



**ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΥΛΙΚΩΝ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
ΠΡΟΗΓΜΕΝΩΝ ΝΑΝΟΥΪΒΡΙΔΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ**

**ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ ΚΑΡΑΝΑΣΤΑΣΗΣ
ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΥΛΙΚΩΝ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2».

Ημερομηνία αίτησης του κ. Καραναστιάση Απόστολου: 05/04/2011

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 15/04/2011

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Ζαφειρόπουλος Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Αυγερόπουλος Απόστολος, Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γουρνής Δημήτριος, Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 15/04/2015

Ανάπτυξη και Χαρακτηρισμός Προηγμένων Νανοϋβριδικών Υλικών

Ημερομηνία Ανασυγκρότησης Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής : 07/10/2015

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων: Ζαφειρόπουλος Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη: Μπέλτσιος Κωνσταντίνος, Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γουρνής Δημήτριος, Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Σχολής Θετικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 27/05/2015

Αντικατάσταση Μέλους Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: 07/10/2015

ΖΑΦΕΙΡΟΠΟΥΛΟΣ	ΝΙΚΟΛΑΟΣ
ΓΟΥΡΝΗΣ	ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΜΠΕΛΤΣΙΟΣ	ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ
ΚΑΡΑΚΑΣΙΔΗΣ	ΜΙΧΑΗΛ
ΑΓΑΘΟΠΟΥΛΟΣ	ΣΥΜΕΩΝ
ΦΩΚΑΣ	ΔΗΜΟΣΘΕΝΗΣ
ΤΖΑΚΟΣ	ΑΝΔΡΕΑΣ

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 29/09/2016

Ο Πρόεδρος του Τμήματος

Η Γραμματέας του Τμήματος

**Καρακασίδης Μιχαήλ
Καθηγητής**

Ξανθή Τουτουνζόγλου

Ευχαριστίες

Ανεξάρτητα από την μοναχική φύση της ερευνητικής εργασίας, η πραγματοποίηση της διατριβής μου δεν θα ήταν εφικτή χωρίς την καταλυτική συμβολή και βοήθεια ορισμένων ανθρώπων.

Πρώτα από όλους ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Νικόλαο Ζαφειρόπουλο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, δίνοντας μου την ευκαιρία να εκπονήσω την διατριβή υπό την επίβλεψη του. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, καθώς μου δόθηκε η δυνατότητα να πειραματιστώ σε διαφορετικά επιστημονικά πεδία. Τέλος θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την συνεχή βοήθεια και καθοδήγηση του σε όλα τα στάδια υλοποίησης της εργασίας.

Θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Απόστολο Αυγερόπουλο για την αμέριστη συμπαράσταση του κατά την διάρκεια εκπόνησης της διατριβής, καθώς επίσης για την ουσιαστική παροχή επιστημονικής γνώσης ως προς την σύνθεση και την εξασφάλιση οικονομικών πόρων.

Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής Καθηγητή Δημήτριο Γουρνή και Καθηγητή Κωνσταντίνο Μπέλτσιο για την τιμή που μου έκαναν και για τις εποικοδομητικές τους παρατηρήσεις και παραινέσεις από τα έτη της προπτυχιακής φοίτησης.

Ευχαριστώ θερμά τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής Καθηγητή Μιχαήλ Καρακασίδη, Αναπληρωτή Καθηγητή Συμεών Αγαθόπουλο, Αναπληρωτή Καθηγητή Δημοσθένη Φωκά και Επίκουρο Καθηγητή Ανδρέα Τζάκο για την τιμή που μου έκαναν με την συμμετοχή τους, για την γενναιόδωρη φιλοξενία στα εργαστήρια τους και για τις χρήσιμες συμβουλές τους.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Ιωάννη Παναγιωτόπουλο για την πρόσβαση στο VSM και τον Κον Λευτέρη Μουζουράκη για τις μετρήσεις. Ευχαριστώ πολύ τον Επίκουρο Καθηγητή Μιχαήλ Σίσκο για τις εξαιρετικά χρήσιμες συζητήσεις γύρω από την φασματοσκοπία. Ευχαριστώ πολύ τους συνεργάτες μου Κα Αναστασία Κουγιουμτζή για την πραγματοποίηση των βιολογικών πειραμάτων και Κους Δημήτρη Διαμαντή και Ρένο Βρέττο για την κρίσιμη συνεισφορά τους στην οργανική σύνθεση και τον χαρακτηρισμό με NMR. Ευχαριστώ την Δρ. Μυρσίνη Αντωνίου για τις μετρήσεις TGA και VSM.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους διδάκτορες Δημήτρη Μοσχόβα, Κωνσταντίνο Ντέτσικα, Γιώργο Ζάψα, Γιώργο Λιόντο και Χρήστο Ντάρα καθώς και την Κα Άννα Γείτονα για το εξαιρετικό κλίμα κατά την συνεργασία μας στο Εργαστήριο Πολυμερικών Υλικών.

Η συνεισφορά του Δικτύου Εργαστηρίων Υποστήριξης Έρευνας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (Δ.Ε.Υ.Ε.Π.Ι.) και ιδιαίτερα του κέντρου NMR ήταν καθοριστική για την πορεία της εργασίας.

Οι λέξεις δεν μπορούν να περιγράψουν την ευγνωμοσύνη που νιώθω απέναντι στην οικογένεια μου και στους αγαπημένους ανθρώπους που με υποστήριξαν πολύπλευρα στα χρόνια των σπουδών μου.

Περίληψη

Η παρούσα διατριβή πραγματεύεται την ανάπτυξη και τον χαρακτηρισμό προηγμένων νανοϋβριδικών μικροπηκτών με έμφαση σε τελικές βιοϊατρικές εφαρμογές ενθυσλάκωσης, μεταφοράς και αποδέσμευσης ενεργών φαρμακευτικών ουσιών. Το θερμοαποκρίσιμο πολυμερές πολυ(*N*-ισοπροπυλακρυλαμίδιο) υπήρξε το βασικό συστατικό των μικροπηκτών και το ακρυλικό οξύ χρησιμοποιήθηκε ως το δεύτερο δραστικό συμμενομερές. Για την επιτεύξη των αριστοποιημένων ιδιοτήτων (μέγεθος ~ 200 nm, θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης ~ 36.7 °C, μορφολογία πυρήνα/κελύφους και επιφανειακή χημική δραστηριότητα) αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολο πολυμερισμού κατά το οποίο το δραστικό συμμενομερές υπεισέρχεται στην αντίδραση σε χρόνο μεταγενέστερο της έναρξης του πολυμερισμού. Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων προτάθηκε ένα νέο μηχανιστικό μοντέλο, σύμφωνα με το οποίο η εισαγωγή μονομερικών στοιχείων ακρυλικού νατρίου στις διαδιδόμενες υδροφοβικές (στην θερμοκρασία διεξαγωγής του πολυμερισμού) αλυσίδες του PNIPAm επάγει ψευδοτασιενεργό δράση και ως εκ τούτου προκαλεί την σταθεροποίηση των αναπτυσσόμενων κολλοειδών. Ο χαρακτηρισμός των υδροδυναμικών διαστάσεων πραγματοποιήθηκε με δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) μεταβλητής θερμοκρασίας σε διαφορετικές τιμές του pH. Ο χαρακτηρισμός του συνολικού φορτίου και των επιφανειακών δραστικών θέσεων πραγματοποιήθηκε μέσω του συνδυασμού μετρήσεων ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός (ELS) με pH-μετρικές και ηλεκτρολυτικές τιτλοδοτήσεις. Το αριστοποιημένο υλικό χρησιμοποιήθηκε ως ικρίωμα για την ανάπτυξη του τελικού τριλειτουγικού νανοϋβριδικού υλικού. Αρχικά συντέθηκε ένα παράγωγο της χρωμοφόρας φθορεσίνη με φέρουσα άμινο δραστηριότητα, το οποίο προσδέθηκε ομοιοπολικά στην επιφάνεια των καρβόξυλο δραστικών μικροπηκτών. Στην συνέχεια ακολούθησε η *in-situ* εναπόθεση της μαγνητικής νανοφάσης του γ-οξειδίου του σιδήρου στην επιφάνεια των φθορίζοντων μικροπηκτών, μέσω μίας διεργασίας καθοδηγούμενης συγκαταβύθισης αλάτων σιδήρου στις παραμένουσες δραστικές θέσεις. Ο μοριακός χαρακτηρισμός περιελάμβανε την χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών FT-IR, ¹H-NMR και ¹³C-NMR. Οι φωτοφυσικές ιδιότητες μελετήθηκαν με φασματοσκοπίες φθορισμού και ορατού-υπεριώδους (UV-Vis). Τα φθορίζοντα και φθορίζοντα/νανοϋβριδικά υλικά επέδειξαν αξιοσημείωτη συμπεριφορά, με διττή θερμική/οπτική αποκρισσιμότητα ανάλογα με το pH. Τα υλικά χαρακτηρίστηκαν στην στερεά κατάσταση με θερμική σταθμική ανάλυση (TGA) και μαγνητομετρία παλλόμενου δείγματος (VSM) για τον προσδιορισμό του ανόργανου ποσοστού και την μελέτη των μαγνητικών ιδιοτήτων αντίστοιχα. Στο τελευταίο στάδιο της ανάπτυξης, η βιοσυμβατότητα των υλικών ως νανοφορείς αξιολογήθηκε μέσω της πρόσληψης από καρκινικά κύτταρα της σειράς HeLa και την μελέτη της κυτταρικής βιωσιμότητας με δοκιμή MTT. Τα υλικά αξιοποιήθηκαν περαιτέρω για την ενθυσλάκωση του αντικαρκινικού φαρμάκου

δοξορουβικίνη. Η μελέτη κυτταρικής πρόσληψης των νανοφορέων με ενθυλακωμένη δοξορουβικίνη απέδειξε την ενδοκυτταρικά ελεγχόμενη απελευθέρωση του φαρμάκου από όλα τα συστήματα. Η παρουσία της μαγνητικής φάσης αποδεικνύεται ότι συμβάλλει καθοριστικά στην ενθυλάκωση της δοξορουβικίνης σε πολύ μεγάλο ποσοστό. Για την εξακρίβωση του μηχανισμού απελευθέρωσης, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές *in-vitro* από τις οποίες επιβεβαιώθηκε ότι η διεργασία απελευθέρωσης ελέγχεται από το pH και συγκεκριμένα πραγματοποιείται σε ελαφρώς όξινες συνθήκες.

Abstract

The present thesis focuses on the development and characterisation of advanced microgel-based nanohybrid materials, intended for use in drug uptake, transport and release for biomedical applications. Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNiPAm), a biocompatible and thermoresponsive polymer, was selected as the main constituent of the microgel nanocarriers. The copolymerisation of sodium acrylate provided active carboxylic sites for post-polymerization modification reactions. In order to achieve optimum properties (hydrodynamic dimensions ~200 nm, volume phase transition temperature ~36.7 °C, core/shell morphology and surface reactivity) to the PNiPAm microgel scaffolds, a novel polymerization protocol was introduced, where the functional comonomer is participating in the polymerization reaction at an instance after the initiation. The results were interpreted in the basis of a phenomenological model, which suggests that the incorporation of charged residues into the developing hydrophobic (at the reaction temperature) PNiPAm chains, induces a pseudo-surfactant effect thereby stabilising the growing microgel particles. The hydrodynamic dimensions were measured with variable temperature dynamic light scattering (DLS) at different pH values. The characterization of the total charge and surface reactive sites was realised through the combination of electrophoretic light scattering measurements (ELS) with pH-metric and polyelectrolytic titrations. The optimized microgels were subsequently utilised for the development of the final trifunctional nanohybrid materials. Initially, a fluorescein derivative with an amino pendant functionality was synthesised and was covalently attached at the surface carboxyl decorated microgels, via carbodiimide coupling. Subsequently, the *in-situ* deposition of γ -Fe₂O₃ magnetic nanophase at the surface of the fluorescent/thermoresponsive materials was performed, through the directed coprecipitation of iron salts at the residual carboxylic active sites. The molecular characterisation included ¹H-NMR ¹³C-NMR and FT-IR. The photophysical properties were studied with UV-Vis and fluorescence spectroscopies. The fluorescent and fluorescent/magnetic materials showed a noticeable dual optical/thermoresponsive behaviour in respect with pH changes. Solid state characterization with TGA and VSM yielded the determination of inorganic content and study of the magnetic properties, respectively. In the last stage of the development, the biocompatibility of the nanocarriers was assessed through the uptake from the HeLa cervical cancer cell line and MTT cell viability study. The materials were used further for the encapsulation of the antitumour drug doxorubicin. The cell uptake study of the doxorubicin loaded nanocarriers revealed the intracellular controlled release of the drug. The presence of the magnetic nanophase was found to significantly augment the complexation of doxorubicin in the nanocarriers. For the elucidation of the drug release mechanism, *in-vitro* experiments were conducted, verifying that the process is controlled

from pH variations and specifically triggered at the mildly acidic conditions that hold in the lysosomal cellular compartments.

Πίνακας Περιεχομένων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή - Σκοπός Διατριβής	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Θεωρητικό Υπόβαθρο - Βιβλιογραφική Ανασκόπηση	3
2.1 Η Έννοια της Πολυμερικής Πηκτής	3
2.2 Λειτουργικές Πολυμερικές Μικροπηκτές με Βάση το PNIPAm.....	5
2.2.1 Μικροπηκτές PNIPAm: Συνθετικά Σχήματα και Θερμοδυναμική Προέλευση της Θερμοαποκρισιμότητας	6
2.2.2 Ομοιοπολική Ενσωμάτωση Λειτουργικών Συμμοномерών σε Μικροπηκτές PNIPAm και Αντιδράσεις Τροποποίησης μετά τον Πολυμερισμό.....	10
2.2.3 Εφαρμογές Λειτουργικών Μικροπηκτών PNIPAm στην Βιολογία	12
2.3 Νανοϋβριδικά Υλικά και Εφαρμογές.....	14
2.3.1 Νανοϋβριδικά Συστήματα Μικροπηκτών PNIPAm με Νανοσωματίδια Ευγενών Μετάλλων	15
2.3.2 Νανοϋβριδικές Μικροπηκτές PNIPAm με Μη-Μεταλλικές Νανοφάσεις.....	16
2.3.3 Νανοϋβριδικές Μικροπηκτές PNIPAm με Μαγνητική Νανοφάση	16
2.4 Φθορεσίνη: Φωτοφυσικές Ιδιότητες, Παράγωγα Μόρια και Εφαρμογές.....	19
2.4.1 Πολυμερικά Υλικά και Νανοϋβριδικές Δομές με Επισήμανση Παραγώγων Φθορεσίνης	22
2.4.2 Θερμοαποκρίσιμα Πολυμερικά Συστήματα με Βάση το PNIPAm Επισημασμένα με Φθορίζουσες Χρωμοφόρες.....	23
2.4.3 Φθορίζουσες Μικροπηκτές με Βάση το PNIPAm για Εφαρμογές Αισθητήρων.....	26
2.4.4 Μακρομοριακά και Νανοσκοπικά Θερμόμετρα με Βάση το PNIPAm	27
2.5 Μαγνητικά-Φθορίζοντα Νανοϋβριδικά Συστήματα	31
2.5.1 Βιολογικές Εφαρμογές Φθορίζοντων-Μαγνητικών Νανοϋβριδικών Συστημάτων	33
2.5.2 Φαινόμενα Απόσβεσης Εκπομπής σε Φθορίζοντα-Μαγνητικά Νανοϋβριδικά Υλικά.....	34
2.6 Εφαρμογές Μικροπηκτών και Νανοϋβριδικών Υλικών στην Μεταφορά και Ελεγχόμενη Αποδέσμευση Φαρμάκων	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Τεχνικές Χαρακτηρισμού - Οργανολογία	38

3.1 Χαρακτηρισμός σε Διάλυμα	38
3.1.1 Φασματοσκοπία UV-Vis.....	38
3.1.2 Φασματοσκοπία Φθορισμού	41
3.1.3 Φασματοσκοπία NMR	45
3.2 Χαρακτηρισμός σε Αιώρημα	46
3.2.1 Προσδιορισμός Υδροδυναμικής Διαμέτρου με Δυναμική Σκέδαση Φωτός	46
3.2.2 Προσδιορισμός Δυναμικού-ζ με Ανάλυση Φάσης Σκεδαζόμενης Ακτινοβολίας Φωτός (PALS)	53
3.3 Χαρακτηρισμός σε Στερεά Κατάσταση	55
3.3.1 Θερμοσταθμική Ανάλυση.....	55
3.3.2 Μαγνητομετρία Παλλόμενου Δείγματος.....	56
3.3.3 Φασματοσκοπία FT-IR	56
3.4 Συνεστιακή Μικροσκοπία Σάρωσης με laser.....	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Ανάπτυξη Πρωτοκόλλου Πολυμερισμού για την Παρασκευή Πολυμερικών Μικροπηκτών Πολυ(<i>N</i>-ισοπροπυλακρυλαμιδίου-<i>co</i>-ακρυλικού νατρίου) [P(NiPAm-<i>co</i>-SA)] με Αριστοποιημένα Χαρακτηριστικά	58
4.1 Εισαγωγή.....	58
4.2 Παράμετροι Αριστοποίησης και Συνθετικός Έλεγχος.....	59
4.3 Πειραματικό Μέρος	65
4.3.1 Σύνθεση Πολυμερικών Μικροπηκτών P(NiPAm- <i>co</i> -SA).....	65
4.3.2 Χαρακτηρισμός Πολυμερικών Μικροπηκτών P(NiPAm- <i>co</i> -SA)	68
4.3.2.1 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)	68
4.3.2.2 Ηλεκτροφορητική Σκέδαση Φωτός (ELS).....	69
4.3.2.3 pH-μετρική/ELS τιτλοδοτήση με HCl. ELS τιτλοδοτήση με PDADMAC	70
4.4 Αποτελέσματα.....	70
4.4.1 Αποτελέσματα DLS	70
4.4.2 Παρασκευή σε Μεγαλύτερη Κλίμακα (<i>Scale-Up</i>) και Αριστοποίηση Δείγματος.....	90
4.4.3 Αποτελέσματα Τιτλοδοτήσεων.....	92
4.5 Συζήτηση.....	95
4.5.1 Ανομοιογενές προφίλ D_h vs T	95

4.5.2 LCST και UCST	96
4.5.3 Διαδικασία Scale-up.	97
4.5.4 Προτεινόμενος μηχανισμός για την “ψευδοτασιενεργό” δράση του SA.....	97
4.5.5 Τιτλοδοτήσεις - Πυκνότητα Φορτίου	100
4.6 Συμπεράσματα.....	101
Κεφάλαιο 5: Σύνθεση και Χαρακτηρισμός Φθορίζοντων και Φθορίζοντων/Μαγνητικών Πολυμερικών Μικροπηκτών με Βάση το PNIPAm	103
5.1 Εισαγωγή.....	103
5.2 Πειραματικό Μέρος	104
5.2.1 Μοριακή Σύνθεση.....	104
5.2.1.1 Καθαρισμός <i>N</i> -Διμεθυλοφορμαμίδιου (DMF)	104
5.2.1.2 Σύνθεση Υδροβρωμικού Αλατος της 2-βρωμοαιθυλαμίνης (2-BEA•HBr).....	105
5.2.1.3 Σύνθεση <i>N</i> -(<i>tert</i> -βουτοξυκαρβονυλο)-2-βρωμοαιθυλο αμίνης (2-BEA-Boc).....	106
5.2.1.4 Σύνθεση αιθυλ-2-(6-υδροξυ-3-οξο-3H-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκού εστέρα (FL Ester).....	106
5.2.1.5 Σύνθεση αιθυλ-2-(6-(2-((<i>tert</i> -βουτοξυκαρβονυλο)αμινο)αιθοξυ)-3-οξο-3H-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκού εστέρα (FL-NH-Boc).....	107
5.2.1.6 Σύνθεση αιθυλ-2-(6-(2-αμινοαιθοξυ)-3-οξο-3H-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκού εστέρα (FL-NH ₂)	108
5.2.1.7 Σύνθεση Χλωριδίου του Μεθακρυλικού Οξέος (MAAcCl).....	108
5.2.1.8 Σύνθεση 2-(6-(μεθακρυλοϋλ)-3-οξο-3H-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκού οξέος (FL-MAAc).....	109
5.2.2 Χημική Τροποποίηση PNS_Opt με Χρωμοφόρες - Παράγωγα Φθορεσίνης	111
5.2.2.1 Παρασκευή Φθορίζοντων Μικροπηκτών (PNS@FL) με Χημική Τροποποίηση της Επιφάνειας μετά τον Πολυμερισμό (post-polymerization modification).....	111
5.2.2.2 Παρασκευή Φθορίζοντων Μικροπηκτών [P(NS-co-FL)] με Συμπολυμερισμό Λειτουργικού Μονομερούς (functional monomer copolymerization).....	112
5.2.3 Εναπόθεση <i>in situ</i> Μαγνητικών ΝΣΟΣ στην Επιφάνεια Μικροπηκτών του Τύπου PNS_Opt και PNS@FL25	113

5.3 Αποτελέσματα - Συζήτηση.....	114
5.3.1 Αποτελέσματα Μοριακού Χαρακτηρισμού PNS_Opt, PNS@FL και PNS@FL#I.....	114
5.3.1.1 Αποτελέσματα Φασματοσκοπίας NMR	114
5.3.1.2 Αποτελέσματα Φασματοσκοπίας FT-IR.....	116
5.3.2 Αποτελέσματα Χαρακτηρισμού PNS@FL, PNS#I και PNS@FL#I με DLS....	117
5.3.3 Αποτελέσματα Φωτοφυσικού Χαρακτηρισμού με UV-Vis και Φασματοσκοπία Φθορισμού	119
5.3.4 Χαρακτηρισμός στην Στερεά Κατάσταση.....	124
5.3.4.1 Θερμική Σταθμική Ανάλυση (TGA)	124
5.3.4.2 Μαγνητομετρία Παλλόμενου Δείγματος (VSM).....	125
5.4 Εφαρμογή: Συσχέτιση Οπτικής Εκπομπής με την Θερμοκρασία.....	127
5.5 Συμπεράσματα.....	131
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Εφαρμογές των Νανοϋβριδικών Υλικών στην Βιολογία - Κυτταρική Πρόσληψη - Ενθυλάκωση και Ελεγχόμενη Αποδέσμευση Φαρμάκου - Μελέτη Κυτταροτοξικότητας.....	132
6.1 Εισαγωγή.....	132
6.2 Πειραματικό Μέρος.....	135
6.2.1 Κυτταρική Καλλιέργεια και Επώαση Κυττάρων HeLa με Νανοπηκτές για την Παρατήρηση με Συνεστιακή Μικροσκοπία.....	135
6.2.2 Μελέτη Κυτταροτοξικότητας	136
6.2.3 Ενθυλάκωση DOX σε Νανοπηκτές: Παρασκευή PF@DOX, PFI@DOX, και PI@DOX.....	136
6.2.4 Ποιοτική Μελέτη Αποδέσμευσης Δοξορουβικίνης από PF@DOX, PFI@DOX, και PI@DOX	138
6.3 Αποτελέσματα.....	139
6.3.1 Κυτταρική Απεικόνιση	139
6.3.2 Βιωσιμότητα Κυττάρων.....	143
6.3.3 Αποδέσμευση DOX	144
6.4 Συζήτηση.....	147
6.5 Συμπεράσματα.....	149
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Γενικά Συμπεράσματα - Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα	151

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	153
Παράρτημα Κεφαλαίου 3.....	153
Μαθηματική Ανάλυση για την Εξαγωγή της Τελικής Μορφής της Συνάρτησης Αυτοσυσχέτισης.....	153
Συμπληρωματικά Στοιχεία Θεωρίας για την Τεχνική της Ανάλυσης Φάσης Σκεδαζόμενης Ακτινοβολίας (Phase Analysis Light Scattering, PALS).....	154
Παράρτημα Κεφαλαίου 4.....	157
Παράρτημα Κεφαλαίου 5.....	161
Αποτελέσματα Φασματοσκοπίας NMR.....	161
Αποτελέσματα Φασματοσκοπίας FT-IR.....	170
Παράρτημα Κεφαλαίου 6.....	172
Βιβλιογραφία	175

Κατάλογος Συντομογραφιών

¹³ C-NMR	φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού άνθρακα
¹ H-NMR	φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου
2-AET	2-αμινοαιθανοθειόλη
2-BEA-Boc	<i>N</i> -(<i>tert</i> -βουτοξυκαρβονυλο)-2-βρωμοαιθύλιο αμίνης
2-BEA•HBr	Υδροβρωμικό άλας της 2-βρωμοαιθυλαμίνης
5-FU	5-φλουορακίλη
<i>A</i>	απορρόφηση
AAc	ακρυλικό οξύ
AFP	α -εμβρυϊκή πρωτεΐνη
AlAm	αλλυλαμίνη
Am	ακρυλαμίδιο
AMPSA	2-ακρυλαμιδο-2-μεθυλ-1-προπανοσουλφονικό οξύ
APM	<i>N</i> -(3-αμινοπροπυλ)μεθακρυλαμίδιο
APBA	3-(ακρυλαμιδο)φαινυλβουρονικό οξύ
ATRP	ριζικός πολυμερισμός μεταφοράς ατόμων
BA	ακρυλικός βουτυλεστέρας
BBB	αιματοεγκεφαλικός φραγμός
Boc	<i>tert</i> -βουτοξυκαρβόνυλο προστατευτική ομάδα
BSA	αλβουμίνη βόειου ορού αίματος
CNTs	νανοσωλήνες άνθρακα
DBD-AA	σουλφονιωμένο ανάλογο της βενζοφουράνης
DCC	δικυκλοεξυλοκαρβοδιμίδιο
DCU	δικυκλοεξυλουρία
DCR	ένταση του καταγραφόμενου σήματος σκεδαζόμενης ακτινοβολίας
<i>D_H</i>	υδροδυναμική διάμετρος
DLS	δυναμική σκέδαση φωτός
DMF	διμεθυλοφορμαμίδιο
DNA	δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DOX	δοξορουβικίνη
DTT	διθειοθρεϊτόλη
EDC	1-αιθυλ-3-(3-διμεθυλαμινοπρόπυλο) καρβοδιμίδιο
EDL	ηλεκτρική διπλοστοιβάδα
ELS	ηλεκτροφορετική σκέδαση φωτός
FL	φθορεσίνη
FL Ester	αιθυλ-2-(6-υδροξυ-3-οξο-3H-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκός εστέρας

