυμερικά συστήματα με εφαρμογές στον τομέα της γονιδιακής θεραπείας.

Η μελέτη της εργασίας αφορά τη σύνθεση διυδροφιλων συμπολυμερών πολυ(μεθακρυλικού εστέρα της ολιγοαιθυλενογλυκόλης)-b-πολυ([2-(μεθακρυλοϋλοξυ)αιθυλο] τριμεθυλαμμωνίου χλωριδίου) (poly(oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate)-b-poly([2-(methacryloyloxy)ethyl] trimethylammonium chloride), POEGMA-b-PMETAC) και πολυ(μεθακρυλικού εστέρα της ολιγοαιθυλενογλυκόλης-co-[2-(μεθακρυλοϋλοξυ)αιθυλο] τριμεθυλαμμωνίου χλωριδίου) (poly(oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate-co-[2-(methacryloyloxy)ethyl] trimethylammonium chloride), P(OEGMA-co-METAC)) μέσω της τεχνικής πολυμερισμού RAFT. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των πολυμερών έγινε με χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC) και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου  $^1\text{H-NMR}$ . Μελετήθηκαν επίσης οι ιδιότητες αυτοοργάνωσής τους σε υδατικά μέσα σαν συνάρτηση μεταβολών στη θερμοκρασία και την ιοντική ισχύ με τη χρήση μεθόδων σκέδασης φωτός (DLS, ELS) και φασματοσκοπίας φθορισμού (FS). Η απόκριση των συστημάτων στις παραπάνω φυσικοχημικές παραμέτρους συντελεί στην εφαρμογή τους ως φορείς γονιδίων. Τα κατιοντικά πολυηλεκτρολυτικά πολυμερή συμπλέχθηκαν με μόρια DNA και εξετάστηκαν οι ιδιότητες και η συμπεριφορά των σχηματιζόμενων συμπλόκων.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Σύνθεση και χαρακτηρισμός πολυμερών

**ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ:** Διυδροφιλα συμπολυμερή, πολυμερισμός RAFT, σύμπλεξη με DNA

## ABSTRACT

Over the past decades, double-hydrophilic copolymers have attracted the scientific interest because of their ability to self-assemble in aqueous solutions. In the present work, we report the synthesis of novel copolymers that can be applied in gene delivery.

The aim of the current research is the synthesis of double-hydrophilic copolymers poly(oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate)-b-poly([2-(methacryloyloxy)ethyl] trimethylammonium chloride) (POEGMA-b-PMETAC) and poly(oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate-co-[2-(methacryloyloxy)ethyl] trimethylammonium chloride) (P(OEGMA-co-METAC)) using the RAFT technique. Their molecular characterization was carried out using size exclusion chromatography (SEC) and proton nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H-NMR}$ ). We also studied the copolymers' self-assembling behavior in aqueous solutions under the effect of temperature and ionic strength changes using light scattering techniques (DLS, ELS) and fluorescence spectroscopy (FS). The copolymers' response to physical and chemical parameters contributes to their application as gene vectors. The cationic polyelectrolyte polymers were complexed with DNA molecules and the properties and behavior of the formed complexes were studied.

**SUBJECT AREA:** Polymer synthesis and characterization

**KEYWORDS:** Double-hydrophilic copolymers, RAFT polymerization, DNA complexation

**Αφιερωμένο στην οικογένειά μου**

**Σας ευχαριστώ...**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της εργασίας μου έλαβε χώρα στο Ινστιτούτο Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

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

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Ερμόλαο Ιατρού, τον Δρ. Μαρίνο Πιτσικάλη καθώς και όλους του διδάσκοντες του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Επιστήμη Πολυμερών και Εφαρμογές της στη Βιομηχανία» για τις πολύτιμες γνώσεις που αποκόμισα παρακολουθώντας το πρόγραμμα.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ερευνητές του Ινστιτούτου Θεωρητικής και Φυσικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, καθώς και τους φοιτητές του Ινστιτούτου για τις πολύτιμες συμβουλές τους και το ευχάριστο περιβάλλον εργασίας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια Διδάκτορα Βαρβάρα Χρυσοστόμου για την πολύτιμη και συνεχή γνώση που μου προσέφερε σε κάθε στάδιο υλοποίησης της εργασίας μου, καθώς και τις υποψήφιες Διδάκτορες Μάρθα Καφετζή και Δέσποινα Γιαούζη για τη βοήθειά τους και το έμπρακτο ενδιαφέρον τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης της ερευνητικής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου και τους ανθρώπους που με στήριξαν και μου συμπαραστάθηκαν όλη αυτή την περίοδο.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....</b>	<b>16</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>17</b>
1.1 Αμφίφιλα συμπολυμερή .....	17
1.1.1 Διπλά υδρόφιλα συμπολυμερή.....	19
1.1.2 Αποκρίσιμα πολυμερή.....	20
1.2 Αυτοοργάνωση αμφίφιλων συμπολυμερών .....	26
1.2.1 Αυτοοργάνωση αμφίφιλων συσταδικών συμπολυμερών.....	28
1.2.2 Αυτοοργάνωση αμφίφιλων τυχαίων συμπολυμερών .....	30
1.2.3 Τρόποι παρασκευής μικκυλίων από αμφίφιλα συμπολυμερή.....	31
1.3 Πολυηλεκτρολύτες .....	33
1.4 Σύμπλεξη πολυμερών με DNA .....	35
1.5 Πολυμερισμός αντιστρεπτής προσθήκης-μεταφοράς αλυσίδας με απόσπαση (RAFT Polymerization).....	36
1.6 Σκοπός της εργασίας .....	40
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ .....</b>	<b>42</b>
2.1 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC).....	42
2.2 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).....	44
2.3 Φασματοσκοπία φθορισμού (FS) .....	46
2.4 Σκέδαση φωτός (LS).....	47
2.4.1 Στατική σκέδαση φωτός (Static Light Scattering, SLS).....	48
2.4.2 Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS).....	51
2.4.3 Ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός (ELS) - ζ-δυναμικό .....	54
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>57</b>
3.1 Υλικά και αντιδραστήρια .....	57
3.2 Οργανολογία και μέθοδοι χαρακτηρισμού .....	58
3.3 Σύνθεση πολυμερών μέσω της τεχνικής πολυμερισμού RAFT.....	59
3.3.1 Σύνθεση ομοπολυμερούς POEGMA .....	60

3.3.2	Σύνθεση συσταδικού συμπολυμερούς P(OEGMA-b-PMETAC).....	60
3.3.3	Σύνθεση στατιστικών συμπολυμερών P(OEGMA-co-METAC).....	61
3.3.4	Σύνθεση ομοπολυμερούς PMETAC .....	62
3.4	Αυτοοργάνωση των PMETAC, P(OEGMA-b-PMETAC και P(OEGMA-co-METAC) σε υδατικά διαλύματα .....	63
3.5	Μελέτη της επίδρασης φυσικοχημικών παραμέτρων στα διαλύματα των πολυμερών .....	63
3.6	Σύμπλεξη των PMETAC, P(OEGMA-b-PMETAC και P(OEGMA-co-METAC) συσσωματωμάτων με μόρια DNA.....	65
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>		<b>67</b>
4.1	Σύνθεση πολυμερών μέσω της τεχνικής πολυμερισμού RAFT.....	67
4.2	Μοριακός χαρακτηρισμός ομοπολυμερών και συμπολυμερών .....	70
4.3	Μελέτη αυτοοργάνωσης ομοπολυμερούς και συμπολυμερών σε υδατικά διαλύματα .....	77
4.4	Μελέτη επίδρασης φυσικοχημικών παραμέτρων στα διαλύματα πολυμερών .....	81
4.4.1	Μελέτη επίδρασης της θερμοκρασίας.....	81
4.4.2	Μελέτη επίδρασης της ιοντικής ισχύος .....	83
4.5	Σύμπλεξη των PMETAC, P(OEGMA-b-PMETAC και P(OEGMA-co-METAC) με DNA.....	88
4.6	Μελέτη επίδρασης της ιοντικής ισχύος στα σύμπλοκα των πολυμερών με μόρια DNA .....	96
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>		<b>101</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....</b>		<b>103</b>
<b>ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....</b>		<b>104</b>
<b>ΑΝΑΦΟΡΕΣ .....</b>		<b>106</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Μηχανισμός πολυμερισμού αντιστρεπτής προσθήκης - μεταφοράς αλυσίδας με απόσπαση (RAFT).....	39
Σχήμα 3.1: Τα μονομερή a) OEGMA και b) METAC.....	57
Σχήμα 4.1: Συνθετική πορεία ομοπολυμερισμού POEGMA.....	68
Σχήμα 4.2: Συνθετική πορεία παρασκευής του συσταδικού συμπολυμερούς POEGMA-b-PMETAC.....	68
Σχήμα 4.3: Συνθετική πορεία παρασκευής των στατιστικών συμπολυμερών P(OEGMA-co-METAC).....	69
Σχήμα 4.4: Συνθετική πορεία ομοπολυμερισμού PMETAC.....	70
Σχήμα 4.5: Χρωματογράφημα SEC ομοπολυμερούς POEGMA.....	71
Σχήμα 4.6: Χρωματογράφημα SEC συμπολυμερούς POEGMA-b-PMETAC.....	72
Σχήμα 4.7: Χρωματογράφημα SEC συμπολυμερούς P(OEGMA-co-METAC)-1.....	73
Σχήμα 4.8: Χρωματογράφημα SEC ομοπολυμερούς PMETAC.....	73
Σχήμα 4.9: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του συμπολυμερούς POEGMA-b-PMETAC σε $\text{D}_2\text{O}$ .....	74
Σχήμα 4.10: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του συμπολυμερούς P(OEGMA-co-METAC)-1 σε $\text{D}_2\text{O}$ .....	74
Σχήμα 4.11: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του ομοπολυμερούς PMETAC σε $\text{D}_2\text{O}$ .....	75
Σχήμα 4.12: Διάγραμμα κατανομής μεγεθών ομοπολυμερούς PMETAC.....	78
Σχήμα 4.13: Διάγραμμα κατανομής μεγεθών συμπολυμερούς POEGMA-b-PMETAC.....	79
Σχήμα 4.14: Διάγραμμα εξάρτησης της έντασης σκεδάσεως I συναρτήσεως της θερμοκρασίας για τα διαλύματα των συμπολυμερών.....	82

Σχήμα 4.15: Διάγραμμα εξάρτησης της υδροδυναμικής ακτίνας $R_h$ συναρτήσει της θερμοκρασίας για τα διαλύματα των συμπολυμερών.....	82
Σχήμα 4.16: Διάγραμμα εξάρτησης της έντασης σκεδάσεως $I$ συναρτήσει της ιοντικής ισχύος για τα διαλύματα των συμπολυμερών.....	84
Σχήμα 4.17: Διάγραμμα εξάρτησης της υδροδυναμικής ακτίνας $R_h$ συναρτήσει της ιοντικής ισχύος για τα διαλύματα των συμπολυμερών.....	84
Σχήμα 4.18: Διάγραμμα κατανομής μεγεθών δείγματος POEGMA-b-PMETAC σε NaCl(aq) 0.15M.....	86
Σχήμα 4.19: Διάγραμμα κατανομής μεγεθών δείγματος POEGMA-b-PMETAC σε NaCl(aq) 0.3M.....	86
Σχήμα 4.20: Μεταβολή της έντασης $I$ και της υδροδυναμικής ακτίνας $R_h$ συναρτήσει του λόγου N/P για το σύστημα PMETAC/DNA.....	89
Σχήμα 4.21: Μεταβολή του ζ-δυναμικού συναρτήσει του λόγου N/P για το σύστημα PMETAC/DNA.....	90
Σχήμα 4.22: Μεταβολή της έντασης $I$ και της υδροδυναμικής ακτίνας $R_h$ συναρτήσει του λόγου N/P για το σύστημα POEGMA-b-PMETAC/DNA.....	92
Σχήμα 4.23: Μεταβολή του ζ-δυναμικού συναρτήσει του λόγου N/P για το σύστημα POEGMA-b-PMETAC/DNA.....	93
Σχήμα 4.24: Μεταβολή της έντασης $I$ και της υδροδυναμικής ακτίνας $R_h$ συναρτήσει του λόγου N/P για το σύστημα P(OEGMA-co-METAC)-1/DNA...	94
Σχήμα 4.25: Μεταβολή του ζ-δυναμικού συναρτήσει του λόγου N/P για το σύστημα P(OEGMA-co-METAC)-1/DNA.....	94
Σχήμα 4.26: Διάγραμμα απόσβεσης φθορισμού και φάσματα που περιγράφουν την αλληλεπίδραση EtBr/DNA με το συμπολυμερές P(OEGMA-co-METAC)-1.....	96
Σχήμα 4.27: Μεταβολή της έντασης $I$ συναρτήσει της ιοντικής ισχύος για το σύστημα PMETAC/DNA, για λόγους φορτίων N/P=1 και N/P=8.....	97

Σχήμα 4.28: Μεταβολή της υδροδυναμικής ακτίνας  $R_h$  συναρτήσει της ιοντικής ισχύος για το σύστημα PMETAC/DNA, για λόγους φορτίων  $N/P=1$  και  $N/P=8$ .....98

Σχήμα 4.29: Μεταβολή της έντασης  $I$  και της υδροδυναμικής ακτίνας  $R_h$  συναρτήσει της ιοντικής ισχύος για το σύστημα POEGMA-b-PMETAC/DNA, για λόγους φορτίων  $N/P=1$  και  $N/P=8$ .....99

Σχήμα 4.30: Μεταβολή της έντασης  $I$  και της υδροδυναμικής ακτίνας  $R_h$  συναρτήσει της ιοντικής ισχύος για το σύστημα P(OEGMA-co-METAC)-1/DNA, για λόγους φορτίων  $N/P=1$  και  $N/P=8$ .....100

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Σχηματική απεικόνιση των κυριότερων δομών συμπολυμερών από δύο διαφορετικές δομικές μονάδες.....	17
Εικόνα 1.2: Αναπαράσταση της μετάπτωσης φάσης που συνδέεται με την LCST και την UCST.....	23
Εικόνα 1.3: Αυτοοργάνωση σε μικκύλια αμφίφιλου δισυσταδικού συμπολυμερούς.....	29
Εικόνα 1.4: Απεικόνιση σχηματισμού μικκυλίου από δισυσταδικό συμπολυμερές.....	32
Εικόνα 1.5: Επέκταση της πολυμερικής αλυσίδας με την ελάττωση της ιοντικής ισχύος.....	34
Εικόνα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση του διαχωρισμού ενός αραιού πολυμερικού διαλύματος με χρήση της SEC.....	43
Εικόνα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση οργανολογίας SEC.....	43
Εικόνα 2.3: Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτομέτρου NMR.....	45
Εικόνα 2.4: Απλοποιημένο διάγραμμα των επιμέρους διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα κατά το φαινόμενο του φθορισμού.....	47
Εικόνα 2.5: Διάγραμμα Zimm.....	50
Εικόνα 2.6: Σχηματική απεικόνιση της διασποράς των ιόντων του διαλύματος γύρω από ένα φορτισμένο σωματίδιο.....	55

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 4.1: Μοριακά χαρακτηριστικά ομοπολυμερών ΡΟΕΓΜΑ και ΡΜΕΤΑC και συμπολυμερών ΡΟΕΓΜΑ-b-ΡΜΕΤΑC και Ρ(ΟΕΓΜΑ-co-MΕΤΑC).....	76
Πίνακας 4.2: Αποτελέσματα από DLS και ELS για τα συσσωματώματα των πολυμερών.....	78
Πίνακας 4.3: Οι λόγοι $I_1/I_3$ για τα δείγματα πολυμερών σε συγκεντρώσεις άλατος 0.01M, 0.15M και 0.3M.....	88
Πίνακας 4.4: Αποτελέσματα τεχνικής SLS με βάση την αναλογία N/P για το σύστημα ΡΜΕΤΑC/DNA.....	90

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματεύεται τη σύνθεση διυδρόφιλων συσταδικών και τυχαίων συμπολυμερών με τη χρήση τη τεχνικής πολυμερισμού RAFT, το χαρακτηρισμό και τη μελέτη της αυτοοργάνωσής τους σε υδατικά διαλύματα.

Στο πρώτο κεφάλαιο παρουσιάζονται βασικές πληροφορίες για τα διυδρόφιλα συμπολυμερή, τις ιδιότητες αυτοοργάνωσής τους σε υδατικά διαλύματα και περιγράφεται αναλυτικά η μεθοδολογία του ζωντανού/ ελεγχόμενου πολυμερισμού RAFT. Στο τέλος του πρώτου κεφαλαίου παρουσιάζεται ο σκοπός της εργασίας.

Στο δεύτερο κεφάλαιο αναπτύσσονται οι αρχές λειτουργίας των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό των υλικών που παρασκευάστηκαν. Στο τρίτο κεφάλαιο αναπτύσσεται αναλυτικά η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή των συμπολυμερών καθώς και το χαρακτηρισμό τους.

Στο τέταρτο κεφάλαιο γίνεται η παρουσίαση και η συζήτηση των αποτελεσμάτων που εξήχθησαν, παραθέτοντας τα αντίστοιχα διαγράμματα, σχήματα, εικόνες και πίνακες με σκοπό την σωστή ανάλυσή τους. Το τελευταίο κεφάλαιο αναφέρεται στα συνολικά συμπεράσματα που αποκομίσθησαν κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων και την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

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

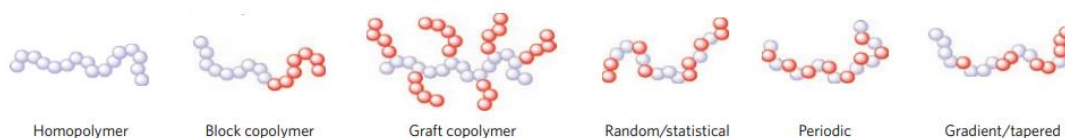


# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Αμφίφιλα συμπολυμερή

Πολυμερές είναι ένα μακρομόριο το οποίο αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων μονάδων, τα μονομερή, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με ομοιοπολικούς δεσμούς. Πολυμερή που περιέχουν ένα μοναδικό είδος επαναλαμβανόμενης μονάδας ονομάζονται ομοπολυμερή (homopolymers), ενώ όσα περιέχουν πάνω από ένα είδος ονομάζονται συμπολυμερή (copolymers). Ο χαρακτηρισμός των συμπολυμερών μπορεί να γίνει με βάση τη θέση των διαφορετικών επαναλαμβανόμενων μονάδων κατά μήκος του μορίου, η οποία ελέγχεται από τον τρόπο σύνθεσής τους. Οι κύριες κατηγορίες συμπολυμερών είναι τα συμπολυμερή κατά συστάδες (block), τα τυχαία ή στατιστικά (random/statistical) συμπολυμερή, τα εναλλασσόμενα (periodic) και τα εμβολιασμένα (graft). (Εικόνα 1.1) Ένα συσταδικό συμπολυμερές χαρακτηρίζεται από εκτεταμένες συνεχόμενες ακολουθίες του ίδιου μονομερούς, ενώ σε ένα τυχαίο συμπολυμερές η ακολουθία των μονομερών είναι αυστηρά τυχαία και εξαρτάται μόνο από τη σχετική περιεκτικότητα των επαναλαμβανόμενων μονάδων.[1]



**Εικόνα 1.1: Σχηματική απεικόνιση των κυριότερων δομών συμπολυμερών από δύο διαφορετικές δομικές μονάδες.[2]**

Τα συμπολυμερή που αποτελούνται από μονομερικές ομάδες οι οποίες διαλύονται σε διαφορετικούς διαλύτες, ονομάζονται αμφίφιλα. Ο όρος αμφιφιλικότητα όμως είναι ευρύς και περιγράφει ένα μόριο που εμφανίζει συγγένεια με δύο διαφορετικά υποστρώματα, ανεξάρτητα από τη φύση αυτών των υποστρωμάτων. Σε αυτό το πλαίσιο, επιφάνειες, μόρια, διαλύτες ή οποιοδήποτε άλλο είδος υλικού μπορούν να θεωρηθούν ως υποστρώματα.[3]

Η ευρεία έννοια του όρου αφορά την συμπεριφορά της ουσίας ως προς την διαλυτότητά της σε ποικιλία διαλυτών, την διεπιφανειακή δραστικότητα, την σταθερότητα εντός μέσων με διαφορετική ενεργειακή συνοχή και την σταθεροποίηση διεσπαρμένων σωματιδίων. Η ασυμβατότητα των διαφορετικών ομάδων έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενδιαφερουσών μορφολογιών σε στερεά κατάσταση ή σε διάλυμα, όπως μικκύλια. Η ιδιαίτερη συμπεριφορά των αμφίφιλων συμπολυμερών καθίσταται δυνατή μέσω της μεγάλης μεταβλητότητας της δομής τους μέσω της επιλογής των δομικών μονάδων, της δυνατότητας συμπολυμερισμού αλλά και του μήκους και της δομής των διαφορετικών τμημάτων. Συμπολυμερή διαφόρων αρχιτεκτονικών είναι εφικτά, όπως τυχαία συμπολυμερή, συσταδικά, εμβολιασμένα και αστεροειδή.[4] Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αμφίφιλα συσταδικά συμπολυμερή και ιδιαίτερα εκείνα που αποτελούνται από υδρόφιλα και υδρόφοβα μονομερή.

Τα αμφίφιλα συμπολυμερή εμφανίζουν μοναδικές ιδιότητες, οι οποίες καθορίζονται από τη μοριακή δομή τους, και κατά συνέπεια πλήθος πιθανών εφαρμογών σε πολλούς τομείς της επιστήμης και της βιομηχανίας. Αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες μπορούν να υποκαταστήσουν συμβατικά υλικά σε μεγάλο φάσμα εφαρμογών στις οποίες είναι απαραίτητη η σταθεροποίηση ετεροφασικών συστημάτων, όπως οι πολυμερισμοί γαλακτώματος, η σταθεροποίηση χρωστικών ουσιών, η σύνθεση καλλυντικών και η μεταφορά φαρμάκων. Μερικά επιπρόσθετα πλεονεκτήματα των αμφίφιλων πολυμερών είναι η σταθεροποίηση του συστήματος με διάφορους μηχανισμούς όπως η στερεοχημική παρεμπόδιση, ως σταθεροποιητές υψηλού μοριακού βάρους, καθώς και η δυνατότητα ελέγχου της κρίσιμης μικκυλιακής συγκέντρωσης, ώστε να επιτυγχάνεται η αποδοτικότερη διασπορά για την εκάστοτε εφαρμογή. Τέλος, η δομή και οι ιδιότητες των σχηματιζόμενων νανοδομών επηρεάζονται από το μήκος και τη χημική δομή των συστάδων του συμπολυμερούς, ενώ ο χρόνος που απαιτείται για τον σχηματισμό τους μπορεί να ρυθμιστεί σε δευτερόλεπτα, λεπτά ή ώρες.[4]

### 1.1.1 Διπλά υδρόφιλα συμπολυμερή [3]

Διπλά υδρόφιλα ή διυδρόφιλα κατά συστάδες συμπολυμερή ονομάζονται τα συμπολυμερή που αποτελούνται από δύο υδατοδιαλυτές συστάδες διαφορετικής χημικής φύσης. Αυτά τα πολυμερή είναι συνήθως αρκετά μικρά, με μήκος συστάδας μεταξύ  $10^3$ - $10^4$  g / mol. Σε πολλές περιπτώσεις, η μία συστάδα απλώς προάγει τη διάλυση, ενώ η άλλη αλληλεπιδρά με ένα υπόστρωμα. Επίσης, μια αλλαγή στη θερμοκρασία ή το pH, καθώς και η συμπλοκοποίηση με κατάλληλα μόρια, μπορούν να προκαλέσουν σχηματισμό μικκυλίων.

Σε διάλυμα, τα διυδρόφιλα κατά συστάδες συμπολυμερή συμπεριφέρονται σαν κανονικά πολυμερή και πολυηλεκτρολύτες, και δεν παρουσιάζουν χαρακτηριστικά αμφίφιλου, όπως σχηματισμό μικκυλίων ή μειωμένη επιφανειακή τάση των διαλυμάτων τους. Η αμφιφιλικότητα προκαλείται μόλις τα μόρια έρθουν σε επαφή με ένα υπόστρωμα, όπως μια επιφάνεια μετάλλου, οδηγώντας σε αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα και επακόλουθο σχηματισμό συμπλόκου ή υπερδομής. Η θερμοκρασία, η ιοντική ισχύς, η διακύμανση του pH, καθώς και μία αντίδραση συμπλοκοποίησης μπορούν να αντιστρέψουν πλήρως την υδροφιλία μιας συστάδας σε υδροφοβικότητα. Από αυτή την άποψη, τα διυδρόφιλα συσταδικά συμπολυμερή αποτελούν αποκρινόμενα (switchable) αμφίφιλα με ικανότητα απόκρισης σε ερεθίσματα της μιας συστάδας και παρέχουν νέες εφαρμογές. Μία ειδική περίπτωση διυδρόφιλων συσταδικών συμπολυμερών είναι πολυαμφολύτες που αποτελούνται από μία συστάδα πολυκατιόντος και μία συστάδα πολυανιόντος, που μπορεί να δρα ως υπόστρωμα. Έτσι, ο σχηματισμός ενδομοριακού/διαμοριακού συμπλόκου στα συγκεκριμένα πολυμερή εξαρτάται από το pH.

Τα διυδρόφιλα συσταδικά συμπολυμερή αποτελούν μια νέα κατηγορία συμπολυμερών, τα οποία απέκτησαν ταχύτατα αυξανόμενο επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων και εφαρμογών στην επιστήμη των υλικών, τη φαρμακευτική, τη βιοχημεία και την επιστήμη των πολυμερών. Πιο συγκεκριμένα, βρίσκουν ποικίλες εφαρμογές στη γονιδιακή θεραπεία, σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, τροποποιητές ανάπτυξης κρυστάλλου, νανοαντιδραστήρες για τη σύνθεση κολλοειδών μετάλλων, μεμβράνες αφαλάτωσης και υδατικά γαλακτώματα πολυμερών.

Είναι πιθανό ότι περισσότερες εφαρμογές θα προκύψουν στο εγγύς μέλλον λόγω των σημαντικών πλεονεκτημάτων που προσφέρει η χρήση τους. Πολλά σημαντικά υποστρώματα όπως ανόργανοι κρύσταλλοι, φάρμακα ή βιομόρια, κολλοειδή ή συστατικά σωματικών υγρών είναι υδρόφιλα, αλλά όχι υδατοδιαλυτά, και βρίσκονται σε υδατικά περιβάλλοντα. Ο καλύτερος μοριακός σχεδιασμός ενός τασιενεργού για αυτά τα υποστρώματα είναι αυτός ενός διπλά υδρόφιλου μορίου. Παράλληλα, ο σχεδιασμός τους είναι ευέλικτος όσον αφορά τη λειτουργική συστάδα, ώστε να μπορεί να προσαρμοστεί σε σχεδόν κάθε τύπο υποστρώματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρήση βιοσυμβατών δομικών μονάδων για τη σύνθεση πολυμερών για ιατρικούς σκοπούς. Τέλος, το νερό ως διαλύτης αποκτά αυξανόμενη σημασία σήμερα, καθώς η οικολογία και η κοινωνία απαιτούν τη χρήση ουσιών φιλικών προς το περιβάλλον.

Υπάρχουν αρκετές συνθετικές πορείες για τη σύνθεση διυδρόφιλων κατά συστάδες συμπολυμερών. Τα πιο καλά καθορισμένα συσταδικά συμπολυμερή με ελεγχόμενα μήκη συστάδων μπορούν να ληφθούν μέσω ζωντανών/ελεγχόμενων πολυμερισμών (ανιοντικός, κατιοντικός, πολυμερισμός μεταφοράς ομάδας). Επιπλέον, η σύζευξη των δύο συστάδων και η τροποποίηση της μίας συστάδας του συμπολυμερούς με κατάλληλες αντιδράσεις αποτελούν εναλλακτικές συνθετικές πορείες. Ωστόσο, η σύνθεσή τους θεωρείται απαιτητική και χρονοβόρα, καθώς περιλαμβάνει διαδοχικούς ελεγχόμενους πολυμερισμούς ή κατεργασίες μετά τον πολυμερισμό, όπως εμβολιασμό, υποκατάσταση ή υδρόλυση. Σε αντίθεση με τα συσταδικά συμπολυμερή, η σύνθεση διυδρόφιλων τυχαίων συμπολυμερών είναι πιο εύκολη και γρήγορη, καθώς συνήθως επιτυγχάνεται με συμπολυμερισμό ενός σταδίου δύο (ή περισσότερων) διαφορετικών μονομερών, γεγονός που καθιστά ιδιαίτερα ελκυστική την εφαρμογή της σε βιομηχανική κλίμακα. Λαμβάνοντας υπόψιν τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν τα αμφίφιλα τυχαία πολυμερή σε σύγκριση με τα συσταδικά, αξίζει να επισημάνουμε τις υπερμοριακές δυνατότητές τους στην αυτο-οργάνωση.[5]

### **1.1.2 Αποκρίσιμα πολυμερή**

Τα τελευταία χρόνια η επιστήμη πολυμερών έχει στραφεί σε υλικά, τα οποία μπορούν να αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα (μεταξύ των οποίων το

pH, η θερμοκρασία, το δυναμικό οξειδοαναγωγής, το φως και η ιοντική ισχύς) και να δημιουργούν πολυμοριακά συσσωματώματα, όπως σφαιρικά και κυλινδρικά μικκύλια, κυστιδιακές δομές (vesicles), σύμπλοκα πολυηλεκτρολυτών και «σχιζοφρενικά» μικκύλια, δομές οι οποίες βρίσκουν ποικίλες εφαρμογές σε πλήθος τομέων.[6] Ως αποκρίσιμα σε εξωτερικά ερεθίσματα πολυμερή ορίζονται τα πολυμερή που υφίστανται σχετικά μεγάλες και άμεσες φυσικές ή χημικές μεταβολές αποκρινόμενα σε μικρές εξωτερικές αλλαγές στις συνθήκες περιβάλλοντος.[7] Σε αυτά τα πολυμερή έχουν δοθεί διάφορες ονομασίες, όπως αποκρίσιμα, έξυπνα και περιβαλλοντικά ευαίσθητα (ενώ στα αγγλικά επικρατεί ο όρος “stimuli-responsive”).

Τα αποκρίσιμα πολυμερικά συστήματα αναγνωρίζουν ένα ερέθισμα ως σήμα, κρίνουν το μέγεθος του σήματος και στη συνέχεια μεταβάλουν τη διαμόρφωση της αλυσίδας με άμεση απόκριση. Υπάρχουν πολλά διαφορετικά ερεθίσματα που ρυθμίζουν την απόκριση των πολυμερών και μπορούν να ταξινομηθούν σε χημικά και σε φυσικά ερεθίσματα. Τα χημικά ερεθίσματα, όπως το pH, η ιοντική ισχύς, οι ιονικοί και χημικοί παράγοντες, αλλάζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων ή μεταξύ των αλυσίδων και του διαλύτη σε μοριακό επίπεδο. Τα φυσικά ερεθίσματα, όπως η θερμοκρασία, το ηλεκτρικό ή μαγνητικό πεδίο και η μηχανική τάση, επηρεάζουν τους θερμοδυναμικούς παράγοντες (ενθαλπία και εντροπία) και μεταβάλουν τις μοριακές αλληλεπιδράσεις.[8] Επιπλέον, ορισμένα πολυμερικά συστήματα έχουν την ικανότητα να είναι πολλαπλά αποκρίσιμα (multi-stimuli responsive), καθώς συνδυάζουν την αποκρισιμότητα σε δύο ή περισσότερα εξωτερικά ερεθίσματα, για παράδειγμα είναι θερμοευαίσθητα, αλλά και αποκρίσιμα σε μεταβολές του pH. Από την άλλη μεριά, υπάρχουν εργασίες που αναφέρουν την ταυτόχρονη επιβολή δύο ερεθισμάτων, ώστε να υπάρξει απόκριση από το προς μελέτη πολυμερές, το οποίο ονομάζεται διπλοαποκρινόμενο.[9, 10] Μία κατηγορία εξωτερικού ερεθίσματος τα τελευταία χρόνια θεωρείται το βιοχημικό ερέθισμα, το οποίο περιλαμβάνει απόκριση σε αντιγόνα, ένζυμα, υποκαταστάτες ή/και βιοχημικούς παράγοντες.

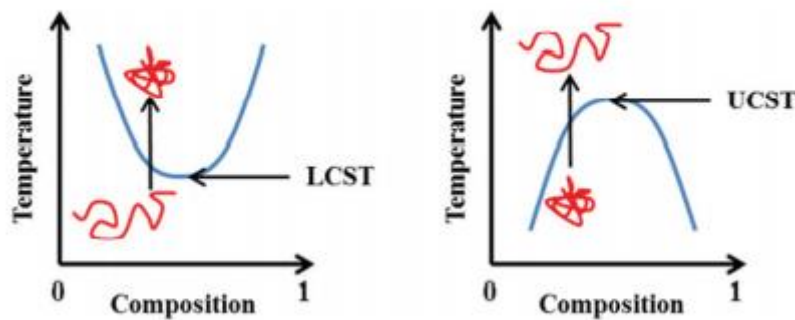
Το ενδιαφέρον για τα αποκρίσιμα πολυμερή έχει αυξηθεί εκθετικά τα τελευταία χρόνια λόγω των δυνητικών εφαρμογών στη βιομηχανία των χρωμάτων, καλλυντικών αλλά κυρίως στο πεδίο της βιοϊατρικής. Πρόσφατες εξελίξεις στο

σχεδιασμό αποκρίσιμων πολυμερών έχουν δημιουργήσει πλήθος ευκαιριών για νέες βιοϊατρικές εφαρμογές. Αλλαγές στο σχήμα, τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας, τη διαλυτότητα ή τη μοριακή αυτοοργάνωση των πολυμερικών συστημάτων οδήγησαν σε νέες εφαρμογές στη μεταφορά φαρμάκων, σε κυτταροκαλλιέργειες, βιοδιαχωρισμούς, αισθητήρες και συστήματα ενεργοποίησης. [7, 11] Είναι δυνατή η σύνθεση αποικοδομήσιμων και μη αποικοδομήσιμων πολυμερών ανάλογα με τις ανάγκες κάθε εφαρμογής.

#### **1.1.2.1 Θερμοαποκρινόμενα πολυμερή**

Η θερμοκρασία είναι ίσως το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο ερέθισμα στα αποκρίσιμα πολυμερικά συστήματα. Η μεταβολή της θερμοκρασίας μπορεί να ελεγχθεί σχετικά εύκολα και τα θερμοαποκρινόμενα πολυμερή βρίσκουν πλήθος εφαρμογών *in vitro* αλλά και *in vivo*. Ειδικότερα, τα υδατοδιαλυτά θερμοαποκρινόμενα πολυμερή έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, εφόσον επιτρέπουν βιοχημικές και ιατρικές εφαρμογές. Παρόλο που η μεταβολή της θερμοκρασίας μπορεί να επιφέρει διάφορες αλλαγές ιδιοτήτων (π.χ. θερμοχρωματικά πολυμερή), η συντριπτική πλειονότητα εμφανίζει μια αλλαγή υδροφιλικότητας.

Τα φαινόμενα εμφάνισης κατώτερης κρίσιμης θερμοκρασίας διαλύματος (Lower Critical Solution Temperature, LCST) και ανώτερης κρίσιμης θερμοκρασίας διαλύματος (Upper Critical Solution Temperature, UCST) αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα μη-γραμμικών συμπεριφορών που εμφανίζονται στα θερμοαποκρινόμενα πολυμερή. Πιο συγκεκριμένα, τα πολυμερή επιδεικνύουν μία μετάπτωση όγκου φάσης (volume phase) σε μία συγκεκριμένη θερμοκρασία, που προκαλεί απότομη αλλαγή στη διαλυτότητά τους σε υδατικό μέσο. Τα πολυμερή εκείνα που γίνονται αδιάλυτα με αύξηση της θερμοκρασίας εμφανίζουν LCST, ενώ εκείνα που γίνονται διαλυτά εμφανίζουν UCST. [12]



**Εικόνα 1.2: Αναπαράσταση της μετάπτωσης φάσης που συνδέεται με την LCST και την UCST.[13]**

Η απότομη αλλαγή στην κατάσταση ενυδάτωσης, η οποία επιφέρει τη μετάπτωση όγκου φάσης, αντικατοπτρίζει τις συναγωνιζόμενες ιδιότητες των δεσμών υδρογόνου, όπου οι διαμοριακοί και ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου στις πολυμερικές αλυσίδες, δηλαδή οι ενδομοριακές και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις πολυμερούς-πολυμερούς, προτιμώνται έναντι της διάλυσης του πολυμερούς από το νερό (μέσω δεσμών υδρογόνου), δηλαδή των αλληλεπιδράσεων πολυμερούς-διαλύτη. Σε χαμηλή θερμοκρασία, το ομοιογενές μίγμα παρουσιάζει κυρίως διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου όπως αποδεικνύεται από διάφορες πειραματικές τεχνικές. Με τη θέρμανση του μίγματος πολυμερούς / νερού προάγονται οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό συσσωματωμάτων που συνοδεύεται από θόλωση του αρχικά διαφανούς διαλύματος. [14,15]

Ένα διάλυμα θερμοαποκρινόμενου πολυμερούς κάτω από την LCST είναι διαυγές και ομοιογενές, ενώ πάνω από την LCST εμφανίζεται θόλωση. Ως αποτέλεσμα η κατώτερη κρίσιμη θερμοκρασία διαλύματος αναφέρεται επίσης ως σημείο θολώσεως (cloud point). Αυτό συμβαίνει επειδή είναι πιο ευνοϊκό ενεργειακά. Συγκεκριμένα, λαμβάνοντας υπόψιν την ελεύθερη ενέργεια του συστήματος χρησιμοποιώντας την εξίσωση κατά Gibbs  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  (G: ελεύθερη ενέργεια Gibbs, H: ενθαλπία και S: εντροπία), ο διαχωρισμός φάσεων είναι πιο ευνοϊκός με αύξηση της θερμοκρασίας κυρίως λόγω της εντροπίας του συστήματος. Η κινητήρια δύναμη είναι η εντροπία του νερού,

που όταν το πολυμερές δεν βρίσκεται εντός του διαλύματος, το νερό είναι λιγότερο οργανωμένο και έχει μεγαλύτερη εντροπία. Αξίζει να σημειωθεί ότι η LCST είναι ένα εντροπικώς οδηγούμενο αποτέλεσμα, ενώ η UCST ένα ενθαλπικώς οδηγούμενο αποτέλεσμα.[16]

Η LCST ενός θερμοαποκρινόμενου πολυμερούς επηρεάζεται από την ύπαρξη υδρόφιλων ή υδρόφοβων τμημάτων στις πολυμερικές αλυσίδες και επομένως θα μπορούσε να ελεγχθεί με ενσωμάτωση των κατάλληλων κάθε φορά τμημάτων. Για την αύξηση της LCST ενός πολυμερούς αρκεί ο στατιστικός συμπολυμερισμός του με ένα μικρό ποσοστό υδρόφιλου μονομερούς [17], ενώ μία μικρή ποσότητα υδρόφοβου συστατικού είναι ικανή να ελαττώσει την LCST του συμπολυμερούς. Τα σημεία θολώσεως συσταδικών συμπολυμερών εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το σχετικό μήκος κάθε συστάδας και συνεπώς μπορούν να ρυθμιστούν μεταξύ των τιμών για τα δύο ομοπολυμερή. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι ένα διυδρόφιλο κατά συστάδες συμπολυμερές έχει υψηλότερο σημείο θολώσεως από ένα στατιστικό συμπολυμερές ίδιας σύστασης, γεγονός που πιθανώς οφείλεται στη μικκυλίωση του πρώτου. Η πιο διαλυτή συστάδα εκτίθεται κυρίως στον διαλύτη παρέχοντας καλύτερη διαλυτότητα.[3]

Οι περισσότερες εργασίες σχετίζονται με πολυμερικά συστήματα που εμφανίζουν LCST σε υδατικά διαλύματα, ενώ ελάχιστες αφορούν πολυμερή που εμφανίζουν UCST. Τα πολυμερή με UCST στο νερό υποεκπροσωπούνται σε μεγάλο βαθμό στην έρευνα για διάφορους πιθανούς λόγους. Το UCST παρατηρείται συχνά μόνο υπό λιγότερο επιθυμητές συνθήκες, για παράδειγμα εκτός του εύρους 0 έως 100 °C ή σε χαμηλό pH. Παραδείγματα αποτελούν τα PEO, PVME και καρβοξυλικά πολυμερή. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις το UCST είναι πολύ ευαίσθητο σε ηλεκτρολύτες, τη συγκέντρωση ή και τη σύνθεση του (συμ)πολυμερούς συμπεριλαμβανομένων των τελικών ομάδων, γεγονός που δεν ευνοεί την ευρεία εφαρμογή του πολυμερούς.[12]

Τυπικά συστήματα με UCST βασίζονται σε συνδυασμό ακρυλαμιδίου (AAm) και ακρυλικού οξέος (AAc). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα πολυμερούς με LCST είναι το πολυ(N-ισοπρωπυλ-ακρυλαμίδιο) (PNIPAM), το οποίο εμφανίζει



απότομη μεταβολή φάσης στο νερό στους 32°C, θερμοκρασία ιδιαίτερα χρήσιμη για βιολογικές εφαρμογές. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύνθεση νέων αποκρίσιμων δισυσταδικών και τρισυσταδικών συμπολυμερών τα οποία βρίσκουν ποικίλες εφαρμογές. Ο Αγοτζαρένα και οι συνεργάτες του [18] ανέφεραν τη σύνθεση ενός συσταδικού συμπολυμερούς που περιέχει δύο διαφορετικές υδρόφιλες και θερμοαποκρινόμενες συστάδες, όπου η μία συστάδα εμφανίζει μία UCST και η δεύτερη μία LCST. Αντίθετα με τα αντίστοιχα ομοπολυμερή, τα συμπολυμερή παραμένουν διαλυτά σε όλο το εύρος θερμοκρασιών που μελετήθηκε καθώς η διαλυτή συστάδα διατηρεί τα συσσωματώματα διαλυτά, ενώ σχηματίζονται μικκυλιακές δομές με πολύ διαφορετικές πολικότητες σε χαμηλές και υψηλές θερμοκρασίες από τη συστάδα που παραμένει αδιάλυτη υπό τις δεδομένες συνθήκες. Συνεπώς, ένα απλό θερμικό ερέθισμα επιτρέπει μια αναστρέψιμη εναλλαγή μεταξύ διαφορετικών μορφών συσσωμάτωσης. Επιπλέον, έχει μελετηθεί η σύνθεση ασύμμετρων ουδέτερων, κατιονικών και ανιονικών διπλά υδρόφιλων συμπολυμερών με PEO και η θερμοαποκρινόμενη ή pH-αποκρινόμενη αναστρέψιμη μικκυλίωσή τους. [19]

#### **1.1.2.2 Επίδραση ιοντικής ισχύος**

Η αποκρισιμότητα στην ιοντική ισχύ αποτελεί μία χαρακτηριστική ιδιότητα πολυμερών που περιέχουν ιοντικές ομάδες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι πολυαμφολύτες, πολυμερή τα οποία περιέχουν ανιονικά και κατιονικά φορτία στην ίδια πολυμερική αλυσίδα. Συνεπώς, η συμπεριφορά τους σε διαλύματα εξαρτάται από την αναλογία των ιόντων που βρίσκονται στο πολυμερές και η οποία μπορεί να τροποποιηθεί μέσω συνθετικών πορειών αλλά και εξωγενών αλλαγών στο υδατικό περιβάλλον, συγκεκριμένα ρυθμίζοντας το pH.

Οι μεταβολές στην ιοντική ισχύ μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στο μέγεθος των πολυμερικών μικκυλίων, στη διαλυτότητα του πολυμερούς και στην κινητική απόσβεσης φθορισμού των χρωμοφόρων ομάδων που είναι δεσμευμένες. Η θερμοαποκρινόμενη συμπεριφορά πολυμερών σε υδατικό διάλυμα μπορεί εύκολα να μεταβληθεί με την προσθήκη μικρών μορίων, καθώς μεταβάλλουν τις αλληλεπιδράσεις πολυμερούς-νερού. Η παρουσία αλάτων διαταράσσει την δομή ενυδάτωσης γύρω από τις πολυμερικές

αλυσίδες με αποτέλεσμα τη μείωση της θερμοκρασίας διαχωρισμού φάσεων. Αυτή η δράση εξαρτάται από το είδος των ιόντων και περιγράφεται από τις σειρές Hofmeister. Ως αποτέλεσμα, η παρουσία αλάτων επηρεάζει την απόδοση της θερμικής απόκρισης.[14] Συνεπώς, η επίδραση των αλάτων στα πολυμερικά συστήματα θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη, ιδιαίτερα όσον αφορά τις βιοϊατρικές εφαρμογές.

Η μεταβολή της ιοντικής ισχύος μπορεί να επιφέρει αλλαγές και στη διαλυτότητα ενός πολυμερούς σε υδατικά διαλύματα. Ειδικότερα, λόγω του ανταγωνισμού των πολυμερικών μορίων με τα ιόντα του άλατος για τα μόρια νερού που απαιτούνται για την επιδιалύτωσή τους, η διαλυτότητα μειώνεται (γνωστό και σαν φαινόμενο εξαλάτωσης-salting out). [20] Σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων τα μόρια του νερού που είναι διαθέσιμα για την επιδιалύτωση των πολυμερών δεν είναι αρκετά καθώς η πλειονότητά τους συνδέεται ισχυρά με τα άλατα. Έτσι, οι αλληλεπιδράσεις πολυμερούς-πολυμερούς υπερτερούν των αλληλεπιδράσεων πολυμερούς-νερού, οπότε σχηματίζονται συσσωματώματα με αποτέλεσμα την καταβύθιση των πολυμερικών μορίων. Το φαινόμενο εξαλάτωσης αξιοποιείται για το σχεδιασμό πολυμερών αποκρίσιμων στην ιοντική ισχύ ("salt-responsive" polymers). Ιδιαίτερη σημασία έχει ότι η ιοντική απόκριση επιτρέπει τη μετάβαση φάσης θερμοευαίσθητων πολυμερών χωρίς αλλαγή θερμοκρασίας. Παράλληλα γίνεται δυνατή η αλλαγή της μετάπτωσης φάσης υδατοδιαλυτών βιοσυμβατών μη ιοντικών πολυμερών μέσω της προσθήκης αλάτων.[21]

## **1.2 Αυτοοργάνωση αμφίφιλων συμπολυμερών**

Είναι γνωστό ότι τα συσταδικά συμπολυμερή με χημικά ασύμβατες συστάδες υφίστανται αυθόρμητη αυτοοργάνωση σε εξαιρετικά διατεταγμένες δομές στη στερεή κατάσταση. Σε σύγκριση με τη συμπεριφορά τους σε στερεά κατάσταση, η αυτοοργάνωση συσταδικών συμπολυμερών σε διαλύματα αποτελεί μία περίπλοκη διαδικασία λόγω της παρουσίας επιπρόσθετων αλληλεπιδράσεων των συστάδων με το διαλύτη καθώς και μεταξύ τους, παρουσιάζοντας έτσι δυσκολία στην πρόβλεψη της μορφολογίας των δομών που σχηματίζονται. Η διαδικασία αυτοοργάνωσης μπορεί να συμβεί σε επίπεδο αλυσίδας πολυμερούς (ενδομοριακή αναδίπλωση) ή να περιλαμβάνει πολλαπλές αλυσίδες με παρόμοιες ή ανόμοιες δομές (διαμοριακή σύνδεση).

Το αυξανόμενο ενδιαφέρον για τα συμπολυμερή κατά συστάδες οφείλεται κυρίως στις μοναδικές ιδιότητές τους σε διαλύματα ως συνέπεια της μοριακής τους δομής. Συγκεκριμένα, η ικανότητα αυτοοργάνωσής τους, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό μικκυλιακών συστημάτων, σχετίζεται άμεσα με την ασυμβατότητα των τμημάτων τους.

Η μικκυλίωση των συμπολυμερών κατά συστάδες σε έναν εκλεκτικό ως προς τη μία συστάδα διαλύτη είναι ένα τυπικό χαρακτηριστικό των κολλοειδών ιδιοτήτων τους. Όταν ένα συσταδικό συμπολυμερές διαλύεται σε ένα διαλύτη ο οποίος είναι θερμοδυναμικά καλός διαλύτης για τη μία συστάδα και κακός για την άλλη, οι πολυμερικές αλυσίδες μπορούν να οργανωθούν αντιστρεπτά προς σχηματισμό υπερμοριακών δομών που χαρακτηρίζονται ως μικκύλια και μοιάζουν με τις κλασικές δομές που δίνουν τα αμφίφιλα μόρια μικρού μοριακού βάρους. Τα μικκύλια αποτελούνται από ένα συμπαγή ή διογκωμένο πυρήνα, ο οποίος σχηματίζεται από τις αδιάλυτες συστάδες του συμπολυμερούς και περιβάλλεται από το κέλυφος, το οποίο αποτελείται από τις διαλυτές συστάδες και είναι διογκωμένο στον εκλεκτικό διαλύτη. Τα μικκύλια αυτά είναι συνήθως σφαιρικά με στενή κατανομή μεγεθών, χαρακτηριστικά που πιθανόν να αλλάξουν υπό ορισμένες συνθήκες. [22] Έχουν περιγραφεί σφαιρικά και κυλινδρικά μικκύλια καθώς και πιο πολύπλοκες δομές κυστιδίων. Τα περισσότερα συσταδικά συμπολυμερή που έχουν μελετηθεί σχηματίζουν μικκύλια είτε με την πιο πολική είτε με την πιο μη πολική συστάδα να αποτελεί το κέλυφος, δηλαδή, κανονικά (regular) ή ανάστροφα μικκύλια (reverse micelles), ανάλογα με την πολικότητα του διαλύτη.

Το μικκυλιακό σύστημα χαρακτηρίζεται από την ισορροπία μεταξύ ελεύθερων αλυσίδων (unimers) και μικκυλίων και την κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση (critical micellar concentration, cmc), η οποία είναι η μικρότερη συγκέντρωση ανίχνευσης μικκυλίων στο διάλυμα. Η cmc δεν αποτελεί μία θερμοδυναμική παράμετρο του συστήματος, γιατί η τιμή της εξαρτάται από την ευαισθησία ανίχνευσης μικκυλίων με τη χρησιμοποιούμενη πειραματική μέθοδο. Αντί της cmc ορίζεται και η κρίσιμη μικκυλιακή θερμοκρασία (critical micellar temperature, cmt), ως η μέγιστη θερμοκρασία εμφάνισης μικκυλίων σε ορισμένη συγκέντρωση διαλύματος συμπολυμερούς. Μία ακόμη σημαντική

παράμετρο αποτελεί ο μέσος βαθμός συσσωμάτωσης,  $N_w$ , των μικκυλίων, ο οποίος εκφράζει το μέσο αριθμό μακρομοριακών αλυσίδων συμπολυμερών που συμμετέχουν στη μικκυλιακή δομή. Προσδιορίζεται ως ο λόγος των μοριακών βαρών των μικκυλίων και των ελεύθερων αλυσίδων. Τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά των μικκυλίων περιγράφονται με τη γυροσκοπική,  $R_g$ , και την υδροδυναμική ακτίνα,  $R_h$ , καθώς και με την ακτίνα του πυρήνα,  $R_c$ , και το πάχος του κελύφους,  $L$ . [23]

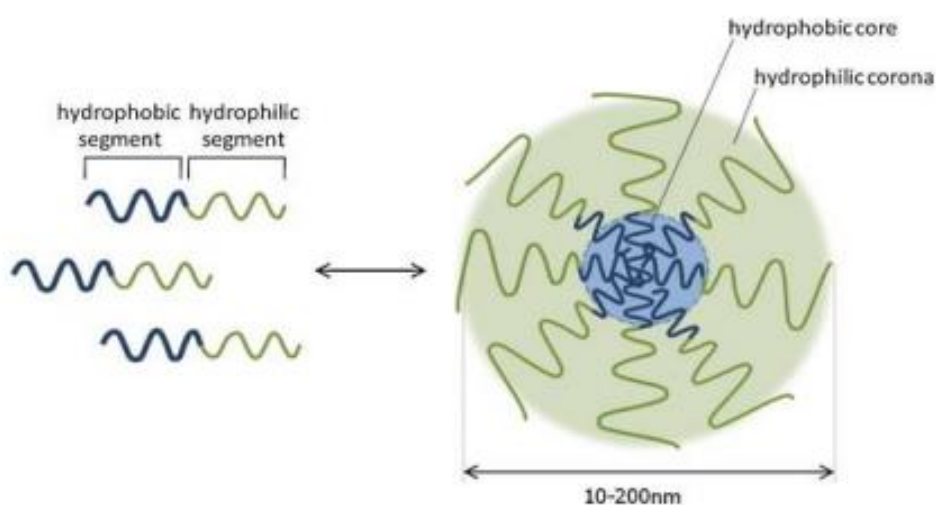
Οι επιφανειοδραστικές ιδιότητες των μικκυλίων και η διαμερισματοποίηση που επιτυγχάνεται από το διαχωρισμό πυρήνα και κελύφους αποτελούν την αιτία για μία πληθώρα εφαρμογών των μικκυλιακών συστημάτων. Αναμφισβήτη η πιο σημαντική έχει να κάνει με τη δυνατότητα εγκλωβισμού βιοδραστικών ουσιών με θεραπευτική δράση και τη σταδιακή τους απελευθέρωση στα κύτταρα στόχους. Ο πυρήνας του μικκυλίου αποτελεί ένα συμβατό, φιλόξενο μικροπεριβάλλον για μόρια μικρού μοριακού βάρους αλλά και μακρομόρια.

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

Τα συσταδικά συμπολυμερή που μπορούν να σχηματίσουν μικκύλια σε νερό διακρίνονται σε δύο διαφορετικές ομάδες, τα αμφίφιλα και τα διυδρόφιλα (ή διπλά υδρόφιλα) κατά συστάδες συμπολυμερή. Τα αμφίφιλα συμπολυμερή αποτελούνται από μία υδρόφοβη, μη υδατοδιαλυτή συστάδα, που αυτοοργανώνεται αυθόρμητα σε υδατικά διαλύματα σχηματίζοντας τον πυρήνα του μικκυλίου και από μία υδρόφιλη συστάδα που αποτρέπει την καθίζηση των συσσωματωμάτων και η οποία μπορεί να είναι ιοντισμένη ή όχι. Η δομή των διυδρόφιλων κατά συστάδες συμπολυμερών αποτελείται από δύο διαφορετικές υδρόφιλες συστάδες. Η μία συστάδα, έπειτα από φυσική ή χημική μετατροπή, ουσιαστικά γίνεται αδιάλυτη στο υδατικό διάλυμα, καθώς το συμπολυμερές παραμένει εν διαλύσει εξαιτίας της υδροφιλικότητας της άλλης συστάδας. [23]

Η ομάδα των διυδρόφιλων συμπολυμερών περιλαμβάνει συμπολυμερή με διάφορους συνδυασμούς μη ιοντικών, ανιοντικών και κατιοντικών συστάδων. Μπορούν να διακριθούν δύο γενικές κατηγορίες διυδρόφιλων δισυσταδικών συμπολυμερών. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει συμπολυμερή, στα οποία τουλάχιστον μία συστάδα είναι μη ιοντική, ενώ η δεύτερη συμπολυμερή στα

οποία και οι δύο συστάδες είναι ιοντικές. Παρατηρείται ότι η πλειοψηφία των συμπολυμερών της πρώτης κατηγορίας περιέχει μία συστάδα πολυαιθυλενοξειδίου (PEO) ή πολυ(βινυλ-μεθυλ-αιθέρα) (PVME) και ότι για εντελώς μη ιοντικά συστήματα, η μικκυλίωση προκαλείται κυρίως από μία αλλαγή θερμοκρασίας. Σε συμπολυμερή με ιοντική και μη ιοντική συστάδα η μικκυλίωση καθίσταται επίσης δυνατή με μεταβολές του pH ή με προσθήκη ηλεκτρολυτών.[22]



**Εικόνα 1.3: Αυτοοργάνωση σε μικκύλια αμφίφιλου δισυσταδικού συμπολυμερούς.**

Στη δεύτερη κατηγορία διυδρόφιλων συμπολυμερών μπορούν να διακριθούν τρεις ξεχωριστές υποκατηγορίες. Οι δύο ιοντικές συστάδες μπορεί να έχουν το ίδιο φορτίο, δηλαδή να είναι είτε ανιοντικές, είτε κατιοντικές, ή μπορεί να έχουν και διαφορετικά φορτία. Σε αυτή την περίπτωση τα συμπολυμερή χαρακτηρίζονται ως πολυαμφολύτες. Εξαιτίας της αλληλεπίδρασης μεταξύ των αντίθετων φορτίων σχηματίζονται συσσωματώματα, τα οποία ονομάζονται πολυηλεκτρολυτικά σύμπλοκα. Αν τα συμπολυμερή είναι ασύμμετρα, δηλαδή επικρατεί η συστάδα είτε με το ανιοντικό, είτε με το κατιοντικό φορτίο, τότε είναι δυνατό τα πολυηλεκτρολυτικά σύμπλοκα να παραμένουν διαλυτά σε νερό σχηματίζοντας μικκυλιακές δομές. Τα μικκύλια αυτά αναμένεται να σταθεροποιούνται έχοντας κέλυφος την ασύμπλεκτη συστάδα που βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο αρχικό

συμπολυμερές.[24] Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα υδατοδιαλυτά συμπολυμερή κατά συστάδες που βασίζονται σε μεθακρυλικά πολυμερή με τριτοταγή αμινομάδα και τα οποία υπό κατάλληλες συνθήκες (pH, ηλεκτρολύτες, θερμοκρασία ή συνδυασμοί παραμέτρων) οδηγούν σε αναστρέψιμα μικκυλιακά συστήματα.[25]

### **1.2.2 Αυτοοργάνωση αμφίφιλων τυχαίων συμπολυμερών**

Η αυτοοργάνωση των πολυμερών θεωρείται μία ελκυστική μέθοδος για την παραγωγή σε νανοκλίμακα δομών διαφορετικών μορφολογιών, όπως σφαίρες, ράβδοι, κυστίδια και κύλινδροι. Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε συμπολυμερή κατά συστάδες, καθώς οι μορφολογίες τους μπορούν συνήθως να ελεγχθούν ή και να προβλεφθούν με βάση τις μοριακές παραμέτρους, όπως το μοριακό βάρος, το μήκος κάθε συστάδας και τη χημική φύση τους. Τα τυχαία συμπολυμερή δεν προτιμούνταν λόγω των μη καλά καθορισμένων ιδιοτήτων τους και των ευρέων κατανομών μοριακού βάρους. Τα τελευταία χρόνια όμως αρκετές ερευνητικές ομάδες μελετούν τη σύνθεση και την αυτοοργάνωσή τους σε διαλύματα, εφόσον μέσω κατάλληλων διαδικασιών μοριακού σχεδιασμού και σύνθεσης, μπορεί να επιτευχθεί μία ποικιλία μορφολογιών με πληθώρα πιθανών εφαρμογών.[5]

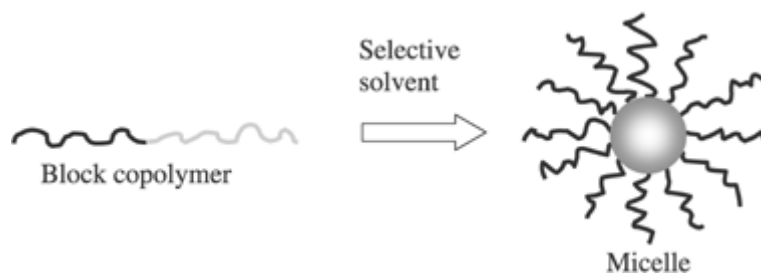
Τα αμφίφιλα τυχαία συμπολυμερή αποτελούνται από υδρόφιλα και υδρόφοβα μονομερή που κατανέμονται στατιστικά κατά μήκος μιας αλυσίδας, σε αντίθεση με τα συσταδικά συμπολυμερή όπου οι επαναλαμβανόμενες μονάδες εντοπίζονται σε διακριτές συστάδες. Ως αποτέλεσμα, τα τυχαία συμπολυμερή τείνουν να αυτοοργανώνονται μέσω ενδομοριακής αλλαγής της διαμόρφωσης της αλυσίδας τους (ενδομοριακή αναδίπλωση-intramolecular self-folding) δημιουργώντας μονομοριακά μικκύλια (unimer micelles) σε υδατικά διαλύματα, ενώ τα συσταδικά αυτοοργανώνονται συνήθως σε πολυμοριακά μικκύλια και κυστίδια.[26] Σε αντίθεση με τα συσταδικά συμπολυμερή όπου οι υδρόφοβες μονάδες βρίσκονται στο εσωτερικό της δομής, τα συσσωματώματα τυχαίων συμπολυμερών μπορούν να έχουν ένα μέρος των λειτουργικών υδρόφοβων τμημάτων τους εκτεθειμένο στην επιφάνεια, το οποίο έχει αξιοποιηθεί για την προσθήκη υποκαταστατών και άλλων λειτουργικών μορίων σε νανογέλη.[27]

Η αυτοοργάνωση και η αναδίπλωση των τυχαίων συμπολυμερών καθορίζεται από την αναλογία υδρόφοβου/υδρόφιλου τμήματος και το μήκος της αλυσίδας (βαθμός πολυμερισμού, DP). Οι μορφολογίες μπορούν να ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό με βάση την αναλογία των υδρόφιλων πλευρικών αλυσίδων προς τις υδρόφοβες ομάδες. Όταν το υδρόφοβο ποσοστό είναι αρκετά μικρότερο σε σχέση με το υδρόφιλο, τα τυχαία συμπολυμερή αυτοαναδιπλώνονται ενδομοριακά σχηματίζοντας μονομοριακά μικκύλια με υδρόφοβους πυρήνες. Για κάθε σύστημα τυχαίου συμπολυμερούς υπάρχει ένας συγκεκριμένος βαθμός πολυμερισμού (threshold degree of polymerization,  $DP_{th}$ ) που εξαρτάται από τη σύστασή του και θεωρείται ως κατώφλι για την αναδίπλωση σε μονομοριακά μικκύλια στο νερό. Τυχαία συμπολυμερή με DP μικρότερο του  $DP_{th}$  αυτοοργανώνονται διαμοριακά σχηματίζοντας συσσωματώματα πολλαπλών αλυσίδων, με το μέγεθός τους να εξαρτάται από τη σύσταση του συμπολυμερούς και συγκεκριμένα να αυξάνεται όσο αυξάνεται το υδρόφοβο ποσοστό. Συνεπώς, ρυθμίζοντας τη σύσταση και το βαθμό πολυμερισμού του συμπολυμερούς, μπορούμε να προβλέψουμε και να ελέγξουμε το μέγεθος, το μοριακό βάρος και τον αριθμό συσσωμάτωσης των αμφίφιλων τυχαίων συμπολυμερών. Λόγω της εξάρτησης του μοριακού βάρους από τη σύσταση των συμπολυμερών, τυχαία συμπολυμερή με ευρεία κατανομή μοριακών βαρών αυτοοργανώνονται σε νανο-συσσωματώματα σε νερό εξαιτίας της ταυτόχρονης ενδομοριακής αναδίπλωσης των πολυμερικών αλυσίδων με DP μεγαλύτερο του  $DP_{th}$  και της διαμοριακής αυτοοργάνωσης των πολυμερικών αλυσίδων με DP μικρότερο του  $DP_{th}$ . [26]

### **1.2.3 Τρόποι παρασκευής μικκυλίων από αμφίφιλα συμπολυμερή**

Η παρασκευή μικκυλίων από αμφίφιλα κατά συστάδες συμπολυμερή λαμβάνει χώρα σε αραιά διαλύματα εκλεκτικού διαλύτη για τη μία συστάδα σε μία σταθερή θερμοκρασία, όταν η συγκέντρωση του διαλύματος υπερβαίνει την κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση (critical micelle concentration, cmc), η οποία αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα του εκάστοτε συστήματος πολυμερούς-διαλύτη. Σε συγκεντρώσεις μικρότερες της cmc υπάρχουν μόνο μοριακά διαλυμένες μεμονωμένες αλυσίδες (unimer chains) του συμπολυμερούς στο διάλυμα, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις

πολυμοριακά μικκύλια βρίσκονται σε θερμοδυναμική ισορροπία με μεμονωμένες αλυσίδες.[28] Οι διάφορες μέθοδοι παρασκευής των διαλυμάτων μικκυλίων συσταδικών συμπολυμερών παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον εφόσον επηρεάζουν έντονα ορισμένα χαρακτηριστικά των μικκυλίων, όπως το μέγεθος και η μορφολογία.