FL-NH-Boc	αιθυλ-2-(6-(2-((tert-βουτοξυκαρβονυλο)αμινο)αιθοξυ)-3-οξο-3H-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκός εστέρας
FL-NH ₂	αιθυλ-2-(6-(2-αμινοαιθοξυ)-3-οξο-3H-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκός εστέρας
FL-MAAc	2-(6-(μεθακρυλοϋλ)-3-οξο-3H-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκό οξύ
FMA	Ο-μεθακρυλικός εστέρας της φθορεσίνης
Fmoc	φθορενυλομεθοξυκαρβόνυλο προστατευτική ομάδα
FOM	αριθμός αριστοποίησης
FRET	μεταφορά ενέργειας χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας
FT-IR	φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier
FTIC	ισοκυανικός εστέρας της φθορεσίνης
GMA	γλυκιδυλικός μεθακρυλεστέρας
HEAM	N-υδροξυαιθυλακρυλαμίδιο
HOBt	υδροξυβενζοτριαζόλιο
HOMO	ανώτερο κατειλημμένο μοριακό τροχιακό
HPF	6-υδροξυ-9-φαινυλ-3H-ξανθεν-3-όνη
ITC	θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης
IUPAC	Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας
KPS	υπερθειικό κάλιο
Laser	ενίσχυση του φωτός μέσω εξαναγκασμένης εκπομπής ακτινοβολίας
LCST	κάτω κρίσιμη θερμοκρασία διαλυτότητας
LDL	λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας
LDV	ταχυμετρία Laser-Doppler
LUMO	κατώτερο μη-κατειλημμένο μοριακό τροχιακό
MAAc	μεθακρυλικό οξύ
MAAcCl	χλωρίδιο του μεθακρυλικού οξέος
MBA	N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο
MDCPDP	παράγωγο του δικυανο-μεθυλενο-4H-πυρανίου
MNDs	μαγνητικά νανοδιαμάντια
MPS	μεθακρυλικό 3-(τριμεθοξυσιλυλ) προπυλεστέρα
MTT	MTT δοκιμή κυτταρικής βιωσιμότητας
NASI	N-ακρυλοσουκινιμίδιο
NMA	ακρυλικός εστέρας της ναφθαλεν-2-όλης
NiPAm	N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο
NiPMAM	N-ισοπροπυλμεθακρυλαμίδιο
NBDAA	πολυμερίσιμα ανάλογα της βενζοξαδιαζόλης
NBDAE	4-(2-ακρυλοϋλ-οξυαιθυλαμινο)-7-νιτρο-2,1,3-βενζοξαδιαζόλη
NHS	N-υδρόξυ σουκινιμίδιο

OEGMA	ολιγομερικός μεθακρυλικός εστέρας της αιθυλενογλυκόλης
PAH	υδροχλωρική πολυαλλυλαμίνη
PALS	ανάλυση φάσης σκεδαζόμενης ακτινοβολίας φωτός
PCS	φασματοσκοπία συσχετισμού φωτονίων
PDADMAC	κατιοντικός πολυηλεκτρολύτης
PDI	πολυδιασπορά
PDMS	πολυδιμεθυλοσιλοξάνη
PEGMA	μεθακρυλικός εστέρας της PEG
PEGylated	τροποποιημένο με PEG
PEI	πολυαιθυλενοϊμίνη
PEO	πολυαιθυλενοξείδιο
pH	
PLGA	τυχαίο συμπολυμερές πολυ(λακτικού- <i>co</i> -γαλακτικού) οξέος
PMMA	πολυμεθακρυλικός μεθυλεστέρας
PNS_Opt	αριστοποιημένες μικροπηκτές με δραστικές καρβοξυλικές θέσεις στην επιφάνεια
PNS@FL	φθορίζουσες/θερμοαποκρίσιμες μικροπηκτές
PNS@FL#I	τριλειτουργικές φθορίζουσες/θερμοαποκρίσιμες/μαγνητικές νανοϋβριδικές μικροπηκτές
PNS#I	θερμοαποκρίσιμες/μαγνητικές νανοϋβριδικές μικροπηκτές
PNiPAm	πολυ(N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο)
PS	πολυστυρένιο
PSS	πολυ(σουλφονικό νάτριο στυρένιο)
PVCL	πολυβινυλοκαπρολακτάμη
R_g	μέση γυροσκοπική ακτίνα
RGD	τριπεπτίδιο αργινίνης - γλυκίνης - ασπαρτικού οξέος
RhAc	χλωρίδιο του <i>N</i> -(9-(2-((2-(ακρυλοϋλοξυ)αιθοξυ)-καρβονυλ)φαινυλ)-6-(διαιθυλαμινο)-3H-ξανθεν-3-υλιδεν)- <i>N</i> -αιθυλαιθαναμινίου
RhBAm	πολυμερίσιμο ανάλογο της ροδαμίνης B
RhBEAm	ακρυλικό υδραζίδιο της ροδαμίνης B
RhBAEAm	άμινο αιθυλεναμίδιο της ροδαμίνης B
SA (NaAAc)	ακρυλικό νάτριο
SDS	δωδέκυλο σουλφονικό νάτριο
SERS	ενίσχυση της σκέδασης Raman από επιφάνειες
siRNA	ολιγονουκλεοτίδια RNA
St	στυρένιο
T	θερμοκρασία

T_g	θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης
TEM	ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης
TGA	θερμική σταθμική ανάλυση
TLC	χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας
TMS	τετραμεθυλοσιλάνιο
TPE	πολυμερίσιμο ανάλογο του τετραφαιθυλαιθυλενίου
UCST	άνω κρίσιμη θερμοκρασία διαλυτότητας
UV-Vis	φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους
VAGA	6-Ο-βινυλαδιποϋλ- <i>d</i> -γαλακτόζη
VI	βινυλοϊμιδαζόλιο
VPTT	θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης όγκου
VSM	μαγνητομετρία παλλόμενου δείγματος
z-average	z-μέση υδροδυναμική διάμετρος
Acs	ακέτυλο συνένζυμο Α συνθάση
ΝΣ	νανοσωματίδια
ΝΣΟΣ	νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου
Φ	κβαντική απόδοση

Κατάλογος Σχημάτων, Εικόνων και Πινάκων

Κεφάλαιο 2

Σχήμα 2.1 Ο συντακτικός τύπος του *N*-ισοπροπυλακρυλαμίδιου.

Εικόνα 2.1 Φωτογραφία ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας σάρωσης πολυμερικού σωματιδίου PNIPAm μεσοσκοπικών διαστάσεων με εμφανή την πορώδη δομή του τρισδιάστατου δικτύου.

Σχήμα 2.2 Σκαρίφημα της θερμοδυναμικής μετάπτωσης φάσης όπου αναπαρίσταται η ανάπτυξη δεσμών-H μεταξύ των μορίων H₂O και της αμιδικής ομάδας κάτω από την LCST και η υδροφοβική αλληλεπίδραση μεταξύ των ισοπροπυλικών ομάδων πάνω από την LCST.

Σχήμα 2.3 Α) Αλληλεπίδραση μεταξύ θετικά φορτισμένων περιοχών της λυσοζύμης και της αρνητικά φορτισμένης επιφάνειας της μικροπηκτής. Β) Μεταβολή του μοριακού βάρους της μικροπηκτής, όπως προσδιορίστηκε με στατική σκέδαση φωτός.

Σχήμα 2.4 Κρυσταλλική δομή του οξειδίου του σιδήρου μαγνητίτη (Fe₃O₄). Με πράσινο χρώμα: Fe³⁺, κόκκινο χρώμα: O²⁻, μαύρο: Fe²⁺.

Σχήμα 2.5 Στερεοχημικός τύπος της λακτοειδούς (αριστερά) και κινουειδούς (δεξιά) δομής συντονισμού στην ουδέτερη κατάσταση της φθορεσίνης.

Σχήμα 2.6 Συντακτικοί τύποι λειτουργικών παραγώγων μορίων φθορεσίνης.

Σχήμα 2.7 Α) Συνθετική πορεία παρασκευής μικροπηκτών με βάση το PNIPAm και επισήμανση με δύο διαφορετικές χρωμοφόρες (ροδαμίνη και φθορεσίνη) εφαρμόζοντας ταυτοχρόνως ορθογώνια χημεία click και χημεία καρβοδιμιδίων σε υδατικά μέσα. Β) Pickering o/w γαλάκτωμα: ελαιώδης σταγόνα PDMS (πράσινο υπόβαθρο) σταθεροποιημένη με φθορίζουσες μικροπηκτές PNIPAm.

Σχήμα 2.8 Φθορίζουσες μικροπηκτές P(NiPAM-co-RhBLMAc-co-FMA) κάτω από UV ακτινοβολία με αντιστρεπτή οπτική αποκρισσιμότητα σε μεταβολές του pH.

Σχήμα 2.9 Α) Τοπική παραγωγή θερμότητας κοντά στα μιτοχόνδρια ζωντανών κυττάρων της σειράς COS7. (Κάτω δεξιά): Με βέλη σημειώνονται οι περιοχές παραγωγής θερμότητας, N:πυρήνας. Β) Φωτογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού σε διαφορετικές θερμοκρασίες σε κύτταρα της σειράς HeLa. (1η σειρά): σήμα καναλιού GFP. (2η σειρά): σήμα καναλιού CY3. (3η σειρά): ανασύνθεση των σημάτων από το λογισμικό. C) Αναλογική ανασύνθεση των σημάτων από τα κανάλια GFP και CY3 για την χρωματική απεικόνιση της θερμοκρασίας καρκινικών κυττάρων HeLa. D) (Αριστερά): Χρωματικό διάγραμμα CIE όπου αποδίδεται η εξάρτηση των (x, y) χρωματικών συντεταγμένων από την θερμοκρασία. (Δεξιά): Απεικόνιση των κυττάρων NIH/3T3 με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού στους 25 °C και 37 °C.

Σχήμα 2.10 Πιθανές αρχιτεκτονικές για την παρασκευή φθορίζοντων-μαγνητικών υλικών.

Σχήμα 2.11 “Σκληρά” φθορίζοντα κολλοειδή A) με βάση το PSt και επιφανειακή τροποποίηση με ΝΣΟΣ Fe_3O_4 και B) με πυρήνα ΝΣΟΣ Fe_3O_4 και επιφανειακή τροποποίηση με πολυμερές FMA.

Κεφάλαιο 3

Σχήμα 3.1 Διάγραμμα ηλεκτρονικών μεταβάσεων μεταξύ μοριακών τροχιακών για το ενεργειακό φάσμα που καλύπτει η φασματοσκοπία UV-Vis.

Σχήμα 3.2 Διάγραμμα των ηλεκτρονικών μεταβάσεων μεταξύ μοριακών τροχιακών όπου απεικονίζονται τα δονητικά και περιστροφικά ενεργειακά επίπεδα.

Σχήμα 3.3 Τυπικό φάσμα απορρόφησης-εκπομπής οργανικής φθορίζουσας ένωσης. Η κορυφή εκπομπής εμφανίζεται μετατοπισμένη στο ερυθρό εξαιτίας ενεργειακών απωλειών που οφείλονται στην μετατόπιση Stokes.

Σχήμα 3.4 Απλοποιημένο διάγραμμα Jablonski. EM: εσωτερική μετατροπή, ΔA: δονητική αποδιέγερση, A: απορρόφηση, F: φθορισμός, P: φωσφορισμός, S_x: μονή κατάσταση και T_x: τριπλή κατάσταση.

Σχήμα 3.5 Απεικόνιση χαρακτηριστικών χρόνων αποδιέγερσης σε απλοποιημένο διάγραμμα Jablonski.

Σχήμα 3.6 Κάτοψη πειραματικής διάταξης δοκιμών σκέδασης φωτός.

Σχήμα 3.7 Αναπαράσταση της μεταβολής του σκεδαζόμενου πεδίου προς τον ανιχνευτή εξαιτίας της αλλαγής της σχετικής θέσης των δύο σωματιδίων.

Σχήμα 3.8 Η διαφορά ανάμεσα στις ποσοστιαίες κατανομές ως προς τον αριθμό, τον όγκο και την ένταση της σκεδαζόμενης έντασης για μία 1:1 συλλογή νανοσωματιδίων 5 και 50 nm.

Σχήμα 3.9 Διεύρυνση της συχνότητας του σκεδαζόμενου H/M πεδίου εξαιτίας του φαινομένου Doppler.

Σχήμα 3.10 Σύγκριση της υδροδυναμικής διαμέτρου με λοιπά χαρακτηριστικά μεγέθη για ένα βιομόριο.

Σχήμα 3.11 Οι περιοχές της ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας φορτισμένου σωματιδίου: στοιβάδα Stern, διάχυτη στοιβάδα και θέση του δυναμικού-ζ (αριστερά). Πειραματική διάταξη PALS του οργάνου Zeatasizer Nano (δεξιά).

Σχήμα 3.12 Σχηματική αναπαράσταση των δονήσεων έκτασης και κάμψης.

Κεφάλαιο 4

Πίνακας 4.1 Σύνοψη βιβλιογραφικών πειραματικών συνθηκών παρασκευής και χαρακτηριστικών μικροπηκτών PNiPAm.

Πίνακας 4.2 Σύνοψη βιβλιογραφικών πειραματικών συνθηκών παρασκευής και χαρακτηριστικών μικροπηκτών P(NiPAm-co-AAc)

Πίνακας 4.3 Πειραματικές συνθήκες και στοιχειομετρία συνθεθειμένων δειγμάτων μικροπηκτών PNiPAm και P(NiPAm-co-SA).

Σχήμα 4.1 Αντίδραση πολυμερισμού κατακρήμνισης P(NiPAm-co-SA). Με γαλάζιο χρώμα αποδίδονται οι αλυσίδες του PNiPAm και με κόκκινο οι ομάδες -COOH.

Εικόνα 4.1 Στιγμιότυπο αντιδραστήρα έπειτα από την έναρξη του πολυμερισμού: A) 90 sec (γαλάζια/γκρι θόλερότητα) και B) 8.5 min (γαλακτόχρωμο). C) Κατακρήμνιση της διασποράς και συλλογή πολυμερούς. D) Λειοτριβιμμένο δείγμα, E) εμφάνιση μετά από επαναδιασπορά σε συγκέντρωση 0.1% κ.β., pH = 7 στους 25 °C και F) στους 40 °C.

Εικόνα 4.2 Θερμοκρασιακή απόκριση μικροπηκτών P(NiPAm) για συγκέντρωση NiPAm 10 mM (A) και 20 mM (B) σε pH = 5, 7, 9.

Σχήμα 4.2 Μορφολογικό μοντέλο μικροπηκτών PN001, όπου με γαλάζιο χρώμα αποδίδονται οι αλυσίδες του PNiPAm. Η γκρι διακεκομμένη καμπύλη αναπαριστά τα ορία του πυκνώς διασταυρωμένου πυρήνα, ενώ οι πορτοκαλί διακεκομμένες αναπαριστούν τις ανιχνεύσιμες υποπεριοχές με DLS.

Εικόνα 4.3 Θερμοκρασιακή απόκριση μικροπηκτών P(NiPAm-co-SA) για εισαγωγή SA εξαρχής και αρχική συγκέντρωση NiPAm 10 mM (A) και 20 mM (B) σε pH = 5, 7, 9.

Εικόνα 4.4 Θερμοκρασιακή απόκριση μικροπηκτών P(NiPAm-co-SA) για εισαγωγή SA 5 min μετά την έναρξη και αρχική συγκέντρωση NiPAm 10 mM (A) και 20 mM (B) σε pH = 5, 7, 9.

Εικόνα 4.5 Θερμοκρασιακή απόκριση μικροπηκτών P(NiPAm-co-SA) για εισαγωγή SA 10 min μετά την έναρξη και αρχική συγκέντρωση NiPAm 10 mM (A) και 20 mM (B) σε pH = 5, 7, 9.

Πίνακας 4.4 Χαρακτηριστικά μικροπηκτών P(NiPAm-co-SA) για εισαγωγή SA 15 - 20 - 25 - 30 min μετά την έναρξη του πολυμερισμού σε pH = 5. Σε παρένθεση περιλαμβάνονται οι τιμές του PDI.

Πίνακας 4.5 Χαρακτηριστικά μικροπηκτών P(NiPAm-co-SA) για εισαγωγή SA 15 - 20 - 25 - 30 min μετά την έναρξη του πολυμερισμού σε pH = 7. Σε παρένθεση περιλαμβάνονται οι τιμές του PDI.

Πίνακας 4.6 Χαρακτηριστικά μικροπηκτών P(NiPAm-co-SA) για εισαγωγή SA 15 - 20 - 25 - 30 min μετά την έναρξη του πολυμερισμού σε pH = 9. Σε παρένθεση περιλαμβάνονται οι τιμές του PDI.

Εικόνα 4.6 Θερμοκρασιακή απόκριση μικροπηκτών P(NiPAm-co-SA) για εισαγωγή SA 15 min μετά την έναρξη και αρχική συγκέντρωση NiPAM 10 mM (A) και 20 mM (B) σε pH = 5, 7, 9.

Εικόνα 4.7 Θερμοκρασιακή απόκριση μικροπηκτών P(NiPAm-co-SA) για εισαγωγή SA 20 min μετά την έναρξη και αρχική συγκέντρωση NiPAM 10 mM (A) και 20 mM (B) σε pH = 5, 7, 9.

Εικόνα 4.8 Θερμοκρασιακή απόκριση μικροπηκτών P(NiPAm-co-SA) για εισαγωγή SA 25 min μετά την έναρξη και αρχική συγκέντρωση NiPAM 10 mM (A) και 20 mM (B) σε pH = 5, 7, 9.

Εικόνα 4.9 Θερμοκρασιακή απόκριση μικροπηκτών P(NiPAm-co-SA) για εισαγωγή SA 30 min μετά την έναρξη και αρχική συγκέντρωση NiPAM 10 mM (A) και 20 mM (B) σε pH = 5, 7, 9.

Εικόνα 4.10 Διάγραμμα αριθμού αριστοποίησης, FOM, συναρτήσει του χρόνου εισαγωγής SA για τις πειραματικές σειρές PNS_001 και PNS_002 σε pH = 7.

Πίνακας 4.7 Χαρακτηριστικά μικροπηκτών P(NiPAm-co-SA) για εισαγωγή SA 15 - 20 - 25 - 30 min μετά την έναρξη του πολυμερισμού σε pH = 5. Σε παρένθεση περιλαμβάνονται οι τιμές του PDI.

Εικόνα 4.11 Θερμοκρασιακή απόκριση μικροπηκτών PNS_Opt (A) και μεταβολή του δυναμικού-ζ σε T=25 °C για διαφορετική ιοντική ισχύ διασποράς (B) σε pH = 5, 7, 9.

Εικόνα 4.12 Καμπύλες τιτλοδότησης: (A) Ποτεντιομετρική τιτλοδότηση για τον προσδιορισμό του συνολικού φορτίου με διάλυμα τίτλου HCl 10 mM και (B) Προσδιορισμός του επιφανειακού φορτίου με διάλυμα τίτλου PDADMAC 0.1 % κ.β.

Σχήμα 4.3 Σύγκριση μηχανισμών σταθεροποίησης πολυμερισμού κατακρήμνισης με SDS (επάνω σειρά) και σταθεροποίησης με χρήση φορτισμένου συμμονομερούς (κάτω σειρά).

Κεφάλαιο 5

Σχήμα 5.1 Πειραματική πορεία σύνθεσης υδροβρωμικού άλατος της αιθανολαμίνης (2-BEA•HBr) και N-(tert-βουτοξυκαρβονυλο)-2-βρωμοαιθύλιο αμίνης (2-BEA-Boc).

Σχήμα 5.2 Πειραματική πορεία σύνθεσης αιθυλ-2-(6-(2-((tert-βουτοξυκαρβονυλο)αμινο)-αιθοξυ)-3-οξο-3H-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκού εστέρα (FL-NH-Boc).

Σχήμα 5.3 Πειραματική πορεία σύνθεσης αιθυλ-2-(6-(2-αμινοαιθοξυ)-3-οξο-3H-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκού εστέρα (FL-NH₂).

Σχήμα 5.4 Πειραματική πορεία σύνθεσης 2-(6-(μεθακρυλοϋλ)-3-οξο-3H-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκού οξέος (FL-MAAc).

Σχήμα 5.5 Σχηματική αναπαράσταση συνθετικής πορείας παρασκευής θερμοαποκρίσιμων/φθορίζοντων μικροπηκτών PNS@FL, θερμοαποκρίσιμων/μαγνητικών νανοϋβριδικών

PNS#I και τριπλά λειτουργικών θερμοαποκρίσιμων/φθορίζοντων/μαγνητικών νανοϋβριδικών PNS@FL#I.

Σχήμα 5.6 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ πρόδρομων μικροπηκτών PNS_Opt.

Σχήμα 5.7 Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ τροποποιημένων μικροπηκτών PNS@FL25.

Σχήμα 5.8 Συγκεντρωτικά φάσματα FT-IR μικροπηκτών PNiPAm, PNS_Opt, PNS@F25, PNS@F25#I10 και ατροποποιητών ΝΣΟΣ.

Σχήμα 5.9 Θερμοκρασιακή απόκριση μικροπηκτών PNS@FL25 σε pH = 5, 7, 9.

Σχήμα 5.10 Θερμοκρασιακή απόκριση νανοϋβριδικών μικροπηκτών PNS#I4, PNS#I8, PNS@FL25#I6, PNS@FL25#I10 σε pH = 7.

Σχήμα 5.11 Φάσματα UV-Vis μοριακών ενώσεων, φθορίζοντων και νανοϋβριδικών μικροπηκτών. Για τον υπολογισμό της κβαντικής απόδοσης χρησιμοποιήθηκε η τιμή απορρόφησης στα 460 nm (A460). Πειραματικές συγκεντρώσεις: [Fluorescein] = 4 μM , [FL Ester] = 10 μM , [FL-NH₂] = 7.14 μM , [FL-NH-Boc] = 7.14 μM , [PNS@F25] = 13.56 μM , [PNS@F25#I10] = 13.56 μM .

Σχήμα 5.12 Φάσματα απορρόφησης/εκπομπής μοριακών ενώσεων, φθορίζοντων και νανοϋβριδικών μικροπηκτών. Για την λήψη των φασμάτων εκπομπής πραγματοποιήθηκε διέγερση σε μήκος κύματος 460 nm.

Εικόνα 5.1 Εμφάνιση των εξεταζόμενων δειγμάτων για 20 \times συγκέντρωση συγκριτικά με την πειραματική κάτω από τεχνητό φως λαμπτήρα φθορισμού (πρώτη σειρά) και λαμπτήρα UV (δεύτερη και τρίτη σειρά). Από αριστερά προς τα δεξιά: FL, FL Ester, FL-NH-Boc, FL-NH₂, PNS@FL25, PNS@FL25#I10.

Σχήμα 5.13 Αποτελέσματα χαρακτηρισμού πρόδρομου PNS_Opt, “καθαρών” ΝΣΟΣ και παραγώγων νανοϋβριδικών υλικών με θερμική σταθμική ανάλυση (TGA).

Σχήμα 5.14 Αποτελέσματα μαγνητομετρίας για “καθαρά” ΝΣΟΣ παράγωγα νανοϋβριδικά υλικά.

Εικόνα 5.2 Στιγμιότυπα του αντιδραστήρα παρασκευής PNS#I μετά το πέρας της προσθήκης του διαλύματος συγκαταβύθισης και της εισαγωγή ατμοσφαιρικού αέρα για τον άμεσο μετασχηματισμό του μαγνητίτη σε μαγγεμίτη. Το μεσοδιάστημα μεταξύ των λήψεων ρυθμίστηκε στα 4 s.

Σχήμα 5.15 Φάσμα διέγερσης/εκπομπής φθορίζουσας μικροπηκτής PNS@F25 σε συγκέντρωση 25 μM και pH=7.

Σχήμα 5.16 Φάσμα διέγερσης/εκπομπής φθορίζουσας μικροπηκτής PNS@F25 σε συγκέντρωση [-CONHFL]=25 μM και pH=3.

Σχήμα 5.17 Φάσμα διέγερσης/εκπομπής τελικού νανοϋβριδικού PNS@F25#I10 σε συγκέντρωση C = 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (0.1% κ.β) και pH=7.

Κεφάλαιο 6

Σχήμα 6.1 Υδροχλωρικό άλας της δοξουβικίνης.

Εικόνα 6.1 Πειραματική πορεία ενθυλάκωσης DOX στις νανοπηκτές.

Εικόνα 6.2 Αιωρήματα PF@DOX (3), PFI@DOX (1) και PI@DOX(2) πριν (A) και μετά (B) την υπερφυγοκέντριση. (C) Στερεό υπόλειμμα.

Εικόνα 6.3 Μεμβράνη διαπίδσης με βιδωτό κλιπ στο άκρο, (A) πριν και (B) μετά την προσθήκη PFI@DOX και την τοποθέτηση στον κυλινδρικό περιέκτη. (C) Πλάγια όψη της διάταξης μετά την τοποθέτηση σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο.

Εικόνα 6.4 Από αριστερά προς τα δεξιά: Σύνθετο σήμα, σήμα φθορισμού και σήμα φωτεινού πεδίου συνεστιακής μικροσκοπίας PF_40μM_2h.

Εικόνα 6.5 Από αριστερά προς τα δεξιά: Σύνθετο σήμα, σήμα φθορισμού και σήμα φωτεινού πεδίου συνεστιακής μικροσκοπίας PF_40μM_1h (πρώτη σειρά), PF_20μM_30min (δεύτερη σειρά) και PFI_20μM_30min (τρίτη σειρά).

Εικόνα 6.6 Από αριστερά προς τα δεξιά: Σήμα φθορισμού του πράσινου καναλιού, σύνθετο σήμα και σήμα φθορισμού του κόκκινου καναλιού συνεστιακής μικροσκοπίας PF@DOX_20μM_30min (πρώτη σειρά), PFI@DOX_20μM_30min (δεύτερη σειρά) και PI@DOX_20μM_5min (τρίτη σειρά).

Σχήμα 6.2 Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων HeLa για επώαση 48h με διαφορετικές συγκεντρώσεις PF και PFI. Απεσταγμένο H₂O χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα ελέγχου.

Σχήμα 6.3 Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων HeLa για επώαση 48h με διαφορετικές συγκεντρώσεις DOX, PF@DOX και PFI@DOX.

Εικόνα 6.7 Αποδέσμευση DOX από τον νανοφορέα PFI@DOX σε pH=5. Όψη του αντιδραστήρα κατά την έναρξη του πειράματος (αριστερά) και έπειτα από 24 h (δεξιά). Είναι εμφανής ο αποχρωματισμός του αιωρήματος και ο χρωματισμός του διαλύματος αποδέσμευσης.

Σχήμα 6.4 Φάσματα UV-Vis αιωρήματος PFI@DOX πριν την έναρξη του πειράματος, διαλύματος αποδέσμευσης DOX έπειτα από 24h και πρόδρομου αιωρήματος PFI σε pH = 7.

Σχήμα 6.5 Φάσματα UV-Vis αιωρήματος PFI@DOX πριν την έναρξη του πειράματος και αιωρήματος PFI@DOX - διάλυματος αποδέσμευσης μετά από 24h.

Παράρτημα Κεφαλαίου 3

Σχήμα Π3.1 Προσομοίωση πειραματικών δεδομένων DLS: Μεταβολή της σκεδαζόμενη ακτινοβολίας $I(t)$ vs t (επάνω). Κανονικοποιημένης συνάρτησης αυτοσυσχέτισης $g^2(\tau)$ vs τ σε γραμμική (κάτω αριστερά) και ημιλογαριθμική κλίμακα (κάτω δεξιά).

Παράρτημα Κεφαλαίου 4

Σχήμα Π4.1 Μεταβολή έντασης σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (DCR) και δείκτη πολυδιασποράς (PDI) συναρτήσει της θερμοκρασίας για διαφορετικές τιμές του pH (Δείγμα PN_001).

Σχήμα Π4.2 Κατανομή σκεδαζόμενης έντασης (I_{scat}) συναρτήσει του σκεδάζοντος πληθυσμού (D_h) για το δείγμα PNS_002_15_min.

Σχήμα Π4.3 Μεταβολή έντασης σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (DCR) και δείκτη πολυδιασποράς (PDI) συναρτήσει της θερμοκρασίας σε pH=7 για το δείγμα PN_001.

Σχήμα Π4.4 Συνδυαστική αποκρισιμότητα σε θερμοκρασία-pH του δείγματος PNS_002_0_min. Ένθεση: Μετατόπιση της VPTT με αύξηση του pH από 4 σε 9.

Σχήμα Π4.5 Μεταβολή του δυναμικού-ζ συναρτήσει της θερμοκρασίας στο δείγμα PNS_002_25_min σε pH=7 (πράσινο χρώμα). Η αντίστοιχη μεταβολή της αγωγιμότητας στο κελί μέτρησης αναπαρίσταται με πορτοκαλί χρώμα.

Παράρτημα Κεφαλαίου 5

Σχήμα Π5.1 Φάσμα 250 MHz $^1\text{H-NMR}$ φθορεσίνης (FL).

Σχήμα Π5.2 Φάσμα 250 MHz $^1\text{H-NMR}$ αιθυλ-2-(6-υδροξυ-3-οξο-3H-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκού εστέρα (FL Ester).

Σχήμα Π5.3 Φάσμα 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ αιθυλ-2-(6-(2-((tert-βουτοξυκαρβονυλοαμινο) αιθοξυ)-3-οξο-3H-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκού εστέρα (FL-NH-Boc).

Σχήμα Π5.4 Φάσμα 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ τριφθοροξικού 2-((9-(2-(αιθόξυ)φαινυλο)-3-οξο-3H-ξανθεν-6-υλ)οξυ)αιθαν-1-αμμωνιακού άλατος (FL-NH₃⁺).

Σχήμα Π5.5 Φάσμα 100 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ αιθυλ-2-(6-(2-((tert-βουτοξυκαρβονυλο)αμινο) αιθοξυ)-3-οξο-3H-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκού εστέρα (FL-NH-Boc).

Σχήμα Π5.6 Φάσμα 100 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ τριφθοροξικού 2-((9-(2-(αιθόξυ)φαινυλο)-3-οξο-3H-ξανθεν-6-υλ)οξυ)αιθαν-1-αμμωνιακού άλατος (FL-NH₃⁺).

Σχήμα Π5.7 Φάσμα 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ 2-(6-(μεθακρυλοϋλ)-3-οξο-3H-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκού οξέος (FL-MAAc).

Σχήμα Π5.8 Συγκεντρωτικά φάσματα FT-IR των μοριακών ενώσεων FL, FL Ester, FL-NH-Boc και FL-NH₃⁺TFA⁻.

Σχήμα Π5.9 Φάσμα διέγερσης/εκπομπής FL-NH₂.

Παράρτημα Κεφαλαίου 6

Σχήμα Π6.1 Σμήνος φασμάτων απορρόφησης DOX σε μεταβλητή συγκέντρωση και κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης.

Εικόνα Π6.1 Κύτταρα HeLa έπειτα από τροφοδοσία με PI@DOX_20_μM για 30 min.

Σχήμα Π6.2 Φάσματα διέγερσης εκπομπής υδατικών διαλυμάτων DOX συγκέντρωσης 69.7 μM και 8 μM.

Εικόνα Π6.2 Φωτογραφία αντιδραστήρα αποδέσμευσης PFI@DOX σε pH=7 για t=24 h.

Εικόνα Π6.3 Πλάκες δοκιμής κυτταρικής βιωσιμότητας MTT.

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή - Σκοπός Διατριβής

Οι νέες ανάγκες στην θεραπευτική ζητούν τη στοχευμένη απόδοση ενεργών φαρμακευτικών ουσιών σε κύτταρα και ιστούς. Με αυτή την προσέγγιση μεγιστοποιείται η δράση της ουσίας στην προβληματική περιοχή (καρκινικός όγκος, χρόνια φλεγμονή), ενώ παράλληλα η συγκέντρωση στην συστηματική κυκλοφορία συγκρατείται σε χαμηλά επίπεδα, ελαχιστοποιώντας με τον τρόπο αυτό τις ανεπιθύμητες ενέργειες. Τα νανοδομημένα υβριδικά υλικά βρίσκονται στην πρώτη γραμμή των επιλογών για την ανάπτυξη “ευφών” συστημάτων μεταφοράς και απόδοσης φαρμακευτικών ουσιών, γεγονός που οφείλεται στην ικανότητα:

- α) φυσικής προσρόφησης και εγκλεισμού των ενεργών φαρμακευτικών συστατικών στο εσωτερικό της δομής τους
- β) τροποποίησης της επιφάνειάς τους με χημικές ομάδες που στοχεύουν σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες-υποδοχείς και ελαχιστοποιούν την αποβολή από τα μακροφάγα
- γ) ελεγχόμενης πρόσδωσης της ουσίας μέσω επιβολής εξωτερικού ερεθίσματος όπως η μεταβολή της θερμοκρασίας, του pH ή μέσω εφαρμογής εναλλασσόμενου μαγνητικού πεδίου.

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής υπήρξε η *ανάπτυξη*, η *αριστοποίηση* και ο *χαρακτηρισμός* ενός *νανοϋβριδικού συστήματος* το οποίο βασίζεται σε κολλοειδείς υδροπηκτές (μικροπηκτές) με βάση το πολυ(*N*-ισοπροπυλακρυλαμίδιο) [poly(*N*-isopropylacrylamide), PNiPAm] και προορίζεται για χρήση σε βιοϊατρικές εφαρμογές ενθυλάκωσης-ελεγχόμενης αποδέσμευσης υδρόφιλων φαρμάκων. Τα υλικά αυτής της κατηγορίας χαρακτηρίζονται από *νάνο-διαστάσεις*, *υδροφιλικότητα*, *πορώδες* και εμφανίζουν *θερμοδυναμική μετάπτωση φάσης* από την *διογκωμένη* (υδρόφιλη) στην *συρρικνωμένη* (υδρόφοβη) κατάσταση η οποία *ελέγχεται* από την θερμοκρασία. Οι μικροπηκτές υπερτερούν έναντι των εναλλακτικών συστημάτων (πολυμερικά μικύλια, δενδριτικά πολυμερή, ανόργανα νανοσωματίδια) σε μία σειρά παραμέτρων όπως η επίτευξη υψηλού ποσοστού ενθυλάκωσης, η ευελιξία χημικής τροποποίησης, η μεγάλη ειδική επιφάνεια και η πολλαπλή αποκρισσιμότητα.

Στα Κεφάλαια 2 και 3 συζητείται η βιβλιογραφική ανασκόπηση και η παρουσίαση των μεθόδων και τεχνικών χαρακτηρισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία, αντιστοίχως. Στο Κεφάλαιο 4 αναλύεται το πρωτόκολλο τυχαίου ριζικού συμπολυμερισμού απουσία τασιενεργού, που αναπτύχθηκε για την σύνθεση των μικροπηκτών PNiPAm με καρβοξυλικές λειτουργικές θέσεις και αριστοποιημένες ιδιότητες (διαστάσεις, κρίσιμη θερμοκρασία μεταπτώσεως, αρχιτεκτονική). Ο χαρακτηρισμός επιτελέστηκε με δυναμική σκέδαση φωτός, ηλεκτροφορετική σκέδαση φωτός και τιτλοδοτήσεις με βασικά και

πολυηλεκτρολυτικά διαλύματα. Όπως παρουσιάζεται στο Κεφάλαιο 5, τα υλικά χρησιμοποιήθηκαν ως κριώματα *i)* για την σύζευξη *φθορίζοντων* λειτουργικών μορίων, *ii)* την *in situ* εναπόθεση μαγνητικών νανοσωματιδίων και *iii)* τον συνδυασμό των προηγούμενων δύο σταδίων προς παρασκευή ενός τριπλά λειτουργικού *θερμοαποκρίσιμου-φθορίζοντος-μαγνητικού νανοϋβριδικού* συστήματος. Τα υλικά χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπικές τεχνικές (FT-IR, UV-Vis, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, φθορισμομετρία), μαγνητομετρία και θερμοσταθμική ανάλυση. Η χρησιμοποίηση του συστήματος για την ενθυλάκωση-ελεγχόμενη αποδέσμευση μίας φαρμακευτικής ουσίας, της δοξορουβικίνης, αποτέλεσε το αντικείμενο του Κεφαλαίου 6, όπου επίσης εξετάζεται η κυτταροτοξικότητα και κυτταρική πρόσληψη του συστήματος. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε μέσω του συνδυασμού φασματοσκοπικών τεχνικών και συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με laser.

Κεφάλαιο 2

Θεωρητικό Υπόβαθρο - Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

ΣΥΝΟΨΗ: Στο πρώτο μέρος του παρόντος Κεφαλαίου αποδίδονται ορισμοί και έννοιες που χρησιμοποιήθηκαν στην έκταση της παρούσης διατριβής, ενώ επιχειρείται η ευσύνοπτη περιγραφή των φυσικοχημικών αρχών που διέπουν το φαινόμενο της θερμοαποκρισιμότητας του πολυ(*N*-ισοπροπυλακρυλαμίδιου) (PNiPAM). Εν συνεχεία επισκοπείται σειρά εργασιών όπου υπογραμμίζεται η ποικιλότητα των λειτουργικών πολυμερικών κolloειδών συστημάτων στα οποία οι μικροπηκτές PNiPAM συμπεριλαμβάνονται ως το βασικό δομικό στοιχείο. Εξετάστηκαν συστήματα κolloειδών με βάση το PNiPAM σε εφαρμογές βιολογικού ενδιαφέροντος, ενώ τα συστήματα όπου η θερμοαποκρίσιμη πλατφόρμα του PNiPAM συνυπάρχει με ανόργανη, και δη μαγνητική, νανοφάση εξετάζονται ξεχωριστά ως προς τις συνθετικές πορείες παρασκευής και ως προς τις ιδιότητες. Ακολούθως σε επόμενη ενότητα, περιγράφονται τα φθορίζοντα πολυμερικά συστήματα με έμφαση στην φθορεσίνη (fluorescein) και στις εφαρμογές τους στην βιολογία. Τα συστήματα με πολλαπλή λειτουργικότητα και παραδείγματα χρησιμοποίησης για την ενθυλάκωση και αποδέσμευση φαρμάκων αποδίδονται στο τέλος του Κεφαλαίου.

2.1 Η Έννοια της Πολυμερικής Πηκτής

Οι πολυμερικής πηκτές είναι δυνατόν να οριστούν με συναφείς τρόπους οι οποίοι εξαρτώνται από την μικροσκοπική οπτική γωνία εξέτασης. Σύμφωνα με την IUPAC, μια πηκτή νοείται ως ένα “μη-ρευστό δίκτυο κolloειδών σωματιδίων ή πολυμερικό δίκτυο, το οποίο διογκώνεται σε όλη του την έκταση από κάποιο ρευστό” [1]. Ο Elias [2] περιορίζει την περιγραφή σε πολυμερικά συστήματα αναφέροντας ότι: “μία πηκτή συνίσταται από ένα χημικά ή φυσικά διασταυρωμένο πολυμερές, το οποίο βρίσκεται διογκωμένο σε μεγάλο βαθμό από κάποιο διαλύτη”. Σε αντιστοιχία με τον προηγούμενο ορισμό, οι υδροπηκτές θεωρούνται ως “τριδιάστατα διασταυρωμένα δίκτυα υδατοδιαλυτών πολυμερών με ικανότητα απορρόφησης ύδατος έως και χιλιάδες φορές επί του ξηρού τους βάρους” [3]. Θεμελιακά, οι πηκτές είναι τα υλικά όπου ενώ η σύσταση καθορίζεται από την ρευστή φάση, εμφανίζουν συνεκτικότητα στερεών σωμάτων. Στην πλειονότητα των εφαρμογών η ρευστή φάση είναι το νερό και ως εκ τούτου οι μακροσκοπικές *υδροπηκτές* και τα μικροσκοπικά ή νανοσκοπικά ανάλογα τους (*μικροπηκτές* ή *νανοπηκτές* αντίστοιχα), συνιστούν υλικά μεγάλης τεχνολογικής σημασίας. Παράλληλα, οι υδροπηκτές αποτελούν επίσης υλικά ευρύτατης εμπορικής απήχησης καθώς χρησιμοποιούνται ως ή είναι βασικό συστατικό σε τρόφιμα, απορροφητικές πάνες, φακούς επαφής, επικαλύψεις βιοϊατρικών

ηλεκτροδίων, εμφυτεύματα, χρώματα, συγκολλητικές ουσίες, μεταλλάκτες, τεχνητό δέρμα και εργαστηριακές τεχνικές όπως για παράδειγμα η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών [4].

Η συνεκτικότητα των υδροπηκτών οφείλεται στον σχηματισμό σταυροδεσμών μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων προς σχηματισμό ενός τρισδιάστατου δικτύου. Οι σταυροδεσμοί οφείλουν την ύπαρξη τους σε είτε σε φυσικές αλληλεπιδράσεις (σχηματισμός κρυσταλλιτών, αλληλοεμπλοκή αλυσίδων, υδροφοβική ή/και ιοντική έλξη και δεσμούς υδρογόνου) είτε στον σχηματισμό μόνιμων χημικών δεσμών ομοιοπολικής φύσης. Στην πρώτη περίπτωση η μετάβαση από το πήκτωμα στο διάλυμα είναι αντιστρεπτή μεταβάλλοντας τις συνθήκες (θερμοκρασία, pH, διάτμηση, είδος διαλύτη) ενώ αντιθέτως στην δεύτερη περίπτωση, η λύση του πηκτώματος δεν είναι εφικτή παρά μόνο με ρήξη δεσμών. Ένας από τους βασικούς λόγους για τους οποίους οι υδροπηκτές συνεχίζουν να προσελκύουν τεράστιο ερευνητικό ενδιαφέρον, αποτελεί η δυνατότητα αντιστρεπτής μεταβολής του όγκου υπό την επίδραση εξωτερικών ερεθισμάτων όπως αλλαγές στην θερμοκρασία, το pH ή την ιοντική ισχύ, ανάλογα με το είδος του πολυμερούς από το οποίο συνίστανται. Συγκεκριμένα για την περίπτωση των θερμοαποκρίσιμων υδροπηκτών, υφίσταται μία κρίσιμη *θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης όγκου (volume phase transition temperature, VPTT)*. Οι φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις οι οποίες γενικά ερμηνεύουν την αποκρίσιμη συμπεριφορά των υδροπηκτών έχουν κατηγοριοποιηθεί σύμφωνα με τους Tanaka [5] και Fernández-Barbero [4] ως εξής:

- **van der Waals:** Οι ελκτικές δυνάμεις αυτού του είδους εγείρονται από τις τοπικές διακυμάνσεις της πόλωσης μεταξύ γειτονικών μορίων και συμπεριλαμβάνουν τις αλληλεπιδράσεις *i)* μεταξύ μόνιμων διπόλων, *ii)* μεταξύ μόνιμου διπόλου - επαγόμενου διπόλου (δυνάμεις επαγωγής) και *iii)* μεταξύ στιγμιαίου διπόλου - επαγόμενου διπόλου (δυνάμεις διασποράς). Οι αλληλεπιδράσεις van der Waals εκτείνονται από το ατομικό επίπεδο μέχρι αποστάσεις μερικών nm. Δεν διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε υδατικά μέσα, καθώς οι διπολικές αλληλεπιδράσεις εξασθενούν λόγω της μεγάλης διηλεκτρικής σταθεράς, είναι όμως καθοριστικές σε συστήματα μιγμάτων διαλυτών.
- **Υδροφοβικές:** Ο δεδομένος τύπος αλληλεπιδράσεων περιγράφει την *διαμοριακή έλξη* μεταξύ υδρόφοβων μορίων ή την *ενδομοριακή έλξη* υδρόφοβων τμημάτων μορίων όταν περιβάλλονται από H₂O. Έχει εντροπική προέλευση και θα αναλυθεί διεξοδικότερα σε επόμενη παράγραφο, καθώς αυτός ο τύπος αλληλεπιδράσεων συσχετίζεται άμεσα με την θερμοαποκρίσιμότητα των υδροπηκτών με βάση το PNIPAm.
- **Δεσμοί υδρογόνου:** Πρόκειται για αλληλεπιδράσεις οι οποίες αναπτύσσονται όταν σε άτομο υδρογόνου, συνδεδεμένο ομοιοπολικά με ηλεκτραρνητικό άτομο O, N ή F, ασκείται ελκτική δύναμη από κοντινό ηλεκτραρνητικό άτομο άλλης ομάδας. Η φύση του δεσμού είναι κατευθυντική και οι δεσμοί-H είναι προεξέχουσας σημασίας σε βιολογικές δομές όπως οι κυτταρικές μεμβράνες, οι πρωτεΐνες και το νουκλεϊκά οξέα. Στην

περίπτωση των συνθετικών υδροπηκτών, οι δεσμοί-H εμφανίζονται κυρίως σε συστήματα τα οποία περιέχουν καρβοξυλομάδες και ανάλογα με την ευκαμψία της πολυμερικής αλυσίδας αναπτύσσονται τόσο *διαμοριακά* όσο και *ενδομοριακά*.

- **Ηλεκτροστατικές:** Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις αναπτύσσονται μεταξύ μορίων με φορτισμένες ομάδες ή μεταξύ ιόντων. Πρόκειται για την ισχυρότερη αλληλεπίδραση όταν συγκρίνεται με τις παραπάνω. Διαδραματίζει σημαίνων ρόλο στην μετάπτωση φάσης όγκου των υδροπηκτών μέσω δύο διακριτών, πλην όμως συζευγμένων, μηχανισμών: *i*) της άμεσης, ελκτικής ή απωστικής ανάλογα με το πρόσημο του φορτίου, αλληλεπίδρασης Coulomb μεταξύ των φορτισμένων ομάδων και *ii*) του έμμεσου αποτελέσματος από την παρουσία αντισταθμιστικών ιόντων στο πορώδες του δικτύου, την ανάπτυξη δηλαδή ωσμωτικής πίεσης η οποία τείνει να διογκώσει την υδροπηκτή.

Όπως θα αναδειχθεί στο Πειραματικό Μέρος, η φυσικοχημική συμπεριφορά των θερμοαποκρίσιμων και pH-αποκρίσιμων μικροπηκτών καθορίζεται από την έκταση και την ισχύ των παραπάνω αλληλεπιδράσεων, εξαιρουμένων των van der Waals.

2.2 Λειτουργικές Πολυμερικές Μικροπηκτές με Βάση το PNIPAm

Από την στιγμή της ανακάλυψής τους το 1986 [6] έως και σήμερα οι πολυμερικές μικροπηκτές με βασικό συστατικό το PNIPAm συνεχίζουν να έλκουν το ερευνητικό ενδιαφέρον και να αποτελούν τη βάση καινοτόμων εφαρμογών [7]. Η μεγάλη “δημοφιλία” της συγκεκριμένης κλάσης υλικών οφείλεται στον συνδυασμό βιοσυμβατότητας [8] και θερμοαποκρίσιμου χαρακτήρα, καθιστώντας τα ιδανικά για ενσωμάτωση σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Από την άλλη πλευρά, ο ταυτόχρονος έλεγχος του μεγέθους και των μορφολογικών χαρακτηριστικών, η επίτευξη πολλαπλής αποκρισιμότητας και η παρατεταμένη κολλοειδής σταθερότητα παραμένουν ανοικτά πεδία προς εξερεύνηση. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση εφαρμογών μεταφοράς και ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμακευτικών ουσιών, οι παραπάνω φυσικοχημικές παράμετροι έχει αποδειχθεί ότι επιδρούν σημαντικά στον χρόνο κυκλοφορίας του φορέα στην ροή του αίματος, στο ποσοστό ενθυλάκωσης, όπως επίσης και στην επιλεκτικότητα του ερεθίσματος [9-11]. Οι Pelton και Hoare [12] όρισαν τις μικροπηκτές ως “τις κολλοειδείς διασπορές σωματιδίων πηκτής”. Τρία κριτήρια περιέχονται υπόρρητα σε αυτό τον ορισμό:

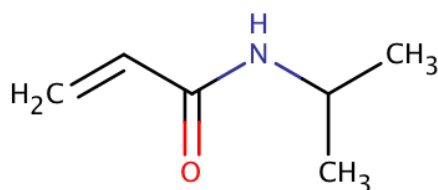
1. Οι μικροπηκτές εμπίπτουν στην κλίμακα μεγέθους των κολλοειδών σωματιδίων (τυπικά 10–1000 nm).
2. Οι μικροπηκτές *βρίσκονται διάσπαρτες* στον διαλύτη.
3. Οι μικροπηκτές *είναι διογκωμένες από τον* διαλύτη.

Παρόλο που οι μικροπηκτές μοιράζονται ακριβώς την ίδια χημική σύσταση και διέπονται από τις ίδιες θερμοδυναμικές αρχές με τις μακροσκοπικές υδροπηκτές, επιδεικνύουν

ουσιώδεις διαφορές. Για παράδειγμα, σε παρεμφερή κλάσματα μάζας, οι μικροπηκτές συγκροτούν διασπορές χαμηλού ιξώδους ενώ οι μακροπηκτές εμφανίζουν χακτήρα ιξωδοελαστικού στερεού [13]. Όσον αφορά την αποκρισιμότητα, η μετάπτωση φάση όγκου πραγματοποιείται πολύ ταχύτερα στις μικροπηκτές ενώ εξίσου ελκυστικό χαρακτηριστικό αποτελεί η τεράστια ειδική επιφάνεια των υλικών σαν απόρροια των κολλοειδών διαστάσεων. Είναι ενδεικτικό ότι πρόσφατα προτάθηκε ένα πρωτόκολο σύνθεσης νανοδομημένων μακροσκοπικών πηκτών PNIPAm, στις οποίες νανοπηκτές PNIPAm με δραστικές θέσεις στην επιφάνεια επιτέλεσαν τον ρόλο των νάνο-σταυροδεσμών, προσδίδοντας στο τελικό υλικό ταχύτερη απόκριση, μεγαλύτερο βαθμό διόγκωσης και υψηλή ελαστομερική ελαστικότητα [14].