**Εικόνα 1.4: Απεικόνιση σχηματισμού μικκυλίου από δισυσταδικό συμπολυμερές.[24]**

Για την παρασκευή των μικκυλιακών διαλυμάτων συνήθως χρησιμοποιείται μία εκ των δύο ακόλουθων μεθόδων.[22,24] Η πιο άμεση μέθοδος περιλαμβάνει την κατευθείαν διάλυση του αμφίφιλου συμπολυμερούς σε έναν εκλεκτικό διαλύτη, δηλαδή έναν καλό διαλύτη για τη μία από τις δύο συστάδες. Για την υποβοήθηση της διαλυτοποίησης το διάλυμα αναδεύεται για μεγάλο χρονικό διάστημα, θερμαίνεται ή υπόκειται σε κατεργασία εντός λουτρού υπερήχων. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή βρίσκει εφαρμογή συνήθως σε συμπολυμερή με σχετικά μικρό μοριακό βάρος και μικρή περιεκτικότητα στο αδιάλυτο συστατικό του συμπολυμερούς. Επιπλέον, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ανάλογα με τις ιδιότητες του συστήματος συμπολυμερούς-διαλύτη, ενδέχεται οι διαδικασίες αυτές να μην οδηγούν σε συνθήκες θερμοδυναμικής ισορροπίας στο διάλυμα. Τα χαρακτηριστικά των μικκυλίων που λαμβάνονται αντανakλούν τη μορφολογία του συμπολυμερούς στη στερεά κατάσταση, χωρίς να επέρχεται μία πραγματική ισορροπία μεταξύ ελεύθερων αλυσίδων συμπολυμερούς και μικκυλίων. Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελούν τα συσταδικά συμπολυμερή όπου η συστάδα που σχηματίζει τον πυρήνα των μικκυλίων χαρακτηρίζεται από υψηλή θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης ( $T_g$ ).

Η δεύτερη μέθοδος βασίζεται στη διάλυση του συμπολυμερούς σε έναν μη εκλεκτικό διαλύτη, δηλαδή έναν κοινό καλό διαλύτη για τις δύο συστάδες, με



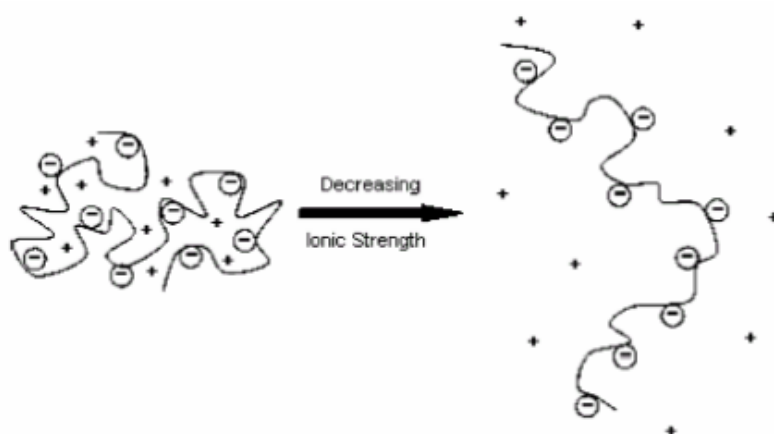
αποτέλεσμα τον σχηματισμό μοριακά διαλυμένων αλυσίδων. Ο σχηματισμός μικκυλίων επιτυγχάνεται με μεταβολή του pH ή της θερμοκρασίας του διαλύματος, σχηματίζοντας με αυτόν τον τρόπο αποκρίσιμα μικκύλια, ή με σταδιακή προσθήκη εκλεκτικού διαλύτη. Σε αυτήν την περίπτωση, ο μη εκλεκτικός διαλύτης μπορεί να εκδιωχθεί με εξάτμιση ή να αντικατασταθεί σταδιακά από τον εκλεκτικό διαλύτη χρησιμοποιώντας μεμβράνες διαπίδυσης. Η συγκεκριμένη τεχνική είναι ευρέως διαδεδομένη, κυρίως για υδατικά διαλύματα, εφόσον εμποδίζει το σχηματισμό μεγάλων συσσωματωμάτων και επιτρέπει το σχηματισμό μικκυλίων από ασύμμετρα συμπολυμερή με μεγάλο ποσοστό ως προς το αδιάλυτο συστατικό. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις δεν μπορεί να αποφευχθεί ο σχηματισμός "παγωμένων" μικκυλίων (frozen micelles) ή μικκυλίων με μεγάλη πολυδιασπορά σε χαρακτηριστικά τους.

### **1.3 Πολυηλεκτρολύτες**

Με τον όρο πολυηλεκτρολύτες δηλώνονται τα πολυμερικά μακρομόρια ή οι υπερμοριακές οντότητες που φέρουν μεγάλο αριθμό ιοντιζόμενων ομάδων. Οι ομάδες αυτές δίστανται σε διάλυμα υπό συγκεκριμένες συνθήκες, με αποτέλεσμα το μακρομόριο να καθίσταται άκρως φορτισμένο. Οι πολυηλεκτρολύτες διαχωρίζονται σε ισχυρούς και ασθενείς με βάση τον βαθμό διάστασης. Κατά τη διαλυτοποίηση σε υδατικό μέσο, οι ιοντιζόμενες ομάδες των ισχυρών πολυηλεκτρολυτών δίστανται πλήρως. Στην περίπτωση των ασθενών πολυηλεκτρολυτών οι ιοντιζόμενες ομάδες δίστανται μερικώς, ωστόσο κατά την εξουδετέρωση, δηλαδή την αλλαγή του pH του διαλύματος, οι ομάδες δίστανται πλήρως. Συνεπώς οι ασθενείς πολυηλεκτρολύτες δεν είναι πλήρως φορτισμένοι σε διάλυμα και το συνολικό φορτίο τους μπορεί να μεταβληθεί συναρτήσει του pH, της συγκέντρωσης των αντισταθμιστικών ιόντων ή/και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος.[29]

Συγκριτικά με μη ιοντικά πολυμερή, οι διαφορετικές ιδιότητες των πολυηλεκτρολυτών είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού περισσότερων χαρακτηριστικών, της παρουσίας σταθερών φορτίων πάνω στην αλυσίδα του πολυμερούς, της ύπαρξης λίγο έως πολύ ελεύθερων αντισταθμιστικών ιόντων στον όγκο του διαλύματος και της συμπεριφοράς σαν μη εύκαμπτα μακρομόρια σε διαλύματα μικρής ιοντικής ισχύος, συνεπώς καθορίζονται κυρίως από τις ισχυρές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις του συστήματος. Οι

φορτισμένες αλυσίδες των πολυηλεκτρολυτών υιοθετούν περισσότερο εκτεταμένες διαμορφώσεις, συγκριτικά με τις ουδέτερες πολυμερικές αλυσίδες, λόγω των ηλεκτροστατικών απώσεων μεταξύ των φορτισμένων τμημάτων της αλυσίδας. Εάν αυξηθεί η ιοντική ισχύς του διαλύματος μέσω της προσθήκης άλατος, επέρχεται προάσπιση των φορτίων και εξασθένηση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων του συστήματος. Ως αποτέλεσμα οι πολυηλεκτρολυτικές αλυσίδες μεταβαίνουν σε λιγότερο εκτεταμένες διαμορφώσεις, παρόμοιες με αυτές των ουδέτερων πολυμερών σε συνθήκες καλού διαλύτη, γεγονός που ονομάζεται φαινόμενο του πολυηλεκτρολύτη (polyelectrolyte effect). Μία μικρή αλλαγή στο βαθμό ιοντισμού μπορεί να μεταβάλλει σε μεγάλο βαθμό τις ιδιότητες του συστήματος του πολυηλεκτρολύτη.[30,31]



**Εικόνα 1.5: Επέκταση της πολυμερικής αλυσίδας με την ελάττωση της ιοντικής ισχύος. [32]**

Οι πολυηλεκτρολύτες εμφανίζουν έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω της διαλυτότητας στο νερό σε συνδυασμό με την τάση να διασυνδέονται με αντίθετα φορτισμένους πολυηλεκτρολύτες σχηματίζοντας σύμπλοκα. Τα σύμπλοκα πολυηλεκτρολυτών είναι σταθερά, συχνά βιοαποικοδομήσιμα, βιοσυμβατά και ικανά να συνδυάσουν τις μοναδικές ιδιότητες διαφορετικών πολυμερών χωρίς να χάσουν τα εγγενή χαρακτηριστικά τους. Επομένως βρίσκουν πλήθος εφαρμογών στη γονιδιακή θεραπεία, τη μεταφορά φαρμάκων και πρωτεϊνών και τη μηχανική ιστών.[33]

Τα αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες που περιέχουν συστάδες πολυηλεκτρολυτών συνδυάζουν τα δομικά χαρακτηριστικά των πολυηλεκτρολυτών, των συσταδικών συμπολυμερών και των επιφανειοδραστικών ουσιών, γεγονός που τους προσδίδει μοναδικές και χρήσιμες ιδιότητες. Η αυτοοργάνωσή τους σε υδατικά διαλύματα εξαρτάται από αρκετές εξωτερικές παραμέτρους όπως το pH, η θερμοκρασία και η αλατότητα, οι οποίες σχετίζονται με διάφορες τεχνολογικές και βιολογικές διεργασίες, και οδηγεί στο σχηματισμό μικκυλίων, κυστιδίων και δικτύων συχνά αρκετά περίπλοκης τοπολογίας. [34,35]

#### **1.4 Σύμπλεξη πολυμερών με DNA**

Η γονιδιακή θεραπεία αποτελεί μία εναλλακτική προσέγγιση στη θεραπεία εγγενών ή επίκτητων ασθενειών σε σχέση με τα συμβατικά φαρμακευτικά προϊόντα, η οποία βασίζεται στην εισαγωγή θεραπευτικών γονιδίων σε κύτταρα-στόχους με σκοπό την παραγωγή βιοενεργών παραγόντων, την αντικατάσταση ελαττωματικών γονιδίων ή τη διακοπή ανεπιθύμητης γονιδιακής έκφρασης. Τεράστια πρόοδος έχει σημειωθεί στον σχεδιασμό και τη σύνθεση μη ιογενών φορέων για την αποτελεσματική μεταφορά γονιδίων, εφόσον προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τη χρήση ιογενών φορέων όπως η ασφάλεια, το χαμηλό κόστος παραγωγής και ο σωστός μακρομοριακός σχεδιασμός.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι κατιοντικοί πολυηλεκτρολύτες ως μη ιογενείς φορείς, καθώς μειώνουν τον ανοσογονικό κίνδυνο και προσφέρουν τη δυνατότητα ακριβούς σχεδιασμού μακρομοριακών δομών. [36,37] Τα πολυκατιόντα σχηματίζουν σύμπλοκα με τα νουκλεϊκά οξέα για τη μεταφορά DNA στα κύτταρα. Τα νανοσωματίδια των συμπλόκων καταστέλλουν την αποικοδόμηση του DNA κατά τη μεταφορά του στον πυρήνα και μεταγενέστερα το απελευθερώνουν. Ωστόσο σε κάποιες περιπτώσεις τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα μπορούν να σχηματίσουν μεγάλα συσσωματώματα και να καθιζάνουν, ενώ πολλά κατιοντικά πολυμερή είναι τοξικά. Η χιτοζάνη και οι πολυαιθυλενιμίνες αποτελούν παραδείγματα κατιοντικών μακρομορίων που έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς γονιδίων, ενώ πρόσφατα, συσταδικά συμπολυμερή με βάση το αμμώνιο και με διαφορετικές αλκυλικές πλευρικές αλυσίδες έχουν μελετηθεί για αυτόν τον σκοπό.[38]

Η σύμπλεξη των πολυηλεκτρολυτών και του DNA είναι αποτέλεσμα των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αντίθετων φορτίων των δύο ειδών μακρομορίων. Η δομή και το μέγεθος των σχηματιζόμενων συμπλόκων επηρεάζονται από πλήθος παραγόντων, όπως το pH, η θερμοκρασία, η ιοντική ισχύς του διαλύματος, η αναλογία μεταξύ των δύο συστατικών και η συγκέντρωση. Το μέγεθος του συμπλόκου σχετίζεται περισσότερο με τις φυσικές ιδιότητες του κατιοντικού πολυμερούς αλλά και με το μέγεθος του μορίου DNA. Το μοριακό βάρος, η πυκνότητα του φορτίου, η ακαμψία, η υδροφοβικότητα της πολυηλεκτρολυτικής αλυσίδας, όπως και η διαμόρφωση και η επιφανειακή κατανομή του μακρομορίου παίζουν σημαντικό ρόλο. [39,40]

### **1.5 Πολυμερισμός αντιστρεπτής προσθήκης-μεταφοράς αλυσίδας με απόσπαση (RAFT Polymerization) [41-44]**

Ο πολυμερισμός αντιστρεπτής προσθήκης - μεταφοράς αλυσίδας με απόσπαση (Reversible Addition – Fragmentation Chain Transfer, RAFT) αποτελεί τεχνική ζωντανού/ελεγχόμενου ριζικού πολυμερισμού, μιας διαδικασίας η οποία συνδυάζει τα πλεονεκτήματα του ζωντανού πολυμερισμού με την προσαρμοστικότητα ενός ριζικού. Οι πρώτες βιβλιογραφικές αναφορές για τον πολυμερισμό RAFT εμφανίστηκαν το 1998 και από τότε έχει εξελιχθεί σε μια πολυχρηστική τεχνική για την σύνθεση πολύπλοκων πολυμερικών αρχιτεκτονικών. Ο πολυμερισμός RAFT επιτρέπει τη σύνθεση συμπολυμερών με καθορισμένη αρχιτεκτονική όπως τα κατά συστάδες, εμβολιασμένα, διακλαδισμένα και αστεροειδή, αλλά και πολυμερών με δυνατότητα απόκρισης σε χημικά και φυσικά ερεθίσματα γεγονός που τα καθιστά χρήσιμα σε πλήθος βιολογικών εφαρμογών. Με τη χρήση της συγκεκριμένης τεχνικής συντίθενται σύνθετες πολυμερικές αρχιτεκτονικές με προβλεπόμενο μοριακό βάρος, στενές κατανομές μοριακών βαρών, ακραίες ομάδες υψηλής πιστότητας και τη δυνατότητα για συνεχιζόμενη αύξηση της αλυσίδας. Η διαδικασία διεξαγωγής του δεν είναι τόσο σύνθετη και απαιτητική σε σχέση με άλλα είδη πολυμερισμού και επιτρέπει τον πολυμερισμό λειτουργικών μονομερών υπό απλές συνθήκες (συχνά με χρήση νερού ως διαλύτη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος χωρίς την ανάγκη προστατευτικών ομάδων). Επιπλέον, η ενσωμάτωση λειτουργικών μονομερών και η επιλογή

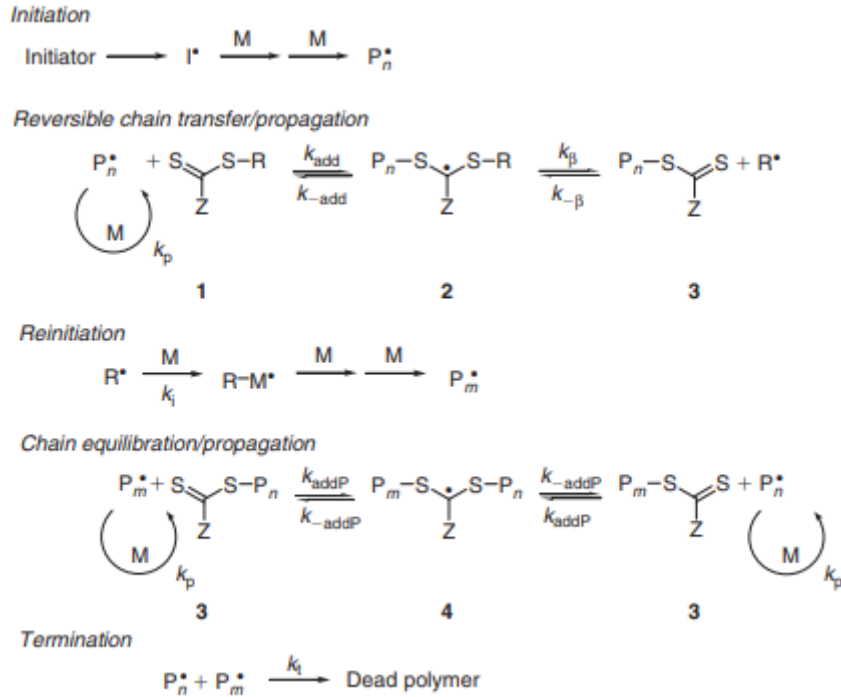
του κατάλληλου μέσου μεταφοράς αλυσίδας (Chain Transfer Agent, CTA) επιτρέπει την τροποποίηση των πλευρικών ή ακραίων ομάδων μετά τον πολυμερισμό.

Ο πολυμερισμός RAFT βασίζεται σε μια σειρά αντιδράσεων αντιστρεπτής μεταφοράς αλυσίδας, ώστε να είναι ελεγχόμενος. Καθώς αποτελεί ουσιαστικά ριζικό πολυμερισμό που διεξάγεται με την παρουσία ενός CTA, το στάδιο της εκκίνησης μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση παραδοσιακών ριζικών απαρχητών, όπως αζωενώσεις, υπεροξειδία, οξειδοαναγωγικά συστήματα εκκίνησης, φωτοαπαρχητές και ακτινοβολία-γ. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η συγκέντρωση του απαρχητή είναι χαμηλότερη σε σχέση με εκείνη του CTA, έτσι ώστε να διασφαλιστεί ότι η εκκίνηση της πλειοψηφίας των αλυσίδων γίνεται από θραύσματα CTA ( $R^\bullet$ ), εφόσον οι αλυσίδες που προέρχονται από τον απαρχητή επιδρούν αρνητικά στον έλεγχο του μοριακού βάρους του τελικού πολυμερούς. Λόγω της εκθετικής αποσύνθεσης των συμβατικών θερμικών απαρχητών, ελεύθερες ρίζες παράγονται καθ' όλη τη διάρκεια του πολυμερισμού, γεγονός που πιθανόν να οδηγήσει σε διμοριακό τερματισμό. Η συνεχής παραγωγή ριζών έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να αντικαταστήσει ρίζες που χάθηκαν σε τυχόν αντιδράσεις τερματισμού ενώ βοηθά στη διατήρηση του ρυθμού πολυμερισμού.

Μετά την αντίδραση την αρχικής ρίζας  $I^\bullet$  με το μονομερές, από την οποία προκύπτει μία διαδιδόμενη ολιγομερική αλυσίδα ( $P_n^\bullet$ ), το CTA αντιδρά με την  $P_n^\bullet$  για να δώσει μια ενδιάμεση ρίζα. Η ενδιάμεση ρίζα, αν έχει γίνει σωστή επιλογή CTA, θραυματοποιείται και δημιουργείται ένα πολυμερικό macroCTA ( $P_nSC(Z) = S$ ) και ένα νέο είδος ρίζας  $R^\bullet$ . Το στάδιο προ-ισορροπίας (pre-equilibrium) ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται ώστε όλα τα θραύσματα  $R^\bullet$  να προσθέσουν μονομερικές μονάδες για να σχηματίσουν διαδιδόμενες αλυσίδες  $P_m^\bullet$  και διέπεται από τις τέσσερις σταθερές  $k_{add}$ ,  $k_{-add}$ ,  $k_\beta$  και  $k_{-\beta}$ . Για να επιτευχθούν στενές κατανομές μοριακών βαρών, το στάδιο προ-ισορροπίας πρέπει να ολοκληρωθεί νωρίς, έτσι ώστε όλες οι αλυσίδες να μπουν στο στάδιο της κυρίως ισορροπίας την ίδια στιγμή. Αυτό είναι ανάλογο με άλλα συστήματα ζωντανού πολυμερισμού, στα οποία η έναρξη θεωρείται ότι συμβαίνει ποσοτικά και ακαριαία.

Μόλις ολοκληρωθεί το στάδιο προ-ισορροπίας, ο πολυμερισμός μπαίνει στο στάδιο της κυρίως ισορροπίας, το οποίο περιλαμβάνει την εκφυλιστική μεταφορά της ακραίας μεταφερόμενης ομάδας του CTA, πχ. την ομάδα θειοκαρβόνυλοθειο (thiocarbonylthio), μεταξύ διαδιδόμενων αλυσίδων, μέσω του σχηματισμού και της απόσπασης μιας ενδιάμεσης ρίζας. Η ανταλλαγή μεταξύ ενεργών και αδρανών αλυσίδων επιτυγχάνεται με την άμεση απόσπαση της ενδιάμεσης ρίζας προς τις δύο κατευθύνσεις, επιτρέποντας την ελεγχόμενη προσθήκη μονομερών σε κάθε αλυσίδα με ίσες πιθανότητες. Η μεγαλύτερη κατανάλωση μονομερούς παρατηρείται κατά τη διάρκεια της κυρίως ισορροπίας, ενώ ο αριθμός των προστιθέμενων μονομερών ποικίλει ανάλογα με τις συνθήκες του πολυμερισμού. Έχει προταθεί, ωστόσο, ότι στις περισσότερες περιπτώσεις, προστίθεται λιγότερο από ένα μονομερές στις διαδιδόμενες αλυσίδες ανά στάδιο μεταφοράς.

Ο πολυμερισμός RAFT, όπως κάθε τεχνική ελεγχόμενου πολυμερισμού, στοχεύει στον περιορισμό του αριθμού των μη αντιστρεπτών αντιδράσεων τερματισμού, ελαχιστοποιώντας την συγκέντρωση ριζών που είναι διαθέσιμες για τερματισμό κάθε στιγμή. Ωστόσο, όπως σε όλες τις διαδικασίες ελευθέρων ριζών, αντιδράσεις τερματισμού λαμβάνουν χώρα μέσω σύζευξης των ελευθέρων ριζών και ανακατανομής και μπορούν να συσχετιστούν άμεσα με την αρχική συγκέντρωση του απαρχητή. Όταν ο κύριος τρόπος τερματισμού είναι ο διμοριακός συνδυασμός (bimolecular combination), ο αριθμός των νεκρών αλυσίδων ισούται με το μισό αριθμό των αλυσίδων που προέρχονται από τον απαρχητή, ενώ στην περίπτωση της ανακατανομής (disproportionation), ο αριθμός των νεκρών αλυσίδων ισούται με τον συνολικό αριθμό των αλυσίδων που προέρχονται από τον απαρχητή. Η τεχνική RAFT περιορίζει αποτελεσματικά τον αριθμό των αντιδράσεων τερματισμού και η υψηλή αναλογία  $[CTA]_0/[I]_0$  που χρησιμοποιείται συνήθως αποτρέπει τον αριθμό των νεκρών αλυσίδων από το να υπερβεί το 5%.



**Σχήμα 1.1: Μηχανισμός πολυμερισμού αντιστρεπτής προσθήκης - μεταφοράς αλυσίδας με απόσπαση (RAFT). [44]**

Πρέπει να πληρούνται αρκετές προϋποθέσεις ώστε να υπάρχει έλεγχος του μοριακού βάρους σε έναν πολυμερισμό RAFT, με πιο σημαντικές την επιλογή του κατάλληλου CTA για τον πολυμερισμό του επιθυμητού μονομερούς και την επαρκώς υψηλότερη συγκέντρωση CTA σε σχέση με αυτή του απαρχητή. Σύμφωνα με τον μηχανισμό RAFT, οι πιθανές πηγές παραγωγής πολυμερικών αλυσίδων είναι τα θραύσματα του απαρχητή και η αποχωρούσα ομάδα του CTA (R•). Συνεπώς, το θεωρητικό μέσο μοριακό βάρος κατ' αριθμό  $M_n$  μπορεί να προσδιοριστεί σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση.

$$M_{n,th} = \frac{[M]_0 M_{MW} \rho}{[CTA]_0 + 2f[I]_0(1 - e^{-k_d t})} + CTA_{MW} \quad (1.5.1)$$

Όπου  $[M]_0$  είναι η αρχική συγκέντρωση μονομερούς,  $M_{MW}$  το μοριακό βάρος του μονομερούς,  $\rho$  είναι η μετατροπή του μονομερούς,  $[CTA]_0$  η αρχική συγκέντρωση CTA,  $f$  η αποδοτικότητα του απαρχητή,  $[I]_0$  η αρχική συγκέντρωση απαρχητή,  $k_d$  η σταθερά ρυθμού αποσύνθεσης του απαρχητή και  $CTA_{MW}$  το μοριακό βάρος του CTA. 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%, με αποτέλεσμα οι όροι που αντιστοιχούν σε αυτές τις αλυσίδες να μπορούν να παραληφθούν και η εξίσωση να πάρει την παρακάτω απλοποιημένη μορφή.

$$M_{n,th} = \frac{[M]_0 M_{MW, \rho}}{[CTA]_0} + CTA_{MW} \quad (1.5.2)$$

Από την παραπάνω σχέση γίνεται εμφανές ότι το μοριακό βάρος αυξάνεται γραμμικά με τη μετατροπή του μονομερούς, επιτρέποντας τη σύνθεση πολυμερών με προκαθορισμένο μοριακό βάρος και χαμηλές τιμές πολυδιασποράς.

Τα CTAs επιλέγονται με βάση τη φύση των ομάδων Z και R και την επίδρασή τους στον πολυμερισμό ενός συγκεκριμένου μονομερούς, εφόσον έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν ή να απενεργοποιούν τον θειοκαρβόνυλο (thiocarbonyl) διπλό δεσμό του CTA και να τροποποιούν τη σταθερότητα των ενδιάμεσων ριζών. Προκειμένου να θεωρείται κατάλληλο το CTA πρέπει να περιέχει έναν ενεργό διπλό δεσμό C=S (υψηλή  $k_{add}$ ). Οι ενδιάμεσες ρίζες πρέπει να αποσπώνται εύκολα (υψηλή  $k_{\beta}$ , ασθενής δεσμός S–R στο ενδιάμεσο στάδιο), η μετατροπή τους σε προϊόντα να ευνοείται ( $k_{\beta} \geq k_{-add}$ ) και να μην πραγματοποιούνται παράπλευρες αντιδράσεις. Τέλος, οι ρίζες που έχουν αποσπαστεί ( $R\cdot$ ) πρέπει να είναι ικανές να επανεκκινήσουν αποτελεσματικά τον πολυμερισμό ( $k_i > k_p$ ).

## 1.6 Σκοπός της εργασίας

Πρωταρχικός σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η επιτυχής σύνθεση καινοτόμων διυδρόφιλων συμπολυμερών του τύπου πολυ(μεθακρυλικός εστέρας της ολιγοαιθυλενογλυκόλης)-b-πολυ([2-(μεθακρυλοϋλοξυ)αιθυλο] τριμεθυλαμμώνιο χλωρίδιο) (poly(oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate)-b-poly([2-(methacryloyloxy)ethyl] trimethylammonium chloride), POEGMA-b-PMETAC) και πολυ(μεθακρυλικός εστέρας της ολιγοαιθυλενογλυκόλης-co-[2-(μεθακρυλοϋλοξυ)αιθυλο] τριμεθυλαμμώνιο χλωρίδιο) (poly(oligo(ethylene glycol) methyl ether



methacrylate-co-[2-(methacryloyloxy)ethyl] trimethylammonium chloride), P(OEGMA-co-METAC)) μέσω της τεχνικής πολυμερισμού αντιστρεπτής προσθήκης-μεταφοράς αλυσίδας με απόσπαση (RAFT Polymerization). Αρχικά πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του ομοπολυμερούς POEGMA, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως παράγοντας μεταφοράς αλυσίδας για τη σύνθεση του δυσυσταδικού συμπολυμερούς, ενώ στη συνέχεια έγινε η σύνθεση και ενός ομοπολυμερούς PMETAC.

Έπειτα το ερευνητικό ενδιαφέρον επικεντρώθηκε στην μελέτη της αυτοοργάνωσης των πολυμερών σε υδατικά διαλύματα και στην απόκριση την οποία παρουσιάζουν στην αλλαγή της θερμοκρασίας και της ιοντικής ισχύος. Σε τελευταίο στάδιο, μελετήθηκε η δυνατότητα σύμπλεξης των πολυηλεκτρολυτικών πολυμερών με μόρια DNA προκειμένου να διερευνηθεί αν τα συστήματα αυτά μπορούν να δράσουν ως φορείς γονιδίων.

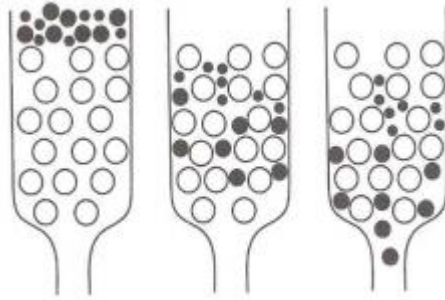
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ

#### **2.1 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (SEC)**

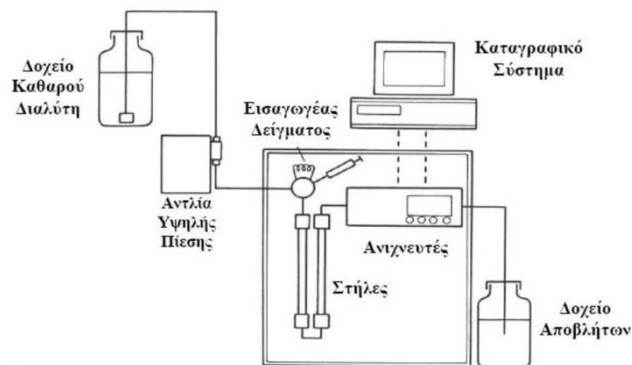
Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (size exclusion chromatography, SEC) ή χρωματογραφία διαπερατότητας μέσω πηκτής (gel permeation chromatography, GPC) είναι μία από τις δυναμικότερες μεθόδους χαρακτηρισμού των πολυμερών. Αποτελεί ουσιαστικά μια τεχνική υγρής χρωματογραφίας, η οποία είναι προσαρμοσμένη για την ανάλυση μακρομορίων όπως τα συνθετικά πολυμερή. Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών βασίζεται στο διαχωρισμό των μακρομοριακών αλυσίδων βάσει του μεγέθους τους και αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μεθόδους προσδιορισμού του μοριακού βάρους και της κατανομής μοριακών βαρών των πολυμερών.

Κατά τη διάρκεια της χρωματογραφίας SEC, τα μακρομόρια διαχωρίζονται σύμφωνα με τον υδροδυναμικό τους όγκο, δηλαδή σύμφωνα με την έκταση που καταλαμβάνει το μόριο τους μέσα στο συγκεκριμένο διαλύτη. Η διαδικασία βασίζεται στο γεγονός ότι ένα αραιό πολυμερικό διάλυμα, το οποίο μπορεί να περιέχει μια πλατεία κατανομή  $M_w$  πολυμερικών αλυσίδων, ολιγομερών ή ακόμα και μονομερών τα οποία δεν πολυμερίστηκαν, αφήνεται να περάσει μέσα από μία στήλη η οποία έχει πληρωθεί με στερεά πορώδη σωματίδια πολύ μικρής διαμέτρου. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο γεγονός ότι τα μικρά μόρια μπορούν να διεισδύσουν βαθύτερα μέσα στους πόρους του πληρωτικού υλικού με αποτέλεσμα να καθυστερήσουν να εξέλθουν της στήλης, σε αντίθεση με τα μεγάλα μόρια, τα οποία επειδή δεν μπορούν να εισχωρήσουν μέσα στους μικρότερους πόρους, εκκλούνται πρώτα. Στις ιδανικές στήλες ο διαχωρισμός οφείλεται μόνο στο μοριακό μέγεθος και δεν υπάρχουν άλλου είδους αλληλεπιδράσεις μεταξύ του πορώδους υλικού και των μακρομορίων. [45,46,47]



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

Το πακεταριστικό υλικό των στηλών μπορεί να είναι οργανικής φύσεως όπως πολυστυρένιο δικτυωμένο με διβινυλοβενζόλιο ή ανόργανο όπως σίλικα ή πορώδες γυαλί. Συνήθως προτιμάται πακεταριστικό υλικό από πολυστυρένιο και όχι από ανόργανες ύλες, επειδή έτσι δεν δημιουργούνται δευτερογενείς αλληλεπιδράσεις, οι οποίες θα οδηγούσαν σε δευτερογενείς διαδικασίες κατανομής. Οι λόγοι για τέτοιες δευτερογενείς διαδικασίες είναι προσρόφηση, κατανομή, ασυμβατότητα κ.α. Γενικά, τέτοιες διαδικασίες αυξάνουν τον χρόνο έκλουσης, δίνοντας έτσι μειωμένο μοριακό βάρος για το άγνωστο δείγμα. [48]



**Εικόνα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση οργάνολογίας SEC. [49]**

Η χρωματογραφία SEC είναι μία σχετική μέθοδος προσδιορισμού MB διότι απαιτεί βαθμονόμηση για τη μετατροπή της κατανομής όγκων έκλουσης σε κατανομή MB. Η βαθμονόμηση γίνεται με πρότυπα, μονοδιάσπαρτα πολυμερή, των οποίων τα MB είναι γνωστά, γιατί έχουν χαρακτηριστεί με απόλυτες μεθόδους, όπως η στατική σκέδαση φωτός και η ωσμωμετρία. Με τον τρόπο αυτό γίνεται γνωστός ο χρόνος κατακράτησης στη στήλη μορίων

συγκεκριμένου MB και με βάση αυτά μπορούν να μετατραπούν οι χρόνοι κατακράτησης αγνώστων δειγμάτων σε ισοδύναμα MB. Επειδή όμως ο όγκος έκλουσης δεν εξαρτάται άμεσα από το μοριακό βάρος, αλλά από το μέγεθος των μακρομορίων, θα πρέπει τα πρότυπα δείγματα και τα αγνώστου μοριακού βάρους δείγματα να έχουν την ίδια χημική σύσταση και την ίδια αρχιτεκτονική (π.χ. γραμμικά ή κυκλικά ή αστεροειδή με ίδιο αριθμό κλάδων κλπ.) και οι μετρήσεις των όγκων έκλουσης σε όλα τα δείγματα να γίνονται υπό τις ίδιες ακριβώς πειραματικές συνθήκες (ροή διαλύτη, πίεση, θερμοκρασία κλπ).[50] Στην αγορά διατίθεται περιορισμένος αριθμός τύπων ομοπολυμερών στενής κατανομής MB για βαθμονόμηση της SEC, με πιο συνηθισμένα τα πρότυπα του πολυστυρενίου, του πολυμεθακρυλικού μεθυλεστέρα και του πολυαιθυλενοξειδίου.

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

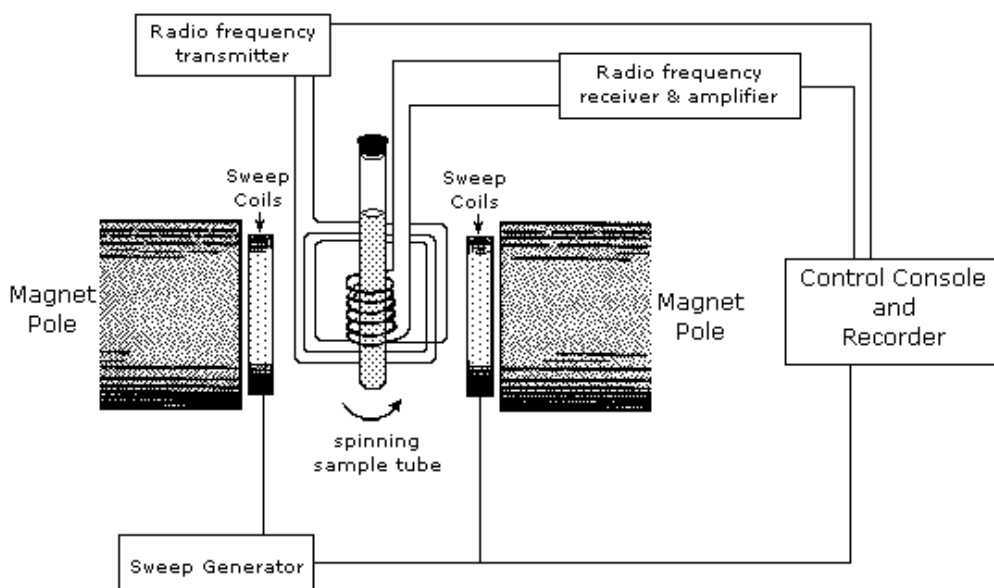
Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές τεχνικές ταυτοποίησης μορίων στην χημεία, καθώς προσδιορίζει τον αριθμό και το είδος των ατόμων σε ένα μόριο, καθώς και τον τρόπο σύνδεσής τους. Παρέχει ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για τη σύσταση των δομικών μονάδων και τη στερεοχημική διαμόρφωση των μορίων. Η φασματοσκοπία NMR παρέχει έναν μεγάλο όγκο πληροφοριών σχετικά με τη δομή της ένωσης, ωστόσο για τον προσδιορισμό των δομών πολύπλοκων οργανικών ενώσεων μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλα είδη φασματοσκοπίας και χημικής ανάλυσης. Για την λήψη ενός φάσματος NMR είναι αρκετή μία σχετικά μικρή ποσότητα δείγματος, το οποίο μένει αναλλοίωτο μετά την ανάλυση.

Η τεχνική NMR 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 του αριθμού των πυρήνων που παράγουν αντίστοιχο σήμα. Βασίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων, από περίπου 4 έως 900 MHz.[51] Στη διαδικασία της απορρόφησης μετέχουν οι πυρήνες των ατόμων, σε αντίθεση με την απορρόφηση υπεριώδους, ορατής και υπέρυθρης ακτινοβολίας όπου μετέχουν τα ηλεκτρόνια.

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

Η οργανολογία ενός απλούστερου τύπου φασματομέτρου NMR αποτελείται από τέσσερα μέρη[52]:

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



**Εικόνα 2.3: Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτομέτρου NMR. [53]**

### 2.3 Φασματοσκοπία φθορισμού (FS) [54,55]

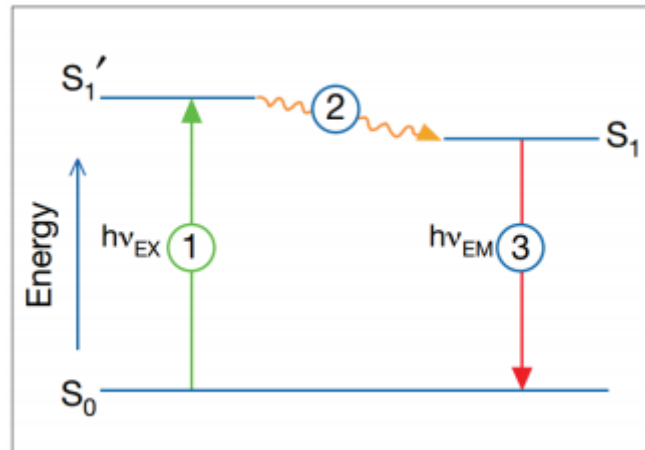
Μέσω της φασματοσκοπίας φθορισμού (Fluorescence Spectroscopy, FS) είναι εύκολο να ανιχνευθούν συγκεκριμένα μόρια με πολύ καλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα. Ο φθορισμός είναι αποτέλεσμα μιας διαδικασίας τριών σταδίων, όπως φαίνεται στο απλοποιημένο διάγραμμα της Εικόνας 2.4.

Στάδιο 1<sup>ο</sup> : Διέγερση. Ένα φωτόνιο ενέργειας  $h\nu_{EX}$  παρέχεται από μια εξωτερική πηγή όπως laser και απορροφάται από το μόριο που βρίσκεται στη θεμελιώδη ηλεκτρονιακή κατάσταση  $S_0$ . Αποτέλεσμα της απορρόφησης αυτής, είναι η μετάβαση ενός ηλεκτρονίου από τη θεμελιώδη κατάσταση στην κατάσταση  $S_1'$ . Κάθε ηλεκτρονιακή κατάσταση διαχωρίζεται σε επιμέρους δονητικά επίπεδα και η μετάβαση συνήθως πραγματοποιείται στο υψηλότερο ενεργειακά δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης κατάστασης  $S_1'$ .

Στάδιο 2<sup>ο</sup> : Διάρκεια ζωής της διεγερμένης κατάστασης. Η διεγερμένη κατάσταση υπάρχει μόνο για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (συνήθως 1-10 nanoseconds). Σε αυτό το χρονικό διάστημα το μόριο χάνει ενέργεια καθώς υποβάλλεται σε αλλαγές στη διαμόρφωση και υπόκειται σε πολλαπλές αλληλεπιδράσεις με τον περιβάλλον του. Οι διαδικασίες αυτές έχουν ως συνέπεια τη μετάβαση του ηλεκτρονίου από το υψηλότερο στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης κατάστασης  $S_1$  και η διαδικασία αυτή καλείται δονητική επαναφορά.

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

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



**Εικόνα 2.4: Απλοποιημένο διάγραμμα των επιμέρους διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα κατά το φαινόμενο του φθορισμού.**

Ο φθορισμός συμβαίνει σε συγκεκριμένα μόρια που ονομάζονται μόρια χρωμοφόρου φθορισμού (fluorophore) ή φθορίζουσες χρωστικές (fluorescent dyes). Οι φθορίζοντες ιχνηθέτες είναι μόρια χρωμοφόρου φθορισμού, οι οποίοι είναι σχεδιασμένοι με τέτοιο τρόπο ώστε να εντοπίζονται εντός μιας συγκεκριμένης περιοχής του δείγματος ή να αποκρίνονται σε ένα συγκεκριμένο ερέθισμα.

#### 2.4 Σκέδαση φωτός (LS)

Οι τεχνικές σκέδασης φωτός (Light Scattering Techniques) χρησιμοποιούνται ευρέως για το χαρακτηρισμό πολυμερικών διαλυμάτων και παρέχουν σημαντικές πληροφορίες αναφορικά με τις στατικές, υδροδυναμικές και θερμοδυναμικές ιδιότητες των πολυμερικών μορίων στο διάλυμα. Η σκέδαση φωτός επιτρέπει τον προσδιορισμό του απόλυτου  $\langle M_w \rangle$  και της γυροσκοπικής ακτίνας  $\langle R_g^2 \rangle$  (στατική σκέδαση φωτός), καθώς και της υδροδυναμικής ακτίνας  $R_h$  (δυναμική σκέδαση φωτός).

Η βασική αρχή λειτουργίας των τεχνικών αυτών, έγκειται στη μέτρηση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από το διάλυμα σε διάφορες κατευθύνσεις σε σχέση με την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Όταν μία δέσμη ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας προσπίπτει στα μόρια μιας ουσίας, το ηλεκτρικό πεδίο του κύματος αλληλεπιδρά με τα φορτία των μορίων, μεταβάλλοντας τη χωρική τους κατανομή. Η δυνατότητα μεταβολής της χωρικής κατανομής των φορτίων ενός μορίου, εκφράζεται από το μέτρο της πολωσιμότητας του μορίου. Η

χωρική κατανομή των φορτίων του μορίου ακολουθεί τη χρονική μεταβολή του ηλεκτρικού πεδίου της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, με αποτέλεσμα τα μόρια να συμπεριφέρονται ως ταλαντούμενα ηλεκτρικά δίπολα, τα οποία εκπέμπουν ακτινοβολία, ίδιας συχνότητας με την προσπίπτουσα, προς όλες τις κατευθύνσεις. [56]

Η τεχνική της σκέδασης του φωτός είναι μία γρήγορη και μη καταστρεπτική για το δείγμα μέθοδος, απόλυτη εφόσον δεν απαιτείται βαθμονόμηση και μπορεί να εφαρμοστεί σε συστήματα, τα οποία αποτελούνται από μεγάλο αριθμό σωματιδίων. Παράλληλα όμως, το δείγμα δεν πρέπει να είναι πολύ πυκνό ώστε να αποφεύγεται η πολλαπλή σκέδαση και δεν πρέπει να υπάρχει πουθενά στο σύστημα σκόνη, διότι τα σωματίδια σκόνης αποτελούν και αυτά κέντρα σκέδασης.

#### **2.4.1 Στατική σκέδαση φωτός (Static Light Scattering, SLS) [57,58]**

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

$$R_\theta = \frac{d^2}{V f} \frac{I_s}{I_0} \quad (2.4.1.1)$$

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, και περιγράφεται σαν παράγοντας διακύμανσης της πυκνότητας και της συγκέντρωσης λόγω των θερμικών κινήσεων των μορίων. 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  $R_{\theta}$  εξαρτάται από τη γεωμετρία της πειραματικής διάταξης. Για το λόγο αυτό στην πράξη υπολογίζεται ο απόλυτος λόγος  $R_{\theta}$ , ο οποίος κανονικοποιείται ως προς πρότυπους διαλύτες, όπως το τολουόλιο, ως εξής:

$$R_{\theta} = R_T \frac{n_0^2}{n_T^2} \frac{I_S}{I_{S,T}} \quad (2.4.1.3)$$

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

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

$$\frac{Kc}{\Delta R_{\theta}} = \frac{1}{M_w} \left( 1 + \frac{1}{3} R_g^2 q^2 \right) + 2A_2c \quad (2.4.1.4)$$

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:

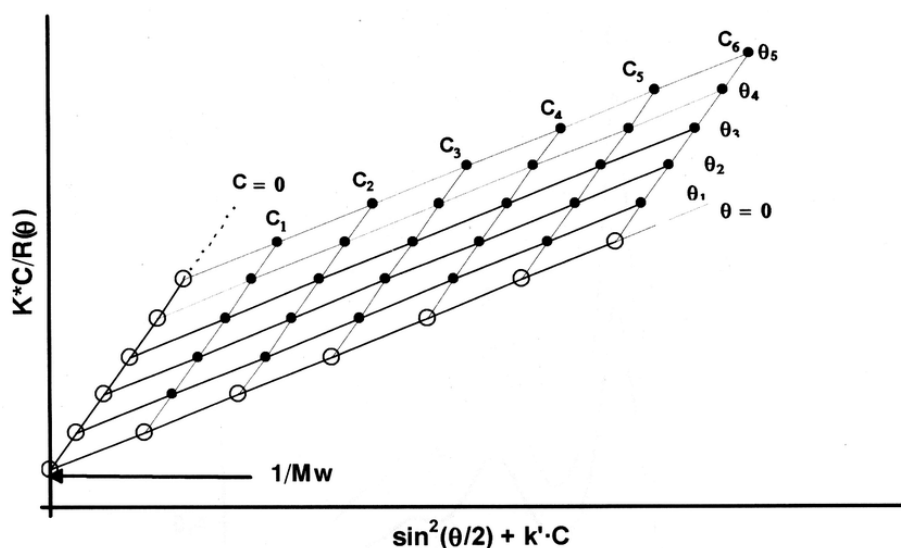
$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2.4.1.5)$$

όπου  $\lambda$  το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η σταθερά  $K$  δίνεται από τη σχέση:

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda^4 N_A} \left(\frac{\partial n}{\partial c}\right)^2 \quad (2.4.1.6)$$

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  $\theta$  και συγκεντρώσεις  $c$ , προκύπτει το διάγραμμα Zimm (Εικόνα 2.5). Από το διάγραμμα αυτό με διπλή προέκταση των μετρούμενων τιμών του λόγου  $Kc/\Delta R_\theta$  σε μηδενική γωνία σκέδασης και μηδενική συγκέντρωση, εξάγεται το μοριακό βάρος  $M_w$  ως το αντίστροφο της κοινής τεταγμένης επί της αρχής, ενώ ο συντελεστής  $A_2$  και η γυροσκοπική ακτίνα  $R_g$  υπολογίζονται από τις κλίσεις των ευθειών για  $\theta = 0$  και  $c = 0$ , αντίστοιχα.



Εικόνα 2.5: Διάγραμμα Zimm. [58]

Όπως φαίνεται από τη σχέση (2.4.1.6), ο διαφορικός δείκτης διάθλασης  $\partial n/\partial c$  του πολυμερικού διαλύματος, είναι μια απαραίτητη παράμετρος για την ανάλυση των μετρήσεων στατικής σκέδασης φωτός. Η παράμετρος αυτή αποτελεί το μέτρο της μεταβολής του δείκτη διάθλασης του διαλύματος συναρτήσει της αύξησης της συγκέντρωσης του πολυμερούς, είναι χαρακτηριστική του κάθε συστήματος πολυμερούς-διαλύτη και μετράται με τη χρήση διαφορικών διαθλασιμέτρων. Αξίζει να σημειωθεί ότι, στην περίπτωση συμπολυμερών κατά συστάδες και διαλυμάτων που περιέχουν δύο ή περισσότερα συστατικά, τα οποία δεν παρουσιάζουν ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ τους, ο διαφορικός δείκτης διάθλασης του διαλύματος  $(\partial n/\partial c)_{\text{ολικό}}$  μπορεί να υπολογιστεί ως σταθμισμένος μέσος όρος των διαφορικών δεικτών διάθλασης  $(\partial n/\partial c)_1$  και  $(\partial n/\partial c)_2$  των επιμέρους συστατικών, ως εξής:

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

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

Το κύριο πλεονέκτημα της SLS είναι ότι είναι μία απόλυτη μέθοδος από την οποία αντλούνται σημαντικές πληροφορίες για τα πολυμερή και είναι μη καταστρεπτική για το δείγμα. Τα μειονεκτήματά της περιλαμβάνουν το ότι είναι ευαίσθητη στην παρουσία σκόνης και ότι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν συστήματα που απορροφούν στο μήκος κύματος που εκπέμπει το λέιζερ.

#### 2.4.2 Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) [57,59]

Η συνεχής μεταβολή της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας λόγω των κινήσεων Brown των αλυσίδων σε ένα διάλυμα πολυμερούς είναι η βάση λειτουργίας της δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS). Σύμφωνα με τη μοριακή κινητική θεωρία, η κίνηση Brown οφείλεται στις τυχαίες συγκρούσεις των μορίων του μέσου διασποράς με τα σωματίδια. Οι κατευθύνσεις των κινήσεων των μορίων του μέσου περί το σωματίδιο είναι τυχαία προσανατολισμένες, ενώ οι ταχύτητές τους κατανέμονται σύμφωνα με το νόμο Maxwell-Boltzman. Η δύναμη που ασκείται πάνω στα σωματίδια είναι ανάλογη τόσο της συχνότητας των συγκρούσεων όσο και της ταχύτητας των

μορίων του μέσου. Η συχνότητα των συγκρούσεων είναι ανάλογη της πυκνότητας του μέσου σε μία περιοχή περί το σωματίδιο πάχους ίσου με την ελεύθερη διαδρομή των μορίων του μέσου. Επειδή η τοπική πυκνότητα ενός υγρού μεταβάλλεται, όπως άλλωστε και η μοριακή ταχύτητα, η ασκούμενη δύναμη ανά μονάδα επιφάνειας του σωματιδίου θα μεταβάλλεται επίσης διαρκώς. Την κάθε χρονική στιγμή θα ασκείται μια συγκεκριμένη συνισταμένη δύναμη στο σωματίδιο της οποίας το μέτρο και η κατεύθυνση θα αλλάζει συνεχώς με αποτέλεσμα το σωματίδιο να κάνει τη χαρακτηριστική κίνηση zig-zag, που ονομάζουμε κίνηση Brown.

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 μία συνάρτηση αυτοσυσχέτισης μεταξύ δύο σφαιρικών σωμάτων που δεν αλληλεπιδρούν έχει τη μορφή:

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

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

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda} \sin(\theta/2) \quad (2.4.2.2)$$

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

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

$$D_0 = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$$

**(2.4.2.3)**

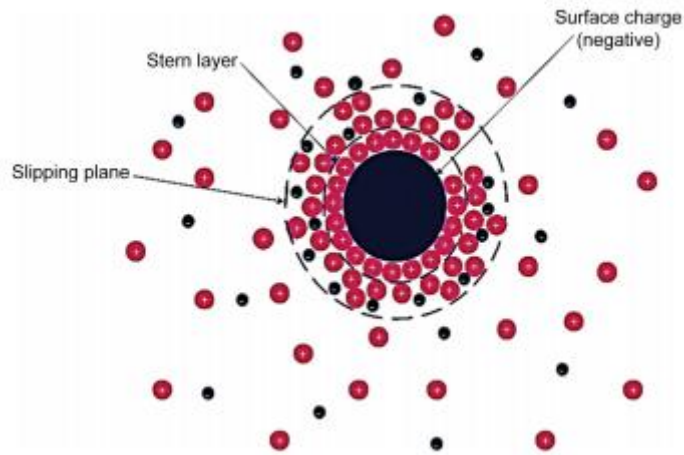
όπου  $k$  η σταθερά Boltzmann,  $T$  η απόλυτη θερμοκρασία,  $\eta$  το ιξώδες του διαλύματος και  $R_h$  η υδροδυναμική ακτίνα του πολυμερούς. Συμπερασματικά μετρώντας και εκφράζοντας τις μεταβολές της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από ένα διάλυμα πολυμερούς ως συνάρτηση του χρόνου, είναι δυνατός ο υπολογισμός της υδροδυναμικής ακτίνας  $R_h$  των πολυμερών στο διάλυμα.

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

### 2.4.3 Ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός (ELS) - ζ-δυναμικό [60-63]

Όταν ένα φορτισμένο σωματίδιο ή μακρομόριο βρεθεί σε περιβάλλον πολικού διαλύτη, τα επιφανειακά φορτία του σωματιδίου αλληλεπιδρούν με τα ιόντα του διαλύτη μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό γύρω από το σωματίδιο μίας ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας (Electrical Double Layer, EDL), η οποία καλείται και στοιβάδα Debye. Η διπλοστοιβάδα 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. Ως αποτέλεσμα, το δυναμικό της διπλοστοιβάδας παρουσιάζει εκθετική μείωση συναρτήσει της απόστασης από την επιφάνεια του σωματιδίου.

Η διπλή αυτή στοιβάδα μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από δύο τμήματα όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.6, μία εσωτερική περιοχή, η οποία περιλαμβάνει ιόντα δεσμευμένα σχετικά ισχυρά με τη φορτισμένη επιφάνεια και ονομάζεται στοιβάδα Stern (Stern Layer), και μία εξωτερική (διαχυτική) περιοχή που δημιουργείται από διάχυση ασθενέστερα συνδεδεμένων ιόντων του μίγματος και ονομάζεται στοιβάδα Gouy-Charman. Στο διάχυτο στρώμα υπάρχει ένα νοητό όριο μέσα στο οποίο ιόντα και μόρια διαλύτη αλληλεπιδρούν αρκετά ισχυρά με τη φορτισμένη επιφάνεια του σωματιδίου ώστε σχηματίζουν μια σταθερή οντότητα με το σωματίδιο. Το όριο αυτό ονομάζεται επίπεδο ολίσθησης (Slipping plane). Όταν ένα σωματίδιο κινείται, τα ιόντα μέσα σε αυτό το όριο κινούνται μαζί του. Το ηλεκτρικό δυναμικό το οποίο υπάρχει στο εξωτερικό μέρος αυτού του ορίου (επίπεδο ολίσθησης) ονομάζεται δυναμικό ζ ( $\zeta$ -potential), ή αλλιώς ηλεκτροκινητικό δυναμικό, και αποτελεί ένδειξη του επιφανειακού φορτίου του σωματιδίου.



**Εικόνα 2.6: Σχηματική απεικόνιση της διασποράς των ιόντων του διαλύματος γύρω από ένα φορτισμένο σωματίδιο. [60]**

Η αρχή για τον προσδιορισμό του ζ-δυναμικού είναι πολύ απλή. Με ηλεκτρόδια εμβαπτισμένα στο δείγμα του κολλοειδούς εφαρμόζεται ένα σταθερό ηλεκτρικό πεδίο και αυτό προκαλεί την κίνηση των σωματιδίων προς το ηλεκτρόδιο με αντίθετη πολικότητα. Ιζώδεις 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 ιζώδους μέσου. Τα σωματίδια φτάνουν σε μια σταθερή τελική ταχύτητα, η οποία εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, τη διηλεκτρική σταθερά και το ιζώδες του μέσου, καθώς και από το ζ-δυναμικό του σωματιδίου.

Σε μία τυπική μέτρηση ζ-δυναμικού ή αλλιώς ηλεκτροφορητικής σκέδασης του φωτός (Electrophoretic Light Scattering, ELS), ένα μέρος από το δείγμα του κολλοειδούς τοποθετείται σε μια κυψελίδα και υπόκειται σε ηλεκτροφόρηση μέσω δύο ηλεκτροδίων. Στο δείγμα προσπίπτει μια δέσμη μονοχρωματικής ακτινοβολίας (laser) και η σκεδαζόμενη από το διάλυμα ακτινοβολία συλλέγεται από έναν ανιχνευτή. Όσο μεγαλύτερη είναι η ταχύτητα των σωματιδίων του κολλοειδούς (εξαρτάται από το φορτίο τους) τόσο μεγαλύτερη θα είναι η μεταβολή στη συχνότητα της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (φαινόμενο Doppler). Ένας διαχωριστής (splitter) χρησιμοποιείται ώστε ένα μέρος της ακτινοβολίας που εκπέμπει το laser να φτάνει απ' ευθείας στον ανιχνευτή χωρίς να προσπίπτει πάνω στο δείγμα. Συσχετίζοντας τις δύο

διαφορετικές ακτινοβολίες που φτάνουν στον ανιχνευτή (προσπίπτουσα και σκεδαζόμενη) είναι εύκολο και προσδιοριστεί η μετατόπιση Doppler, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ταχύτητας των σωματιδίων.

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

$$\zeta = \eta / \epsilon U_e \quad (2.4.3.1)$$

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

$$U_e = \frac{u}{V/L} \quad (2.4.3.2)$$

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



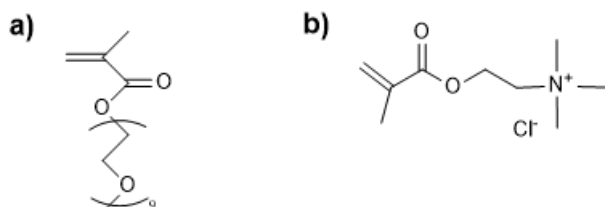
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 3.1 Υλικά και αντιδραστήρια

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

**Μονομερή:** Μεθακρυλικός εστέρας της ολιγοαιθυλενογλυκόλης με  $M_w=500$  (oligo (ethylene glycol) methyl ether methacrylate, OEGMA) (Sigma Aldrich), [2-(μεθακρυλοϋλοξυ)αιθυλο] τριμεθυλαμμώνιο χλωρίδιο ([2-(Methacryloyloxy)ethyl]trimethylammonium chloride, METAC) (Sigma Aldrich)



Σχήμα 3.1: Τα μονομερή a) OEGMA και b) METAC.

**Μέσα μεταφοράς αλυσίδας (CTA):** 4-κυανο-4-(φαινυλοκαρβονυλοθειο) πεντανοϊκό οξύ (4-cyano-4-(phenylcarbonothioylthio) pentanoic acid, CPAD) (Sigma Aldrich), 4-κυανο-4-[(δωδεκυλοσουλφανυλοθειοκαρβονυλο) σουλφανυλο] πεντανοϊκό οξύ (4-cyano-4-[(dodecylsulfanylthiocarbonyl) sulfanyl]pentanoic acid) (Sigma Aldrich)

**Απαρχητές:** Αζωδισισοβουτυρονιτρίλιο (azobisisobutyronitrile, AIBN) (Sigma Aldrich), 4,4'-αζωδισ(4-κυανοβαλερικό οξύ) (4,4'-Azobis(4-cyanopentanoic acid), ACVA) (Sigma Aldrich)

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

**DNA:** από σπέρμα σολωμού (Deoxyribonucleic acid double stranded from salmon testes) (Sigma Aldrich)

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

**Διαλύτες:** 1,4-Διοξάνιο (1,4 dioxane), Διμεθυλομεθαναμίδιο (DMF), Αιθανόλη (ethanol), Απεσταγμένο νερό (Distilled water), Δευτεριωμένο νερό ( $D_2O$ )

### **3.2 Οργανολογία και μέθοδοι χαρακτηρισμού**

#### Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών

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

#### Φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$

Τα φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  ελήφθησαν από ένα φασματόμετρο Bruker AC 300 FT-NMR. Οι χημικές μετατοπίσεις παρουσιάζονται σε ppm με σημείο αναφοράς το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS). Η προετοιμασία των δειγμάτων για τις μετρήσεις  $^1\text{H-NMR}$  ήταν η εξής: διάλυση περίπου 10mg δείγματος σε 0,7ml δευτεριωμένο νερό και εισαγωγή του διαλύματος στα σωληνάκια NMR (NMR tubes). Η ανάλυση των φασμάτων NMR έγινε με χρήση του λογισμικού MestReNova της εταιρίας MestRelabs.

#### Φασματοσκοπία φθορισμού

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

#### Δυναμική και στατική σκέδαση φωτός

Οι μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το όργανο ALV/CGS-3 Compact Goniometer System (ALV

GmbH, Germany), εξοπλισμένο με λέιζερ JDS Uniphase 22mW He-Ne, που λειτουργεί στα 632,8 nm, συνδεδεμένο με έναν ψηφιακό συσχετιστή 288 καναλιών ALV-5000/EPP multi-tau και μία ηλεκτρονική μονάδα σκέδασης φωτός ALV/LSE-5003, για έλεγχο της σταδιακής κίνησης του γωνιομέτρου και έλεγχο του διακόπτη ακραίας θέσης. Η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας και οι συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης μετρήθηκαν στις 45°, 90° και 135°. Οι συναρτήσεις συσχέτισης καταγράφηκαν πέντε φορές και αναλύθηκαν με τη μέθοδο αθροισμάτων και τον αλγόριθμο CONTIN, ο οποίος παρέχει τις κατανομές για την φαινόμενη υδροδυναμική ακτίνα με χρήση αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης με τη βοήθεια της σχέσης Stokes – Einstein. Οι μετρήσεις στατικής σκέδασης φωτός πραγματοποιήθηκαν με το ίδιο όργανο σε γωνιακό εύρος 30° - 150° λαμβάνοντας μέτρηση ανά 10 μοίρες. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων για τον υπολογισμό του γυροσκοπικού λόγου έγιναν με τη χρήση της προσέγγισης Guinier 2<sup>ης</sup> τάξης. Έγιναν μετρήσεις στα διαφορετικά σε σύσταση συμπολυμερή σε κατάλληλες συγκεντρώσεις και όλα τα διαλύματα διηθήθηκαν με υδρόφιλο φίλτρο πορώδους 0,45μm από PVDF πριν τη μέτρηση.

#### Ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός- ζ δυναμικό

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

### **3.3 Σύνθεση πολυμερών μέσω της τεχνικής πολυμερισμού RAFT**

Οι συνθέσεις των ομοπολυμερών POEGMA και PMETAC καθώς και των συμπολυμερών POEGMA-b-PMETAC και P(OEGMA-co-METAC) πραγματοποιήθηκαν με την χρήση της τεχνικής πολυμερισμού RAFT και οι συνθετικές πορείες που ακολουθήθηκαν περιγράφονται παρακάτω.

### 3.3.1 Σύνθεση ομοπολυμερούς POEGMA

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός του μονομερούς OEGMA από τους παρεμποδιστές τους οποίους περιείχε (μονομεθυλαιθέρας της υδροκινόνης και τριτοταγής βουτυλική κατεχόλη), διαπερνώντας το από στήλη πληρωμένη με τις κατάλληλες ρητίνες. Σε σφαιρική φιάλη (25ml) προστέθηκαν 2g (0.004 mol) μονομερούς OEGMA απαλλαγμένο από παρεμποδιστές, 0.05588g (0.2 mmol) 4-κυανο-4- (φαινυλο καρβονυλόθειο) πεντανοϊκό οξύ (CPAD) ως αντιδραστήριο μεταφοράς αλυσίδας, 0,00657g (0.04mmol) αζωδισισοβουτυρονιτρίλιο (AIBN) ως απαρχητής και 1,4-διοξάνιο ως διαλύτης πολυμερισμού, ώστε το διάλυμα να έχει τελικό όγκο 10 ml.

Στη συνέχεια το διάλυμα απαερώθηκε με συνεχή και ομαλή ροή αέριου αζώτου για δεκαπέντε λεπτά. Μετά το τέλος της απαέρωσης η σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο θερμοστατημένο στους 70°C για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών, η φιάλη με το προϊόν της αντίδρασης τοποθετήθηκε σε χαμηλή θερμοκρασία (-8°C) με σκοπό τη διακοπή του πολυμερισμού και έπειτα ανοίγεται στην ατμόσφαιρα ώστε να απενεργοποιηθούν ελεύθερες ρίζες που δεν έχουν αντιδράσει και επαναφέρεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Για την ανάκτηση του προϊόντος μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, πραγματοποιήθηκε καταβύθιση του προϊόντος της αντίδρασης σε δεκαπλάσια ποσότητα κανονικού εξανίου, απόχυση του υπερκειμένου, επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος με μικρή ποσότητα τετραϋδροφουρανίου και δεύτερη καταβύθιση του σε πενταπλάσια περίσσεια κανονικού εξανίου. Ακολούθησε απόχυση του υπερκειμένου και τοποθέτηση του προϊόντος στο φούρνο κενού για 48 ώρες για ξήρανση.

### 3.3.2 Σύνθεση συσταδικού συμπολυμερούς POEGMA-b-PMETAC

Για τη σύνθεση του συμπολυμερούς POEGMA-b-PMETAC, το ομοπολυμερές POEGMA χρησιμοποιήθηκε ως μακρο-CTA για τον πολυμερισμό της δεύτερης συστάδας του συμπολυμερούς. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια της τεχνικής πολυμερισμού RAFT και η γενική πορεία που ακολουθήθηκε, περιγράφεται παρακάτω.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του μονομερούς METAC από τον παρεμποδιστή του (μονομεθυλαιθέρας της υδροκινόνης) με τη χρήση στήλης πληρωμένης με την κατάλληλη ρητίνη. Στη συνέχεια σε σφαιρική φιάλη (25ml) προστέθηκαν κατάλληλες ποσότητες από POEGMA ως αντιδραστήριο μεταφοράς αλυσίδας (macro-CTA), 4,4'-αζωδισ(4-κυανοβαλερικό οξύ) (ACVA) ως απαρχητή, μονομερές METAC και απιονισμένο νερό ως διαλύτη πολυμερισμού. Η αναλογία σε mol CTA / απαρχητή που χρησιμοποιήθηκε είναι POEGMA / ACVA = 2.