2.2.1 Μικροπηκτές PNIPAm: Συνθετικά Σχήματα και Θερμοδυναμική Προέλευση της Θερμοαποκρισιμότητας

Τυπικά, η απλούστερη συνθετική πορεία για την παρασκευή μικροπηκτών PNIPAm σε υδατικά μέσα περιλαμβάνει το μονομερές NiPAm (Σχήμα 2.1), τον παράγοντα σχηματισμού σταυροδεσμών και τον εκκινητή. Μία παραλλαγή του πολυμερισμού διασποράς (dispersion polymerization), ο πολυμερισμός κατακρήμνισης (precipitation polymerization) [15], αποτελεί την πιο διαδεδομένη τεχνική για την παρασκευή μικροπηκτών με βάση το PNIPAm. Στον πολυμερισμό κατακρήμνισης, τα μονομερή και ο εκκινητής αναμιγνύονται υπό θέρμανση για την έναρξη του πολυμερισμού. Αφού προσεγγίσουν ένα κρίσιμο μοριακό βάρος, οι αναπτυσσόμενες αλυσίδες καθίστανται αδιάλυτες (κατακρημνίζονται), εξ ου και η ονομασία της τεχνικής, η οποία αναλύεται λεπτομερώς στο Πειραματικό Μέρος.



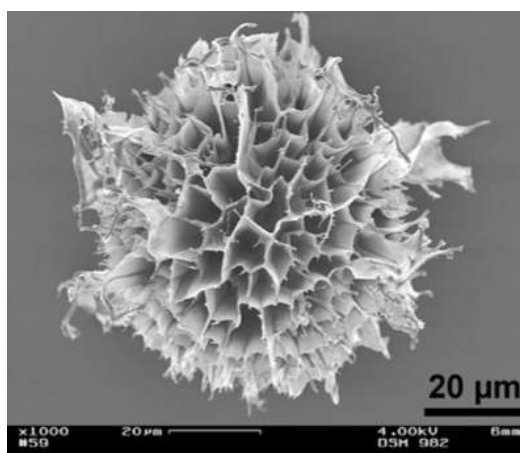
Σχήμα 2.1 Ο συντακτικός τύπος του N-ισοπροπυλακρυλαμιδίου.

Παραδοσιακά, το μέγεθος των κολλοειδών σωματιδίων με βάση το PNIPAm μπορεί να ρυθμιστεί με την προσθήκη SDS στην αντίδραση πολυμερισμού [16]. Ταυτόχρονα όμως υπεισέρχεται μία σειρά περιπλοκών στο στάδιο του χαρακτηρισμού και προβλημάτων σε ενδεχόμενη εφαρμογή. Αναλυτικότερα για το σύστημα το οποίο μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή, το SDS:

1. Είναι δυνατόν να ανεβάζει πλασματικά την θερμοκρασία της μετάπτωσης όγκου VPTT και να μεταβάλλει το προφίλ μετάβασης στην “υδρόφοβη” κατάσταση [17].
2. Προσροφάται στις ισοπροπυλικές θέσεις του δικτύου [18], με αποτέλεσμα την απαίτηση πολλαπλών κύκλων υπερφυγοκέντρισης και επαναδιασποράς ή χρονοβόρας διαπίδησης μεμβράνης για τον καθαρισμό της κολλοειδούς διασποράς [19, 20]. Το κλάσμα των αρνητικά φορτισμένων σουλφονικών ομάδων το οποίο παραμένει προσροφημένο είναι ανιχνεύσιμο σε πειράματα τιτλοδότησης και μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα σχετικά με το ποσοστό ενσωμάτωσης ενός αρνητικά φορτισμένου μονομερούς.
3. Καταλαμβάνει θέσεις στο πορώδες του δικτύου, γεγονός το οποίο είναι ανεπιθύμητο σε πειράματα ενθυλάκωσης ενεργών φαρμακευτικών μορίων.
4. Δεν είναι βιολογικά ανεκτό και αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες [21, 22].
5. Ενδέχεται να αλληλεπιδρά με αντιδρώντα κατά την πραγματοποίηση χημικής μετατροποποίησης των μικροπηκτών, εξαιτίας της ασθενούς πυρηνοφιλικότητας της σουλφονικής ομάδας .

Οι παραπάνω λόγοι οδήγησαν στον αποκλεισμό του SDS από το συνθετικό πρωτόκολλο αριστοποίησης και όπως θα γίνει σαφές στην πορεία, ο έλεγχος του μεγέθους κατέστη εφικτός μέσω της ρύθμισης λοιπών συνθετικών παραμέτρων.

Οι μόνιμοι χημικοί σταυροδεσμοί εξασφαλίζουν την διαστατική σταθερότητα των μικροπηκτών κατά την διόγκωση τους σε καλό “διαλύτη”, καθώς επιμέρους τμήματα των μακρομοριακών αλυσίδων είναι ελεύθερα να κινηθούν, την ίδια στιγμή όμως οι ομοιοπολικές συνδέσεις συγκρατούν την όλη νανοδομή. Η πορώδης δομή του τρισδιάστατου δικτύου είναι εμφανής στην απεικόνιση με ηλεκτρονιακή μικροσκοπία σάρωσης μίας απομονωμένης μικροπηκτικής PNiPAm μικροσκοπικών διαστάσεων (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1 Φωτογραφία ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας σάρωσης πολυμερικού σωματιδίου PNiPAm μεσοσκοπικών διαστάσεων με εμφανή την πορώδη δομή του τρισδιάστατου δικτύου [15].

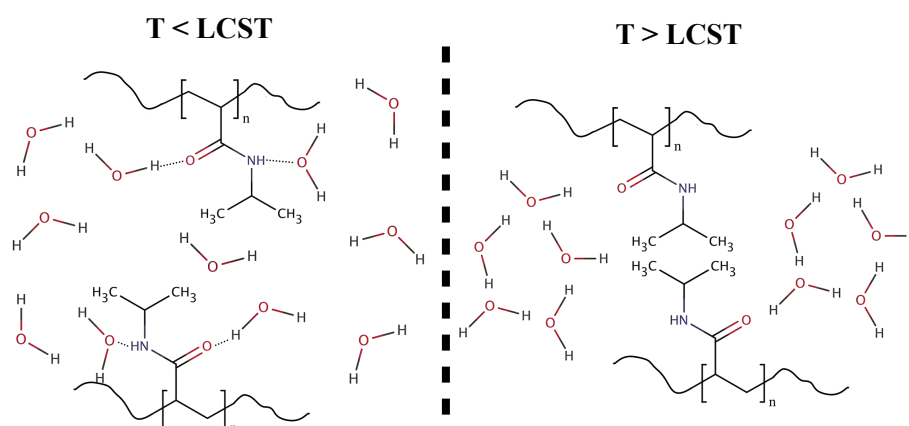
Αξίζει να σημειωθεί ότι βιβλιογραφικά έχουν αναφερθεί ακόμα περισσότερο μινιμαλιστικά συνθετικά σχήματα για τον σχηματισμό μονοδιάσπαρτων, κολλοειδώς και διαστατικώς σταθερών σωματιδίων. Σύμφωνα με τους Gao και Frisken [23], μόνιμοι χημικοί δεσμοί σχηματίζονται τόσο απουσία παράγοντα σχηματισμού σταυροδεσμών κατά τον πολυμερισμό του NiPAm όσο και μέσω της θέρμανσης διαλύματος ήδη συντεθειμένων γραμμικών αλυσίδων PNiPAm παρουσία εκκινητή, αποδίδοντας το φαινόμενο σε αντιδράσεις μεταφοράς αλυσίδας. Ο συνηθέστερος παράγοντας σχηματισμού σταυροδεσμών είναι το *N,N'*-μεθυλεν-δις-ακρυλαμίδιο λόγω της πολύ καλής διαλυτότητας σε H₂O και της παρεμφερούς δομής και χημικής συμπεριφοράς κατά τον πολυμερισμό με το NiPAm. Επίσης, πληθώρα διδραστικών μορίων (φέροντα δύο πολυμερίσιμους διπλούς δεσμού) έχει προταθεί στην βιβλιογραφία ως παράγοντες σχηματισμού σταυροδεσμών όπως για παράδειγμα οι διμεθακρυλικοί εστέρες της πολυαιθυλενογλυκόλης [24], η 1,4-διακρυλοϋλ πιπεραζίνη [25], βιοδιασπώμενοι εστέρες πολυλακτικού οξέος [26], ακρυλικοί εστέρες δενδριτικής πολυγλυκερόλης [27] και η υδρολυτικά αποικοδομήσιμη *N,O*-διμεθακρυλοϋλ υδροξυαμίνη [28]. Όσον αφορά τα συστήματα εκκινητών, συνήθως πρόκειται για υδατοδιαλυτά παράγωγα αζωενώσεων και υπερθειικά άλατα. Συγκεκριμένα, κατά την αποικοδόμηση των υπερθειικών αλάτων παράγονται αρνητικά φορτισμένες ρίζες οι οποίες αντιδρούν με τα μονομερή και παράλληλα συμβάλλουν στην κολλοειδή σταθερότητα της διασποράς. Η σταθερότητα των κολλοειδών σωματιδίων από PNiPAm σε θερμοκρασία κάτω από την VPTT εξασφαλίζεται διττά από τα φορτισμένα κατάλοιπα του εκκινητή και μέσω της στερικής σταθεροποίησης που παρέχουν τα ελεύθερα άκρα των αλυσίδων στο κέλυφος της μικροπηκτής. Ο δεύτερος μηχανισμός προκύπτει από την ανάμιξη των αλυσίδων, όταν υφίσταται αλληλεπικάλυψη των υδροδυναμικών όγκων έταιρων κολλοειδών και ουσιαστικά πρόκειται για έναν όρο ο οποίος προκύπτει από την ανάπτυξη ωσμωτικής πίεσης [29]. Επάνω από την VPTT, η κολλοειδής σταθερότητα εξασφαλίζεται αποκλειστικά μέσω απωστικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, που όπως θα συζητηθεί στην συνέχεια, μπορεί να οφείλονται επιπλέον σε φορτισμένα κατάλοιπα συμμοномерών.

Τα θερμοαποκρίσιμα πολυμερή χωρίζονται σε δύο ευρείες κατηγορίες: στα πολυμερή όπου επέρχεται αναμιξιμότητα με τον διαλύτη όταν αυξάνεται η θερμοκρασία, εμφανίζοντας μία *άνω κρίσιμη θερμοκρασία διαλυτότητας (upper critical solution temperature, UCST)* και σε αυτά όπου η άνοδος της θερμοκρασίας οδηγεί σε διαχωρισμό φάσεων και χαρακτηρίζονται από μία *κάτω κρίσιμη θερμοκρασία διαλυτότητας (lower critical solution temperature, LCST)*. Στην ανασκόπηση των Liu, Fraylich και Saunders [30] καλύπτεται ένα αρκετά ευρύ φάσμα θερμοαποκρίσιμων πολυμερών. Μεταξύ των πολυμερών με LCST συμπεριφορά, ιδιαίτερη προσοχή έχει δοθεί σε όσα συστήματα παρουσιάζουν προοπτική για χρήση σε βιοϊατρικές εφαρμογές και πληρούν δύο βασικές προϋποθέσεις: βιολογική ανοχή (βιοσυμβατότητα ή/και βιοαποικοδομησιμότητα) και θερμοκρασία

μετάπτωσης φάσης κοντά στην φυσιολογική θερμοκρασία του σώματος (36.7 °C). Τα πολυμερή με βάση το πολυ(*N*-ισοπροπυλακρυλαμίδιο) [poly(*N*-isopropylacrylamide), PNiPAm) βρίσκονται ευθυγραμμισμένα με αυτά τα κριτήρια καθώς η εγγενής LCST (~ 32 °C) είναι ευέλικτο να ρυθμιστεί σε μεγαλύτερες τιμές μέσω του συμπολυμερισμού υδρόφιλων μονομερών. Δεν ξενίζει λοιπόν το γεγονός ότι περίπου 30 χρόνια μετά την ανακάλυψή τους, οι μικροπηκτές με βάση το PNiPAm και οι συναφείς νανοϋβριδικές δομές συνεχίζουν να αποτελούν αντικείμενο εντατικής ερευνητικής δραστηριότητας.

Για την φυσικοχημική εξέταση του φαινομένου της θερμικής απόκρισης στις μικροπηκτές PNiPAm κρίνεται σκόπιμη μία σύντομη αναφορά στην συμπεριφορά των αντίστοιχων γραμμικών πολυμερών σε υδατικά διαλύματα. Η παράμετρος αλληλεπίδρασης Flory-Huggins, χ , συνιστά το κριτήριο διαλυτότητας ή μη ενός πολυμερούς σε έναν διαλύτη. Σύμφωνα με την θεμελιώδη θεωρία του Flory, το χ είναι μία *ενθαλπική* παράμετρος, το μέτρο της οποίας μπορεί να εκφραστεί από μία σχέση της μορφής $\chi = A + B/T$, όπου A, B : σταθερές και T : θερμοκρασία. Η θεωρία του Flory μπορεί να περιγράψει την περίπτωση εμφάνισης ανώτερης κρίσιμης θερμοκρασίας διαλυτότητας, δεν καλύπτει όμως την περίπτωση εμφάνισης LCST [31]. Φαινομενολογικά, στην περίπτωση των υδατικών διαλυμάτων γραμμικών πολυμερών PNiPAm ενώ ισχύει ότι $\chi < 1/2$ σε $T < LCST$ (το νερό είναι καλός διαλύτης), η τιμή του χ αυξάνεται απότομα στην κρίσιμη θερμοκρασία (ισχύει δηλαδή ότι $\chi > 1/2$) και το νερό παύει να είναι καλός διαλύτης για $T > LCST$ [32]. Το φαινόμενο της LCST έχει εντροπική προέλευση και στα πλαίσια της παρούσης βιβλιογραφικής ανασκόπησης, η πληρέστερη *ποιοτική περιγραφή* του φαινομένου της θερμοαποκρισιμότητας στα γραμμικά πολυμερή PNiPAm εντοπίστηκε στην μονογραφία του Schild [33]. Σύμφωνα με τον Schild, η διαλυτότητα του PNiPAm σε χαμηλή θερμοκρασία οφείλεται στον σχηματισμό δεσμών-Η μεταξύ των μορίων του H₂O και των πολικών (αμιδικών) ομάδων των μονομερικών στοιχείων του PNiPAM. Ο σχηματισμός δεσμών-Η είναι μία εξώθερμη διεργασία, προσδίδει αρνητικό πρόσημο στην ενθαλπία ανάμιξης και η συνολική ελεύθερη ενέργεια ανάμιξης παραμένει αρνητική εξαιτίας της συνεισφοράς αυτού του όρου. Την ίδια στιγμή όμως η παρουσία των μη-πολικών ισοπροπυλικών ομάδων στα μονομερικά στοιχεία του PNiPAM αναγκάζουν τα μόρια του H₂O να επαναπροσανατολιστούν με τρόπο τέτοιο ώστε να αποφεύγεται η ετεροεπαφή με αυτές τις ομάδες του πολυμερούς. Αυτή η διεργασία αφενός παρεμποδίζει τον σχηματισμό δεσμών-Η μεταξύ των ιδίων των μορίων του H₂O γύρω από τις μη-πολικές περιοχές και αφετέρου οδηγεί τα μόρια του H₂O στην υιοθέτηση μίας περισσότερο οργανωμένης “δομής-κλωβού” (clathrate-like ή cage-like structures). Αυτό είναι το γνωστό *υδροφοβικό φαινόμενο* και έχει ως αποτέλεσμα την αρνητική εντροπία ανάμιξης πολυμερούς-διαλύτη. Σε υψηλές θερμοκρασίες, ο αρνητικός όρος της εντροπίας ανάμιξης κυριαρχεί έναντι του κατά τα άλλα αρνητικού όρου της ενθαλπίας ανάμιξης. Όταν το πρόσημο της ελεύθερης ενέργειας ανάμιξης γίνει θετικό,

πραγματοποιείται η μετάπτωση φάσης και το PNIPAm καθίσταται αδιάλυτο σε θερμοκρασία πάνω από την LCST. Όταν η συγκέντρωση σε πολυμερές είναι αρκούντως υψηλή και απουσιάζουν σταθεροποιητικοί παράγοντες όπως τασιενεργές ενώσεις, σχηματίζονται θρόμβοι και το πολυμερές σταδιακά κατακρημνίζεται, επέρχεται δηλαδή ο διαχωρισμός φάσεων. Η αντιστοιχία αυτής της διεργασίας στις μικροπηκτές PNIPAm έχει παρουσιαστεί στο άρθρο ανασκόπησης των Quesada-Perez et al. [34]. Το τρισδιάστατο δίκτυο των μικροπηκτών συνίσταται από τμήματα γραμμικών αλυσίδων PNIPAm τα οποία βρίσκονται συνδεδεμένα μεταξύ τους με μόνιμους χημικούς σταυροδεσμούς: η αναδίπλωση των επιμέρους αλυσίδων του πολυμερούς πάνω από την LCST προκαλεί την συρρίκνωση του δικτύου λόγω της προαγωγής των επαφών πολυμερούς-πολυμερούς και διαλύτη-διαλύτη έναντι των ετεροεπαφών πολυμερούς-διαλύτη. Η διεργασία αποδίδεται σχηματικά στο Σχήμα 2.2. Πρέπει να τονιστεί ότι οι μικροπηκτές με βάση το PNIPAm συγκρατούν μεγάλο ποσοστό H₂O εντός του δικτύου ακόμα και σε $T \gg VPTT$ [35]. Σε όλη την εργασία, ο όρος VPTT χρησιμοποιήθηκε για την περίπτωση των μικροπηκτών με βάση το PNIPAm έναντι του LCST, καθώς κρίθηκε καταλληλότερος, αν και στην βιβλιογραφία οι όροι είναι ταυτόσημοι.



Σχήμα 2.2 Σκαρίφημα της θερμοδυναμικής μετάπτωσης φάσης όπου αναπαρίσταται η ανάπτυξη δεσμών-H μεταξύ των μορίων H₂O και της αμιδικής ομάδας κάτω από την LCST και η υδροφοβική αλληλεπίδραση μεταξύ των ισοπροπυλικών ομάδων πάνω από την LCST.

2.2.2 Ομοιοπολική Ενσωμάτωση Λειτουργικών Συμμοномерών σε Μικροπηκτές PNIPAm και Αντιδράσεις Τροποποίησης μετά τον Πολυμερισμό

Η παρασκευή προηγμένων νανοϋλικών με βασικό δομικό στοιχείο τις μικροπηκτές PNIPAm απαιτεί ως προϋπόθεση την ενσωμάτωση ομάδων με χημική λειτουργικότητα, είτε μέσω της απευθείας ομοιοπολικής εισαγωγής στο στάδιο του πολυμερισμού, είτε μέσω

αντιδράσεων τροποποίησης μετά τον πολυμερισμό (*post-polymerization modification* ή αλλιώς *αντιδράσεις μετατροποποίησης, post-modification reactions*) [36]. Αν και η πρώτη εκδοχή είναι λιγότερο χρονοβόρα, καθώς το λειτουργικό υλικό συντίθεται σε ένα μόνο στάδιο, η δεύτερη προσέγγιση είναι συνηθέστερη διότι παρακάμπτονται προβλήματα που σχετίζονται με την σύνθεση πολυμερίσιμων λειτουργικών μορίων, την διαλυτότητα και την σταθερότητα αυτών στις συνθήκες πολυμερισμού καθώς επίσης και με το κόστος. Επιπλέον, η ενσωμάτωση δραστικών χημικών ομάδων στις μικροπηκτές (π.χ. -COOH, -NH₂, επόξυ) με ταυτόχρονο έλεγχο της αρχιτεκτονικής (π.χ. δραστηκότητα στον πυρήνα ή το κέλυφος) παρέχει ένα υλικό με υψηλό βαθμό ευελιξίας όσον αφορά το είδος της επικείμενης εφαρμογής.

Η σύνθεση μικροπηκτών PNiPAm με όξινες δραστικές θέσεις έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία [37, 38] και τα συστήματα αυτά εξετάζονται διεξοδικά στο Κεφάλαιο 4. Οι Tang et al. [39, 40] συνέθεσαν μικροπηκτές PNiPAm με δραστικές ομάδες -OH χρησιμοποιώντας τον μεθακρυλικό εστέρα της πολυαιθυλενογλυκόλης, ενώ εποξειδικές δραστηκότητες έχουν εισαχθεί με συμπολυμερισμό γλυκιδυλομεθακρυλικού εστέρα [41]. Διάφορες οδοί έχουν προταθεί για την παραγωγή μικροπηκτών με πρωτοταγείς αμίνες ως δραστικές θέσεις. Οι Chen et al. παρασκεύασαν core/shell μικροπηκτές με πυρήνα PNiPAm και -NH₂ λειτουργικό κέλυφος από τον ενοφθαλισμό (*grafting*) προσυντεθειμένης πολυβινυλαμίνης, παρουσία *tert*-βουτυλυδροϋπεροξειδίου [42]. Οι Xu και Pelton κατέληξαν στην ίδια μορφολογία έπειτα από τον ενοφθαλισμό ολιγομερών *N*-βινυλοφορμαμίδιου στην επιφάνεια προσχηματισμένων μικροπηκτών PNiPAm και την εν συνεχεία υδρόλυση σε όξινες συνθήκες πάνω από την VPTT [43]. Απλούστερα συνθετικά πρωτόκολα για την ενσωμάτωση αμινομάδων περιλαμβάνουν τον συμπολυμερισμό αλλυλαμίνης [44], υδροχλωρικού *N*-(3-αμινοπροπυλ) μεθακρυλαμίδιου (APM) [45] και μεθακρυλοϋλ υδραζιδίου [46], ενώ οι Kiriy et al. [47] κατάφεραν να προσθέσουν πρωτοταγείς αμίνες μέσω της αναδιάταξης Hoffman δομικών μονάδων ακρυλαμίδιου. Καμμία από όσες προσεγγίσεις εξετάστηκαν έως τώρα δεν στέκεται χρήσιμη για την παρασκευή μικροπηκτών με βάση το PNiPAm όπου καρβοξυλικές ομάδες και πρωτοταγείς αμίνες συνυπάρχουν, είτε λόγω της ασυμβατότητας του συστήματος εκκίνησης για ένα εκ των δύο δραστικών μονομερών, είτε γιατί επακόλουθες αντιδράσεις σύζευξης με καρβοδιμίδια θα καθίσταντο προβληματικές λόγω της διασταυρωμένης δραστηκότητας. Αναγνωρίζοντας αυτές τις συνθετικές δυσκολίες, η ομάδα του Lyon [48] παρασκεύασε μικροπηκτές PNiPAm με άμινο και καρβόξυ δραστικές ομάδες έπειτα από τον συμπολυμερισμό μακρομονομερούς πολυαιθυλενογλυκόλης με άκρο φθορενυλομεθοξυκαρβόνυλο (Fmoc) προστατευμένης αμίνης, παρουσία ακρυλικού οξέος (AAc). Η δυνατότητα διπλής χημικής μετατροποποίησης αποδείχθηκε μέσα από την σύζευξη της 5-αμινοφθορεσίνης στις καρβοξυλικές θέσεις με υδατική χημεία καρβοδιμιδίων

χρησιμοποιώντας EDC/NHS, την αποπροστασία της αμίνης και της εκλεκτικής σύζευξης ενός σουκινιμιδικού παραγώγου της ροδαμίνης στις ελεύθερες θέσεις $-NH_2$.

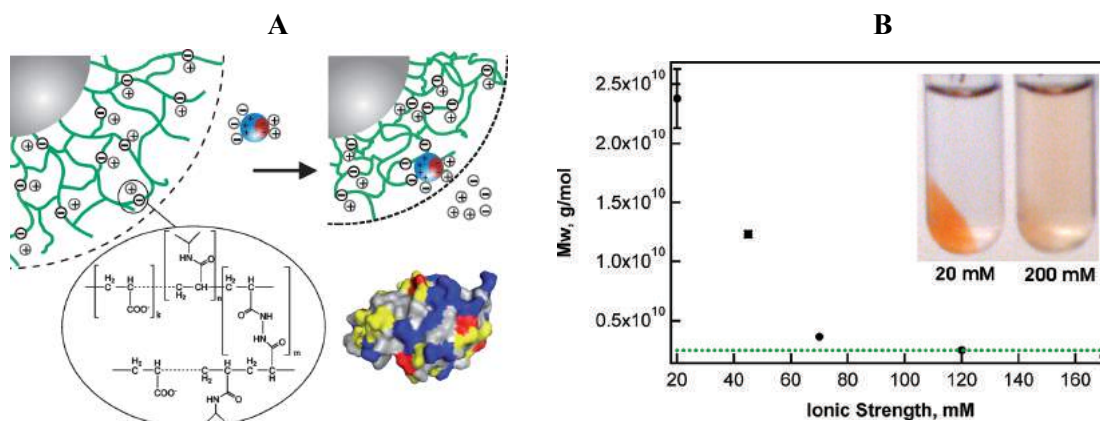
Αμφοτερικές μικροπηκτές PNIPAM έχουν παρασκευαστεί με τον συμπολυμερισμό 1-βινυλοϊμιδαζολίου (VI) και AAc [49], ενώ πολύ πρόσφατα οι ομάδες των Pich και Richtering ανέφεραν τον επιτυχημένο συμπολυμερισμό ενός μεθακρυλαμιδικού παραγώγου της σουλφοβεταΐνης [50]. Η σύνθεση κατιονικών μικροπηκτών PNIPAM έχει αναφερθεί χρησιμοποιώντας μεθακρυλικό 2-(διμεθυλαμινο)αιθυλεστέρα [51], 4-βινυλοπυριδίνη [52-55] και 2-βινυλοπυριδίνη [56]. Η πρωτονίωση του τριτοταγούς ατόμου του αζώτου σε χαμηλό pH καθιστά τις μικροπηκτές αυτού του τύπου διπλά αποκρίσιμες σε μεταβολές της θερμοκρασίας και του pH.

Τα τελευταία χρόνια οι μικροπηκτές PNIPAM με απόκριση στην γλυκόζη έχουν συγκροτήσει μία νέα υποομάδα νανοϋλικών. Όπως αναδείχθηκε στην πρωτοποριακή εργασία του Kataoka [57], η πρόσδεση ομάδων φαινυλβορονικού οξέος σε πηκτές PNIPAM είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός υλικού που αποκρίνεται δυναμικά σε αλλαγές της συγκέντρωσης γλυκόζης με αυτόματη απελευθέρωση ινσουλίνης. Έκτοτε, η παρασκευή των νανο-αναλόγων συστημάτων συγκέντρωσε μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον, καθώς δυνητικά θα καθιστούσε εφικτή την μικρορύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος όταν παρατηρούνταν ανιχνεύσιμες μεταβολές. Οι Pelton και Hoare σύζευξαν με υδατική χημεία καρβοδιμιδίων το 3-αμινοφαινυλβορονικό όξύ σε μικροπηκτές PNIPAM με μεταβλητό χωροεντοπισμό καρβοξυλομάδων [58]. Όπως αποδείχθηκε, το ποσοστό σύζευξης βρέθηκε μέγιστο στις μικροπηκτές με περιφερική συγκέντρωση ομάδων $-COOH$ καθώς η αντίδραση ελέγχεται από την διάχυση, ενώ το ίδιο συνθετικό σχήμα εφαρμόστηκε από τους Zhou et al. [59] για την τροποποίηση μικροπηκτών $P(NiPAM-co-AAc)$. Οι Zhang et al. παρασκεύασαν τα ίδια υλικά με τον συμπολυμερισμό του 3-(ακρυλαμιδο)φαινυλβορονικού οξέος (APBA) [60], τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ενθυλάκωση γλυκόζης και ερυθρού της αλιζαρίνης σε χαμηλές θερμοκρασίας και την αποβολή τους επάνω από την VPTT. Στην πιο πρόσφατη εργασία από τις παραπάνω, οι Lapeyre et al. πέτυχαν ένα πρώτο βήμα προς την κατεύθυνση ανάπτυξης ενός νανοφορέα με χαρακτηριστικά βιοανατροφοδότησης, όμοια με αυτά του συστήματος του Kataoka, καθώς έδειξαν ότι μικροπηκτές $P(NiPAM-co-APBA)$ με μορφολογία core/shell είναι δυνατόν να απελευθερώνουν σταδιακά ινσουλίνη για συγκεντρώσεις γλυκόζης 100 mM στους 25 °C.

2.2.3 Εφαρμογές Λειτουργικών Μικροπηκτών PNIPAM στην Βιολογία

Η χρησιμοποίηση κολλοειδών συστημάτων με βάση το PNIPAM σε βιολογικές εφαρμογές όπως η ακινητοποίηση πρωτεϊνών, η βιοκατάλυση και η ενίσχυση της ενζυμικής δράσης έχει διερευνηθεί στην βιβλιογραφία. Η συμπεριφορά μικροπηκτών PNIPAM στην

προσρόφηση της πρωτεΐνης BSA (αλβουμίνη βόειου ορού αίματος) μελετήθηκε από τους Zhu et al. [61]. Το ποσοστό της προσροφούμενης BSA βρέθηκε ότι αυξάνεται *i)* σε θερμοκρασία μεγαλύτερης της VPTT, *ii)* σε pH πάνω από την τιμή που αντιστοιχεί στο ισοηλεκτρικό σημείο και *iii)* για μεγαλύτερο ποσοστό σταυροδεσμών. Η ελαχιστοποίηση της θρόμβωση κολλοειδών σωματιδίων σε ενδεχόμενες *in vivo* εφαρμογές αποτελεί μία σημαντική πρόκληση. Προς αυτή την κατεύθυνση, οι Trongsatitkul και Budhlall [62] παρασκεύασαν τροποποιημένες με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEGylated) μικροπηκτές PNIPAm μέσω του συμπολυμερισμού μεθακρυλικού μεθόξυ εστέρα της PEG και σκοπό την μελέτη της αντίστασης στην επιφανειακή προσρόφηση BSA. Το εύρος και η τιμή της VPTT καθώς και το ποσοστό της προσροφούμενης BSA βρέθηκε ότι εξαρτάται από παράγοντες όπως το μοριακό βάρος της PEG και το ποσοστό της τροποποίησης. Τα αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τα ευρήματα των Gan και Lyon για το ίδιο σύστημα [63]. Μικροπηκτές PNIPAm με λειτουργικά συμμενομερή VI, APM και N-[3-(διμεθυλ)αμινοπροπυλ] μεθακρυλαμιδίου έχουν προταθεί για εφαρμογές που μιμούνται την ενζυμική δράση και συγκεκριμένα για την αμιδόλυση υποστρωμάτων μονοπεπτιδίων ολιγοπεπτιδίων και πρωτεϊνών [64]. Η προσρόφηση της λυσοζύμης στην επιφάνεια core/shell κολλοειδών με πυρήνα PS και ανιοντικό κέλυφος μικροπηκτικής P(NiPAm-co-AAc) μελετήθηκε με θερμοδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης (isothermal titration calorimetry, ITC) [65]. Η ιοντική ισχύς βρέθηκε ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στο βαθμό της προσρόφησης της λυσοζύμης, η οποία επέδειξε αύξηση της ενζυμικής δράσης ~3.5 φορές όντας προσροφημένη (Σχήμα 2.3A).



Σχήμα 2.3 A) Αλληλεπίδραση μεταξύ θετικά φορτισμένων περιοχών της λυσοζύμης (μπλε περιοχές) και της αρνητικά φορτισμένης επιφάνειας της μικροπηκτικής [65]. Η πρόσδεση συνεπικουρείται από την ανάπτυξη υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων. B) Η μεταβολή του μοριακού βάρους της μικροπηκτικής, όπως προσδιορίστηκε με στατική σκέδαση φωτός, χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση του ενθλακωμένου κυτοχρώματος *c*. Ο επιτυχής διαχωρισμός με φθογκέντρωση σε συνθήκες χαμηλής ιοντικής ισχύος (20 mM) είναι οφθαλμοφανής [66].

Οι Dubey et al. [67] ακινητοποίησαν το ακέτυλο συνένζυμο A συνθάση (Acs) στην επιφάνεια άμινο τροποποιημένων μικροπηκτών PNiPAm μέσω υδατικής χημείας καρβοδιμιδίων. Το ακινητοποιημένο Acs επέδειξε βελτιωμένη δραστικότητα σε σχέση με το ελεύθερο συνένζυμο σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασίας και pH, ενώ το υλικό επέδειξε θερμική σταθερότητα και δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης τουλάχιστον για τέσσερις κύκλους. Η ενθυλάκωση της πρωτεΐνης κυτόχρωμα c στο εσωτερικό μικροπηκτών P(NiPAm-co-AAc) πραγματοποιήθηκε από τους Smith και Lyon [66]. Το ποσοστό της ενθυλάκωσης βρέθηκε ότι εξαρτάται από παράγοντες όπως το pH, η ιοντική ισχύς και η πυκνότητα φορτίου των μικροπηκτών (Σχήμα 2.3B).

2.3 Νανοϋβριδικά Υλικά και Εφαρμογές

Νέες προκλήσεις σε διάφορα πεδία όπως η βιοϊατρική, η περιβαλλοντική επιστήμη, η κατάλυση και η τεχνολογία υλικών έχουν ωθήσει την ανάπτυξη πολυλειτουργικών υβριδικών υλικών στις νανοδιαστάσεις [68]. Η στρατηγική της σύνθεσης “*all-in-one*” νανοσυστημάτων [69], όπου συνδυάζεται η δράση των επιμέρους διακριτών συστατικών και επιτυγχάνεται απόκριση σε πολλαπλά ερεθίσματα, έχει αποβεί εξαιρετικά ελκυστική σε πλειάδα εφαρμογών. Τέτοιου είδους συστήματα έχουν ενσωματωθεί επιτυχώς σε εφαρμογές μεταφοράς και ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκου [70], βιοδιαχωρισμών [71], βιοαπεικόνισης [72], βιοανίχνευσης [73] και βιοκατάλυσης [74]. Τα υλικά συστήματα που αποτελούνται από δυο διαφορετικές φάσεις, με τουλάχιστον μία εκ των οποίων στην νανοκλίμακα και εξυπηρετούν συνδυαστικά με βάση τα χαρακτηριστικά της κάθε φάσης, καλούνται *νανοσύνθετα* ή καταλληλότερα για την περίπτωση των αιωρημάτων/διασπορών *νανοϋβριδικά*. Από την πληθώρα των διαθέσιμων νανοϋβριδικών δομών (μικύλια με ανόργανο πυρήνα ή αντιστρόφως με πολυμερικό πυρήνα και ανόργανη νανοφάση στην περιφέρεια, νανοσωματίδια (NΣ) επικαλυμμένα με πολυμερή με μεθόδους πολυμερισμού από/προς (*grafting-to/from*) ή φυσική προσρόφηση στην επιφάνεια κ.α.), στην παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε αποκλειστικά σε δομές όπου το ικρίωμα αποτελείτο από μικροπηκτές με βάση το PNiPAm, καθώς το αντικείμενο μικροπηκτών από άλλα πολυμερή είναι υπερβολικά εκτενές. Καλύφθηκαν κυρίως περιπτώσεις όπου η ανόργανη φάση υπήρξε μεταλλική (Au, Ag) ή κεραμική, με ιδιαίτερη έμφαση στα μαγνητικά οξείδια του σιδήρου (Fe_3O_4 , $\gamma-Fe_2O_3$), ενώ όσον αφορά την αρχιτεκτονική, η διάκριση έγινε σύμφωνα με τον Karg [75] σε μικροπηκτές *i*) τύπου *core/shell* με πυρήνα ανόργανων NΣ *ii*) με ανόργανα NΣ διάσπαρτα στο εσωτερικό του δικτύου και *iii*) επιφανειακά επικαλυμμένες με ανόργανα NΣ.

2.3.1 Νανοϋβριδικά Συστήματα Μικροπηκτών PNiPAm με Νανοσωματίδια Ευγενών Μετάλλων

Τα νανοσωματίδια ευγενών μετάλλων (Au, Ag, Pt) έχουν συγκροτήσει μία δημοφιλή κλάση ανόργανων υλικών που οφείλεται στην εξαιρετική προοπτική χρησιμοποίησης που εμφανίζουν σε πεδία όπως η κατάλυση, η φωτονική, η ηλεκτρονική, η οπτική και η βιοϊατρική [76]. Η ενσωμάτωση της ανόργανης νανοφάσης μέσα σε “έξυπνες” πολυμερικές δομές, εν προκειμένω σε μικροπηκτές, προσδίδει ενεργά χαρακτηριστικά για εφαρμογές όπως η ελεγχόμενη από την θερμοκρασία κατάλυση, οι αισθητήρες και η μεταφορά φαρμάκων. Οι Suzuki και Kawaguchi σε μία σειρά από πρωτοποριακές εργασίες εισήγαγαν ΝΣ Au σε λειτουργικές μικροπηκτές PNiPAm [77-79]. Κοινός τόπος υπήρξε ο έλεγχος της χωρικής κατανομής των εποξειδικών ομάδων του συμμονομερούς γλυκιδυλομεθακρυλικού εστέρα και η μετατροπή τους σε αμινομάδες και ομάδες θειόλης έπειτα από την αντίδραση με 2-αμινοαιθανοθειόλη (2-AET) και διθειοθρεϊτόλη (DTT) αντίστοιχα. Η σύμπλεξη ιόντων Au (προερχόμενων από πρόδρομα αλάτα HClAu) στις λειτουργικές θέσεις των μικροπηκτών που έδρασαν ως νάνο-ικριώματα και η επακόλουθη αναγωγή με βοροϋδρίδιο του νατρίου απέφερε την ελεγχόμενη *in situ* εναπόθεση των μεταλλικών ΝΣ. Τα υλικά εμφάνισαν αξιοσημείωτες αλλαγές στο χρώμα για $T > V_{PPT}$ που οφείλονταν στην σύζευξη του πλασματικού πεδίου, όταν γειτονικά νανοσωματίδια Au πλησιάζουν μεταξύ τους. Οι Contreras-Cáceres et al. [80] παρασκεύασαν core/shell νανοϋβριδικές μικροπηκτές PNiPAm μέσω του *ετεροφασικού πολυμερισμού κατακρήμνισης (seeded precipitation polymerization)*, παρουσία ΝΣ Au, τα οποία ήταν επιφανειακά τροποποιημένα με PS. Η μετάπτωση φάσης του κελύφους βρέθηκε ότι επηρεάζει την συνθήκη συντονισμού των επιφανειακών πλασματιών σαν απόρροια των τοπικών μεταβολών του δείκτη διάθλασης. Αντίστροφη πορεία ακολουθήθηκε από τον Karg και τους συνεργάτες του [81], όπου προσυντεθειμένες νανοράβδοι χρυσού, επικαλυμένες με διαδοχικά στρώματα πολυηλεκτρολυτών πολυ(σουλφονικού νατρίου στυρενίου)/υδροχλωρικής πολυαλληλαμίνης (PSS/PAH) εναποτέθηκαν μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στην επιφάνεια μικροπηκτών P(NiPAm-co-αλληλακετικού οξέος). Σε συμφωνία με τα ευρήματα των Suzuki-Kawaguchi, οι οπτικές ιδιότητες διαμορφώνονταν ανάλογα με την θερμοκρασία λόγω της μεταβαλλόμενης εγγύτητας των νανοράβδων. Εκμεταλευόμενοι την συνεργιστική δράση νανοράβδων Au και λειτουργικών μονομερικών στοιχείων φαινυλβορονικού οξέος, οι Zhang et al. [82] ανέπτυξαν οπτικούς αισθητήρες γλυκόζης βασισμένους σε νανοϋβριδικές μικροπηκτές P(NiPAm-co-APBA). Οι Shi et al. [83, 84] αφού σύζευξαν τις καρβοξυλικές θέσεις μικροπηκτών P(NiPAM-co-AAc) με 2-AET, εναπόθεσαν *in situ* με ομοιογενή τρόπο ΝΣ Au. Τα υλικά μελετήθηκαν ως προς την καταλυτική αναγωγή της νιτροφαινόλης προς αμινοφαινόλη παρουσία NaBH_4 .

Με παρεμφερείς συνθετικές στρατηγικές έχει επίσης επιτευχθεί η παρασκευή νανοϋβριδικών υλικών από την ενσωμάτωση ΝΣ Ag σε μικροπηκτές PNiPAm και τα υλικά έχουν μελετηθεί ως προς την ενίσχυση του σήματος φθορισμού από μεταλλική επιφάνεια [85]. Πρόκειται για εξαίρεση του κανόνα, καθώς τα βαρέα μέταλλα και τα ιόντα τους αποσβένουν το σήμα του φθορισμού, όπως θα εκτεθεί σε επόμενες Παραγράφους. Εντούτοις, η ακριβής ρύθμιση της απόστασης μεταξύ της χρωμοφόρας και της επιφάνειας των ΝΣ, όπως καθίσταται εφικτή από την θερμοαποκρισιμότητα του PNiPAm, επιφέρει την ενίσχυση του σήματος φθορισμού. Ενδεικτικά, στο πεδίο της κατάλυσης μικροπηκτές PNiPAm@Ag έχουν χρησιμοποιηθεί για την καταλυτική αναγωγή του μπλε του μεθυλενίου [86].

2.3.2 Νανοϋβριδικές Μικροπηκτές PNiPAm με Μη-Μεταλλικές Νανοφάσεις

Η ευελιξία των νανοϋβριδικών υλικών έχει οδηγήσει στην αξιοποίηση τους ως αδρανή ενδιάμεσα για την σύνθεση μικροπηκτών PNiPAm με εξεζητημένη μορφολογία. Ακολουθώντας πορεία ετεροφασικού πολυμερισμού κατακρήμνισης, οι Zha et al. [87] τροποποίησαν νανοσωματίδια σίλικας με μεθακρυλικό 3-(τριμεθοξυσιλυλ) προπυλεστέρα (MPS) για τον εμπλουτισμό της επιφάνειας με διπλούς δεσμούς και στην συνέχεια τα χρησιμοποίησαν ως πυρήνες για τον σχηματισμό κελύφους από μικροπηκτική PNiPAm. Η νανοϋβριδική δομή υπήρξε το ενδιάμεσο υλικό πριν την χημική προσβολή του πυρήνα με υδροφθόριο για την παρασκευή *κοίλων μικροπηκτών PNiPAm*. Τα ίδια νανοϋλικά έχουν επίσης παραχθεί με παρόμοια μεθοδολογία, έπειτα από τον ετερογενή πολυμερισμό παρουσία πυρήνων “σκληρών” κολλοειδών πολυστυρενίου, οι οποίοι αποδομήθηκαν μέσω διάλυσης με τετραϋδροφουράνιο [88].

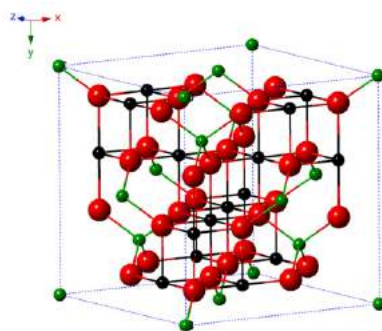
Η ομάδα του Zafeiropoulos [89] παρασκεύασε θερμοαποκρίσιμες φθορίζουσες μικροπηκτές μέσω της ομοιοπολικής πρόσδεσης νανο-κρυστάλλων CdTe (κβαντικές τελείες) στην επιφάνεια μικροπηκτών PNiPAm. Η ένταση του φθορισμού επέδειξε *on/off* συμπεριφορά, ελεγχόμενη από την θερμοκρασία μετάπτωσης στην υδρόφοβη κατάσταση. Όσον αφορά τις νανοδομές άνθρακα, είναι αξιοσημείωτη η απουσία δημοσιεύσεων σχετικά με κολλοειδή του τύπου PNiPAm@CNTs, ενώ πολύ πρόσφατα γραφένιο [90], νανοδιαμάντια [91] και κβαντικές τελείες άνθρακα [92] έχουν ενσωματωθεί σε μικροπηκτές με βάση το PNiPAm.

2.3.3 Νανοϋβριδικές Μικροπηκτές PNiPAm με Μαγνητική Νανοφάση

Οι κολλοειδείς διασπορές μαγνητικών νανοσωματιδίων, τα επονομαζόμενα “μαγνητικά ρευστά”, συντέθηκαν για πρώτη φορά την δεκαετία του 1960 [93]. Εκτοτε ένας

πολύ μεγάλος αριθμός εργασιών έχει αφιερωθεί στην ανάπτυξη νανοϋβριδικών υλικών στα οποία είτε η φάση των μαγνητικών ΝΣ αποκτά βελτιωμένα χαρακτηριστικά (αυξημένη κολλοειδή σταθερότητα, χημική λειτουργικότητα), είτε αντιστρόφως οι ιδιότητες της “μαλακής” φάση εμπλουτίζονται με μαγνητική λειτουργικότητα. Σε κάθε περίπτωση υφίσταται μία αμφίδρομη σχέση μεταξύ των δύο φάσεων, με συνέπεια την ανάπτυξη υλικών με νέες και βελτιωμένες ιδιότητες. Οι νανοφάσεις των οξειδίων του σιδήρου $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (μαγγελίτης) και Fe_3O_4 (μαγνητίτης) έχουν συγκεντρώσει τεράστιο ενδιαφέρον, μεταξύ των διαθέσιμων μαγνητικών ΝΣ, γεγονός που οφείλεται στο χαμηλό κόστος παρασκευής, στην ευκολία σύνθεσης με διαφορετικές μεθόδους, στην δυνατότητα επιφανειακής τροποποίησης και στην βιοσυμβατότητα [94]. Σε αντίθεση με την ομολογούμενη αναντιστοιχία μεταξύ της πλούσιας ερευνητικής δραστηριότητας και της σπανής πραγματικών εφαρμογών της νανοϊατρικής [95], ο αριθμός των εγκεκριμένων και εμπορικά διαθέσιμων νανοϋλικών για βιοϊατρικές εφαρμογές όπου βασικό συστατικό αποτελούν τα ΝΣ οξειδίου του σιδήρου είναι αρκετά σημαντικός [96].

Οι νανοκρύσταλλοι του μαγγελίτη και του μαγνητίτη υιοθετούν την δομή του σπινελίου (Σχήμα 2.4). Ενώ στο κρυσταλλικό πλέγμα του μαγνητίτη συνυπάρχουν δισθενή και τρισθενή ιόντα σιδήρου, στον μαγγελίτη όλα τα ιόντα είναι τρισθενή και η ηλεκτρική ουδετερότητα εξασφαλίζεται από κενά στις οκταεδρικές θέσεις του πλέγματος [97]. Ο μαγνητίτης είναι μετασταθής δομή και πολλές φορές οξειδώνεται επί τούτου σε μαγγελίτη. Η ελαφρώς χαμηλότερη μαγνήτιση κόρου, M_s , του μαγγελίτη σε σχέση με τον μαγνητίτη αντισταθμίζεται από την υπέρτερη χημική σταθερότητα [98].



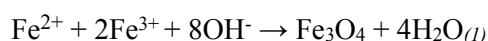
Magnetite

cubic, Fd3m

Σχήμα 2.4 Κρυσταλλική δομή του οξειδίου του σιδήρου μαγνητίτη (Fe_3O_4). Με πράσινο χρώμα: Fe^{3+} , κόκκινο χρώμα: O^{2+} , μαύρο: Fe^{2+} [99].

Η μέθοδοι σύνθεσης μαγνητικών ΝΣ οξειδίου του σιδήρου (ΝΣΟΣ) έχουν καλυφθεί σε εκτενή άρθρα ανασκόπησης [100]. Μεταξύ αυτών, η μέθοδος συγκαταβύθισης

αλάτων αποτελεί μία ευέλικτη και “πράσινη” επιλογή, καθώς πραγματοποιείται σε υδατικά περιβάλλοντα, ενώ το μέγεθος και η πολυδιασπορά των ΝΣΟΣ μπορούν να ελεγχθούν από παραμέτρους όπως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση των πρόδρομων αλάτων και το είδος της βάσης του διαλύματος καταβύθισης (NaOH, NH₄OH, υδροξείδιο του τετραμεθυλαμμωνίου). Η αντίδραση σύνθεσης του μαγνητίτη εκφράζεται πολύ απλά ως:

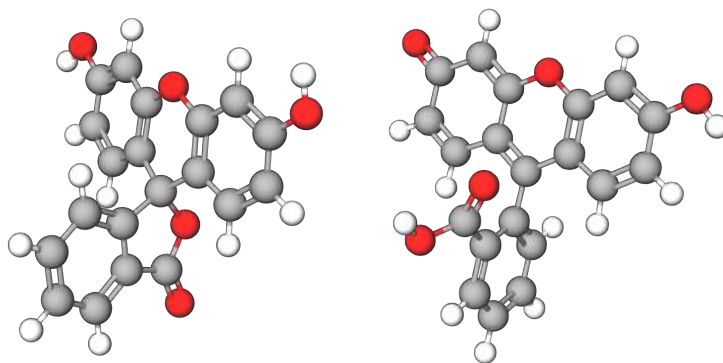


Η αντίδραση είναι ποσοτική στο εύρος pH = 8 - 14, ενώ απαιτείται αυστηρή τήρηση της στοιχειομετρικής αναλογίας και επιβολή αδρανών συνθηκών. Τα μαγνητικά ΝΣΟΣ έχουν συνδυαστεί με διάφορους τρόπους για την παρασκευή νανοϋβριδικών με βάση τις μικροπηκτές PNiPAm. Η ομάδα του Zafeiropoulos [101] αξιοποίησε την απλή συνθετική πορεία της συγκαταβύθισης αλάτων του σιδήρου για την παρασκευή διπλά θερμο- και μαγνητικά αποκρίσιμων υβριδικών μικροπηκτών PNiPAm@ΝΣΟΣ. Η μέθοδος απέδωσε νανοϋβριδικά με θερμοαποκρίσιμο πυρήνα και μαγνητικό κέλυφος. Το ποσοστό της ανόργανης νανοφάσης βρέθηκε ότι ρυθμίζεται εύκολα από τις συνθετικές παραμέτρους, ενώ η θερμοκρασία της μετάπτωσης βρέθηκε ότι εμφανίζει εξάρτηση από το ανόργανο περιεχόμενο. Εναλλακτικά, με στόχο την παρασκευή νανοϋβριδικών με μαγνητικό πυρήνα και θερμοαποκρίσιμο κέλυφος, πλειάδες (clusters) από προσχηματισμένα ΝΣΟΣ υαλώθηκαν επιφανειακά με μία παραλλαγή της μεθόδου Stöber και τροποποιήθηκαν με MPS [102]. Η μικροπηκτική αναπτύχθηκε σε δεύτερο στάδιο, μέσω του ετεροφασικού πολυμερισμού κατακρήμνισης στην επιφάνεια των μαγνητικών πλειάδων. Η επιφανειακή υάλωση είναι απαραίτητη καθώς η έναρξη του ριζικού πολυμερισμού από την επιφάνεια των ΝΣΟΣ αναστέλλεται εξαιτίας της μεταφοράς ηλεκτρονίων στην διαδιδόμενη ρίζα. Σε μεταγενέστερη εργασία, οι Rubio-Retama et al. [103] κατάφεραν να εξαλείψουν την ανάγκη επιφανειακής υάλωσης των ΝΣ οξειδίου και να επιτύχουν την έναρξη του πολυμερισμού κατακρήμνισης από την επιφάνεια πλειάδων ΝΣΟΣ επικαλυμένων με 3-βουτενοϊκό οξύ. Θερμοαποκρίσιμες μαγνητικές μικροπηκτές έχουν επίσης παραχθεί με απλούστερες συνθετικές πορείες, όπως για παράδειγμα στην εργασία του Khan [104] όπου ο πολυμερισμός κατακρήμνισης του NiPAm και του AAc πραγματοποιήθηκε παρουσία ΝΣΟΣ επικαλυμένων με ολεϊκό οξύ, με τίμημα τον έλεγχο του μεγέθους και της πολυδιασποράς των τελικών νανοϋβριδικών. Παρεμφερή πειραματικά πρωτόκολα, στα οποία η φάση των ΝΣΟΣ βρισκόταν ομοιογενώς διάσπαρτη στην φάση των μικροπηκτών PNiPAm οδήγησαν σε υλικά με υψηλή πολυδιασπορά [105] ή σε απώλεια της θερμοαποκρισιμότητας [106]. Πολύ πρόσφατα, τα υλικά αυτού του τύπου προτάθηκαν ως λιπαντικά μέσα σε βιομιμικές τριβολογικές εφαρμογές και συγκεκριμένα ως υποκατάστατα του αρθρικού υγρού [107].