Ακολούθησε η απαέρωση του διαλύματος με συνεχή και ομαλή ροή αέριου αζώτου για δεκαπέντε λεπτά. Μετά το τέλος της απαέρωσης το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο θερμοστατημένο στους 70°C για 16 ώρες. Μετά το πέρας των ωρών του πολυμερισμού, η φιάλη με το προϊόν της αντίδρασης τοποθετήθηκε σε χαμηλή θερμοκρασία (-8°C) με σκοπό τη διακοπή του πολυμερισμού και έπειτα ανοίγεται στην ατμόσφαιρα και επαναφέρεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Για την ανάκτηση του πολυμερούς χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διαπίδυσης μεμβράνης (Dialysis Method). Κατά τη μέθοδο αυτή, το πολυμερές εγκλωβίζεται εντός μιας μεμβράνης διαπίδυσης της οποίας το μέγεθος των πόρων επιτρέπει στα μονομερή που δεν αντέδρασαν να εξέλθουν, αλλά συγκρατεί το πολυμερές. Η μεμβράνη τοποθετείται σε λουτρό που περιέχει μεγάλη περίσσεια απεσταγμένου νερού (το οποίο ανανεώνεται ανά 3 ώρες για 3 ημέρες) υπό χαμηλή ανάδευση. Τέλος, με την βοήθεια του περιστροφικού εξατμιστήρα το νερό εξατμίστηκε και το πολυμερές συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε στο φούρνο κενού για ξήρανση επί 48 ώρες.

### **3.3.3 Σύνθεση στατιστικών συμπολυμερών P(OEGMA-co-METAC)**

Πραγματοποιήθηκε η σύνθεση δυο στατιστικών συμπολυμερών P(OEGMA-co-METAC), με διαφορετικές αναλογίες μεταξύ των μονομερών τους, με χρήση της τεχνικής πολυμερισμού RAFT.

Αρχικά, τα μονομερή OEGMA και METAC καθαρίστηκαν από τους παρεμποδιστές τους οποίους περιείχαν (μονομεθυλαιθέρας της υδροκινόνης και τριτοταγής βουτυλική κατεχόλη), διαπερνώντας τα το καθένα ξεχωριστά από στήλη, πληρωμένη με τις κατάλληλες σε κάθε περίπτωση ρητίνες. Σε

σφαιρική φιάλη (25ml) προστέθηκαν κατάλληλες ποσότητες από τα καθαρισμένα πλέον μονομερή OEGMA και METAC, 4-κυανο-4-[(δωδεκυλοσουλφανυλοθειοκαρβονυλο)σουλφανυλο] πεντανοϊκό οξύ ως αντιδραστήριο μεταφοράς αλυσίδας, 4,4'-αζωδισ(4-κυανοβαλερικό οξύ) (ACVA) ως απαρχητή και μείγμα απιονισμένου νερού με αιθανόλη ως διαλύτη πολυμερισμού. Χρησιμοποιήθηκε αναλογία σε mol CTA / απαρχητή = 2.

Το διάλυμα απαερώθηκε με συνεχή και ομαλή ροή αέριου αζώτου για δεκαπέντε λεπτά. Μετά το τέλος της απαέρωσης το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο θερμοστατημένο στους 70°C για 16 ώρες. Μετά το πέρας των ωρών του πολυμερισμού, η φιάλη με το προϊόν της αντίδρασης τοποθετήθηκε σε χαμηλή θερμοκρασία (-8°C) με σκοπό τη διακοπή του πολυμερισμού και έπειτα ανοίγεται στην ατμόσφαιρα και επαναφέρεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για την ανάκτηση του πολυμερούς χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διαπίδυσης μεμβράνης (Dialysis Method) και στη συνέχεια με την βοήθεια του περιστροφικού εξατμιστήρα το νερό εξατμίστηκε. Το πολυμερές συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε στο φούρνο κενού για ξήρανση επί 48 ώρες.

### 3.3.4 Σύνθεση ομοπολυμερούς PMETAC

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ο καθαρισμός του μονομερούς METAC από τον παρεμποδιστή του (μονομεθυλαιθέρας της υδροκινόνης) με τη χρήση στήλης πληρωμένης με την κατάλληλη ρητίνη. Σε σφαιρική φιάλη (25ml) προστέθηκαν 1g (0.0048 mol) μονομερούς METAC απαλλαγμένο από παρεμποδιστές, 0.04037g (0.1mmol) 4-κυανο-4-[(δωδεκυλοσουλφανυλοθειοκαρβονυλο)σουλφανυλο] πεντανοϊκό οξύ ως αντιδραστήριο μεταφοράς αλυσίδας, 0,01401g (0.05 mmol) 4,4'-αζωδισ(4-κυανοβαλερικό οξύ) (ACVA) ως απαρχητής και DMF ως διαλύτης πολυμερισμού, ώστε το διάλυμα να έχει τελικό όγκο 5 ml.

Στη συνέχεια το διάλυμα απαερώθηκε με συνεχή και ομαλή ροή αέριου αζώτου για δεκαπέντε λεπτά. Μετά το τέλος της απαέρωσης η σφαιρική φιάλη τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο θερμοστατημένο στους 70°C για 16 ώρες. Μετά το πέρας των 16 ωρών, η φιάλη με το προϊόν της αντίδρασης τοποθετήθηκε σε χαμηλή θερμοκρασία (-8°C) με σκοπό τη διακοπή του πολυμερισμού και έπειτα ανοίγεται στην ατμόσφαιρα και επαναφέρεται σε θερμοκρασία

περιβάλλοντος. Για την ανάκτηση του προϊόντος μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διαπίδυσης μεμβράνης (Dialysis Method) και στη συνέχεια με την βοήθεια του περιστροφικού εξατμιστήρα το νερό εξατμίστηκε. Το πολυμερές συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε στο φούρνο κενού για ξήρανση επί 48 ώρες.

### **3.4 Αυτοοργάνωση των PMETAC, POEGMA-b-PMETAC και P(OEGMA-co-METAC) σε υδατικά διαλύματα**

Τα συμπολυμερή που παρασκευάστηκαν μελετήθηκαν τόσο σε μοριακό επίπεδο όσο και βάσει της ικανότητάς τους να αυτοοργανώνονται σε υδατικά διαλύματα. Επιπλέον, διερευνήθηκε η επίδραση φυσικοχημικών παραμέτρων στη μορφολογία των νανοδομών.

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των υδατικών πολυμερικών διαλυμάτων περιλαμβάνει την απευθείας διάλυση του στερεού πολυμερούς σε υδατικό μέσο NaCl 0.01M, χωρίς να απαιτείται η χρήση οργανικού διαλύτη. Στη συνέχεια τα δείγματα αφέθηκαν σε ηρεμία όλη τη νύχτα προκειμένου επέλθει δυναμική ισορροπία στο σύστημα. Στην περίπτωση του ομοπολυμερούς PMETAC και των συμπολυμερών P(OEGMA-co-METAC) ήταν απαραίτητη η υποβοήθηση της διάλυσης με θέρμανση των δειγμάτων στους 60°C για 20 λεπτά. Η ανάγκη θέρμανσης υποδηλώνει την ύπαρξη δευτερογενών αλληλεπιδράσεων στο στερεό που χρειάζονται παροχή ενέργειας για να διασπαστούν και να διαλυθεί το πολυμερές.

### **3.5 Μελέτη της επίδρασης φυσικοχημικών παραμέτρων στα διαλύματα των πολυμερών**

Μετά την αυτοοργάνωση των πολυμερών σε υδατικά διαλύματα, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της επίδρασης ορισμένων φυσικοχημικών παραμέτρων στις ιδιότητες των διαλυμάτων τους. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία συστήματα που περιέχουν PMETAC τμήματα αναμένεται να μην αποκρίνονται σε αλλαγές του pH, καθώς το PMETAC αποτελεί ισχυρό κατιοντικό πολυηλεκτρολύτη μόνιμα θετικά φορτισμένο, αλλά να αποκρίνονται σε μεταβολές της ιοντικής ισχύος.

Η μελέτη για την επίδραση της μεταβολής της θερμοκρασίας στις ιδιότητες των διαλυμάτων των συμπολυμερών υλοποιήθηκε μέσω μετρήσεων δυναμικής σκέδασης φωτός υπό γωνία 90°. Παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκεντρώσεων  $1,0 \times 10^{-3}$  g/ml σε υδατικό μέσο NaCl 0,01M. Στην περίπτωση των συμπολυμερών P(OEGMA-co-METAC) ήταν απαραίτητη η υποβοήθηση της διάλυσης με θέρμανση των δειγμάτων στους 60°C για 20 λεπτά και επαναφορά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε εύρος θερμοκρασιών από 25°C έως 55°C, ανά 10°C και πριν από κάθε μέτρηση, το διάλυμα παρέμενε σε κάθε θερμοκρασία 15 λεπτά, προκειμένου να επιτευχθεί εξισορρόπηση.

Η επίδραση της ιοντικής ισχύος στα διαλύματα πολυμερών μελετήθηκε αρχικά μέσω δυναμικής σκέδασης φωτός. Παρασκευάστηκαν διαλύματα των πολυμερών συγκέντρωσης  $1,0 \times 10^{-3}$  g/mL με την απευθείας διαλυτοποίηση του κάθε πολυμερούς σε NaCl 0.01 M και μετρήθηκαν. Στην περίπτωση του ομοπολυμερούς PMETAC και των συμπολυμερών P(OEGMA-co-METAC) ήταν απαραίτητη η υποβοήθηση της διάλυσης με θέρμανση των δειγμάτων στους 60°C για 20 λεπτά και επαναφορά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η επίδραση της ιοντικής ισχύος μελετήθηκε, με σταδιακή προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων υδατικού διαλύματος NaCl 1M στο ίδιο διάλυμα, έτσι ώστε να επιτευχθούν επιπλέον οι συγκεντρώσεις 0.15M και 0.3M NaCl στα δείγματα. Μετά από κάθε προσθήκη, τα διαλύματα παρέμειναν σε ηρεμία για 15 λεπτά προκειμένου να επέλθει εξισορρόπηση και έπειτα μετρήθηκαν. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν υπό γωνία 90°.

Επιπρόσθετα, η επίδραση της ιοντικής ισχύος μελετήθηκε μέσω μετρήσεων φασματοσκοπίας φθορισμού υπό γωνία 90°. Παρασκευάστηκαν διαλύματα των πολυμερών συγκέντρωσης  $1,0 \times 10^{-3}$  g/mL σε υδατικό μέσο NaCl 0,01M. Στην περίπτωση του ομοπολυμερούς PMETAC και των συμπολυμερών P(OEGMA-co-METAC) ήταν απαραίτητη η υποβοήθηση της διάλυσης με θέρμανση των δειγμάτων στους 60°C για 20 λεπτά και επαναφορά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα δείγματα ιχνηθετήθηκαν με πυρένιο, σε αναλογία 1  $\mu$ L διαλύματος πυρενίου (C=1mM) / 1mL διαλύματος πολυμερούς, αφέθηκαν σε ηρεμία για 24 ώρες, ώστε να εγκλωβιστεί το πυρένιο σε πιθανές υδρόφοβες περιοχές των νανοσωματιδίων και στη συνέχεια μετρήθηκαν. Οι



μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε  $\lambda_{excitation} = 335 \text{ nm}$ . Έπειτα ακολούθησε η σταδιακή προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων υδατικού διαλύματος NaCl 1M στο ίδιο διάλυμα, έτσι ώστε να επιτευχθούν επιπλέον οι συγκεντρώσεις 0.15M και 0.3M NaCl στα δείγματα. Μετά από κάθε προσθήκη, τα διαλύματα παρέμειναν σε ηρεμία για 15 λεπτά προκειμένου να επέλθει εξισορρόπηση και έπειτα μετρήθηκαν.

### **3.6 Σύμπλεξη των PMETAC, POEGMA-b-PMETAC και P(OEGMA-co-METAC) συσσωματωμάτων με μόρια DNA**

Με σκοπό τη διερεύνηση της χρήσης τους ως φορείς γενετικού υλικού, πραγματοποιήθηκαν μελέτες σύμπλεξης του ομοπολυμερούς PMETAC και των συμπολυμερών POEGMA-b-PMETAC και P(OEGMA-co-METAC) με μόρια DNA. Η σύμπλεξη του DNA με το κάθε πολυμερές επιτεύχθηκε με την ανάμιξη του διαλύματος του πολυμερούς με το διάλυμα του DNA ώστε να παρασκευαστούν σύμπλοκα με λόγους N/P 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6 και 8. Ο λόγος N/P εκφράζεται σε mol και ορίζεται ως ο λόγος των θετικά φορτισμένων μονάδων για τις αλυσίδες του PMETAC που αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του μορίου του DNA.

Η σύμπλεξη επιτεύχθηκε ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία. Αρχικά, παρασκευάστηκε διάλυμα πολυμερούς συγκέντρωσης  $5.0 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$  σε διαλύτη NaCl 0.01M και διάλυμα DNA  $2.0 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$  σε διαλύτη NaCl 0.01M. Υπολογίζεται η κατά βάρος σύσταση (%wt) σε PMETAC και συνεπώς υπολογίζονται τα mol PMETAC που υπάρχουν στο διάλυμα που παρασκευάστηκε. Δεδομένου ότι ο αριθμός των mol PMETAC παραμένει σταθερός σε όλα τα δείγματα και με βάση τον λόγο N/P του συμπλόκου που θέλουμε να παρασκευάσουμε, υπολογίζουμε τα mol των φωσφορικών ομάδων και άρα την ποσότητα DNA που θα χρησιμοποιήσουμε σε κάθε περίπτωση.

Τα αρχικά διαλύματα πολυμερούς και DNA αφέθηκαν σε ηρεμία για 24 ώρες και την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε η ανάμειξή τους ανάλογα με τον επιθυμητό λόγο N/P, σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο ανάμειξης. Σε κάθε διάλυμα πολυμερούς όγκου 1 mL το οποίο αναδεύεται ήπια, προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος DNA. Το διάλυμα συνεχίζει να αναδεύεται

για περίπου 5 λεπτά και μετά αφήνεται σε ηρεμία για 20 λεπτά. Στη συνέχεια αραιώνεται με NaCl 0.01 M έως ότου ο τελικός του όγκος είναι 10 mL. Τα σύμπλοκα που σχηματίστηκαν αφήθηκαν σε ηρεμία για 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ώστε η σύμπλεξη των θετικά φορτισμένων ομάδων του PMETAC με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του μορίου του DNA να έρθει σε ισορροπία.

Οι ιδιότητες των συμπλόκων που παρασκευάστηκαν μελετήθηκαν μέσω μετρήσεων στατικής, δυναμικής και ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μελέτη απόσβεσης φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου. Προκειμένου να διερευνηθεί η ικανότητα των ομάδων του PMETAC να σχηματίζουν σύμπλοκα με μόρια DNA, εξετάστηκε ο φθορισμός του βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide, EtBr) σε διάφορες N/P αναλογίες. Παρασκευάστηκε διάλυμα πολυμερούς συγκέντρωσης  $5.0 \times 10^{-4}$  g/mL και διάλυμα DNA συγκέντρωσης  $1.0 \times 10^{-5}$  g/mL, στο οποίο προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο σε αναλογία  $[EB]=[DNA]/4$  (κατά mol). Τα διαλύματα αφήθηκαν σε ηρεμία για 24 ώρες και την επόμενη μέρα, το διάλυμα του DNA τιτλοδοτήθηκε με το διάλυμα του πολυμερούς ξεκινώντας από λόγο N/P ίσο με 0.25 καταλήγοντας σε N/P ίσο με 8. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε  $\lambda_{emission} = 535$  nm.

Τέλος, εξετάστηκε πως επιδρά η αύξηση της ιοντικής ισχύος στις ιδιότητες των συμπλόκων των πολυμερών με DNA. Για τις μετρήσεις επιλέχθηκαν διαλύματα δύο λόγων N/P για την κάθε σειρά συμπλόκων. Η αρχική συγκέντρωση άλατος στα διαλύματα συμπλόκων είναι NaCl 0.01M. Με σταδιακή προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων υδατικού διαλύματος NaCl 1M, επιτεύχθηκαν επιπλέον οι συγκεντρώσεις 0.15M και 0.3M NaCl στα δείγματα και πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός υπό γωνία  $90^\circ$ .

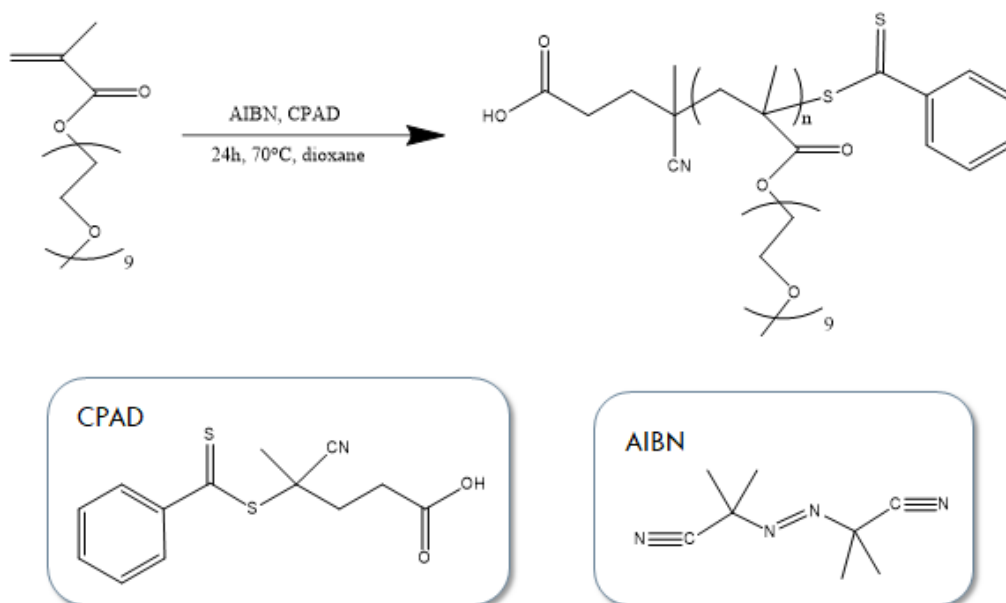
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο παρόν κεφάλαιο παρατίθενται τα αποτελέσματα από την σύνθεση και τον μοριακό - φυσικοχημικό χαρακτηρισμό των συμπολυμερών POEGMA-b-PMETAC και P(OEGMA-co-METAC) καθώς και του ομοπολυμερούς PMETAC. Στη συνέχεια αναλύονται τα αποτελέσματα από την αυτοοργάνωσή τους σε υδατικά διαλύματα ως συνάρτηση της θερμοκρασίας και της ιοντικής ισχύος, καθώς επίσης και τα αποτελέσματα των πειραμάτων σύμπλεξης των πολυμερών με DNA και η εξάρτηση των χαρακτηριστικών των συμπλόκων αυτών από την ιοντική ισχύ. Ο χαρακτηρισμός των συμπολυμερών επιτεύχθηκε με διάφορες τεχνικές ενόργανης ανάλυσης οι οποίες είναι οι εξής: Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών (SEC), Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR), Φασματοσκοπία Φθορισμού (Fluorescence Spectroscopy), Στατική (SLS), Δυναμική (DLS) και Ηλεκτροφορητική Σκέδαση Φωτός (ELS).

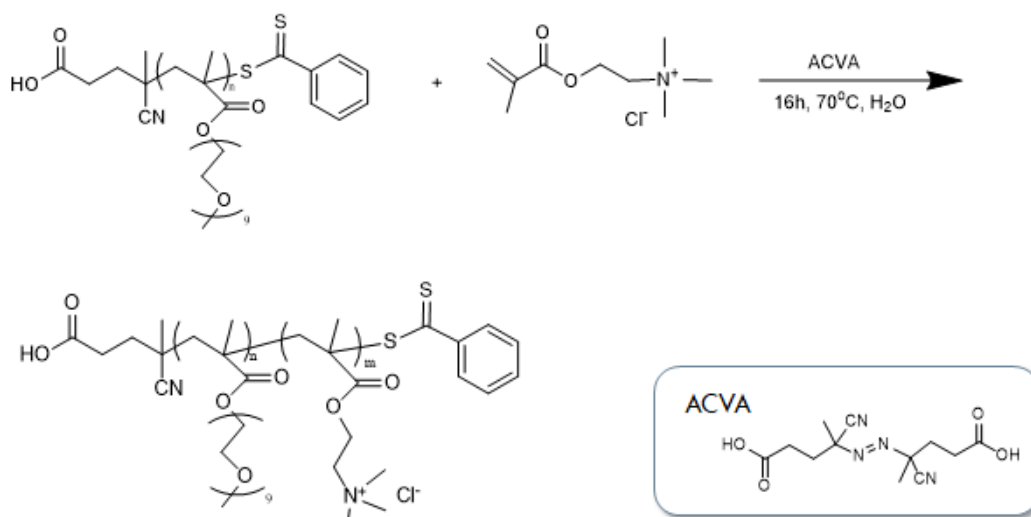
#### 4.1 Σύνθεση πολυμερών μέσω της τεχνικής πολυμερισμού RAFT

Αρχικά συντέθηκε το ομοπολυμερές POEGMA με την βοήθεια της τεχνικής πολυμερισμού RAFT, χρησιμοποιώντας ως CTA το 4-κυανο-4-(φαινυλοκαρβονυλοθειο) πεντανοϊκό οξύ (CPAD), ως απαρχητή θερμικής διάσπασης το AIBN και ως διαλύτη το 1,4-διοξάνιο. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 70°C για 24 ώρες και περιγράφεται στο Σχήμα 4.1.



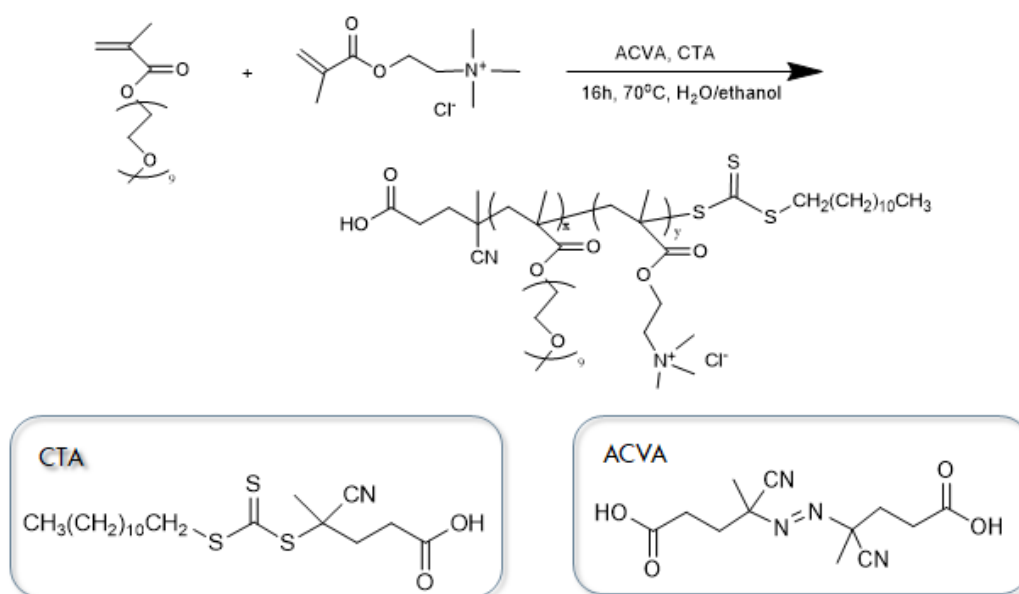
**Σχήμα 4.1: Συνθετική πορεία ομοπολυμερισμού POEGMA.**

Η σύνθεση του συμπολυμερούς POEGMA-b-PMETAC έγινε με την τεχνική πολυμερισμού RAFT στους 70°C για 16 ώρες χρησιμοποιώντας το ομοπολυμερές POEGMA ως μάκρο-CTA, ACVA ως απαρχητή και διαλύτη απιονισμένο νερό, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4.2. Το διάλυμα του πολυμερούς ήταν ομογενές καθ' όλη τη διάρκεια του πολυμερισμού.



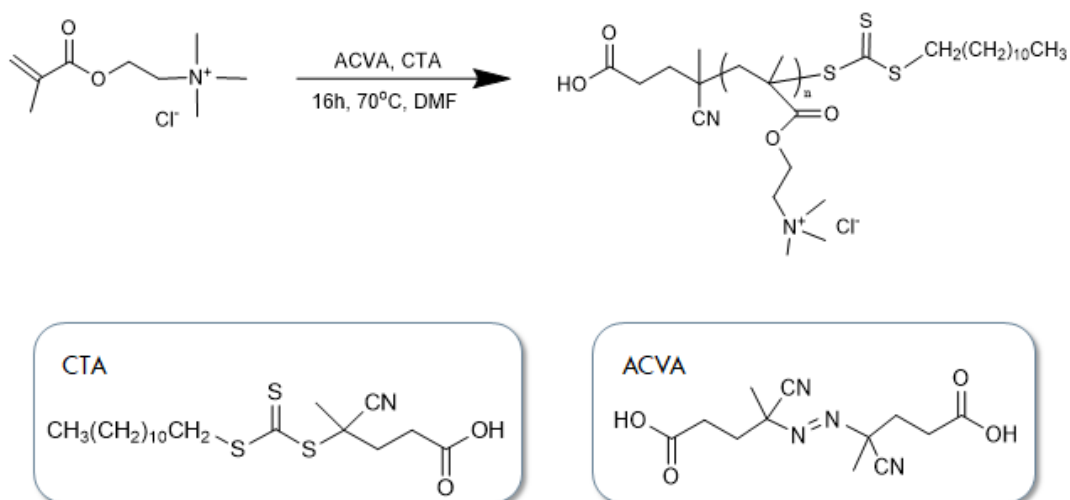
**Σχήμα 4.2: Συνθετική πορεία παρασκευής του συσταδικού συμπολυμερούς POEGMA-b-PMETAC.**

Η σύνθεση των συμπολυμερών P(OEGMA-co-METAC) έγινε με την τεχνική πολυμερισμού RAFT, χρησιμοποιώντας ως απαρχητή το ACVA, ως CTA το 4-κυανο-4-[(δωδεκυλοσουλφανυλοθειοκαρβονυλο)σουλφανυλο] πεντανοϊκό οξύ και ως διαλύτη μείγμα απιονισμένου νερού με αιθανόλη. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 70°C για 16 ώρες και περιγράφεται στο Σχήμα 4.3. Συντέθηκαν δύο στατιστικά συμπολυμερή P(OEGMA-co-METAC) διαφορετικών συστάσεων.



**Σχήμα 4.3: Συνθετική πορεία παρασκευής των στατιστικών συμπολυμερών P(OEGMA-co-METAC).**

Το ομοπολυμερές PMETAC συντέθηκε με την βοήθεια της τεχνικής πολυμερισμού RAFT, χρησιμοποιώντας ως CTA το 4-κυανο-4-[(δωδεκυλοσουλφανυλοθειοκαρβονυλο)σουλφανυλο] πεντανοϊκό οξύ, ως απαρχητή το ACVA και ως διαλύτη DMF. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 70°C για 16 ώρες και περιγράφεται στο Σχήμα 4.4.



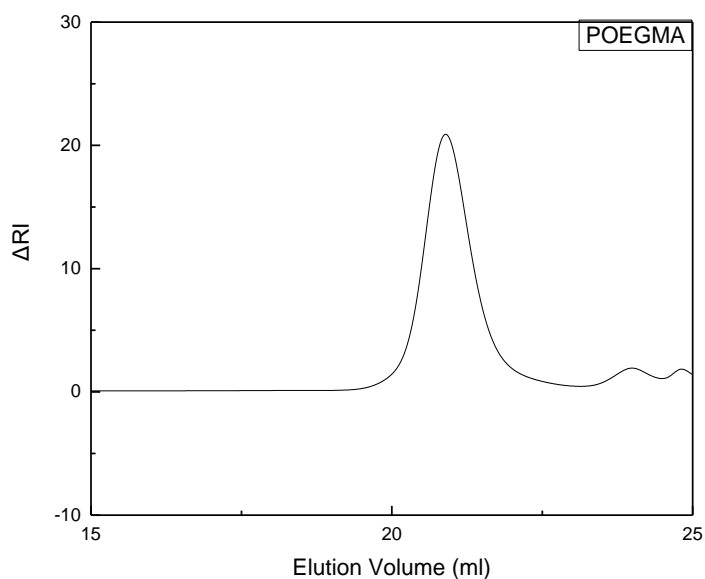
**Σχήμα 4.4: Συνθετική πορεία ομοπολυμερισμού PMETAC.**

Τα μοριακά χαρακτηριστικά του δισυσταδικού συμπολυμερούς POEGMA-b-PMETAC, των στατιστικών συμπολυμερών P(OEGMA-co-METAC) καθώς και του ομοπολυμερούς PMETAC περιγράφονται στον Πίνακα 4.1.

#### 4.2 Μοριακός χαρακτηρισμός ομοπολυμερών και συμπολυμερών

Τα μοριακά βάρη και οι κατανομές μοριακών βαρών του δισυσταδικού και των στατιστικών συμπολυμερών αλλά και ομοπολυμερών που συντέθηκαν προσδιορίστηκαν με χρωματογραφία αποκλεισμού μοριακών βαρών (SEC) και παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.

Ο χαρακτηρισμός του ομοπολυμερούς POEGMA επιτεύχθηκε μέσω χρωματογραφίας αποκλεισμού μοριακών βαρών (SEC) με κινητή φάση τετραϋδροφουρανίου. Στο παρακάτω Σχήμα 4.5 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα του ομοπολυμερούς POEGMA, μέσω του οποίου διαπιστώθηκε ο επιτυχής πολυμερισμός του με χρήση της τεχνικής RAFT. Η κατανομή του μοριακού βάρους είναι μικρή και εντός του εύρους που επιβάλλει το θεωρητικό υπόβαθρο και η πρακτική εφαρμογή της τεχνικής πολυμερισμού RAFT.



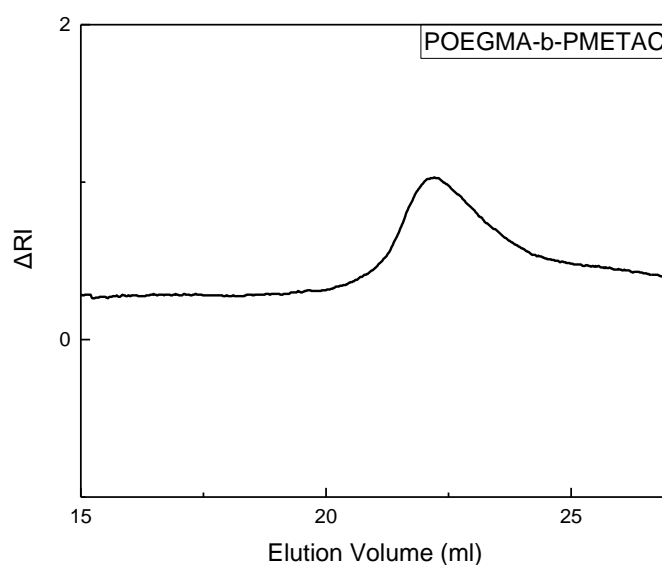
**Σχήμα 4.5: Χρωματογράφημα SEC ομοπολυμερούς POEGMA.**

Στο Σχήμα 4.6 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα του συμπολυμερούς POEGMA-b-PMETAC που συντέθηκε από το παραπάνω ομοπολυμερές. Στη συνέχεια παρουσιάζεται ενδεικτικά ένα χαρακτηριστικό χρωματογράφημα του συμπολυμερούς P(OEGMA-co-METAC) και το χρωματογράφημα του ομοπολυμερούς PMETAC.