2.4 Φθορεσίνη: Φωτοφυσικές Ιδιότητες, Παράγωγα Μόρια και Εφαρμογές

Η φθορεσίνη (fluorescein, FL) ανήκει στην κατηγορία των χρωστικών του τριφαινυλομεθυλίου [108]. Μαζί με την φαινολφθαλεΐνη, το γνωστότερο ίσως μόριο της κατηγορίας εξαιτίας της διαδεδομένης χρήσης του ως δείκτη του pH, ανακαλύφθηκαν από τον Adolf von Bayern περί το 1871 [109]. Η μοναδική διαφορά στην χημική δομή των μορίων της φαινολφθαλεΐνης και της FL αποτελεί η γεφύρωση των φαινολικών δακτυλίων με ένα άτομο οξυγόνου προς σχηματισμό της ομάδας του ξανθενίου. Ως αποτέλεσμα, η φαινολφθαλεΐνη εμφανίζεται απλώς έγχρωμη σε αλκαλικά διαλύματα, ενώ στις ίδιες συνθήκες η φθορεσίνη εμφανίζει ισχυρό φθορισμό. Το “κλείδωμα” στην επίπεδη και άκαμπτη δομή του ξανθενίου μειώνει την απώλεια ενέργειας μέσα στο μόριο (εσωτερική μετατροπή), με απόρροια την απόδοση της ενέργειας με φθορίζουσα εκπομπή.

Δομικά, το μόριο της FL απαρτίζεται από δύο χαρακτηριστικές ομάδες: την ξανθενική και την φθαλική ή αλλιώς ομάδα του βενζοϊκού οξέος (Σχήμα 2.5). Οι Martin και Linqvist το 1975 μελέτησαν τον φθορισμό της FL σε υδατικά διαλύματα και βρήκαν ότι το μόριο μεταπίπτει σε διάφορες πρωτολυτικές μορφές σαν συνάρτηση του pH [110]. Η λακτοειδής μορφή υιοθετείται σε όξινες συνθήκες ($2.2 < \text{pH} < 4.4$), ενώ στην περιοχή $4.4 < \text{pH} < 6.7$ υφίσταται ως μονοανιόν στην κινουειδή μορφή και ως διανιόν για $\text{pH} > 6.7$ (Σχήμα 2.5). Στην ίδια εργασία, αντιπαραβλήθηκε η φωτοφυσική συμπεριφορά της FL με αυτή της 6-υδροξυ-9-φαινυλ-3H-ξανθεν-3-όνης (HPF), ενός πανομοιότυπου μορίου στο οποίο η βενζοϊκή καρβοξυλομάδα έχει αντικατασταθεί από ένα πρωτόνιο. Η κβαντική απόδοση¹, Φ ,



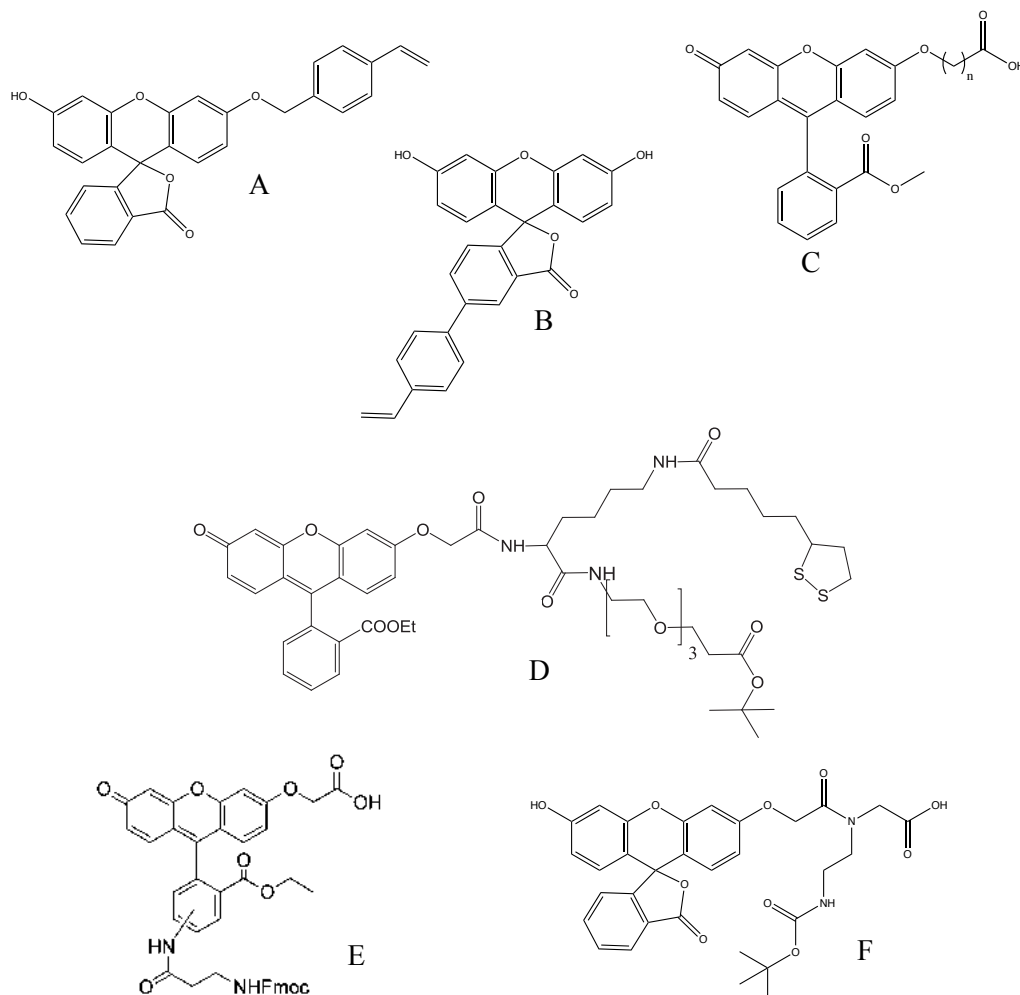
Σχήμα 2.5 Στεreoχημικός τύπος της λακτοειδούς (αριστερά) και κινουειδούς (δεξιά) δομής συντονισμού στην ουδέτερη κατάσταση της φθορεσίνης. Οι δομές σχεδιασθηκαν στο λογισμικό Molview [111] εφαρμόζοντας τον αλγόριθμο ενεργειακής ελαχιστοποίησης. Και στις δύο περιπτώσεις είναι εμφανής ο κάθετος προσανατολισμός του φθαλικού δακτυλίου σε σχέση με την ξανθενική ομάδα.

¹ Η έννοια της κβαντικής απόδοσης αποσαφηνίζεται και αναλύεται στα Κεφάλαια 3 και 5. Πρακτικά αποτελεί ένα μέτρο για τον ποσοτικό προσδιορισμό της μετατροπής της απορροφόμενης ενέργειας σε ακτινοβολία φθορισμού.

της HPF σε αλκαλικό pH βρέθηκε 4.4 φορές μικρότερη σε σχέση με την FL, ενώ σε όξινο pH τα δύο μόρια χαρακτηρίζονται από την ίδια χαμηλή Φ . Σύμφωνα με τους συγγραφείς, αφού η λακτοειδής πρωτολυτική μορφή δεν υφίσταται στην HPF, η ελάττωση του φθορισμού οφείλεται σε διεργασίες εσωτερικής μετατροπής. Έπειτα από τρεις δεκαετίες, η ομάδα του Nagano [112] απέδειξε ότι το βενζοϊκό καρβοξύλιο δεν επιτελεί κανέναν άλλο ρόλο πέραν από την διασφάλιση της καθετότητας του δακτύλιου με την ξανθενική ομάδα και ως εκ τούτου είναι ανταλλάξιμο με άλλον υποκαταστάτη. Αυτή η προσέγγιση αφενός ερμηνεύει την χαμηλή Φ της HPF και αφετέρου οδήγησε στην σύνθεση μίας νέας κατηγορίας χρωστικών, των TokyoGreens, όπου ο δακτύλιος είναι υποκατεστημένος στις *meta* ή/και *para* θέσεις με μεθυλικές ή/και μεθόξυ ομάδες.

Η FL χρησιμοποιείται ευρύτατα εξαιτίας της εύκολης και οικονομικά συμφέρουσας διαδικασίας παρασκευής, καθώς επίσης και για την πολύ μεγάλη επιδεκτικότητα του μορίου σε αντιδράσεις τροποποίησης [113]. Πρόκειται για ουσία εγκεκριμένη από τον FDA εδώ και 40 χρόνια [114], με προεξέχουσα βιοϊατρική εφαρμογή την αγγειογραφία φθορισμού [115]. Με βάση τα παραπάνω και με δεδομένη την ανάγκη ενσωμάτωσης χρωμοφόρων σε ένα εξαιρετικά ποικιλόμορφο σύνολο εφαρμογών, η σύνθεση παραγώγων μορίων της FL έχει αποτελέσει αντικείμενο εντατικής ερευνητικής δραστηριότητας. Η ομάδα του Bradley [116] χρησιμοποίησε στυρενικά παράγωγα (4-βινυλοφαινυλβορονικό οξύ και 4-βινυλοβενζυλοχλωρίδιο) για την σύνθεση επιδεκτικών σε πολυμερισμό (πολυμερίσιμων) παραγώγων της αμινοφθορεσίνης και της FL. Τα πολυμερίσιμα παράγωγα χρησιμοποιήθηκαν για την φθορίζουσα επισήμανση κολλοειδών PS παρασκευασθέντων μέσω μίας απλής διαδικασίας πολυμερισμού γαλακτώματος απουσία σταθεροποιητή. Το παράγωγο της αμινοφθορεσίνης επέδειξε ισχυρότερο φθορισμό σε σχέση με τα παράγωγα της FL, υπογραμμίζοντας την εξάρτηση της Φ από χημικές μεταβολές στην ξανθενική ομάδα. Οι Adamczyk et al. [117], συνέθεσαν -COOH λειτουργικά παράγωγα τροποποιώντας την FL στην 3-φαινολική θέση, χρησιμοποιώντας αλκύλια διαφορετικού μήκους ως συνδέτες. Οι Wzresnien και Graham [118] πραγματεύτηκαν το πρόβλημα της ενίσχυσης του σήματος SERS (Surface Enhanced Raman Scattering) για την ανίχνευση βιομορίων. Χρησιμοποιώντας έναν τριδραστικό συνδέτη (linker) ο οποίος συμπεριλάμβανε την FL ως δομικό λίθο, δραστική καρβοξυλομάδα προστατευμένη με *tert*-βουτοξυκαρβόνυλο (Boc) ομάδα, για την πρόσδεση σε NH₂-τροποποιημένο DNA και δισουλφιδική ομάδα για την συναρμογή στην επιφάνεια μεταλλικών ΝΣ, κατάφεραν να αξιοποιήσουν την οπτική ενεργότητα της FL στο ορατό για την ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών βάσεων με SERS. Η 5(6)-καρβόξυ FL και η 5(6)-καρβόξυ ροδαμίνη έχουν χρησιμοποιηθεί για την επισήμανση των ακραίων αμινομάδων σε συνθετικά πολυπεπίδια [119]. Ο σχηματισμός ζεύγους μεταφορά ενέργειας χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας (fluorescence non-radiative energy transfer, FRET) μεταξύ των μορίων επέτρεψε την μελέτη αντιδράσεων της τρανσπεπτιδάσης *Staphylococcus aureus*

SrtA. Λιπόφιλα παράγωγα της FL συντέθησαν από τους Brown et al. [120] μέσω της εστεροποίησης του βενζοϊκού καρβοξυλίου με παράγωγο της χοληστερόλης. Η ανασύσταση του φθορίζοντος παραγώγου στον πυρήνα των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) αποτέλεσε χρήσιμο εργαλείο για την μελέτη του μεταβολισμού της χοληστερόλης. Στο πεδίο της πεπτιδικής σύνθεσης σε στερεά φάση, έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη η προετοιμασία φθορίζοντων αμινοξέων ξεκινώντας από την αμινοφθορεσίνη [121]. Μέσω συνθετικής πορείας τεσσάρων σταδίων, τα παράγωγα μόρια χαρακτηρίζονται από -COOH λειτουργικότητα στο τμήμα της ξανθениκής ομάδα και Fmoc προστατευμένη αμινομάδα στον εστεροποιημένο βενζοϊκό δακτύλιο. Στο ίδιο πλαίσιο, φθορίζοντα αμινοξέα με Boc προστατευμένη αμινομάδα συντέθηκαν με βάση την FL [122]. Οι NHBoc/COOH λειτουργικότητες φέρονται σε συνδέτη ο οποίος βρίσκεται ομοιοπολικά ενωμένος με αιθερικό δεσμό στο ξανθениκό τμήμα. Στο σχήμα 2.6 αποδίδεται ο συντακτικός τύπος ορισμένων εκ των λειτουργικών παραγώγων μορίων που αναφέρθηκαν παραπάνω.



Σχήμα 2.6 Συντακτικοί τύποι λειτουργικών παραγώγων μορίων φθορεσίνης: A-B [116], C [117], D [118], E [121], F [122].

Η εστιασμένη μελέτη της φωτοφυσικής συμπεριφοράς παραγώγων μορίων της FL, χωρίς απαραίτητα την πρόσδοση λειτουργικών χαρακτηριστικών, έχει αποτελέσει το θέμα αρκετών ερευνητικών εργασιών. Οι Zhao, Shen και Xu [123] εξέτασαν το φάσμα απορρόφησης του αιθυλ 2-(6-αιθοξυ-3-οξο-3*H*-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκού εστέρα σε διαφορετικές τιμές του pH, “κλειδώνοντας” το μόριο της FL στην κινουειδή μορφή. Λόγω της μοναδικής πρωτολυτικής μορφής για $\text{pH} > 2.2$, η απορρόφηση επέδειξε ασθενή εξάρτηση στο εύρος $4.03 < \text{pH} < 9.28$. Στην παρεμφερή εργασία των Song et al. [124] συνετέθη μία σειρά από αλκυλιωμένα παράγωγα της FL τα οποία μελετήθηκαν με φασματοσκοπία απορρόφησης και φασματοσκοπία φθορισμού τόσο σε υδατικά διαλύματα παρουσία ανιοντικών, κατιοντικών και ουδέτερων τασιενεργών όσο και σε οργανικούς διαλύτες με διαφορετική πολικότητα. Βρέθηκε ότι το σχήμα της καμπύλης απορρόφησης, όπως ορίζεται από την θέση και την σχετική αναλογία έντασης των κορυφών, παρουσιάζει εξάρτηση από την πολικότητα του περιβάλλοντος. Οι Liu et al. [125] συνέθεσαν έναν λειτουργικό 3-*O*-άλκυλο αιθέρα της FL. Η κβαντική απόδοση σε $\text{pH} = 8$ βρέθηκε ίση με 0.22, η οποία είναι άμεσα συγκρίσιμη με δημοσιευμένες τιμές για 3-*O*-αλκυλιωμένα παράγωγα της FL. Οι ερευνητές απέδωσαν την διεύρυνση της κορυφής εκπομπής και την ελάττωση της κβαντικής απόδοσης σε σχέση με την FL (0.92) σε μεταβολές της D_{2h} μοριακής συμμετρίας στο ξανθενικό τμήμα.

2.4.1 Πολυμερικά Υλικά και Νανοϊβριδικές Δομές με Επισήμανση Παραγώγων Φθορεσίνης

Η στρατηγική της ομοιοπολικής επισήμανσης πρωτεϊνών με ισοκυανικό εστέρα της FL (FTIC) εφαρμόζεται στον κλάδο της βιοχημείας από την δεκατία του 1960 [126], ενώ από το 1975 [127] έχει αναφερθεί η υποκατάσταση βιοπολυμερών υαλουρονικού οξέος με FITC σε χαμηλά ποσοστά της τάξης του 0.1% - 5%. Στο πλαίσιο της παρούσας βιβλιογραφικής ανασκόπησης, η πρώτη αναφορά ομοιοπολικής σύζευξης FITC σε γραμμικά πολυμερή πολυακρυλαμιδίου εντοπίζεται το 1987 [128] και πραγματοποιήθηκε έπειτα από μερική αναδιάταξη των αμιδικών δεσμών κατά Hoffman προς σχηματισμό ελεύθερων αμινομάδων. Σημειώνεται, ότι οι θειοκαρβαμιδικοί δεσμοί [-NH(C=S)O-] και οι δεσμοί θειουρίας [-NH(C=S)NH-] δεν ενδείκνυνται για εφαρμογές όπου απαιτείται υψηλή χημική σταθερότητα [129]. Μολαταύτα, υδρόφιλα πολυμερή πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) έχουν τροποποιηθεί με παράγωγα FITC για την ανίχνευση ανιόντων θείου (S^{2-}) [130]. Ο συμπολυμερισμός του *O*-μεθακρυλικού εστέρα της FL (FMA) με υδρόφιλα και υδρόφοβα μονομερή έχει αναφερθεί σε σχετικά πρόσφατες εργασίες. “Σκληρά” πολυμερικά κολλοειδή PS και PMMA επισήμασμένα με FMA χρησιμοποιήθηκαν για εξωτερική τοπική χορήγηση ενεργής φαρμακευτικής ουσίας [131]. Ο FMA έχει χρησιμοποιηθεί επίσης για την

παρασκευή νανοϋβριδικών δομών, καθώς συμπολυμερίστηκε επιτυχώς με μεθακρυλικό εστέρα της PEG (PEGMA) για την επιφανειακή τροποποίηση ανόργανων κβαντικών τελειών ZnS/CdSe, ΝΣ μαγγεμίτη και νανοδιάστατων ντοπαρισμένων ημιαγωγών ZnS/Mn [132]. Το ίδιο φθορίζον μονομερές χρησιμοποιήθηκε κατά την επικάλυψη νανοράβδων Au με PEGMA [133]. Στο εν λόγω σύστημα, η κβαντική απόδοση σημείωσε μείωση στο 9% από 96% λόγω της αλληλεπίδρασης των καταλοίπων του FMA με την επιφάνεια των ανόργανων ΝΣ, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι η απόδοση του φθορισμού παραμένει αναλλοίωτη στη φάση του πολυμερούς. Η χρωστική επέτρεψε την παρακολούθηση της μετάβασης της νανοϋβριδικής δομής από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Πολύ πρόσφατα έχει αναφερθεί η σύνθεση φθορίζοντων πολυμερικών ιοντικών ρευστών, έπειτα από τον συμπολυμερισμό του FMA με ριζικό πολυμερισμό μεταφοράς ατόμων (ATRP) [134]. Το πολυμερές χρησιμοποιήθηκε για την φθορίζουσα επικάλυψη πυριτικών και υάλινων υποστρωμάτων. Οι Henna Vihola et. al [135] μελέτησαν την αλληλεπίδραση της κυτταρικής σειράς μακροφάγων RAW264.7 και της σειράς καρκινικών κυττάρων Caco-2 με core/shell πολυμερικά νανოსωματίδια, αποτελούμενα από πυρήνα πολυ(στυρενίου-*co*-*O*,*O*'-διμεθακρυλικού εστερά της FL) και κέλυφος PNIPAm, PVCL και PEO. Η μελέτη με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού απέδειξε την εφαρμοσιμότητα του PNIPAm σε βιοτεχνολογικές/φαρμακευτικές εφαρμογές και την μικρορύθμιση των αλληλεπιδράσεων κυττάρων/πολυμερούς με έλεγχο του μεγέθους, του επιφανειακού φορτίου, της υδροφοβικότητας, των στερικών αλληλεπιδράσεων και της θερμοκρασίας.

2.4.2 Θερμοαποκρίσιμα Πολυμερικά Συστήματα με Βάση το PNIPAm Επισημασμένα με Φθορίζουσες Χρωμοφόρες.

Η μετάπτωση φάσης των θερμοαποκρίσιμων μικροπηκτών έχει μελετηθεί μέσω του εγκλεισμού, της προσρόφησης ή της ομοιοπολικής πρόσδεσης χρωμοφόρων στο εσωτερικό τους αξιοποιώντας πλείαδα φαινομένων όπως ο χρόνος ζωής φθορισμού, η απόσβεση φθορισμού και η FRET [13]. Οι μη-χρονοεξαρτημένες τεχνικές χαρακτηρισμού και οι τεχνικές που δεν βασίζονται στην πολωσιμότητα είναι περισσότερο εύχρηστες γιατί δεν απαιτούν ιδιαίτερα εξειδικευμένη οργανολογία. Στα πλαίσια της παρούσας ανασκόπησης, το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε, ως επί το πλείστον, σε μελέτες οι οποίες συντελέστηκαν με συμβατική φασματοσκοπία φθορισμού.

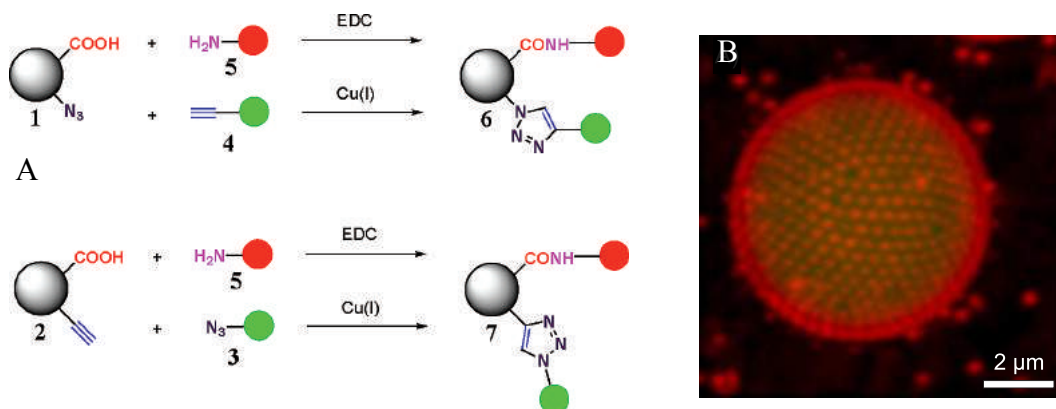
Σε μία από τις πρώτες εργασίες στο πεδίο, η ομάδα της F. M. Winnik προσδιόρισε μεταξύ άλλων το νεφελώδες σημείο γραμμικών ομοπολυμερών PNIPAm τα οποία είχαν συμπολυμεριστεί σε χαμηλή στοιχειομετρική αναλογία με πυρένιο, μέσα από μετρήσεις του λόγου έντασης φθορισμού $I_3 : I_1$. Το πυρένιο είναι ο πιο διαδεδομένος ιχνηθέτης πολικότητας, εξαιτίας της χαρακτηριστικής εξάρτησης του λόγου των εντάσεων της 3ης

προς την 1η κορυφή στο φάσμα εκπομπής απο μεταβολές της πολικότητας του άμεσου περιβάλλοντος: όσο μεγαλύτερο το μέτρο του $I_3 : I_1$, τόσο πιο υδρόφοβο είναι το μικροπεριβάλλον της χρωμοφόρας. Η πρώτη αναφορά χρησιμοποίησης πυρενίου για την εξερεύνηση των λεπτών χαρακτηριστικών της μετάπτωσης φάσης μικροπηκτών PNiPAm υφίσταται το 1998 [136]. Στο ίδιο πλαίσιο, ο Khan εκμεταλεύτηκε την θερμοκρασιακή μεταβολή του λόγου $I_3 : I_1$ για τον ακριβή προσδιορισμό της VPTT μικροπηκτών P(NiPAm-co-AAc) μέσω της φυσιορόφησης πυρενίου [137]. Πολύ πρόσφατα, ένα σουλφωνιωμένο παράγωγο του πυρενίου, η πυρανίνη, χρησιμοποιήθηκε ως συστατικό κατά τον συμβατικό πολυμερισμό κατακρήμνισης του PNiPAm όπου καταδείχθηκε ότι μπορεί να συμβάλλει στον έλεγχο του μεγέθους των μικροπηκτών [138].