Η υψηλή πυκνότητα επιφανειακού φορτίου του PMETAC κάνει τα πολυμερή εξαιρετικά υδρόφιλα και συνεπώς αδιάλυτα σε χλωροφόρμιο ή τετραϋδροφουράνιο. Κατά συνέπεια ο χαρακτηρισμός του ομοπολυμερούς PMETAC και των συμπολυμερών POEGMA-b-PMETAC και P(OEGMA-co-METAC) επιτεύχθηκε μέσω χρωματογραφίας αποκλεισμού μοριακών βαρών (SEC) με κινητή φάση νερού. Ωστόσο η τεχνική αυτή θεωρείται επίσης ακατάλληλη για την ανάλυση πολυϊόντων όπως το PMETAC, καθώς ο χρόνος έκλουσης μπορεί να επηρεαστεί από ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, είτε ελκτικές είτε απωστικές, ειδικά με το πληρωτικό υλικό των στηλών και να ληφθούν λάθος συμπεράσματα για τα μοριακά βάρη και τις κατανομές μοριακών βαρών των πολυμερών. [64, 65]

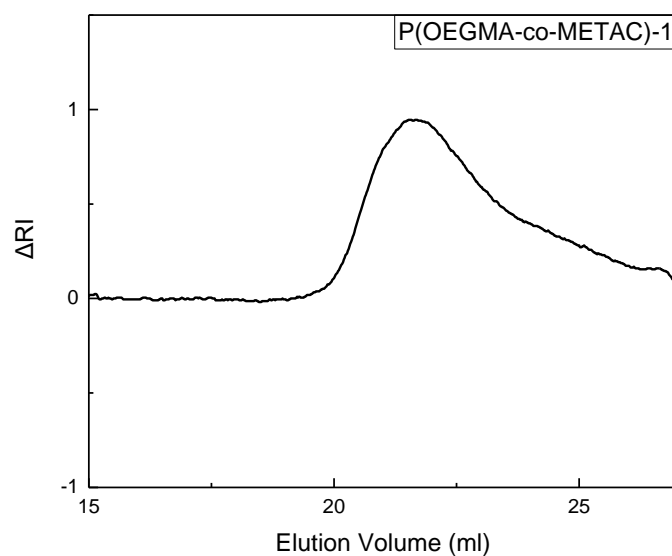
Σύμφωνα με τα παρακάτω χρωματογραφήματα, οι κατανομές μοριακών βαρών είναι αρκετά μεγάλες και οι τιμές τους είναι εκτός του εύρους που

επιβάλλει το θεωρητικό υπόβαθρο του πολυμερισμού RAFT. Συγκεκριμένα στην περίπτωση του συμπολυμερούς POEGMA-b-PMETAC, παρατηρούμε ότι το μοριακό βάρος που προκύπτει από το αντίστοιχο χρωματογράφημα έχει μικρότερη τιμή από το μοριακό βάρος της συστάδας του POEGMA από την οποία συντέθηκε, το οποίο προσδιορίστηκε με χρήση SEC με κινητή φάση τετραϋδροφουρανίου (Πίνακας 4.1), το οποίο είναι άτοπο. Συμπερασματικά, προκύπτει ότι τα μοριακά βάρη και οι κατανομές τους όπως προκύπτουν από τα παρακάτω χρωματογραφήματα, έχουν σημαντικό σφάλμα.

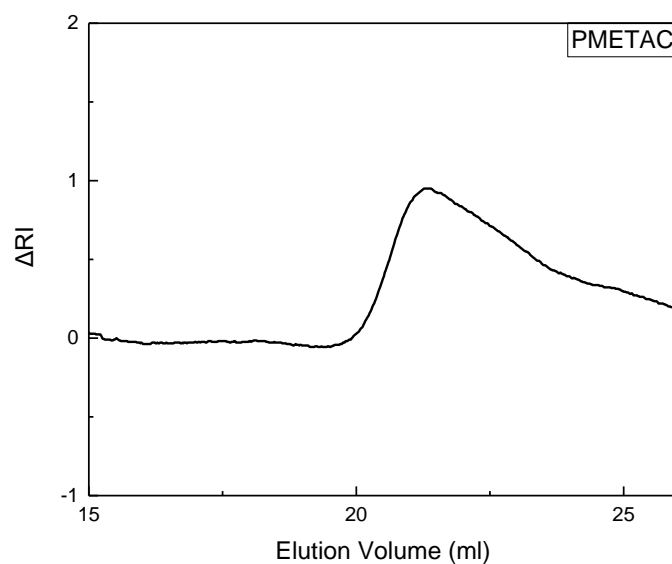


**Σχήμα 4.6: Χρωματογράφημα SEC συμπολυμερούς POEGMA-b-PMETAC.**





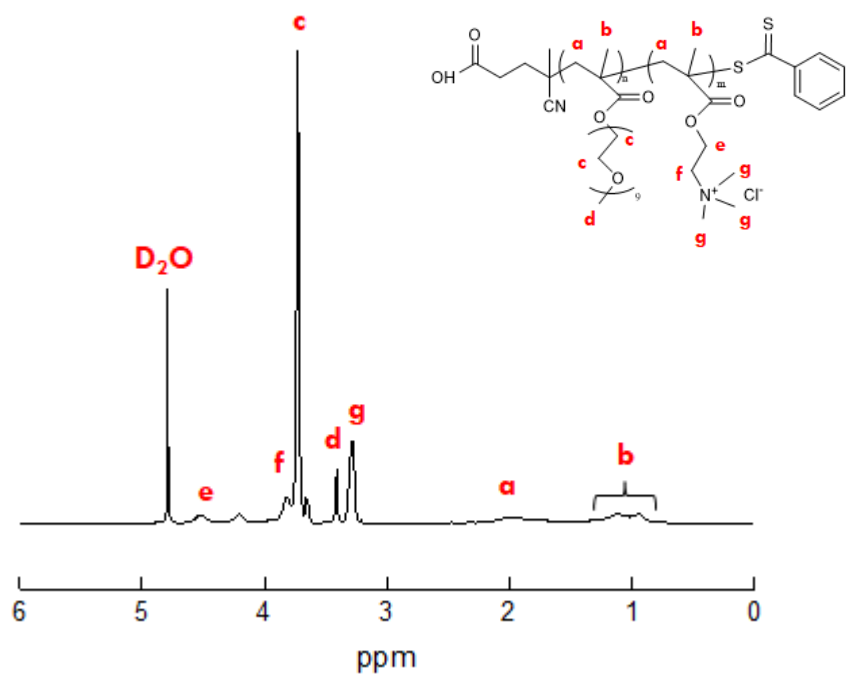
**Σχήμα 4.7: Χρωματογράφημα SEC συμπολυμερούς P(OEGMA-co-METAC)-1.**



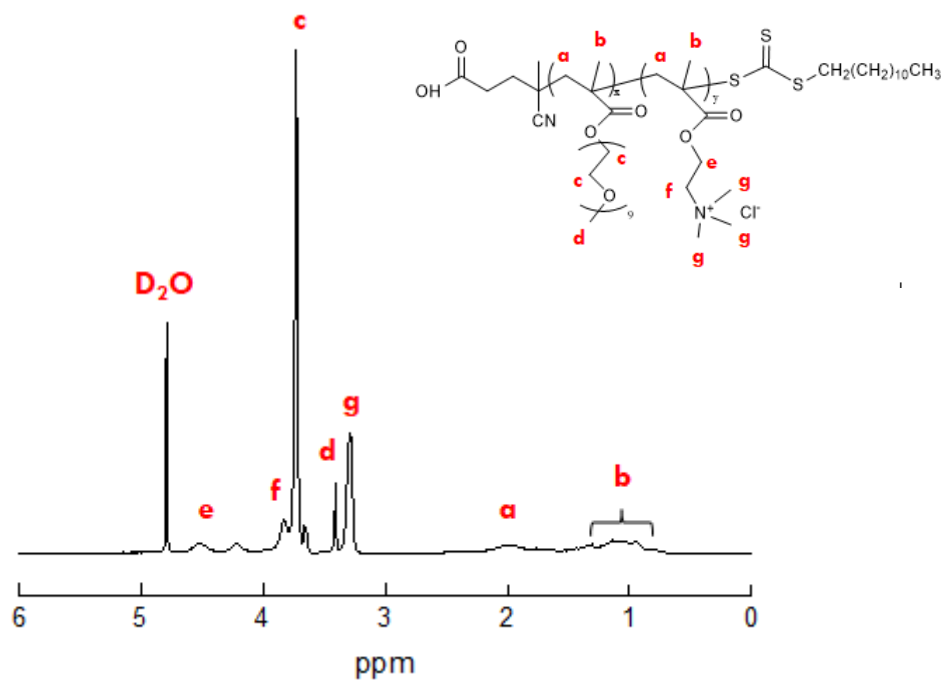
**Σχήμα 4.8: Χρωματογράφημα SEC ομοπολυμερούς PMETAC.**

Η ταυτοποίηση της χημικής δομής και ο προσδιορισμός της σύστασης των συντεθέντων πολυμερών επιτεύχθηκαν με φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ . Παρουσιάζονται τα φάσματα των πολυμερών POEGMA-*b*-PMETAC (Σχήμα

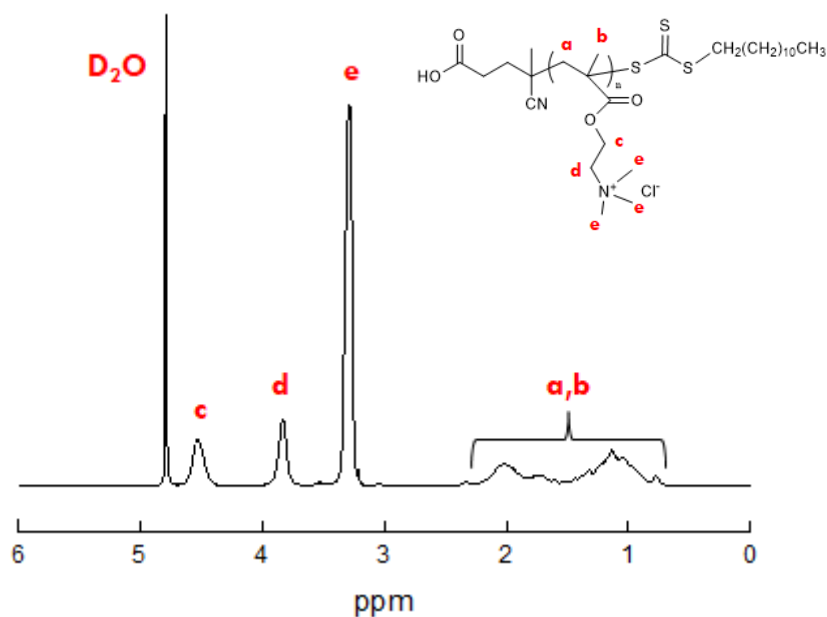
4.9), P(OEGMA-co-METAC)-1 (Σχήμα 4.10) και PMETAC (Σχήμα 4.11) μαζί με την αποτίμηση κορυφών σε σχέση με τις δομικές μονάδες των πολυμερών.



Σχήμα 4.9: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του συμπολυμερούς POEGMA-b-PMETAC σε  $\text{D}_2\text{O}$ .



Σχήμα 4.10: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του συμπολυμερούς P(OEGMA-co-METAC)-1 σε  $\text{D}_2\text{O}$ .



**Σχήμα 4.11: Φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  του ομοπολυμερούς PMETAC σε  $\text{D}_2\text{O}$ .**

Οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές της κάθε συστάδας χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό τον υπολογισμό της σύστασης. Πιο συγκεκριμένα επιλέχθηκαν τα  $-\text{CH}_3$  υδρογόνα των τριών μεθυλιών (g κορυφή σχήματος) που αντιστοιχούν στη συστάδα του PMETAC και εμφανίζονται στα 3.29 ppm [66] και τα  $-\text{CH}_2$  υδρογόνα (c κορυφή σχήματος) που αντιστοιχούν στη συστάδα του POEGMA και εμφανίζονται στα 3.64 ppm [67]. Στην συνέχεια έγινε διαίρεση του εμβαδού της κάθε κορυφής με τον αριθμό των υδρογόνων που αντιστοιχούν σε αυτή και πολλαπλασιασμός με το μοριακό βάρος της αντίστοιχης μονομερικής μονάδας. Τέλος η κατά βάρος σύσταση κάθε συστάδας προέκυψε διαιρώντας τον παραπάνω αριθμό με το άθροισμα αυτών και για τις δύο κορυφές. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της σύστασης των στατιστικών συμπολυμερών. Οι πειραματικά προσδιορισμένες συστάσεις για τα πολυμερή που συντέθηκαν συμφωνούν ικανοποιητικά με τις στοιχειομετρικά υπολογιζόμενες και βρίσκονται καταγεγραμμένες στο Πίνακα 4.1.

Συγκεκριμένα για το συμπολυμερές POEGMA-b-PMETAC, έχοντας υπολογίσει τη σύσταση και γνωρίζοντας το μοριακό βάρος της συστάδας POEGMA, το οποίο προσδιορίστηκε με χρήση SEC σε THF, μπορούμε να

υπολογίσουμε το μοριακό βάρος της συστάδας του PMETAC αλλά και το συνολικό μοριακό βάρος. Παρατηρούμε πως υπάρχει πολύ μεγάλη διαφορά ανάμεσα στο προσδιοριζόμενο μέσω SEC μοριακό βάρος του POEGMA-b-PMETAC και στο υπολογιζόμενο εμμέσως μέσω φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H-NMR (Πίνακας 4.1). Η τιμή του μοριακού βάρους που προσδιορίστηκε μέσω φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H-NMR βρίσκεται αρκετά κοντά στη θεωρητική. Επιπλέον, διαιρώντας το μοριακό βάρος κάθε συστάδας του συμπολυμερούς με το μοριακό βάρος της αντίστοιχης μονομερικής μονάδας προκύπτει ότι η συστάδα του PMETAC αποτελείται από 22 δομικές μονάδες, ενώ η συστάδα του POEGMA από 19.

**Πίνακας 4.1: Μοριακά χαρακτηριστικά ομοπολυμερών POEGMA και PMETAC και συμπολυμερών POEGMA-b-PMETAC και P(OEGMA-co-METAC).**

Όνομα δείγματος	$M_w$	$M_w$	$M_w$	Σύσταση %wt POEGMA	Σύσταση %wt PMETAC
	( $\times 10^4$ ) (g/mol)	$M_w/M_n$ (SEC)	( $\times 10^4$ ) (g/mol)		
				( <sup>1</sup> H-NMR)	( <sup>1</sup> H-NMR)
POEGMA	0.96	1,14	-	-	-
POEGMA-b- PMETAC	0.57	2,57	0.46	67,5	32,5
P(OEGMA-co- METAC)-1	1.17	2,86	-	61,5	38,5
P(OEGMA-co- METAC)-2	0.56	2,72	-	76,5	23,5
PMETAC	1.23	2,42	-	-	-

### 4.3 Μελέτη αυτοοργάνωσης ομοπολυμερούς και συμπολυμερών σε υδατικά διαλύματα

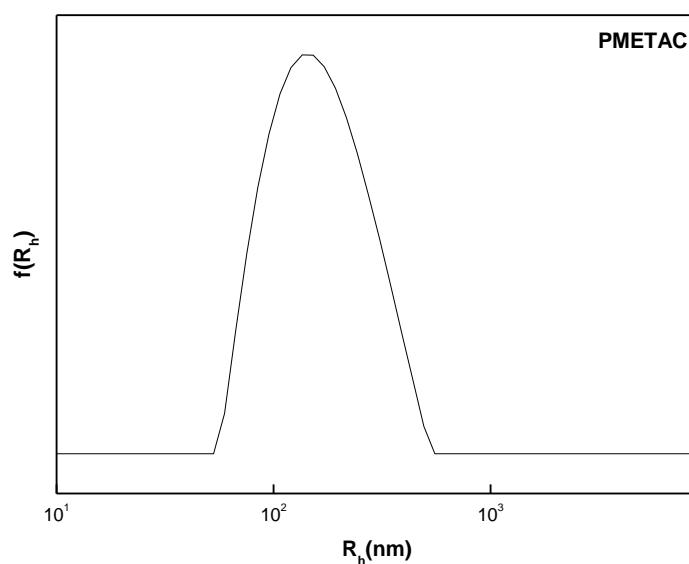
Η αυτοοργάνωση πολυμερών σε υδατικά μέσα πραγματοποιήθηκε με την απευθείας διάλυση των πολυμερών σε υδατικό μέσο NaCl 0,01M. Η προσθήκη ηλεκτρολυτών χαμηλού μοριακού βάρους είναι απαραίτητη ώστε να κατασταλούν οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων που επιδρούν στη διαμόρφωση των μακρομορίων.[68] Τα διαλύματα των πολυμερών μετρήθηκαν την επόμενη μέρα από την παρασκευή τους με σκοπό την επίτευξη ισορροπίας. Στην περίπτωση του ομοπολυμερούς PMETAC και των συμπολυμερών P(OEGMA-co-METAC) ήταν απαραίτητη η υποβοήθηση της διάλυσης με θέρμανση των δειγμάτων στους 60°C για 20 λεπτά. Το γεγονός αυτό μπορεί να υποδηλώνει την ύπαρξη πολικών αλληλεπιδράσεων στη στερεά κατάσταση μεταξύ των μονομερικών στοιχείων.

Οι ιδιότητες των υδατικών διαλυμάτων των πολυμερών μελετήθηκαν μέσω δυναμικής και ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός. Οι μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός πραγματοποιήθηκαν υπό γωνία 90° σε διαλύματα συγκέντρωσης  $1.0 \times 10^{-3}$  g/mL και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη χρήση του αλγορίθμου CONTIN και τη μέθοδο των αθροισμάτων. Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζονται ενδεικτικά τα διαγράμματα δυναμικής σκέδασης φωτός του ομοπολυμερούς PMETAC και του συμπολυμερούς POEGMA-b-PMETAC.

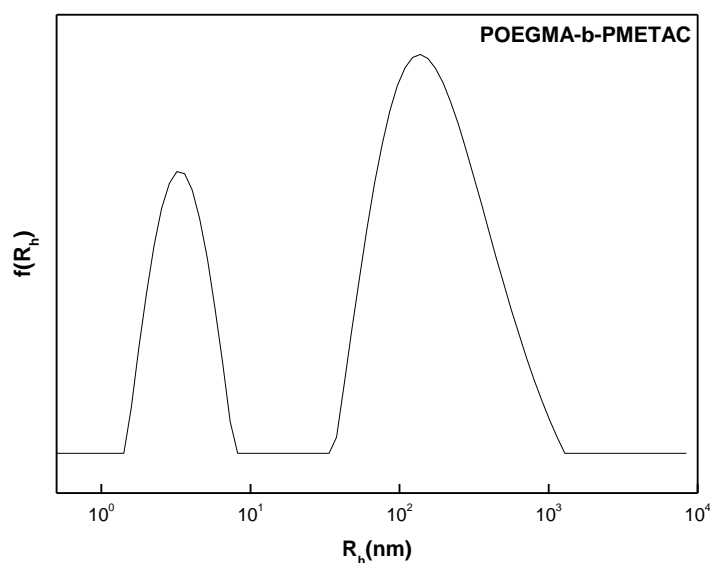
Τα αποτελέσματα της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (Intensity), της υδροδυναμικής ακτίνας ( $R_h$ ) και του δείκτη πολυδιασποράς (PDI) των σωματιδίων όπως μετρήθηκαν μέσω της δυναμικής σκέδασης φωτός αλλά και οι τιμές ζ-δυναμικού που προσδιορίστηκαν μέσω της ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός για όλα τα πολυμερή παρουσιάζονται στο Πίνακα 4.2.

**Πίνακας 4.2: Αποτελέσματα από DLS και ELS για τα συσσωματώματα των πολυμερών.**

Όνομα δείγματος	Intensity (kHz)	$R_h$ (nm)	PDI	ζ-δυναμικό (mV)
P(OEGMA-co-METAC)-1	291,12	131,1	0,5	13,9
P(OEGMA-co-METAC)-2	302,08	130,5	0,398	14
POEGMA-b-PMETAC	28,61	170,6	0,591	6,9
PMETAC	141,73	158,9	0,332	15,1



**Σχήμα 4.12: Διάγραμμα κατανομής μεγεθών ομοπολυμερούς PMETAC.**



**Σχήμα 4.13: Διάγραμμα κατανομής μεγεθών συμπολυμερούς POEGMA-b-PMETAC.**

Στο Σχήμα 4.12 παρατηρούμε την ύπαρξη μίας κορυφής με σχετικά πλατιά κατανομή. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι όλες οι αλυσίδες του PMETAC σχηματίζουν συσσωματώματα τα οποία εμφανίζουν σχετική πολυδιασπορά στο μέγεθος. Αυτό μπορεί να σχετίζεται με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που επιφέρουν αυτοοργάνωση των πολυμερικών αλυσίδων στο διάλυμα ή σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις από την κύρια αλυσίδα του πολυμερούς.[30] Στο διάγραμμα κατανομής μεγεθών του δείγματος POEGMA-b-PMETAC παρατηρείται η ύπαρξη δύο πληθυσμών. Ο πρώτος λόγω του μικρού μεγέθους, αντιστοιχεί σε ελεύθερες πολυμερικές αλυσίδες ακτίνας 3 nm, ενώ ο δεύτερος πληθυσμός περιλαμβάνει συσσωματώματα με ευρεία κατανομή μεγεθών. Επιπλέον, παρατηρείται ότι η τιμή της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας είναι αρκετά μικρή, συνεπώς στο διάλυμα υπάρχει μεγάλος αριθμός ελεύθερων αλυσίδων, οι οποίες σκεδάζουν λιγότερο, και συσσωματώματα μικρής μάζας. Στην περίπτωση των στατιστικών συμπολυμερών, παρατηρούμε το σχηματισμό συσσωματωμάτων. Συγκεκριμένα στην περίπτωση του P(OEGMA-co-METAC)-1 τα συσσωματώματα εμφανίζουν μεγάλη πολυδιασπορά στο μέγεθος.

Μέσω της ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός (ELS) προσδιορίστηκε το ζ-δυναμικό. Για όλα τα διαλύματα πολυμερών η τιμή του είναι θετική λόγω των μόνιμα θετικά φορτισμένων ομάδων του METAC.

Το ομοπολυμερές PMETAC ήταν αδιάλυτο σε υδατικό μέσο NaCl 0.01M σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και για την διαλυτοποίηση ήταν απαραίτητη η θέρμανση του δείγματος. Μπορούμε συνεπώς να υποθέσουμε την ύπαρξη μίας ανώτερης κρίσιμης θερμοκρασίας διαλύματος (Upper Critical Solution Temperature, UCST), πάνω από την οποία το πολυμερές γίνεται διαλυτό.

Στην περίπτωση του συσταδικού συμπολυμερούς POEGMA-b-PMETAC η αυτοοργάνωση σε υδατικό μέσο πραγματοποιήθηκε με την απευθείας διάλυσή του σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με το παρακάτω σενάριο συμπεριφοράς: σε χαμηλές θερμοκρασίες όπου η συστάδα του PMETAC είναι αδιάλυτη, η υδατοδιαλυτή συστάδα του POEGMA διατηρεί το συμπολυμερές διαλυτό στο νερό, αποτρέποντας το σχηματισμό μεγάλων συσσωματωμάτων. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός έρχονται σε συμφωνία με την παραπάνω υπόθεση. Το συσταδικό συμπολυμερές έχει πολύ μικρότερη τιμή ζ-δυναμικού από τα υπόλοιπα πολυμερή και άρα μπορούμε να συμπεράνουμε πως η ουδέτερη συστάδα του POEGMA εκτίθεται κυρίως στον διαλύτη παρέχοντας καλύτερη διαλυτότητα.

Αντίθετα, τα συμπολυμερή P(OEGMA-co-METAC) χαρακτηρίζονται από την τυχαία διάταξη των μονομερικών ομάδων τους, η οποία καθιστά πιο δύσκολη την εκδήλωση έντονα υδρόφοβων ή υδρόφιλων χαρακτηριστικών καθώς δεν υπάρχουν ομοιογενείς ενιαίες πολυμερικές συστάδες που να συμπεριφέρονται με τον ίδιο τρόπο. Επομένως στην περίπτωση των συμπολυμερών P(OEGMA-co-METAC) ήταν απαραίτητη η υποβοήθηση της διάλυσης με θέρμανση των δειγμάτων. Είναι εμφανές πως η αρχιτεκτονική των συμπολυμερών παίζει καθοριστικό ρόλο στην αυτοοργάνωσή τους σε υδατικά διαλύματα.



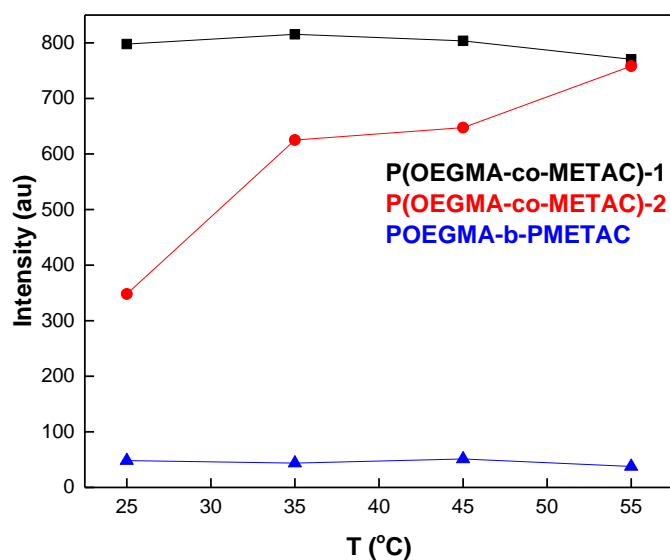
## 4.4 Μελέτη επίδρασης φυσικοχημικών παραμέτρων στα διαλύματα πολυμερών

### 4.4.1 Μελέτη επίδρασης της θερμοκρασίας

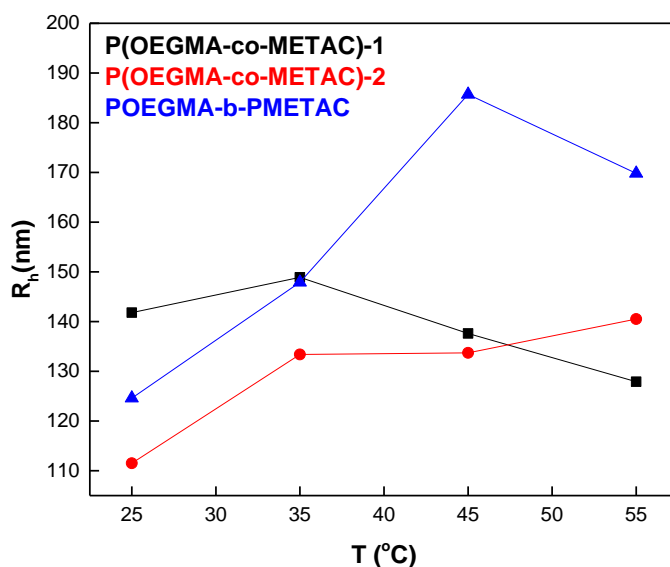
Τα συμπολυμερή που παρασκευάστηκαν μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να αυτοοργανώνονται σε υδατικά διαλύματα αποκρινόμενα σε αλλαγές της θερμοκρασίας. Για τον προσδιορισμό της φαινόμενης υδροδυναμικής ακτίνας ( $R_h$ ) και του δείκτη πολυδιασποράς (PDI) των πολυμερικών συστημάτων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν υπό γωνία  $90^\circ$ , σε διαλύματα συγκέντρωσης  $1 \times 10^{-3}$  g/ml και σε εύρος θερμοκρασιών  $25^\circ\text{C}$ - $55^\circ\text{C}$ .

Το PMETAC είναι ένας αμφίφιλος κατιοντικός πολυηλεκτρολύτης που περιέχει τόσο υδρόφοβες ομάδες (ομάδες μεθυλίου και σκελετός αλυσίδας (backbone chain)) όσο και υδρόφιλες θετικά φορτισμένες ομάδες τεταρτοταγούς αμίνης σε κάθε δομική μονάδα. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η συστάδα του PEOGMA είναι υδρόφιλη, χωρίς να αποκρίνεται σε θερμοκρασιακές αλλαγές, ωστόσο συμβάλλει στην μορφολογία και την καλύτερη αυτοοργάνωση των συμπολυμερών στο νερό προσδίδοντας σταθερότητα και επιπλέον είναι βιοσυμβατή, χαρακτηριστικό απαραίτητο για βιολογικές εφαρμογές.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα διαγράμματα εξάρτησης της έντασης σκεδάσεως ( $I$ ) (Σχήμα 4.14), η οποία αποτελεί μέτρο της μεταβολής της μάζας των σωματιδίων, και της υδροδυναμικής ακτίνας ( $R_h$ ) (Σχήμα 4.15) για εύρος θερμοκρασιών  $25^\circ\text{C}$ - $55^\circ\text{C}$  για τα συμπολυμερή.



**Σχήμα 4.14: Διάγραμμα εξάρτησης της έντασης σκέδασης I συναρτήσει της θερμοκρασίας για τα διαλύματα των συμπολυμερών.**



**Σχήμα 4.15: Διάγραμμα εξάρτησης της υδροδυναμικής ακτίνας  $R_h$  συναρτήσει της θερμοκρασίας για τα διαλύματα των συμπολυμερών.**

Στην περίπτωση του συμπολυμερούς POEGMA-b-PMETAC, με την αύξηση της θερμοκρασίας η υδροδυναμική ακτίνα παρουσιάζει μια μικρή αύξηση ενώ η ένταση σκέδασης του διαλύματος μειώνεται ελάχιστα, δηλώνοντας μία μικρή

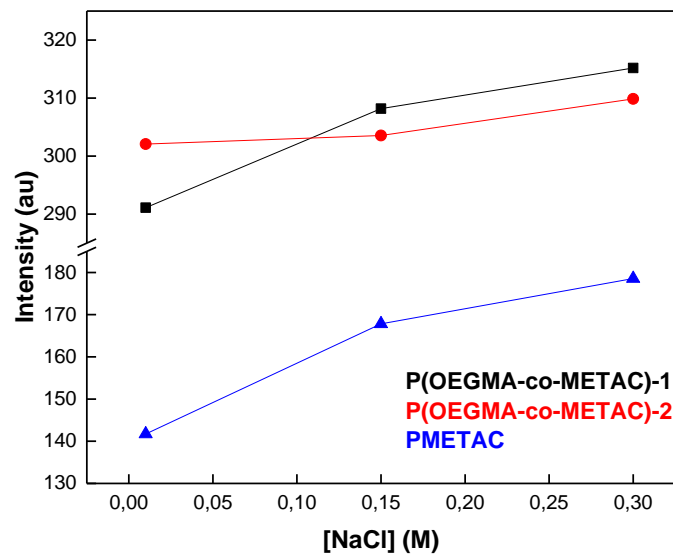
διόγκωση των συσσωματωμάτων καθώς εισέρχεται διαλύτης στο εσωτερικό τους (swelling). Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με την υπόθεση που διατυπώθηκε στο προηγούμενο υποκεφάλαιο. Με την αύξηση της θερμοκρασίας η συστάδα του PMETAC γίνεται υδατοδιαλυτή και τα συσσωματώματα του συμπολυμερούς δομικά πιο χαλαρά.

Αντίστοιχα, στην περίπτωση του συμπολυμερούς P(OEGMA-co-METAC)-1, παρατηρούμε μικρές μειώσεις στις τιμές της έντασης και της ακτίνας, οι οποίες εκφράζουν μία τάση αποσυσσωμάτωσης του συστήματος σε υψηλές θερμοκρασίες. Ωστόσο, στο διάλυμα του συμπολυμερούς P(OEGMA-co-METAC)-2 παρατηρείται αύξηση στην ένταση σκεδάσεως και άρα στη μάζα των δομών και μικρή αύξηση στην τιμή της υδροδυναμικής ακτίνας. Συνεπώς η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί μία τάση συσσωμάτωσης των πολυμερικών αλυσίδων, η οποία πιθανώς να οφείλεται στη μεγαλύτερη περιεκτικότητα του συγκεκριμένου συμπολυμερούς σε OEGMA.

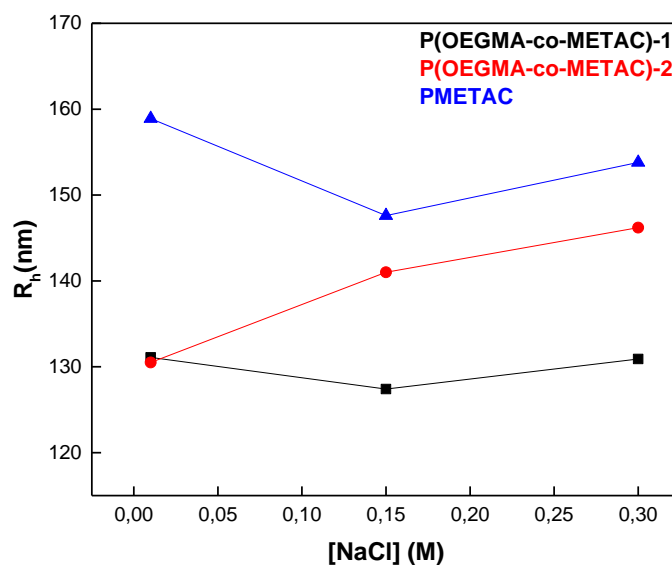
Συμπερασματικά, οι μεταβολές που σημειώνονται από την αύξηση της θερμοκρασίας αποδεικνύουν πως η συμπεριφορά των πολυμερών εξαρτάται έντονα από την σύστασή τους και την αρχιτεκτονική τους.

#### **4.4.2 Μελέτη επίδρασης της ιοντικής ισχύος**

Η μελέτη της ιοντικής ισχύος στα υδατικά διαλύματα των συμπολυμερών P(OEGMA-co-METAC) και POEGMA-b-PMETAC και του ομοπολυμερούς PMETAC πραγματοποιήθηκε με προσθήκες διαλύματος NaCl 1M. Συνολικά επετεύχθησαν οι συγκεντρώσεις 0.01M, 0.15M και 0.3M NaCl στα δείγματα και μέσω της δυναμικής σκέδασης φωτός μετρήθηκαν οι μεταβολές της έντασης και της ακτίνας  $R_h$  με την αύξηση της αλατότητας του διαλύματος. Οι μετρήσεις έγιναν σε γωνία  $90^\circ$ , θερμοκρασία  $25^\circ\text{C}$  και συγκέντρωση διαλύματος  $1 \times 10^{-3}$  g/ml. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στα Σχήματα 4.16 και 4.17 .



**Σχήμα 4.16:** Διάγραμμα εξάρτησης της έντασης σκεδάσεως I συναρτήσει της ιοντικής ισχύος για τα διαλύματα των συμπολυμερών.



**Σχήμα 4.17:** Διάγραμμα εξάρτησης της υδροδυναμικής ακτίνας  $R_h$  συναρτήσει της ιοντικής ισχύος για τα διαλύματα των συμπολυμερών.

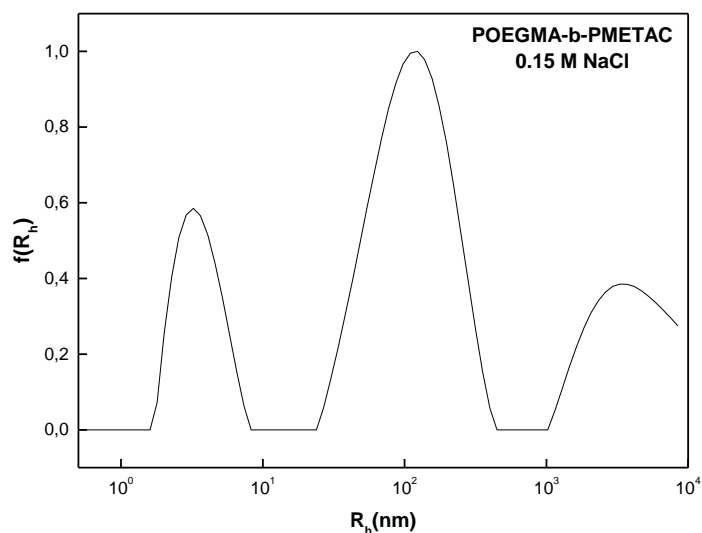
Στις μετρήσεις του διαλύματος του ομοπολυμερούς PMETAC παρατηρούμε μία αύξηση στην ένταση σκεδάσεως και άρα στη μάζα των δομών, ενώ οι τιμές της υδροδυναμικής ακτίνας τείνουν να μένουν σταθερές με την αύξηση

της ιοντικής ισχύος. Συνεπώς μπορούμε να υποθέσουμε ότι προκαλείται μία τάση συσσωμάτωσης με ταυτόχρονη συστολή των εκτεταμένων αλυσίδων του PMETAC. Το PMETAC είναι ένας ισχυρός κατιοντικός πολυηλεκτρολύτης, με αποτέλεσμα οι φορτισμένες αλυσίδες του να υιοθετούν περισσότερο εκτεταμένες διαμορφώσεις, συγκριτικά με ουδέτερες πολυμερικές αλυσίδες, λόγω των ηλεκτροστατικών απώσεων μεταξύ των φορτισμένων τμημάτων της αλυσίδας. Με την αύξηση της ιοντικής ισχύς του διαλύματος μέσω της προσθήκης άλατος, επέρχεται προάσπιση των φορτίων και εξασθένηση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων του συστήματος με αποτέλεσμα οι αλυσίδες να μεταβαίνουν σε λιγότερο εκτεταμένες διαμορφώσεις.

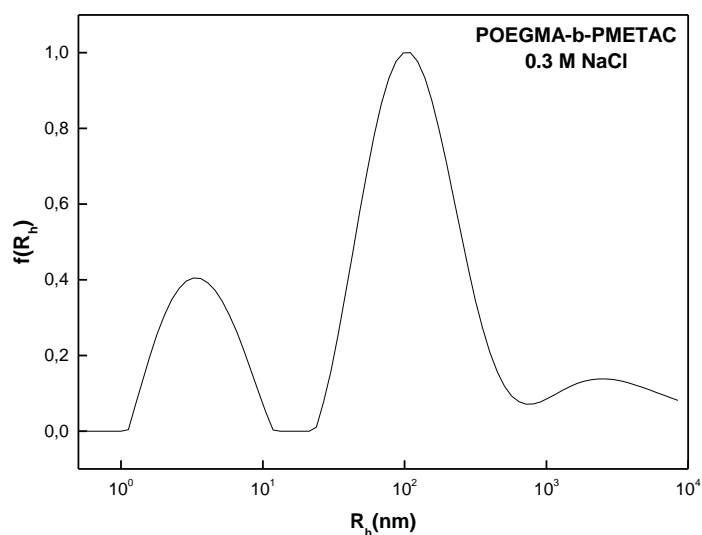
Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα, το διάλυμα του πολυμερούς P(OEGMA-co-METAC)-1 δεν εμφάνισε ισχυρή εξάρτηση από την ιοντική ισχύ. Στην περίπτωση του συμπολυμερούς P(OEGMA-co-METAC)-2 σημειώθηκαν μικρές μεταβολές αύξησης ως προς την ακτίνα  $R_h$  και την ένταση σκέδασης με την αύξηση της ιοντικής ισχύος. Παρατηρείται μία τάση αύξησης του μεγέθους των συσσωματωμάτων, η οποία πιθανώς να οφείλεται στην μικρή περιεκτικότητα του συμπολυμερούς σε METAC. Η μεταβολή της ιοντικής ισχύος μπορεί να επιφέρει μείωση της διαλυτότητας ενός πολυμερούς σε υδατικό διάλυμα (salting out). Οι αλληλεπιδράσεις πολυμερούς-πολυμερούς υπερτερούν των αλληλεπιδράσεων πολυμερούς-νερού και σχηματίζονται συσσωματώματα.

Για να έχουμε μία πιο ολοκληρωμένη εικόνα για τις δομές στις οποίες αναφερόμαστε για το συμπολυμερές POEGMA-b-PMETAC παρατίθενται τα διαγράμματα δυναμικής σκέδασης φωτός (Σχήματα 4.18 και 4.19). Με αύξηση της ιοντικής ισχύος παρατηρείται αύξηση στην ένταση σκεδάσεως. Σε σύγκριση με το διάγραμμα κατανομής μεγεθών του συμπολυμερούς σε διάλυμα NaCl 0.01M (Σχήμα 4.13), ο πληθυσμός των ελεύθερων πολυμερικών αλυσίδων παραμένει σταθερός, η υδροδυναμική ακτίνα των συσσωματωμάτων του δεύτερου πληθυσμού τείνει να μειωθεί, ενώ παράλληλα παρατηρείται ο σχηματισμός ενός τρίτου πληθυσμού μεγάλης υδροδυναμικής ακτίνας ( $R_h > 10^3 \text{nm}$ ). Η υψηλότερη συγκέντρωση άλατος έχει ως αποτέλεσμα τον υψηλότερο βαθμό συσσωμάτωσης των πολυμερικών αλυσίδων λόγω της προάσπισης των φορτίων.

Συνοψίζοντας, σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, τα συσσωματώματα των συμπολυμερών ανταποκρίνονται σε μεταβολές της ιοντικής ισχύος σε υδατικά διαλύματα, ωστόσο σημαντικό ρόλο παίζει η περιεκτικότητα του πολυμερούς σε METAC και η αρχιτεκτονική του.



**Σχήμα 4.18: Διάγραμμα κατανομής μεγεθών δείγματος POEGMA-b-PMETAC σε NaCl(aq) 0.15M.**



**Σχήμα 4.19: Διάγραμμα κατανομής μεγεθών δείγματος POEGMA-b-PMETAC σε NaCl(aq) 0.3M.**

Τέλος έγιναν μετρήσεις φασματοσκοπίας φθορισμού των δειγμάτων με τη χρήση πυρενίου ως ιχνηθέτη προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω η εξάρτηση των ιδιοτήτων των διαλυμάτων των πολυμερών από τη μεταβολή της ιοντικής ισχύος. Το πυρένιο αποτελεί υδρόφοβη ένωση με μικρή διαλυτότητα στο νερό, η οποία μπορεί όμως να αυξηθεί σημαντικά σε λιγότερο πολικό περιβάλλον, αφού ως υδρόφοβη ουσία μπορεί να εισχωρήσει στο εσωτερικό των υδρόφοβων περιοχών των συσσωματωμάτων. Ο λόγος των σχετικών εντάσεων της πρώτης και τρίτης κορυφής ( $I_1/I_3$ ) που εμφανίζονται στο φάσμα του πυρενίου είναι πολύ ευαίσθητος στις μεταβολές πολικότητας του διαλύτη. Σε πολύ πολικό για τον ιχνηθέτη μικροπεριβάλλον ο λόγος  $I_1/I_3$  αντιστοιχεί σε τιμές 1.7-1.9 οι οποίες μειώνονται στο 1.0-1.2 σε ισχυρά υδρόφοβο μικροπεριβάλλον. [69, 70]

Στον Πίνακα 4.3 αναγράφονται οι τιμές των λόγων  $I_1/I_3$  σε διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος για τα διαλύματα των πολυμερών όπως υπολογίστηκαν με βάση τα φάσματα εκπομπής φθορισμού του πυρενίου.

Είναι εμφανές ότι οι τιμές των λόγων  $I_1/I_3$  για όλα τα δείγματα είναι υψηλές, καταδεικνύοντας την ύπαρξη πολύ πολικού περιβάλλοντος. Στα διαλύματα των συμπολυμερών P(OEGMA-co-METAC) και του ομοπολυμερούς PMETAC ο λόγος  $I_1/I_3$  μειώνεται ελάχιστα με την αύξηση της ιοντικής ισχύος, υποδεικνύοντας μία μικρή αύξηση της υδροφοβικότητας. Το πυρένιο ίσως να εγκλωβίζεται στα μεγαλύτερα συσσωματώματα που σχηματίζονται κατά την αύξηση της ιοντικής ισχύος και η ένταση εκπομπής του μειώνεται.

**Πίνακας 4.3: Οι λόγοι  $I_1/I_3$  για τα δείγματα πολυμερών σε συγκεντρώσεις άλατος 0.01M, 0.15M και 0.3M.**

Όνομα δείγματος	[NaCl] (M)	$I_1/I_3$ (FS)
P(OEGMA-co-METAC)-1	0.01	1.8
	0.15	1.8
	0.3	1.7
P(OEGMA-co-METAC)-2	0.01	1.8
	0.15	1.7
	0.3	1.7
POEGMA-b-PMETAC	0.01	1.7
	0.15	1.7
	0.3	1.7
PMETAC	0.01	1.9
	0.15	1.8
	0.3	1.8

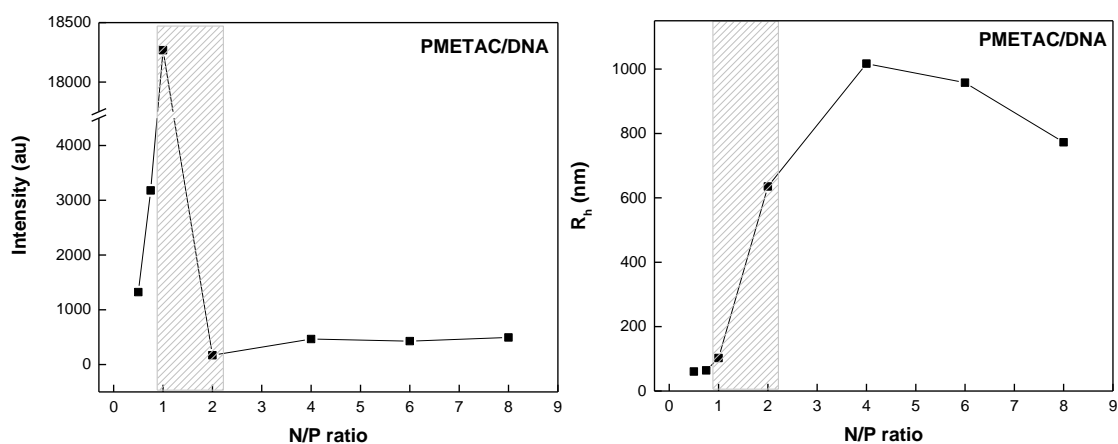
#### **4.5 Σύμπλεξη των PMETAC, POEGMA-b-PMETAC και P(OEGMA-co-METAC) με DNA**

Οι κατιοντικοί πολυηλεκτρολύτες παρουσιάζουν ενδιαφέρον ως μη ιογενείς φορείς για γονιδιακή θεραπεία. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν μελέτες για τη σύμπλεξη των PMETAC, POEGMA-b-PMETAC και P(OEGMA-co-METAC)-1 πολυμερών με μόρια DNA. Η σύμπλεξη των μορίων γίνεται μέσω της ηλεκτροστατικής σύζευξης των θετικά φορτισμένων αμινομάδων των πολυμερών και των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του DNA.

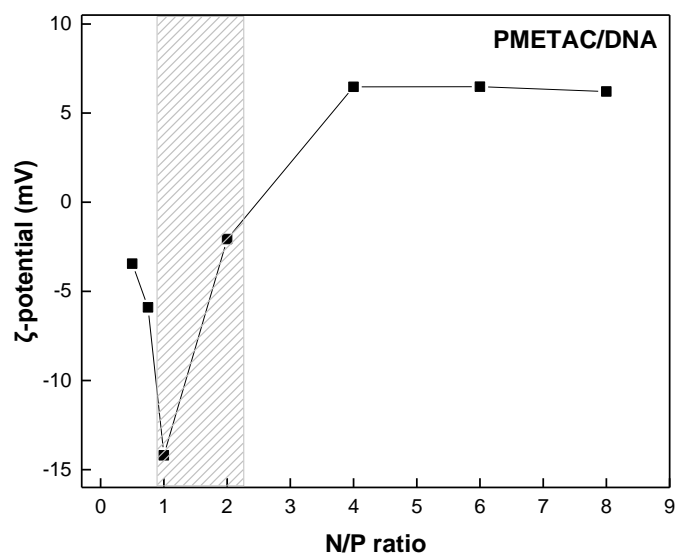


Στα συστήματα που μελετήθηκαν το PMETAC αποτελεί τον θετικά φορτισμένο πολυηλεκτρολύτη και το POEGMA προσφέρει βιοσυμβατότητα και σταθερότητα στο σύστημα προστατεύοντάς το από πιθανή καταβύθιση. Το PMETAC έχει μελετηθεί ως βιοδιαβρώσιμος φορέας φαρμάκων. Τα σύμπλοκα του ομοπολυμερούς δεν ήταν σταθερά, σε αντίθεση με τα σύμπλοκα συμπολυμερών του, τα οποία σχημάτισαν αδιάλυτα στο νερό σύμπλοκα με ανιονικά φάρμακα. [71]

Σχηματίστηκαν σύμπλοκα σε διαφορετικές αναλογίες N/P και εξετάστηκαν μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού, στατικής, δυναμικής και ηλεκτροφορετικής σκέδασης φωτός. Η συγκέντρωση του διαλύματος του πολυμερούς ήταν  $5 \times 10^{-4}$  g/ml και του DNA  $2 \times 10^{-4}$  g/ml, ενώ όλα τα διαλύματα έγιναν σε συγκέντρωση άλατος 0.01M NaCl. Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζεται η επίδραση της μεταβολής του λόγου N/P στην ένταση I, την ακτίνα  $R_h$  και το ζ-δυναμικό για τα σύμπλοκα των πολυμερών με DNA, αλλά και τα αποτελέσματα της τεχνικής SLS με βάση την αναλογία N/P.



**Σχήμα 4.20: Μεταβολή της έντασης I και της υδροδυναμικής ακτίνας  $R_h$  συναρτήσει του λόγου N/P για το σύστημα PMETAC/DNA.**



**Σχήμα 4.21: Μεταβολή του ζ-δυναμικού συναρτήσει του λόγου N/P για το σύστημα PMETAC/DNA.**

**Πίνακας 4.4: Αποτελέσματα τεχνικής SLS με βάση την αναλογία N/P για το σύστημα PMETAC/DNA.**

N/P ratio	$R_g/R_{h0}$ (SLS)
0.5	1.26
0.75	1.57
1	1.02
4	0.19
8	0.20

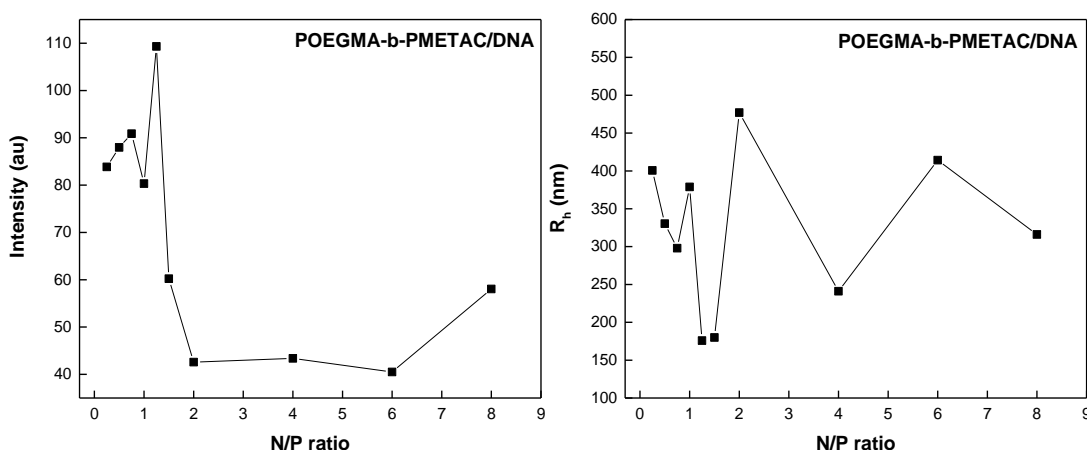
Στο Σχήμα 4.20 για το διάλυμα συμπλόκου PMETAC/DNA σε αναλογίες  $N/P=0.5$  και  $0.75$  παρατηρούνται μεγάλες τιμές έντασης σκεδάσεως σε συνδυασμό όμως με σχετικά χαμηλές τιμές υδροδυναμικής ακτίνας, γεγονός που σηματοδοτεί τον σχηματισμό δομών μεγάλης μάζας. Οι παρατηρήσεις αυτές έρχονται σε συμφωνία με τις αντίστοιχες τιμές του λόγου  $R_g/R_{h0}$  που προσδιορίστηκαν. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οι τιμές του λόγου  $R_g/R_{h0}$  για  $N/P=0.5$  όπως και για  $N/P=1$  αντιστοιχούν σε μορφολογίες κυστιδίων (Πίνακας 4.4). [72] Η ύπαρξη περισσότερων φωσφορικών ομάδων στο διάλυμα από ότι αμινομάδων σε αυτές τις αναλογίες έχει ως συνέπεια τα σύμπλοκα που σχηματίζονται να μην είναι καλά οργανωμένα. Ορισμένα τμήματα DNA δεν έχουν συμπλεχθεί εφόσον δεν υπάρχει ο απαιτούμενος αριθμός αμινομάδων στο διάλυμα.

Παρατηρείται ότι για τους λόγους φορτίων  $N/P$  1 και 2 εμφανίζονται φαινόμενα συσσωμάτωσης και καθίζησης (precipitation). Σε αναλογία  $N/P=1$  ο αριθμός των φορτίων των φωσφορικών ομάδων του DNA είναι ίσος με τον αριθμό των θετικών φορτίων του PMETAC που υπάρχουν στο διάλυμα με αποτέλεσμα την πλήρη εξουδετέρωση των φορτίων. Οι δομές που σχηματίζονται δεν είναι διαλυτές και προκαλούν έντονη θολότητα του δείγματος στην οποία και οφείλεται η υψηλή τιμή έντασης. Επίσης, σε αναλογία  $N/P=2$  τα σύμπλοκα δεν είναι σταθερά και εμφανίζεται καθίζηση.

Τέλος, όσο αυξάνεται ο λόγος  $N/P$  η υδροδυναμική ακτίνα μειώνεται, καθώς η αύξηση των θετικών φορτίων στο διάλυμα προκαλεί τον σχηματισμό πιο συμπαγών και σταθερών υπερδομών. Παράλληλα όμως, σε μεγάλες τιμές του λόγου  $N/P$  παρατηρούνται μικρότερες τιμές έντασης σκεδάσεως σε συνδυασμό όμως με σχετικά μεγάλες τιμές υδροδυναμικής ακτίνας, δηλώνοντας μία μικρή διόγκωση των συμπλόκων η οποία παρουσιάζεται με μικρές τιμές του λόγου  $R_g/R_{h0}$ . Οι χαμηλές τιμές του λόγου  $R_g/R_{h0}$  μπορούν να δικαιολογηθούν από το γεγονός πως η  $R_{h0}$  είναι “ευαίσθητη” σε ολόκληρη την αλυσίδα του πολυμερούς, ενώ η  $R_g$  είναι “πιο ευαίσθητη” στον πυρήνα της δομής.

Μέσω της τεχνικής ELS προσδιορίστηκε η τιμή του ζ-δυναμικού για όλες τις αναλογίες φορτίων  $N/P$ , όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.21. Σε χαμηλές

τιμές N/P τα σωματίδια είναι φορτισμένα αρνητικά λόγω της παρουσίας περισσότερων φωσφορικών ομάδων, ενώ σε μεγαλύτερες τιμές N/P το ζ-δυναμικό έχει θετικό φορτίο εφόσον υπερισχύουν οι θετικά φορτισμένες αμινομάδες. Συγκεκριμένα για την αναλογία N/P=1 παρατηρείται ιδιαίτερα χαμηλή τιμή ζ-δυναμικού, η οποία πιθανώς οφείλεται σε μόρια DNA που δεν συμπλέχθηκαν και στον σχηματισμό μεγάλων συσσωματωμάτων PMETAC.



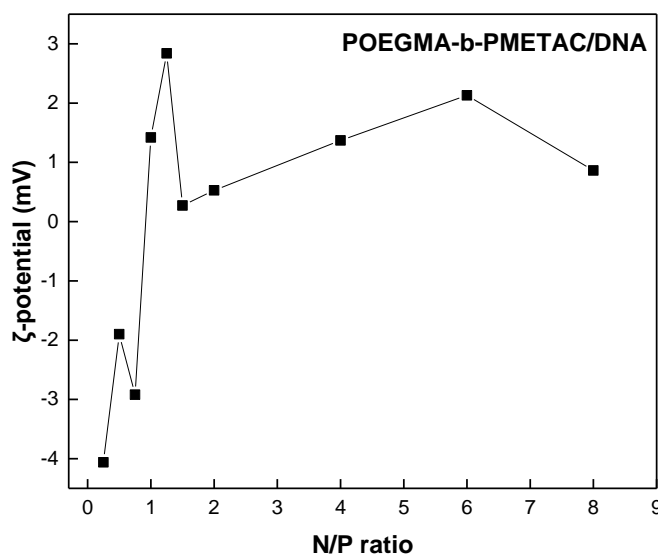
**Σχήμα 4.22: Μεταβολή της έντασης I και της υδροδυναμικής ακτίνας  $R_h$  συναρτήσει του λόγου N/P για το σύστημα POEGMA-b-PMETAC/DNA.**

Όπως φαίνεται στο σχήμα 4.22 η τιμή της υδροδυναμικής ακτίνας από τον λόγο N/P=0.25 έως N/P=0.75 μειώνεται ενώ η ένταση αυξάνεται διότι η αύξηση των θετικών φορτίων έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό πιο συμπαγών υπερδομών καθώς ο αριθμός των θετικών φορτίων που αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με τα αρνητικά είναι μεγαλύτερος. Επιπλέον ενώ η ένταση είναι αρχικά υψηλή, σε μεγάλους λόγους N/P μειώνεται λόγω σχηματισμού μικρότερων σε μάζα συμπλόκων. Σε υψηλές τιμές του λόγου N/P υπάρχουν περισσότερες αμινομάδες συνδεδεμένες ηλεκτροστατικά με φωσφορικές ομάδες του DNA συνεπώς αυξάνεται και το μέγεθος των συσσωματωμάτων.

Σε αρκετές περιπτώσεις δεν ήταν δυνατό να γίνουν μετρήσεις στατικής σκέδασης φωτός καθώς τα διαλύματα περιλάμβαναν δύο πληθυσμούς. Οι τιμές  $R_g/R_{h0}$  που προσκομίστηκαν κυμαίνονται από 0.10 έως 0.64 σε υψηλές τιμές του λόγου N/P, δηλώνοντας μία διόγκωση των συμπλόκων. Εξαιρεση

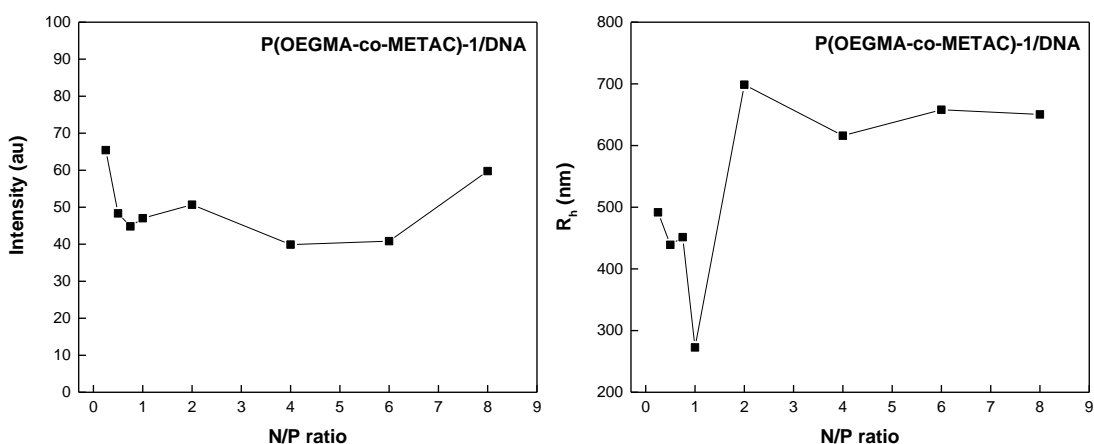
αποτελεί η τιμή του  $R_g/R_{h0} = 1.57$  για  $N/P=8$ , από τη οποία μπορούμε να συμπεράνουμε το σχηματισμό συμπλόκων μεγάλης μάζας.

Τα διαλύματα των συμπλόκων POEGMA-b-PMETAC /DNA δεν παρουσίασαν εμφανή καθίζηση, σε αντίθεση με εκείνα των συμπλόκων PMETAC/DNA. Γίνεται εμφανές πως η ουδέτερη και υδατοδιαλυτή συστάδα του POEGMA συνεισφέρει στη σταθερότητα και τη διαλυτότητα των συμπλόκων.

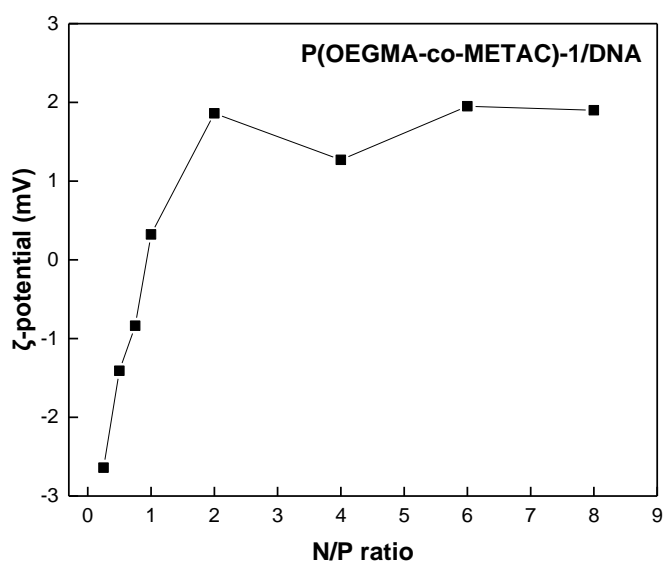


**Σχήμα 4.23: Μεταβολή του ζ-δυναμικού συναρτήσει του λόγου N/P για το σύστημα POEGMA-b-PMETAC/DNA.**

Στο Σχήμα 4.23 παρουσιάζονται οι τιμές του ζ-δυναμικού για όλες τις αναλογίες φορτίων N/P. Παρατηρείται ότι σε χαμηλές τιμές N/P τα σωματίδια είναι φορτισμένα αρνητικά λόγω της παρουσίας περισσότερων φωσφορικών ομάδων, ενώ αντίθετα σε μεγαλύτερες τιμές N/P είναι φορτισμένα ελαφρώς θετικά. Οι μικρές γενικότερα τιμές ζ-δυναμικού αποδίδονται στην ύπαρξη των συστάδων POEGMA που προασπίζουν τα φορτία στο σύστημα.



**Σχήμα 4.24: Μεταβολή της έντασης  $I$  και της υδροδυναμικής ακτίνας  $R_h$  συναρτήσει του λόγου  $N/P$  για το σύστημα P(OEGMA-co-METAC)-1/DNA.**



**Σχήμα 4.25: Μεταβολή του ζ-δυναμικού συναρτήσει του λόγου  $N/P$  για το σύστημα P(OEGMA-co-METAC)-1/DNA.**

Στα διαλύματα συμπλόκων P(OEGMA-co-METAC)-1/DNA παρατηρούμε πως η τιμή της υδροδυναμικής ακτίνας από τον λόγο  $N/P=0.25$  έως  $N/P=1$  μειώνεται καθώς σχηματίζονται πιο συμπαγή σύμπλοκα. Σε υψηλές τιμές του λόγου  $N/P$ , η ένταση παραμένει σχετικά σταθερή ενώ παρατηρούνται υψηλές τιμές υδροδυναμικής ακτίνας, το οποίο σηματοδοτεί τον σχηματισμό συμπλόκων μεγάλου μεγέθους. Οι τιμές των λόγων  $R_g/R_{h0}$  που

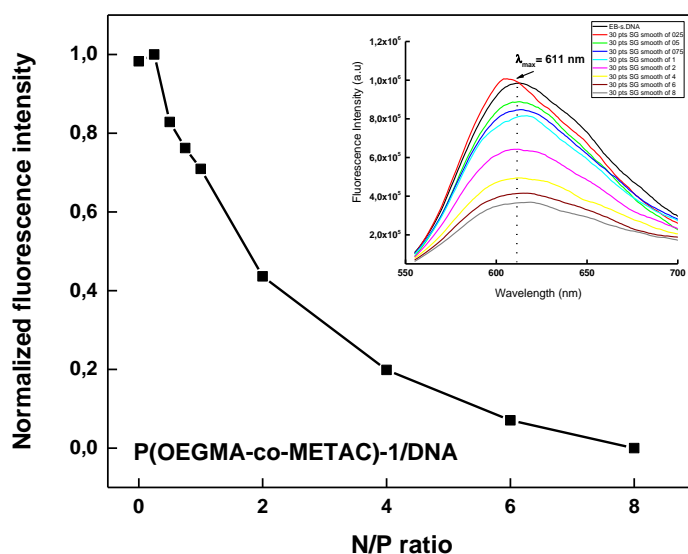
προσδιορίστηκαν από μετρήσεις στατικής σκέδασης φωτός είναι ιδιαίτερα χαμηλές, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τις χαμηλές τιμές έντασης που παρατηρήθηκαν και πιθανώς να οφείλεται στην ύπαρξη διογκωμένων συμπλόκων μικρής μάζας.

Τα διαλύματα των συμπλόκων P(OEGMA-co-METAC)-1/DNA δεν παρουσίασαν φαινόμενα καθίζησης. Καθοριστικό ρόλο φαίνεται να παίζει η περιεκτικότητα των συμπολυμερών σε OEGMA, το οποίο προσδίδει σταθερότητα στα σύμπλοκα, ακόμη και στην περίπτωση που οι μονομερικές του μονάδες είναι τυχαία διατεταγμένες στο συμπολυμερές.

Σύμφωνα με το Σχήμα 4.25 σε χαμηλές τιμές N/P τα σωματίδια είναι φορτισμένα ελαφρώς αρνητικά λόγω του μεγάλου αριθμού φωσφορικών ομάδων, ενώ όσο αυξάνεται ο λόγος N/P οι τιμές του ζ-δυναμικού αυξάνονται αισθητά χωρίς να λαμβάνουν μεγάλες τιμές λόγω της παρουσίας των υδατοδιαλυτών μη ιοντικών πλευρικών ομάδων OEGMA στα σύμπλοκα.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη απόσβεσης φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μία φθορίζουσα ένωση που αλληλεπιδρά με το DNA καθώς παρεμβάλλεται ανάμεσα στα ζεύγη βάσεων και ως αποτέλεσμα παρουσιάζει έντονο φθορισμό. Κατά τη σύμπλεξη του DNA με ένα κατιοντικό πολυμερές το παρεμβαλλόμενο βρωμιούχο αιθίδιο εκτοπίζεται από τη διπλή έλικα του DNA και συνεπώς το περιβάλλον του αλλάζει από υδρόφοβο (έλικα DNA) σε υδρόφιλο (υδατικό μέσο). Η ένταση φθορισμού μειώνεται, γεγονός που υποδηλώνει την ικανότητα του κατιοντικού πολυμερούς να σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με το DNA. [73]

Η τεχνική απόσβεσης φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου χρησιμοποιείται κατά κόρον στη μελέτη συστημάτων σύμπλεξης κατιοντικών πολυμερών με DNA, καθώς μέσω του φάσματος φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου καταγράφεται η ικανότητα σχηματισμού συμπλόκων μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Στο Σχήμα 4.26 παρουσιάζεται το διάγραμμα απόσβεσης φθορισμού και τα αντίστοιχα φάσματα για το σύμπλοκο EtBr/DNA υπό αλληλεπίδραση με το συμπολυμερές P(OEGMA-co-METAC)-1 σε διαφορετικούς λόγους N/P.