Η μεταβολή μήκους του κύματος της εκπομπής φθορισμού αποτελεί εξίσου ικανή ένδειξη για την παροχή πληροφορίας σχετικά με αλλαγές στην πολικότητα, όπως αναδείχθηκε στην εργασία των Matsumura και Iwai [139], όπου χρησιμοποιήθηκε ένα μεθακρυλικό παράγωγο του ιχνηθέτη 3-(2-προπενυλ)-9-(4-*N,N*-διμεθυλαμινοφαινυλ)-φαινανθρένιο κατά την παρασκευή μικροπηκτών PNiPAm. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας φθορισμού, παρατηρήθηκε η αντιστρεπτή μετατόπιση της κορυφής φθορισμού προς το κυανό όταν το σύστημα μετέπιπτε στην συρρικνωμένη κατάσταση. Περαιτέρω, η μικρή ολίσθηση της κορυφής πριν από την πλήρη μετάβαση συσχετίστηκε με τη βαθμιαία συρρίκνωσης σε $T < VPTT$. Η ίδια ομάδα σε μεταγενέστερη εργασία [140], χρησιμοποίησε τον ιχνηθέτη 4-*N*-(2-ακρυλοϋλοξυαιθυλ)-*N*-μεθυλαμινο-7-*N,N*-διμεθυλαμινοσουλφονυλ-2,1,3-βενζοξαδιαζόλη και κατάφερε με παρεμφερή μελέτη της μικροπολικότητας να εξερευνήσει την δομική ετερογένεια μικροπηκτών PNiPAM με υψηλά ποσοστά διασταύρωσης, χρησιμοποιώντας τον παράγοντα σχηματισμού σταυροδεσμών MBA.

Το λειτουργικό παράγωγο της FL, 2-(6-((2-βρωμο-2-μεθυλ προπανοϋλ)οξύ)-3-όξο-3*H*-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκό οξύ, έχει συντεθεί από την αλκυλίωση της FL με τον κοινό εκκινητή ATRP 2-βρωμοϊσοβουτυρικό βρωμίδιο (BIBB). Ο φθορίζων εκκινητής έχει χρησιμοποιηθεί με τα ανάλογα καταλυτικά συστήματα για την σύνθεση γραμμικών ομοπολυμερών PMMA [141] και PNiPAm [142] μέσω ATRP. Στον αντίποδα, γραμμικά τελεηλικά ομοπολυμερή PNiPAm με φθορίζουσα επισήμανση έχουν συντεθεί μέσω της σύζευξης με χημεία καρβοδιμιδίων, της αμινοφθορεσίνης και των ακραίων -COOH δραστικών ομάδων του πολυμερούς [143]. Η συσσωμάτωση των γραμμικών πολυμερών πάνω από την LCST οδήγησε στον σχηματισμό νανοσωματιδίων με $D_H \sim 200$ nm, η θερμοκρασιακή εξάρτηση της πρόσληψης των οποίων από κύτταρα της σειράς RAW264.7 μελετήθηκε *in vitro*. Η παρασκευή μικροπηκτών P(NiPam-co-AAc), με ελεγχόμενες υδροδυναμικές διαστάσεις μέσω της προσθήκης SDS στην αντίδραση πολυμερισμού, φθορίζουσα λειτουργικότητα και περιφερική τροποποίηση με ομάδες α -λακτόζης

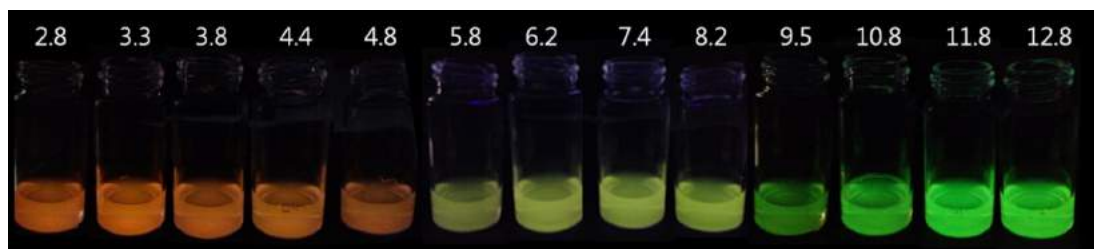
πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια [144]. Πρώτον, εφαρμόστηκε χημεία καρβοδιμιδίων για την εναλλαγή των -COOH θέσεων σε -NH₂ με σύζευξη αιθυλενοδιαμίνης, δεύτερον ένα μέρος των ομάδων -NH₂ αντέδρασε με FITC και τρίτον ακολούθησε η αντίδραση γαλακτοζυλίωσης. Παρά το προφανές πρόβλημα διασταυρωμένης δραστηριότητας λόγω της χρήσης διδραστικής αμίνης σε καρβόξυλο-δραστικές μικροπηκτές, οι ερευνητές τροφοδότησαν υπατικά καρκινικά κύτταρα με τις μικροπηκτές και αναγνώρισαν μηχανισμό κυτταρικής πρόσληψης μέσω υποδοχέων και εξάρτηση του ποσοστού πρόσληψης από την δοσολογία. Νανοκάψουλες PNiPAm παρασκευάστηκαν μέσω του συμβατικού πολυμερισμού του NiPAm παρουσία νανοσίλικας με εγκλωβισμένη FITC [145]. Η αποικοδόμηση του ανόγανου πυρήνα με υδροφθόριο απελευθέρωσε την FITC στο εσωτερικό της νανοκάψουλας. Η ελεύθερη FITC επιτέλεσε τον ρόλο του ενθυλακωμένου “ενεργού μορίου” και αποδείχθηκε ότι η διάχυση μέσα από τους πόρους της νανοκάψουλας ελέγχεται από την θερμοκρασία. Μία ελκυστική και αποδοτική μέθοδος για την παρασκευή διττά pH-αποκρίσιμων και θέρμοαποκρίσιμων μικροπηκτών με βάση το PNiPAm υιοθετήθηκε από τον Garcia και τους συνεργάτες του [146]. Μετά τον συμπολυμερισμό του NiPAm με το λειτουργικό συμμονομερές αλλυλαμίνη, ακολούθησε η σύζευξη ενός καρβοξυλικού παραγώγου της σπιροπυράνης με χημεία καρβοδιμιδίων. Σε μία από τις σημαντικότερες εργασίες στο πεδίο [147], η ομάδα του Lyon απέδειξε την δυνατότητα ορθογώνιας χημικής τροποποίησης [148] σε μικροπηκτές P(NiPAm-co-AAc), οι οποίες επιπλέον έφεραν εποξειδικές και αλκινικές θέσεις έπειτα από τον συμπολυμερισμό του NiPAm/MBA σε δεύτερο στάδιο με γλυκιδυλομεθακρυλικό και προπαργυλακρυλικό εστέρα. Μετά την περαιτέρω μετατροπή των εποξειδίων σε αζίδια, κατέστη εφικτή η ταυτόχρονη και συνδυαστική σύζευξη αλκενύλ- και άζιδο παραγώγων της FL με χημεία click και άμινο παραγώγων της ροδαμίνης με χημεία καρβοδιμιδίων (Σχήμα 2.7A). Πολύ πρόσφατα ο FMA και το πολυμερίσιμο παράγωγο μεθακρυλοξαιθυλ-θειο-καρβαμόυλο ροδαμίνη B χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρασκευή φθορίζοντων μικροπηκτών με συμβατικό πολυμερισμό κατακρήμνισης [149]. Τα “μαλακά” φθορίζοντα κολλοειδή χρησιμοποιήθηκαν για την σταθεροποίηση Pickering o/w γαλακτώματων πολυδιμεθυλοσιλοξάνης (PDMS) και λόγω των σχετικά μεγάλων διαστάσεων ($D_H \sim 640$ nm) κατέστη εφικτή η απεικόνισή τους με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού (Σχήμα 2.7B).



Σχήμα 2.7 Α) Συνθετική πορεία παρασκευής μικροπηκτών με βάση το PNiPAm και επισήμανση με δύο διαφορετικές χρωμοφόρες (ροδαμίνη και φθορεσίνη) εφαρμόζοντας ταυτόχρονα ορθογώνια χημεία click και χημεία καρβοδιμιδίων σε υδατικά μέσα [147]. Β) Pickering o/w γαλάκτωμα: ελαιώδης σταγόνα PDMS (πράσινο υπόβαθρο) σταθεροποιημένη με φθορίζουσες μικροπηκτές PNiPAm [149].

2.4.3 Φθορίζουσες Μικροπήκτες με Βάση το PNiPAm για Εφαρμογές Αισθητήρων.

Η ομάδα του Seung Lee [150] συνέθεσε το πολυμερίσιμο φθορίζον μονομερές αιθυλ-2-μεθακρυλαμίδιο της *N*-(Ροδαμίνη Β) λακτάμης το οποίο σε χαμηλό pH μεταβαίνει στην πρωτολυτική μορφή ανοικτού δακτυλίου, εμφανίζοντας έντονο ερυθρόχρωμο φθορισμό. Αξιοποιώντας την συμπληρωματική ευαισθησία του FMA σε αλκαλικό pH, κατάφεραν μέσω του παράλληλου συμπολυμερισμού των δύο λειτουργικών μονομερών να παρασκευάσουν οπτικούς αισθητήρες του pH. Οι ερευνητές αναφέρουν την αντιστρεπτότητα της διεργασίας για 20 κύκλους μετάβασης από pH = 4 σε pH = 12 (Σχήμα 2.8). Όλος παραδόξως, δεν γίνεται καμμία νύξη για ενδεχόμενα προβλήματα σταθερότητας έναντι της υδρόλυσης ενώ από βιβλιογραφικά δεδομένα είναι γνωστό ότι η ταχύτητα υδρόλυσης φαινολικών εστέρων εμφανίζει εκθετική εξάρτηση από μεταβολές του pH [151].



Σχήμα 2.8 Φθορίζουσες μικροπηκτές *P*(NiPAM-co-RhBLMAc-co-FMA) κάτω από UV ακτινοβολία με αντιστρεπτή οπτική αποκρισιμότητα σε μεταβολές του pH [151].

Σε επακόλουθη μελέτη [152], η ίδια ομάδα αξιοποίησε το ίδιο σύστημα για την ανίχνευση γλυκόζης ενθυλακώνοντας στο πορώδες του δικτύου το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης. Σύμφωνα με τον προτεινόμενο μηχανισμό, η γλυκόζη μετατρέπεται σε D-γλουκονο-1,5-λακτόνη υπό την δράση του ενζύμου, παράγοντας υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το οποίο οι συγγραφείς ισχυρίστηκαν ότι διασπάται περαιτέρω σε οξυγόνο, πρωτόνια και ηλεκτρόνια! Σε κάθε περίπτωση είναι γεγονός ότι το H_2O_2 , σύμφωνα με τις αρχές της κλασσικής χημείας και σε κανονικές συνθήκες, διασπάται αργά σε $H_2O_{(l)}$ και $O_{2(g)}$, ενώ η ένωση είναι εμπορικά διαθέσιμη ως υδατικό διάλυμα. Η μείωση του pH οφείλεται στην παραγωγή γλουκονικού οξέος [153]. Οι Gan και Lyon υπήρξαν πρωτοπόροι, όσον αφορά την ενσωμάτωση μονομερικών στοιχείων ζεύγους δότη και δέκτη FRET στο δίκτυο μικροπηκτών PNiPAm με σκοπό την μελέτη της μετάπτωσης φάσης [154]. Η ιδέα αξιοποιήθηκε ομάδα του Shiyong Liu [155] για την παρασκευή μικροπηκτών με δράση ως διπλοί αισθητήρες γλυκόζης-θερμοκρασίας. Συγκεκριμένα, συμπολυμερίστηκαν μαζί με NiPAM το APBA ως η μονάδα ανίχνευσης γλυκόζης, η 4-(2-ακρυλοϋλ-οξυαιθυλαμινο)-7-νιτρο-2,1,3-βενζοξαδιαζόλη (NBDAE) ως χρωμοφόρα δότης FRET και το χλωρίδιο του *N*-(9-(2-((2-(ακρυλοϋλοξυ)αιθοξυ)-καρβονυλ)φαινυλ)-6-(διαιθυλαμινο)-3H-ξανθεν-3-υλιδεν)-*N*-αιθυλαιθαναμινίου (RhAc) ως χρωμοφόρα δέκτης FRET. Η μεταβολή της απόστασης μεταξύ των υποκατεστημένων θέσεων δότη και δέκτη FRET στο εσωτερικό των μικροπηκτών P(NiPAm-co-APBA-co-NBDAE-co-RhAc) σαν συνάρτηση της θερμοκρασίας, σε συνδυασμό με την παρουσία των ομάδων APBA όπου πραγματοποιείται η συναρμογή της γλυκόζης, οδήγησαν στην εξάρτηση του λόγου έντασης κορυφών φθορισμού από τις παραπάνω παραμέτρους.

Παραμένοντας στο πεδίο της ανίχνευσης μικρών μορίων, ο Rubio-Retama και οι συνεργάτες του [156] παρασκεύασαν φθορίζουσες μικροπηκτές PNiPAm μέσω της αλληλοεμπλοκή με το υδρόφιλο συζυγιακό πολυμερές πολυ[2-(3-θειενυλ)-αιθοξυ-4-βουτυλ σουλφονικό εστέρα]. Η ένταση του φθορισμού εμφάνισε μείωση κατά την μετάπτωση στην συρρικνωμένη κατάσταση και η συνακόλουθη παρατηρούμενη μετατόπιση του μήκους κύματος αποδόθηκε στην παρεμπόδιση των π - π αλληλεπιδράσεων από το πολυμερικό δίκτυο. Αυτή η ιδιότητα βρήκε περαιτέρω εφαρμογή στην ανίχνευση μορίων πικρικού οξέος στην κλίμακα των ppm. Ενδεικτικά, αξίζει να αναφερθεί ότι οι φθορίζουσες θερμοαποκρίσιμες μικροπηκτές PNiPAM έχουν βρει επίσης εφαρμογή στην ανίχνευση ιόντων Cu^{2+} [157].

2.4.4 Μακρομοριακά και Νανοσκοπικά Θερμόμετρα με Βάση το PNiPAM

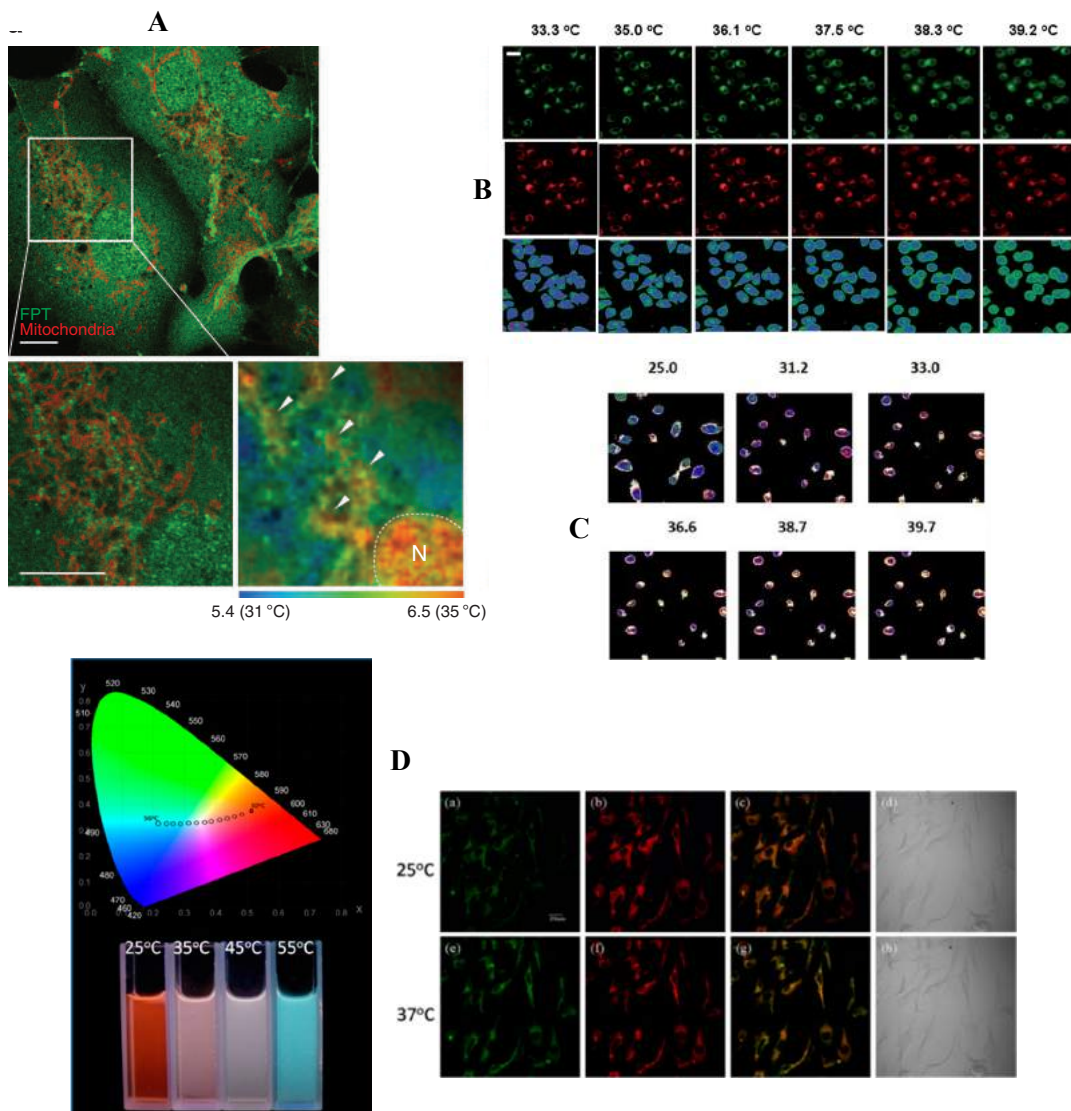
Η συσχέτιση φωτοφυσικών μεγεθών όπως η μεταβολή της έντασης φθορισμού, η μετατόπιση του μεγίστου της κορυφής ή η μεταβολή του λόγου μεταξύ της έντασης δύο

χαρακτηριστικών κορυφών εκπομπής φθορισμού και η εμφάνιση του φαινομένου FRET, με δομικές αλλαγές σε φθορίζοντα θερμοαποκρίσιμα πολυμερή έχει συγκροτήσει μία ξεχωριστή κλάση υλικών, τα λεγόμενα “μοριακά θερμοόμετρα”. Για πρώτη φορά το 2003 οι ομάδες των Uchiyama και Iwai παρασκεύασαν φθορίζοντα γραμμικά πολυμερή από τον συμπολυμερισμό του NiPAm με πολυμερίσιμα ανάλογα της βενζοφουράνης [158]. Ενώ αναφέρουν ότι η αύξηση της έντασης φθορισμού απορρέει ευθέως από την αύξηση της υδροφοβικότητας δεν διευκρινίζεται αν σχετίζεται με ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις ή με τον σχηματισμό συσσωματωμάτων. Σε μεταγενέστερη δημοσίευση ο Uchiyama πρότεινε ότι ο μηχανισμός της ενίσχυσης του φθορισμού προέρχεται από ενδομοριακές υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, ενώ με σκοπό την ελαχιστοποίηση τους και επακολούθως την αύξηση της διακριτικής ικανότητας, προστέθηκαν ιοντικά μονομερή στο ίδιο πολυμερικό σύστημα [159]. Εμβόλιμα, αξίζει να αναφερθεί η μελέτη των Gota et al. [160] πάνω στην θερμοκρασιακή εξάρτηση του χρόνου ζωής φθορισμού, τ_f , γραμμικών τυχαίων συμπολυμερών P(NIPAM-co-DBD-AA) όπου DBD-AA: σουλφονιωμένο ανάλογο της βενζοφουράνης. Η αύξηση του τ_f από 4.22 σε 14.1 ns στο θερμοκρασιακό εύρος 30 - 35 °C μεταφράζεται σε αύξηση κατά 27 % ανά °C και παρέχει εξαιρετική διακριτική ικανότητα. Το ίδιο λειτουργικό μονομερές είχε χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν από τον Iwai για την παρασκευή μικροπηκτών με βάση μονομερή ακρυλαμιδίου διαφορετικού βαθμού υδροφιλικότητας, καταφέροντας με αυτόν τον τρόπο να παρασκευάσει υλικά με οπτική απόκριση σε διαφορετικά φάσματα θερμοκρασίας [161]. Οι Shiraishi et al. [162] συνέθεσαν γραμμικό τυχαίο συμπολυμερές P(NiPAm-co-N-ακρυλοσουκινιμίδιου) [P(NiPAm-co-NASI)] σε αναλογία [NiPAm]:[NASI] = 92:1, και έπειτα από την σύζευξη του άμινο αιθυλεναμιδίου της ροδαμίνης B (RhBAEAm) στις σουκινιμιδικές θέσεις παρασκεύασαν το φθορίζων πολυμερές P(NiPAm-co-RhBAEAm). Το πολυμερές επέδειξε *off-on-off* συμπεριφορά φθορισμού στο θερμοκρασιακό παράθυρο 10 °C - 55 °C παρουσιάζοντας μέγιστη ισχύ εκπομπής στους 33 °C εξαιτίας του αντιστρεπτού σχηματισμού μικροσκοπικών συσσωματωμάτων και της εγγενούς ευαισθησίας της ροδαμίνης σε αλλαγές της πολικότητας.

Η διακρίβωση του μηχανισμού ενίσχυσης του φθορισμού συντελέστηκε με ευκρίνεια στην εργασία των ομάδων των Tang και Sun [163], όπου εξετάστηκε η θερμοκρασιακή εξάρτηση της φωτοφυσικής συμπεριφοράς γραμμικών τυχαίων συμπολυμερών P(NiPAm-co-TPE), όπου TPE ένα πολυμερίσιμο ανάλογο του τετραφανυλαιθυλενίου. Καθώς είναι γνωστό ότι το TPE εμφανίζει φθορισμό εξαρτώμενο από την μοριακή συσσωμάτωση (δεν παρουσιάζει φθορισμό όταν είναι διαλυμένο σε καλούς διαλύτες αλλά φθορίζει όταν βρίσκεται σαν αιώρημα σε κακούς διαλύτες) και παράλληλα είναι υδρόφοβο, η απότομη αύξηση της έντασης μετά τους 28 °C αποδόθηκε στον σχηματισμό συσσωματωμάτων του πολυμερούς, όπως αποδείχθηκε από μετρήσεις DLS. Στο

ίδιο πνεύμα, η ομάδες των Liu και Zhang [164] παρασκεύασαν δισυσταδικά τυχαία συμπολυμερή P[(NiPAM-*co*-FITC)-*b*-(OEGMA-*co*-RhBAm)], όπου OEGMA: ολιγομερικός μεθακρυλικός εστέρας της αιθυλενογλυκόλης και RhBAm: ακρυλικό υδραζίδιο της ροδαμίνης Β (RhBEAm). Πάνω από την LCST αναφέρεται ο σχηματισμός μικυλίων με καλά καθορισμένες διαστάσεις ($D_H = 44$ nm) και χαμηλή πολυδιασπορά ($PDI = 0.065$) και σημαντική άνοδο του λόγου εκπομπής φθορισμού $I_{582} : I_{522}$ σε pH = 5.5 ως αποτέλεσμα της εμφάνισης FRET μεταξύ των καταλοίπων FITC και RhBAm. Οι Chen και Chen [165] παρέκαμψαν την στρατηγική ενσωμάτωσης δύο διαφορετικών χρωμοφώρων, μέσω της ενσωμάτωσης πολυμερίσιμου παραγώγου της 3-υδροξυφλαβόνης σε μικροπηκτές PNiPAM. Η ανίχνευση θερμοκρασιακών μεταβολών πραγματοποιείται δια γυμνού οφθαλμού, καθώς το μέγιστο της φθορίζουσας εκπομπής μεταπίπτει από τα 438 nm (κυανό) στα 533 nm (πράσινο). Το εν λόγω σύστημα υπερτερεί έναντι των αντίστοιχων συστημάτων με ιχνηθέτηση πυρενίου όπου η μεταβολή του λόγου εκπομπής I_3 (391 nm) : I_1 (371 nm) δεν αντιστοιχεί στο ορατό.