**Σχήμα 4.26: Διάγραμμα απόσβεσης φθορισμού και φάσματα που περιγράφουν την αλληλεπίδραση EtBr/DNA με το συμπολυμερές P(OEGMA-co-METAC)-1.**

Παρατηρούμε πως όσο αυξάνεται ο λόγος N/P η ένταση φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου μειώνεται, καθώς ο αριθμός των θετικά φορτισμένων αμινομάδων των πολυμερών που αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του DNA αυξάνεται. Με αυτόν τον τρόπο επιβεβαιώνεται η ικανότητα του συμπολυμερούς P(OEGMA-co-METAC)-1 να συμπλέκεται με μόρια DNA και να σχηματίζει υπερμοριακές δομές (σύμπλοκα). Πρέπει να σημειωθεί ότι οι μετρήσεις εκπομπής φθορισμού πραγματοποιούνται αμέσως μετά την παρασκευή των συμπλόκων και άρα οι δομές αυτές μπορεί να μην είναι δομές ισορροπίας.

#### **4.6 Μελέτη επίδρασης της ιοντικής ισχύος στα σύμπλοκα των πολυμερών με μόρια DNA**

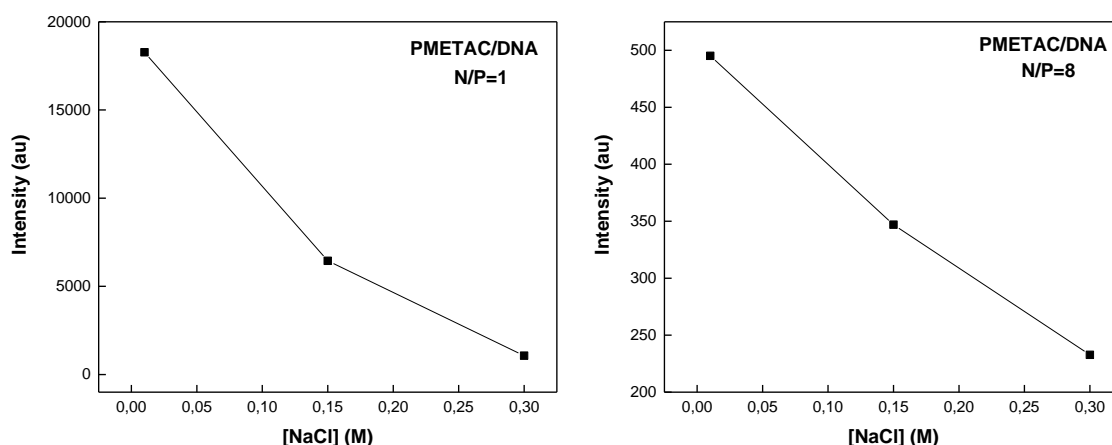
Τα σύμπλοκα των PMETAC, POEGMA-b-PMETAC και P(OEGMA-co-METAC)-1 πολυμερών με μόρια DNA με διαφορετικούς λόγους N/P μελετήθηκαν και ως προς την επίδραση που έχει η αύξηση της ιοντικής ισχύος στη συμπεριφορά τους σε διάλυμα. Ο Khutoryanskiy και οι συνεργάτες του [74] μελέτησαν τη σύμπλεξη του PMETAC με πολυ(ακρυλικό οξύ) με αποτέλεσμα τον σχηματισμό αδιάλυτων μη στοιχειομετρικών συμπλοκών



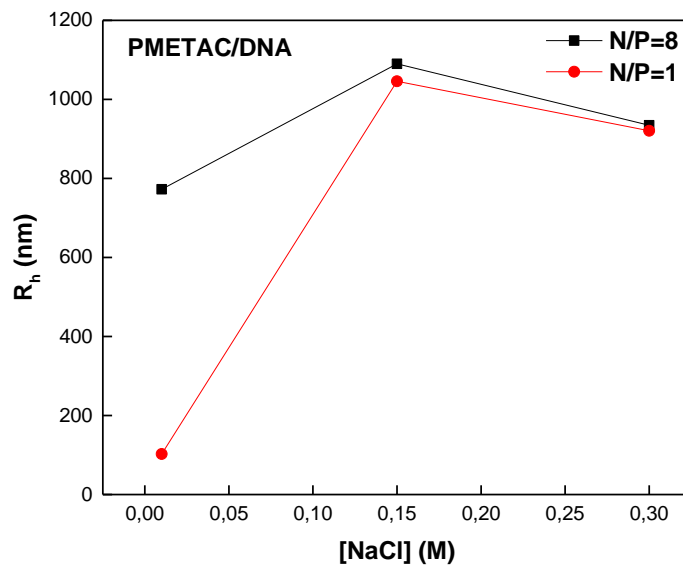
πολυηλεκτρολυτών. Η αύξηση της ιοντικής ισχύος δεν εμπόδισε την σύμπλεξη των πολυμερών αλλά επηρέασε τη σταθερότητα των συμπλόκων, ωστόσο, σε πολύ υψηλές τιμές ιοντικής ισχύος τα σύμπλοκα δεν σχηματίστηκαν λόγω της προάσπισης των πολυμερικών φορτίων από ανόργανα ιόντα.

Στα υδατικά διαλύματα των συμπλόκων PMETAC/DNA, POEGMA-b-PMETAC/DNA και P(OEGMA-co-METAC)-1/DNA συγκέντρωσης 0,01M NaCl πραγματοποιήθηκαν προσθήκες διαλύματος NaCl 1M προκειμένου να επιτευχθούν επιπλέον οι συγκεντρώσεις 0.15M και 0.3M NaCl και στη συνέχεια μέσω της δυναμικής σκέδασης φωτός μετρήθηκαν οι μεταβολές της έντασης και της ακτίνας  $R_h$  με την αύξηση της αλατότητας του διαλύματος. Οι μετρήσεις έγιναν σε γωνία  $90^\circ$ , θερμοκρασία  $25^\circ\text{C}$ , ενώ η συγκέντρωση του διαλύματος του πολυμερούς ήταν  $5 \times 10^{-4}$  g/ml και του DNA  $2 \times 10^{-4}$  g/ml. Για τις μετρήσεις επιλέχθηκαν διαλύματα δύο λόγων N/P για την κάθε σειρά συμπλόκων.

Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζονται οι μεταβολές έντασης και ακτίνας  $R_h$  με την αύξηση της ιοντικής ισχύος για τα σύμπλοκα των πολυμερών με DNA και για λόγους φορτίων N/P=1 και N/P=8.

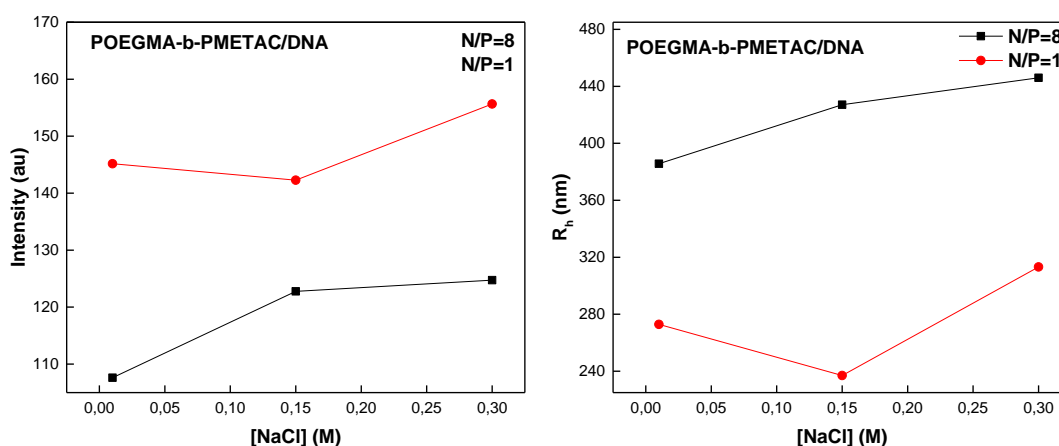


**Σχήμα 4.27: Μεταβολή της έντασης I συναρτήσει της ιοντικής ισχύος για το σύστημα PMETAC/DNA, για λόγους φορτίων N/P=1 και N/P=8.**



**Σχήμα 4.28: Μεταβολή της υδροδυναμικής ακτίνας  $R_h$  συναρτήσει της ιοντικής ισχύος για το σύστημα PMETAC/DNA, για λόγους φορτίων  $N/P=1$  και  $N/P=8$ .**

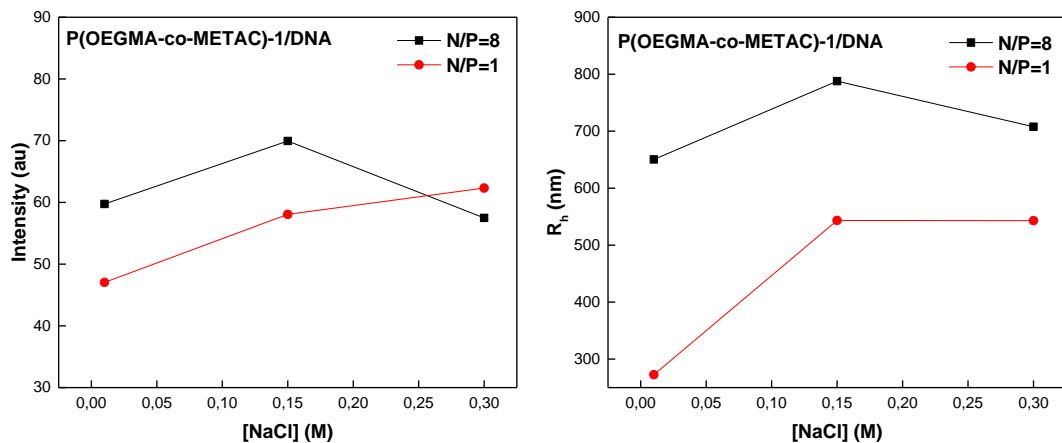
Στα παραπάνω διαγράμματα και για τους δύο λόγους φορτίων, παρατηρείται η έντονη μείωση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του άλατος στο διάλυμα, γεγονός που σηματοδοτεί τη μείωση των συμπλόκων σε μάζα και άρα την σταδιακή απόσυνθεσή τους. Αρχικά η υδροδυναμική ακτίνα αυξάνεται λόγω της αποσύμπλεξης των φορτίων των συμπλόκων με αποτέλεσμα την είσοδο νερού στο εσωτερικό τους (διόγκωση των νανοδομών), ενώ στη συνέχεια τείνει να μειωθεί λόγω της πλήρους διάσπασης των συμπλόκων.



**Σχήμα 4.29: Μεταβολή της έντασης I και της υδροδυναμικής ακτίνας R<sub>h</sub> συναρτήσει της ιοντικής ισχύος για το σύστημα POEGMA-b-PMETAC/DNA, για λόγους φορτίων N/P=1 και N/P=8.**

Στην περίπτωση του συστήματος POEGMA-b-PMETAC/DNA και για N/P=1 αρχικά η ένταση παραμένει σταθερή. Σε συγκέντρωση 0.3M NaCl όμως, παρατηρείται αύξηση της έντασης και της ακτίνας, η οποία συνοδεύεται από έντονη μείωση της πολυδιασποράς. Η υψηλότερη συγκέντρωση άλατος προκαλεί το σχηματισμό μεγαλύτερων συμπλόκων με μικρότερη πολυδιασπορά στο μέγεθος.

Στην περίπτωση του διαλύματος με N/P=8 σημειώθηκαν μικρές μεταβολές αύξησης ως προς την ακτίνα R<sub>h</sub> και την ένταση σκέδασης με την αύξηση της ιοντικής ισχύος. Η υψηλότερη συγκέντρωση άλατος έχει ως αποτέλεσμα τον υψηλότερο βαθμό συσσωμάτωσης των πολυμερικών αλυσίδων λόγω της προάσπισης των φορτίων, καθώς σε μία τόσο υψηλή τιμή του λόγου N/P υπάρχουν περισσότερες αμινομάδες μη συνδεδεμένες ηλεκτροστατικά με φωσφορικές ομάδες του DNA.



**Σχήμα 4.30: Μεταβολή της έντασης  $I$  και της υδροδυναμικής ακτίνας  $R_h$  συναρτήσει της ιοντικής ισχύος για το σύστημα P(OEGMA-co-METAC)-1/DNA, για λόγους φορτίων  $N/P=1$  και  $N/P=8$ .**

Σύμφωνα με το Σχήμα 4.30 στο σύστημα P(OEGMA-co-METAC)-1/DNA και για  $N/P=1$  παρατηρείται αύξηση της έντασης και της ακτίνας με την αύξηση της ιοντικής ισχύος, η οποία συνοδεύεται από μείωση της πολυδιασποράς. Μπορούμε να συμπεράνουμε πως ομοίως με το σύστημα P(OEGMA-co-METAC)-1/DNA, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις άλατος σχηματίζονται μεγαλύτερα σύμπλοκα με μικρότερη πολυδιασπορά στο μέγεθος. Στην περίπτωση του διαλύματος με  $N/P=8$ , με την αύξηση της ιοντικής ισχύος παρατηρείται αρχικά αύξηση της έντασης και της ακτίνας ενώ στη συνέχεια μείωση.

Γίνεται φανερό πως τα σύμπλοκα των πολυμερών με DNA ανταποκρίνονται έντονα σε μεταβολές της ιοντικής ισχύος σε υδατικά διαλύματα, ωστόσο η συμπεριφορά τους καθορίζεται από την σύσταση και την αρχιτεκτονική των πολυμερών. Η περιεκτικότητα των συμπολυμερών σε OEGMA προσέδωσε σταθερότητα στα σύμπλοκα. Σε αντίθετη περίπτωση (σύστημα PMETAC/DNA) η αύξηση της ιοντικής ισχύος οδήγησε σε διάσπαση των συμπλόκων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Επιτεύχθηκε η σύνθεση διυδρόφιλων συμπολυμερών και ενός ομοπολυμερούς με τη χρήση της τεχνικής πολυμερισμού RAFT. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε η σύνθεση ενός ομοπολυμερούς PMETAC, ενός δισυσταδικού συμπολυμερούς POEGMA-b-PMETAC και δύο στατιστικών συμπολυμερών P(OEGMA-co-METAC). Τα στατιστικά συμπολυμερή διέφεραν ως προς την κατά βάρος σύστασή τους σε OEGMA και METAC. Ο μοριακός χαρακτηρισμός των πολυμερών πραγματοποιήθηκε μέσω της χρωματογραφίας αποκλεισμού μοριακών βαρών και της φασματοσκοπίας  $^1\text{H-NMR}$ . Τα αποτελέσματα των εν λόγω τεχνικών επιβεβαίωσαν την επιτυχή σύνθεση των επιδιωκόμενων πολυμερών.

Στη συνέχεια μελετήθηκαν οι ιδιότητες αυτοοργάνωσής τους σε υδατικά διαλύματα και η εξάρτηση των ιδιοτήτων αυτών από τις μεταβολές της θερμοκρασίας και της ιοντικής ισχύος. Το πρωτόκολλο παρασκευής διαλυμάτων που ακολουθήθηκε ήταν η απευθείας διάλυση των πολυμερών σε υδατικό μέσο. Σε ορισμένα δείγματα ήταν απαραίτητη η υποβοήθηση της διάλυσης με θέρμανση. Οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν με την εφαρμογή των μεθόδων DLS, ELS και FS, τα αποτελέσματα των οποίων τείνουν στο συμπέρασμα ότι τα πολυμερή αυτοοργανώνονται στο νερό σχηματίζοντας συσσωματώματα των οποίων οι ιδιότητες εξαρτώνται από τις αλλαγές στη θερμοκρασία και την ιοντική ισχύ, την αναλογία μεταξύ των μονομερών και την αρχιτεκτονική.

Τα πολυμερή που συντέθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για τη σύμπλεξη των θετικά φορτισμένων αμινομάδων του METAC με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του DNA για διαφορετικούς λόγους N/P. Τα σύμπλοκα που παρασκευάστηκαν διερευνήθηκαν με τις μεθόδους DLS, SLS, ELS και FS και παράλληλα μελετήθηκε η επίδραση της ιοντικής ισχύος στη συμπεριφορά τους σε υδατικά διαλύματα για συγκεκριμένους λόγους φορτίων. Διαπιστώθηκε πως τα χαρακτηριστικά των συμπλόκων και η ικανότητα

σύμπλεξης του πολυμερούς με το DNA εξαρτώνται από την αναλογία N/P, την ιοντική ισχύ, τη σύσταση των πολυμερών και την αρχιτεκτονική τους.

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τις μελέτες που διεξήχθησαν κατά την παρούσα ερευνητική εργασία είναι πως τα διυδρόφιλα συμπολυμερή P(OEGMA-*b*-PMETAC και P(OEGMA-*co*-METAC) παρουσιάζουν ενδιαφέρουσα συμπεριφορά αυτοοργάνωσης υπό διαφορετικές φυσικοχημικές συνθήκες σε υδατικά διαλύματα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς ως φορείς για γονιδιακή θεραπεία.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος Όρος	Ελληνικός Όρος
Poly [2-(Methacryloyloxy)ethyl] trimethylammonium chloride	Πολυ [2-(μεθακρυλοϋλοξυ)αιθυλο] τριμεθυλαμμώνιο χλωρίδιο
Poly [oligo (ethylene glycol) - methyl ether methacrylate]	Πολυ (μεθακρυλικός - εστέρας της ολιγοαιθυνελογλυκόλης)
Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer	Πολυμερισμός Αντιστρεπτής Προσθήκης – Μεταφοράς Αλυσίδας με Απόσπαση
Chain Transfer Agent	Μέσο Μεταφοράς Αλυσίδας
Critical Micelles Concentration	Κρίσιμη Μικκυλιακή Συγκέντρωση
Size Exclusion Chromatography	Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγεθών
Nuclear Magnetic Resonance	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
Dynamic Light Scattering	Δυναμική Σκέδαση Φωτός
Static Light Scattering	Στατική Σκέδαση Φωτός
Fluorescence Spectroscopy	Φασματοσκοπία Φθορισμού
Electrophoretic Light Scattering	Ηλεκτροφορητική Σκέδαση Φωτός

**ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ**

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

PMETAC	Poly [2-(Methacryloyloxy)ethyl] trimethylammonium chloride
POEGMA	Poly [oligo (ethylene glycol) - methyl ether methacrylate]
RAFT	Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer
AIBN	Azo-bisisobutyrylnitrile
SEC	Size Exclusion Chromatography
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
$^1\text{H-NMR}$	Proton Nuclear Magnetic Resonance
$\text{D}_2\text{O}$	Deuterium Oxide
DLS	Dynamic Light Scattering
SLS	Static Light Scattering
FS	Fluorescence Spectroscopy
ELS	Electrophoretic Light Scattering
Rh	Hydrodynamic radius



Rg	Radius of gyration
PDI	Polydispersity Index

## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Hiemenz, P., C., Lodge, T., P., Χημεία πολυμερών, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σελ.13-15, 2014
2. Matyjaszewski, K., Tsarevsky, N., Nanostructured functional materials prepared by atom transfer radical polymerization, *Nature Chem* 1, pp.276–288, 2009
3. Colfen, H., Double-Hydrophilic Block Copolymers: Synthesis and application as novel surfactants and crystal growth modifiers, *Macromolecular Rapid Communications*, vol.22, pp.219-252, 2001
4. Forster, S., Antonietti, M., Amphiphilic Block Copolymers in Structure-Controlled nanomaterial hybrids, *Advanced Materials*, vol.10, pp.195-217, 1998
5. Li, L., Raghupathi, K., Song, C., Prasad, P., Thayumanavan, S., Self-assembly of random copolymers, *Chemical Communications*, vol.50, pp. 13417-13432, 2014
6. Canning, S. L., Neal, T.J., Armes, S.P., pH-Responsive Schizophrenic Diblock Copolymers Prepared by Polymerization-Induces Self Assembly, *Macromolecules*, vol.50, pp.6108–6116, 2017
7. Jeong, B., Gutowska, A., Lessons from nature: stimuli-responsive polymers and their biomedical applications, *Trends in Biotechnology*, vol. 20(7), pp.305-311, 2002
8. Joglekar, M., Trewyn, B. G., Polymer-based stimuli-responsive nanosystems for biomedical applications, *Biotechnology Journal*, vol.8, pp.931-945, 2013
9. Moad, G., RAFT polymerization to form stimuli-responsive polymers, *Polym. Chem.*, vol.8, pp.177–219, 2017

10. Kurisawa, M., M., Yui, N., Dual-stimuli-responsive drug release from interpenetrating polymer network-structured hydrogels of gelatin and dextran, *Journal of Controlled Release*, vol. 54(2), pp.191-200, 1998
11. Gupta, P., Vermani, K., Garg, S., Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery, *Drug Discovery Today*, vol. 7(10), pp.569-579, 2002
12. Seuring, J., Agarwal, S., Polymers with upper critical solution temperature in aqueous solution, *Macromolecular Rapid Communications*, vol. 33, pp.1898-1920, 2012
13. Phillips, D.J., Gibson, M.I., Towards being genuinely smart: isothermally-responsive polymers as versatile, programmable scaffolds for biologically-adaptable materials, *Polymer Chemistry*, vol.6, pp.1033-1043, 2015
14. 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
15. Schmaljohann, D., Thermo-and pH-responsive polymers in drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 58(15),pp.1655-1670, 2006
16. Ward, M. A, Georgiou, T. K., Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications, *Polymers*, vol.3, pp.1215-1242, 2011
17. 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
18. Arotçaréna, M., Heise, B., Ishaya, S., Laschewsky, A., Switching the Inside and the Outside of Aggregates of Water-Soluble Block Copolymers

with Double Thermoresponsivity, J. AM. CHEM. SOC., vol.124, pp.3787-3793, 2002

19. Bathfield, M., Warnant, J., Gérardin, C., Lacroix-Desmazes, P., Asymmetric neutral, cationic and anionic PEO-based double-hydrophilic block copolymers (DHBCs): synthesis and reversible micellization triggered by temperature or pH, Polymer Chemistry, vol.6, pp.1339-1349, 2015
20. Gao, X., Kucerka, N., Nich, M.P., Katsaras, J., Zhu, S., Brash, J., Sheardown, H., Chain conformation of a new class of PEG-based thermoresponsive polymer brushes grafted on silicon as determined by neutron reflectometry, Langmuir, vol. 25(17), pp.10271-10278, 2009
21. Magnusson, J. P., Khan, A., Pasparakis, G., Saeed, A. O., Wang, W., Alexander, C., Ion-Sensitive “Isothermal” Responsive Polymers Prepared in Water, J. AM. CHEM. SOC., vol.130, pp.10852–10853, 2008
22. Riess, G., Micellization of block copolymers, Progress in Polymer Science, vol.28, pp. 1107-1170, 2003
23. Πισικάλης, Μ., Χατζηχρηστίδη, Μ., Ειδικά θέματα επιστήμης πολυμερών, Σημειώσεις Μαθήματος, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2010
24. Gohy, J., F., Block copolymer micelles, Advances in Polymer Science, vol.190, pp.65–136, 2005
25. Liu, S., Armes, S., P., Recent advances in the synthesis of polymeric surfactants, Curr Opin Colloid Interf Sci, vol.6, pp.249–56, 2001
26. 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

27. González-Toro, D., C., Ryu, J., H., Chacko, R., T., Zhuang, J., Thayumanavan, S., Concurrent Binding and Delivery of Proteins and Lipophilic Small Molecules Using Polymeric Nanogels, *J. Am. Chem. Soc.*, vol.134, pp.6964-6967, 2012
28. Karayianni, M., Pispas, S., Self-Assembly of Amphiphilic Block Copolymers in Selective Solvents, Chapter in: *Fluorescence Studies of Polymer Containing Systems*, Springer International Publishing, pp.27-63, 2016
29. Καραγιάννη, Μ., Αυτοοργάνωση Πολυμερών: Πολυηλεκτρολύτες και Σύμπλοκά τους με Πρωτεΐνες, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, ΕΚΠΑ, 2012
30. Hoagland, D., Polyelectrolytes, *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, vol.7, pp.439-504, 2003
31. Radeva, T., *Physical Chemistry of Polyelectrolytes*, Marcel & Dekker, 2001
32. Bolto, B., Gregory, J., Organic polyelectrolytes in water treatment, *Water Res.*, vol.41(11), pp.2301-24, 2007
33. Kulkarni, A., D., Vanjari, Y., H., Sancheti, K., H., Patel, H., M., Belgamwar, V., S., Surana, S., J., & Pardeshi, C., V., Polyelectrolyte complexes: mechanisms, critical experimental aspects, and applications, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, vol.44(7), pp.1615-1625, 2016
34. Förster, S., Abetz, V., & Müller, A. H. Polyelectrolyte block copolymer micelles, *Advanced Polymer Science*, vol.166, pp.173-210, 2004
35. Moffit, M., Khougaz, K., Eisenberg, A., Micellization of Ionic Block copolymers, *Accounts of Chemical Research*, vol.29, pp. 95-102, 1996

36. Wang, H., Ding, S., Zhang, Z., Wang, L., You, Y., Cationic micelle: A promising nanocarrier for gene delivery with high transfection efficiency, *J Gene Med*, vol.21, p.e3101, 2019
37. Dey, D., Kumar, S., Banerjee, R., Maiti, S., Dhara, D., Polyplex Formation between PEGylated Linear Cationic Block Copolymers and DNA: Equilibrium and Kinetic Studies, *J. Phys. Chem. B*, vol.118, pp. 7012–7025, 2014
38. Isik, M., Agirre, M., Zarate, J., Mecerreyes, D., Sardon, H., Pedraz, J.L., Amine containing cationic methacrylate copolymers as efficient gene delivery vehicles to retinal epithelial cells, *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, vol.55, pp. 280-287, 2017
39. Mintzer, M., A., Simanek, E., E., Nonviral Vectors for Gene Delivery, *Chemical Reviews*, vol.109, pp.259–302, 2009
40. Krishnamoorthy, M., Developing Cationic Nanoparticles for Gene Delivery, School of Engineering and Materials Science, Queen Mary, University of London, 2015
41. 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
42. Perrier, S., 50th Anniversary Perspective: RAFT Polymerization - A User Guide, *Macromolecules*, vol.50(19), pp. 7433-7447, 2017
43. Smith, A. E., Xu, X., McCormick, C. L., Stimuli-responsive amphiphilic (co)polymers via RAFT polymerization, *Progress in Polymer Science*, vol. 35, pp. 45-93, 2010
44. Moad, G., Rizzardo, E., Thang, S. H., Radical addition-fragmentation chemistry in polymer synthesis, *Polymer*, vol.49, pp. 1079–1131, 2008

45. Skoog, D., A., Holler, F., J., Crouch, S., R., Principles of Instrumental Analysis (6 ed.), New York, pp.968–972, 1998
46. Braun, D., Cherdrón, H., Rehahn, M., Ritter, H., Voit, B., Polymer Synthesis: Theory and Practice, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp.102-109, 2013
47. Gedde, U., W., Polymer Physics, Chapman and Hall: UK, Chap. 1, pp. 1-18, 1995
48. Ιατρού, Ε., Πίσπας, Α., Πιτσικάλης, Μ., Σημειώσεις μεταπτυχιακού μαθήματος: Μέθοδοι χαρακτηρισμού πολυμερών, Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών: Επιστήμη πολυμερών και εφαρμογές της, Πανεπιστήμιο Αθηνών
49. Ιατρού, Ε., Σιακαλη, Α., Χατζηχρηστίδης, Ν., Σημειώσεις εργαστηριακών ασκήσεων Χημείας πολυμερών, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2002
50. Yusa, S., Polymer characterization, Polymer Science and Nanotechnology, pp.105–124, 2020
51. Abraham, P.J., Fisher, J., Loftus, P., Introduction to NMR spectroscopy, New York: Wiley, 1993
52. Wade, L., G., JR, Withman College, Οργανική Χημεία, 7η εκδ., Εκδόσεις Τζιόλα, σελ.483-538, 2011
53. Raja, P., M., V., & Barron, A., R., NMR Spectroscopy, LibreTexts is licensed under CC BY
54. Χατζηγιωάννου, Θ., Π., Κουππάρης, Μ., Α., Ενόργανη ανάλυση, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 1997

55. Sharma, A., & Schulman, S., G., Introduction to fluorescence spectroscopy, Wiley-interscience, vol. 13, 1999
56. Santos, N., C., Castanho, M., Teaching Light Scattering Spectroscopy: The Dimension and Shape of Tobacco Mosaic Virus, Biophysics Journal, vol. 71, pp.1641-1646, 1996
57. Χατζηχρηστίδης, Ν., Βύρας, Κ., Ιατρού, Ε., Πίσπας, Σ., Πισικάλης, Μ., Πίσσης, Π., Μέθοδοι Χαρακτηρισμού Πολυμερών, Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών “Επιστήμη Πολυμερών και Εφαρμογές της”, 1998
58. Oliva, A., Llabrés, M., Fariña, J., B., Applications of Multi-Angle Laser Light-Scattering Detection in the Analysis of Peptides and Proteins, Current Drug Discovery Technologies, vol.1(3), pp.229-42, 2004
59. Pecora, R., Dynamic light scattering: Applications of photon correlation spectroscopy, Plenum Press, 1985
60. Shnoudeh, A. J., Hamad, I., Abdo, R. W., Qadumii, L., Jaber, A. Y., Surchi, H. S., & Alkelany, S. Z., Synthesis, Characterization, and Applications of Metal Nanoparticles, Biomaterials and Bionanotechnology, pp.527–612, 2019
61. <http://zeta-potential.sourceforge.net/zeta-potential.shtml>
62. [http://nition.com/en/products/zeecom\\_s.htm](http://nition.com/en/products/zeecom_s.htm)
63. Hunter, R., J., Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications, Academic Press, 1981



64. Li, Z., Zhang, Y., Lu, D., Liu, Z., Uniform mPEG-b-PMETAC enables pH-responsive delivery of insulin, *J. APPL. POLYM. SCI.*, vol.132, p.42596, 2015
65. Stickler, M., Molecular weight distributions and solution properties of poly(2-trimethylammoniummethyl methacrylate chloride), *Angew. Makromol. Chem.*, vol.123, pp.85-117, 1984
66. Banerjee, S., L., and Singha, N., K., A new class of dual responsive self-healable hydrogels based on a core crosslinked ionic block copolymer micelle prepared via RAFT polymerization and Diels–Alder “click” chemistry, *Soft Matter*, vo.13, pp. 9024-9035, 2017
67. Skandalis., A., Pispas., S., PDMAEMA-b-PLMA-b-POEGMA triblock terpolymers via RAFT polymerization and their self-assembly in aqueous solutions, *polymer chemistry*, vol.8, pp.4538-4547, 2017
68. Griebel , Th., Kulicke, W., M., and Hashemzadeh, A., Characterization of water-soluble, cationic polyelectrolytes as exemplified by poly(acrylamide-co-trimethylammoniummethylethacrylate chloride) and the establishment of structure-property relationships, *Colloid Polym Sci*, vol.269, pp.113-120, 1991
69. Zhao., C.L., Winnik., M.A., Fluorescence Probe Techniques Used To Study Micelle Formation in Water-Soluble Block Copolymers, *Langmuir*, vol.6, pp. 514-516, 1990
70. Wilhelm, M., Zhao., C.L., Wang, Y., Xu, R., Winnik., M.A., Poly(styrene-ethylene oxide) block copolymer micelle formation in water: a fluorescence probe study, *Macromolecules*, vol. 24, pp.1033- 1040, 1991
71. Konar, N., and Kim, C.-J., Water-soluble quaternary amine polymers as controlled release carriers, *J. Appl. Polym. Sci.*, vol.69, pp.263-269, 1998

72. Tande, B., M., and Wagner, N., J., Viscosimetric, Hydrodynamic, and Conformational Properties of Dendrimers and Dendrons, *Macromolecules*, vol.34, pp.8580-8585, 2001
73. Dey, D., Maiti, C., Maiti, S., and Dhara, D., Interaction between calf thymus DNA and cationic bottle-brush copolymers: equilibrium and stopped-flow kinetic studies, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol.17, pp.2366-2377, 2015
74. Khutoryanskiy, V.V. et al., Polyelectrolyte complexes of soluble poly-2-[(methacryloyloxy)ethyl]trimethylammonium chloride and its hydrogels with poly(acrylic acid), *European Polymer Journal*, vol.39, pp.761-766, 2003