Συγγενικά συστήματα με όσα έχουν περιγραφεί παραπάνω έχουν βρει εφαρμογή στον προσδιορισμό της ενδοκυτταρικής θερμοκρασίας με οπτικά μέσα σε *in-vitro* μελέτες. Μία εκδοχή των μακρομοριακών θερμομέτρων του Uchiyama [166] απέφερε για πρώτη φορά την θερμική χαρτογράφηση κυττάρων της σειράς COS7 (Εικόνα 2.9Α), με χωρική διακριτική ανάλυση κοντά στο όριο της περίθλασης του ορατού φωτός (~200 nm) και θερμοκρασιακή ανάλυση στο εύρος των 0.18 - 0.58 °C. Η μίξη δύο διαφορετικών γραμμικών πολυμερών του τύπου P(NiPAM-*co*-RhBAm) και P(NiPAM-*co*-NBDAA) σε μοριακή αναλογία 1:100 (όπου RhBAm και NBDAA: πολυμερίσιμα ανάλογα της ροδαμίνης Β και της βενζοξαδιαζόλης) παρείχε την απαραίτητη αναλογικότητα στο οπτικό σήμα για την συσχέτιση θερμοκρασιακών διαφορών στον ενδοκυττάριο χώρο της σειράς HeLa [167] (Εικόνα 2.9Β). Η θερμοκρασία της ίδιας κυτταρικής σειράς απεικονίστηκε οπτικά μέσω της συνέργειας της ανόργανης φάσης ΝΣ Au και του φθορίζοντος πολυμερούς PNiPAM-*co*-NBDAA [168]. Η ανόργανη φάση πρόσδεσε την οπτική αναλογικότητα και η φάση του πολυμερούς αποτέλεσε την μονάδα οπτικής μετάφρασης του θερμοκρασιακού ερεθίσματος, επιτυγχάνοντας διακρισιμότητα της τάξης των 0.3 με 0.5 °C (Εικόνα 2.9C). Οι Liu et al. [169] παρασκεύασαν ένα καινοτόμο σύστημα FRET για την χρωματικά ευκρινή αποτύπωση θερμοκρασιακών μεταβολών: ένα πολυμερίσιμο παράγωγο της χρωμοφόρας διπυρέν-1-υλ(2,4,6-τρισοπροπυλφαινυλ)βοράνιο ενσωματώθηκε σε μικροπηκτές PNiPAM, στο πορώδες των οποίων φυσιοροφήθηκε η χρωστική κόκκινο του Νείλου. Η χρωματική διαφορά ανάμεσα στους 25 °C και στους 37 °C σε κύτταρα NIH/3T3 παρατίθεται στην Εικόνα 2.9D.



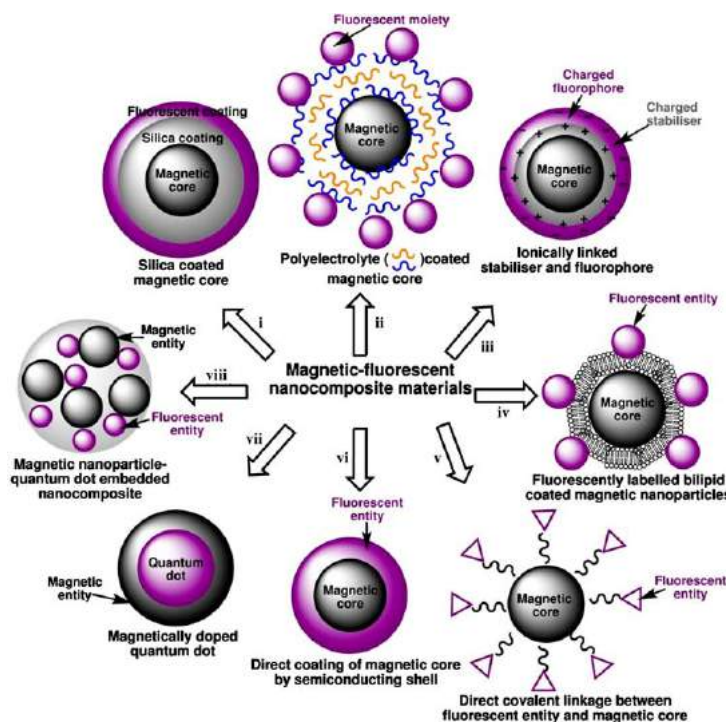
Σχήμα 2.9 *A*) Τοπική παραγωγή θερμότητας κοντά στα μιτοχόνδρια ζωντανών κυττάρων της σειράς COS7. (Κάτω δεξιά): Με βέλη σημειώνονται οι περιοχές παραγωγής θερμότητας, N: πυρήνας [166]. *B*) Φωτογραφίες συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού σε διαφορετικές θερμοκρασίες σε κύτταρα της σειράς HeLa. (1^η σειρά): σήμα καναλιού GFP. (2^η σειρά): σήμα καναλιού CY3. (3^η σειρά): ανασύνθεση των σημάτων από το λογισμικό [167]. *C*) Αναλογική ανασύνθεση των σημάτων από τα κανάλια GFP και CY3 για την χρωματική απεικόνιση της θερμοκρασίας καρκινικών κυττάρων HeLa [168]. *D*) (Αριστερά): Χρωματικό διάγραμμα CIE όπου αποδίδεται η εξάρτηση των (x, y) χρωματικών συντεταγμένων από την θερμοκρασία. (Δεξιά): Απεικόνιση των κυττάρων NIH/3T3 με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού στους 25 °C και 37°C [169].

Περισσότερο “εξωτικές” εφαρμογές των θερμοαποκρίσιμων φθορίζοντων πολυμερικών δομών αφορούν την ενσωμάτωση σε συστήματα φωτονικής λογικής. Ένα γραμμικό τυχαίο πολυμερές P(NiPMAM-*co*-MDCPDP), όπου NiPMAM: N-ισοπροπυλ-

μεθακρυλαμίδιο και MDCPDP: ένα παράγωγο του δικυανο-μεθυλενο-4H-πυρανίου, εξυπνήρησε ως οπτική λογική πύλη NOR ή INHIBIT ανάλογα με τον συνδυασμό των ερεθισμάτων (pH, T, [Cu²⁺]) που δεχόταν στην “είσοδο” [170]. Η Sambe και οι συνεργάτες της εκμεταλεύτηκαν την υστέρηση θερμοαποκρίσιμων φθορίζοντων πολυμερών για την παρασκευή ενός υλικού το οποίο έχει την δυνατότητα να απομνημονεύει και να απεικονίζει χρωματικά την θερμική ιστορία του διαλύματος [171].

2.5 Μαγνητικά-Φθορίζοντα Νανοϋβριδικά Συστήματα

Οι Corr et al. [172] ταξινομήσαν τα μαγνητικά-φθορίζοντα νανοϋβριδικά συστήματα για εφαρμογές στην βιολογία και την βιοϊατρική με γνώμονα την αρχιτεκτονική της νανοδομής (Σχήμα 2.10) χωρίς να επιχειρείται διάκριση σχετικά με την προέλευση του φθορισμού (μοριακές χρωμοφόρες ή κβαντικές τελείες). Η συγκεκριμένη κλάση των υλικών αποτέλεσε επίσης το αντικείμενο άρθρου ανασκόπησης από την ομάδα του Elaissari [173].

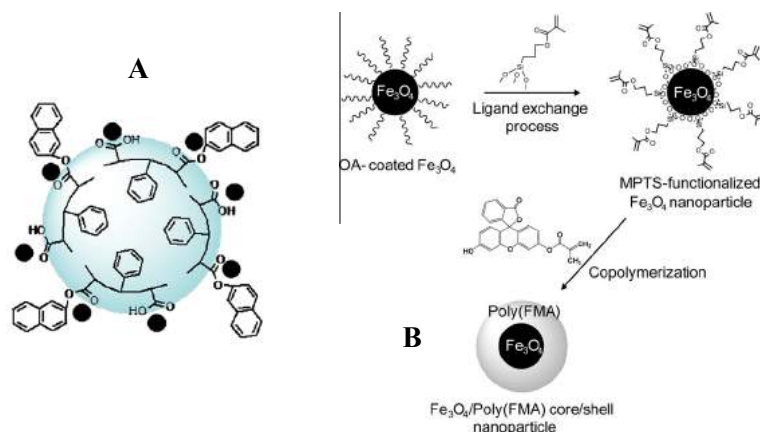


Σχήμα 2.10 Πιθανές αρχιτεκτονικές για την παρασκευή φθορίζοντων-μαγνητικών υλικών [172].

Ο συνδυασμός μαγνητικών και φθορίζοντων ιδιοτήτων είναι επιθυμητός σε πιθανές εφαρμογές στην βιοϊατρική τεχνολογία καθώς έχει επιτρέψει την ταυτόχρονη απεικόνιση με μαγνητική τομογραφία (MRI) και την οπτική απεικόνιση με συμβατική μικροσκοπία [174, 175]. Πληθώρα υλικών έχει επιστρατευτεί ως το “μαλακό” συστατικό στην ανάπτυξη διττός

λειτουργικών *μαγνητικών/φθορίζοντων* νανοϋβριδικών υλικών, συμπεριλαμβανομένων εναλλασόμενων στρωμάτων πολυηλεκτρολυτών αντίθετου φορτίου [176], μοριακώς αποτυπωμένων πολυμερών [177], αμφίφιλων πολυμερών [178], δενδριμερών [179, 180], πολυσακχαριτών [181, 182], συμπλόκων βιομορίων [183], βιοδιασπώμενων πολυεστέρων [184] ή PEG [185]. Σε όλες τις παραπάνω αναφορές η οργανική φάση επιτελεί τον ρόλο του παθητικού στρώματος μέσω του οποίου *i)* η χρωμοφόρα ακινητοποιείται με μόνιμο χημικό ή άλλου τύπου δεσμό και *ii)* ταυτόχρονα επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός της χρωμοφόρας από τον μαγνητικό πυρήνα για την αποφυγή της απόσβεσης του φθορισμού [186]. Από την άλλη πλευρά, οι πολυμερικές μικροπηκτές με βάση το PNIPAm συνιστούν μία ευρεία κλάση υλικών, πάνω στην οποία μπορεί να βασιστεί η ανάπτυξη λειτουργικών υλικών με πολλαπλή αποκρισσιμότητα.

Στην παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση δόθηκε μεγαλύτερη έμφαση στις στρατηγικές ανάπτυξης μαγνητικών-φθορίζοντων νανοϋβριδικών υλικών με χρήση μοριακών χρωμοφώρων, λόγω της καλύτερης βιολογικής ανεκτικότητας των τελευταίων έναντι των κβαντικών τελειών που ως επί το πλείστον περιλαμβάνουν βαρέα μέταλλα (Cd, Hg, Se, Te, In, As, Pb). Οι Govindaiah et al. [187] εφαρμόζοντας συμβατικό πολυμερισμό γαλακτώματος απουσία τασιενεργού, παρασκεύασαν φθορίζοντα “σκλήρα” κολλοειδή P(St-co-MAAc-co-NMA), όπου St: στυρένιο, MMAc: μεθακρυλικό οξύ και NMA: ακρυλικός εστέρας της ναφθαλεν-2-όλης. Η υδροφιλικότητα του MMAc οδηγεί στον εγγενή εμπλουτισμό της επιφάνειας του κολλοειδούς με δραστικές -COOH θέσεις κατά τον πολυμερισμό γαλακτώματος. Το φθορίζον-μαγνητικό νανοϋλικό προήλθε από την συναρμογή προσχηματισμένων ΝΣΟΣ Fe₃O₄ τα οποία συνετέθησαν με υδροθερμική μέθοδο (Σχήμα 2.11A). Ο ίδιος συγγραφέας σε μεταγενέστερη εργασία ακολούθησε την αντίστροφη πορεία, “διακοσμώντας” την επιφάνεια των ΝΣΟΣ Fe₃O₄ με παραμένοντες διπλούς χρησιμοποιώντας το μεθακρυλοϋλπρόπυλ τριαίθοξυ σιλάνιο και ακολούθως πολυμερίζοντας τον FMA [188] (Σχήμα 2.11B). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το πρωτόκολο που ακολουθήθηκε από την ομάδα του Konno [189], όπου αρχικά ΝΣ Fe₃O₄ παρασκευάστηκαν με συμβατική συγκαταβύθιση αλάτων Fe παρουσία παράγοντα επιφανειακής συλιλίωσης. Ακολούθησε ετεροθρόμβωση με προσχηματισμένα ΝΣ SiO₂, ενώ τα προκύπτοντα υβριδικά ΝΣ SiO₂@Fe₃O₄ υαλώθηκαν εκ νέου πριν από τον seeded πολυμερισμό γαλακτώματος St παρουσία πυρενίου. Σε μία προσέγγιση τύπου “grafting-from”, η έναρξη του ATRP μέσω ενεργοποίησης από μεταφορά ηλεκτρονίων (activators generated from electron transfer, AGET) από την επιφάνεια -Br τροποποιημένων ΝΣΟΣ έχει αναφερθεί για τον διαδοχικό πολυμερισμό του φθορίζοντος μονομερούς 9-(4-βινυλοβενζυλο)-9H-καρβαζόλιο και του μεθακρυλικού μεθυλαιθέρα της PEG-300 [190].



Σχήμα 2.11 “Σκληρά” φθορίζοντα κολλοειδή A) με βάση το PSt και επιφανειακή τροποποίηση με ΝΣΟΣ Fe_3O_4 [187] και B) με πυρήνα ΝΣΟΣ Fe_3O_4 και επιφανειακή τροποποίηση με πολυμερές FMA [188].

2.5.1 Βιολογικές Εφαρμογές Φθορίζοντων-Μαγνητικών Νανοϋβριδικών Συστημάτων

Ένα από τα πιο δυναμικά αναπτυσσόμενα πεδία εφαρμογής των εν λόγω συστημάτων αποτελεί η πρόσληψη σε καρκινικά κύτταρα και η εκμετάλευση του μαγνητικού σήματος. Οι Lee et al. [191] παρασκεύασαν νανοϋβριδικά μαγνητικού πυρήνα και πολυμερικού κελύφους με συζευμένη την χρωστική Cy5.5 για την διττή απεικόνιση *in vivo* καρκινικών όγκων με μικροσκοπία φθορισμού και μαγνητική τομογραφία T2 χρόνου αποκατάσης. Υιοθετώντας την ίδια αρχιτεκτονική, η ομάδα του Zhao [192] παρασκεύασε νανοϋβριδικά σωματίδια με κέλυφος μοριακώς αποτυπωμένου φθορίζοντος συμπολυμερούς με βάση το PNIPAm. Το υλικό προσιδιάζει την δράση των αντισωμάτων, επιτρέποντας την ενδοκυτταρική σύζευξη με πρωτεΐνες. Πολύ πρόσφατα ένα ανάλογο σύστημα, όπου η φθορίζουσα λειτουργικότητα ενσωματώθηκε στην υαλώδη επικάλυψη του μαγνητικού πυρήνα ΝΣΟΣ Fe_3O_4 και η πολυμερική επικάλυψη με πολυαιθυλενοϊμίνη προσέφερε θέσεις σύζευξης με φολικό οξύ, χρησιμοποιήθηκε για την απόδοση siRNA καρκινικά κύτταρα της σειράς MDA-MB-231 [193].

Οι νανοφάσεις του άνθρακα έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης ως πλατφόρμες για την ανάπτυξη φθορίζοντων-μαγνητικών συστημάτων. Οι Chang, Hwang και Chiang [194] παρασκεύασαν μαγνητικά νανοδιαμάντια (MNDs) μέσω της *in situ* αποικοδόμησης φεροκενίου υπό την επίδραση μικροκυματικής ακτινοβολίας και εν συνεχεία εισήγαγαν την φθορίζουσα λειτουργικότητα μέσω της έναρξης του συμπολυμερισμού AAc και FMA από την επιφάνεια των MNDs. Η επιτυχημένη πρόσληψη του υλικού από κύτταρα HeLa επιβεβαιώθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού. Μεταγράφοντας αυτούσια την προηγούμενη μεθοδολογία, οι Ganesh και Ling [195] παρασκεύασαν την γραφενική εκδοχή

του υλικού, όπου μελετήθηκε επίσης η πρόσληψη από κύτταρα HeLa και η *in vivo* τοξικότητα σε έμβρυα ψαριών ζέμπρα. Η εξαιρετική προοπτική των ΝΣΟΣ ως δομικά στοιχεία σε συστήματα μεταφοράς και ελεγχόμενης απόδοσης φαρμακευτικών ουσιών στον εγκέφαλο, παρακάμπτοντας τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (blood brain barrier, BBB) [196, 197], οδήγησε την ομάδα του Dringen [198] στην παρασκευή ΝΣΟΣ επικαλυμμένων με την φθορίζουσα χρωστική BODIPY και την μελέτη της *in vitro* πρόσληψης από μικρογλοιακά κύτταρα του εγκεφάλου. Η ερευνητική ομάδα της Pellegrino [178] ανέπτυξε φθορίζοντα-μαγνητικά νανοϋλικά από την ελεγχόμενη συσσωμάτωση ΝΣΟΣ γ -Fe₂O₃ και ενός αμφίφιλου εναλασσόμενου συμπολυμερούς πολυ(μαλεϊκού ανυδρίτη-*alt*-οκταδεκενίου) το οποίο ήταν ενοφθαλμισμένο με ολιγομερή θειοφαινίου. Το μέγεθος κυμάνθηκε από 30 έως 400 nm μεταβάλλοντας τις συνθήκες και τα νανοϋλικά χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία για την ταξινόμηση καρκινικών κυττάρων.

2.5.2 Φαινόμενα Απόσβεσης Εκπομπής σε Φθορίζοντα-Μαγνητικά Νανοϋβριδικά Υλικά

Κρίνεται απαραίτητο σε αυτό το σημείο να πραγματοποιηθεί μία σύντομη περιγραφή του φαινομένου της απόσβεσης της εκπομπής φθορισμού, όταν μοριακές χρωμοφόρες βρίσκονται στο άμεσο περιβάλλον ανόργανων νανοδομών. Κατ' αντιστοιχία με τα μοριακά συστήματα FRET, η μεταφορά ενέργειας πραγματοποιείται μέσω ενός σχηματιζόμενου ζεύγους δότη (χρωμοφόρα) - δέκτη (νανοσωματίδιο) [199]. Το φαινόμενο δεν εξαντλείται σε μεταλλικά ΝΣ αλλά εγείρεται επίσης τόσο σε νανοδομές άνθρακα [194] και μεταλλικά οξειδία, όπου ο ακριβής μηχανισμός έχει προταθεί ότι εμπλέκει την εκδίωξη ενός ηλεκτρονίου από το μόριο και την μετάβαση στην ζώνη αγωγιμότητας της ανόργανης δομής [200]. Η μείωση της εκπεμπόμενης ισχύος φθορισμού από την άμεση επαφή της χρωμοφόρας με την επιφάνεια των ΝΣ, όταν συγκρίνεται με την εκπομπή της χρωμοφόρας σε διάλυμα, έχει αναφερθεί ότι κυμαίνεται σε ποσοστά της τάξης του 34% [201], ~ 70% [202] ή ακόμα και μέχρι την σχεδόν πλήρη απόσβεση (95 - 99%) [199]. Η απόσβεση του φθορισμού αποτελεί μία αναπόφευκτη πειραματική περιπλοκή κατά τον σχεδιασμό φθορίζοντων μαγνητικών νανοδομών και είναι αποδεκτή στα πλαίσια που ορίζονται από την εκάστοτε εφαρμογή [203]. Από την άλλη πλευρά, η απόσβεση φθορισμού της FITC από μεταλλικά ΝΣ Au έχει αξιοποιηθεί για την ανάπτυξη ενός καινοτόμου συστήματος ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση της α -εμβρυϊκής πρωτεΐνης (AFP, Alpha-Fetal Protein) [204].

2.6 Εφαρμογές Μικροπηκτών και Νανοϋβριδικών Υλικών στην Μεταφορά και Ελεγχόμενη Αποδέσμευση Φαρμάκων

Η εξαιρετική βιοσυμβατότητα και ο συνδυασμός ελκυστικών φυσικοχημικών χαρακτηριστικών (νανοδιαστάσεις και έλεγχος του μεγέθους, πορώδης δομή, δυνατότητα πολλαπλής αποκρισιμότητας, επιδεκτικότητα χημικής τροποποίησης) έχουν οδηγήσει στην ενσωμάτωση των μικροπηκτών με βάση το PNiPAM σε εφαρμογές ενθυλάκωσης και ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμακευτικών ουσιών. Η ποικιλότητα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του φορέα και της ουσίας προς ενθυλάκωση καταδεικνύεται στην εργασία των Hoare και Pelton [205], όπου σειρά κατιοντικών και ουδέτερων φαρμάκων προσροφήθηκαν σε μικροπηκτές του τύπου P(NiPAM-co-όξινο μονομερές). Σε συνέχεια αυτής της σειράς μελετών, η ομάδα του Kohane [206] κατάφερε να αριστοποιήσει τις συνθήκες ενθυλάκωσης ενός τοπικού αναισθητικού (bupivacaine) σε μικροπηκτές P(NiPAM-co-AAc). Η ελεγχόμενη αποδέσμευση του αναισθητικού παράγοντα μελετήθηκε με στόχο την επίτευξη του μέγιστου χρόνου αναισθησίας μετεγχειρητικά. Η φτωχή υδατοδιαλυτότητα ενός φαρμάκου μπορεί να αναστείλει σημαντικά την δράση του εξαιτίας της ελλιπούς βιοδιαθεσιμότητας. Η αντιοξειδωτική δράση των κουρκουμοειδών (κουρκουμίνη, δεμεθοξικουρκουμίνη, δις-δεμεθοξικουρκουμίνη) είναι γνωστή αλλά τα μόρια επιδεικνύουν μικρή συστημική κυκλοφορία και χαμηλή συγκέντρωση σε ιστούς. Πολύ πρόσφατα βρέθηκε ότι συμπολυμερικές μικροπηκτές του τύπου P(NiPAM-co-AAc-co-VI), μπορούν να εξυπηρετήσουν ως νανοφορείς για την ενθυλάκωση κουρκουμοειδών [207]. Η ρινική χορήγηση των νανοθεραπευτικών σε πειραματόζωα στα οποία είχε τεχνητά προκληθεί ισχαιμικό επεισόδιο, οδήγησε στην αποτελεσματικότερη αποκατάσταση της νευροφυσιολογικής δραστηριότητας σε σχέση με την ενδοφλέβια χορήγηση, όπως αποδείχθηκε από την *in vivo* μελέτη. Ένα αντιυπερτασικό φάρμακο (προπανολόλη) ενθυλακώθηκε σε μικροπηκτές P(NiPAM-co-HEAM) [208], όπου HEAM: N-υδροξυαιθυλακρυλαμίδιο. Ο ρυθμός απελευθέρωσης του φαρμάκου εμφάνισε ισχυρή εξάρτηση από την θερμοκρασία: πάνω από την VPTT το φάρμακο διαχέεται ταχέως από τις μικροπηκτές ενώ για $T > VPTT$ το προφίλ αποδέσμευσης χαρακτηρίζεται από γρήγορη αποδέσμευση για τα πρώτα 5 min και έπειτα από παρατεταμένη διάχυση.

Η ανοχή ευρέως διαδεδομένων λοιμωδών βακτηριδίων σε κοινά αντιβιοτικά έχει στρέψει την ερευνητική δραστηριότητα στην αναζήτηση εναλλακτικών. Μικροπηκτές με βάση το PNiPAM έχουν χρησιμοποιηθεί σαν οχήματα για την μεταφορά αντιβακτηριακών παραγόντων. Συγκεκριμένα, βακτηριοφάγα K ενθυλακώθηκαν σε μικροπηκτές του τύπου P(NiPAM-co-AIAm), όπου AIAm: αλλυλαμίνη και μελετήθηκε η δράση έναντι σε βακτηριακή λοίμωξη με *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Οι νανοφορείς επέδειξαν μέγιστη δραστηριότητα σε θερμοκρασίες που σχετίζονται με παθολογικές περιοχές της

επιδερμίδας (~37 °C) [209]. Στο ίδιο πλαίσιο, η εξωτερική χορήγηση δραστικών ουσιών όπως το σαλικυλαμίδιο, ο μεθυλικός 4-υδροξυβενζοϊκός εστέρας (methyl paraben) και ο προπυλικός 4-υδροξυβενζοϊκός εστέρας (propyl paraben) έχουν μελετηθεί ως προς την δυνατότητα ενθυλάκωσης και απελευθέρωσης από μικροπηκτές του τύπου poly(NiPAm-co-BA-co-MAAc), όπου BA: ακρυλικός βουτυλεστέρας [210].

Η ενθυλάκωση ενός πεπτιδίου με αντιφλεγμονώδη δράση πραγματοποιήθηκε αξιοποιώντας μικροπηκτές του τύπου P(NiPAm-co-AMPSA), όπου AMPSA: 2-ακρυλαμιδο-2-μεθυλ-1-προπανοσουλφονικό οξύ. Οι δισουλφιδικοί δεσμοί του παράγοντα σχηματισμού σταυροδεσμών που χρησιμοποιήθηκε (*N,N'*-δις-ακρυλόυλ κυσταμίνη) επήγαγαν την ελεγχόμενη απελευθέρωση σε αναγωγικά περιβάλλοντα ή σε όξινο pH [211]. Η ενθυλάκωση και απελευθέρωση βιομορίων έχει επίσης υπάρξει το αντικείμενο της μελέτης των Zhu et al. [212]. Η BSA χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη-μοντέλο κατά την προσρόφηση από μικροπηκτές του τύπου poly(NiPAm-co-VAGA), όπου VAGA: 6-Ο-βινυλαδιποϋλ-*d*-γαλακτόζη. Η κινητική της απελευθέρωσης της BSA βρέθηκε ότι ελέγχεται από παράγοντες όπως η σύσταση της μικροπηκτής και η θερμοκρασία.

Οι μικροπηκτές με βάση το PNiPAm έχουν επίσης μελετηθεί ως προς την ενθυλάκωση αντικαρκινικών παραγόντων. Το χημειοθεραπευτικό και ανοσοκατασταλτικό μεθοτρεξάτη, ενθυλακώθηκε σε μικροπηκτές του τύπου P(NiPAAm-co-PAAc)-*g*-PEI, όπου PEI: πολυαιθυλενοϊμίνη [213]. Το νανοθεραπευτικό σχήμα βρέθηκε ότι απελευθερώνει ελεγχόμενα το φάρμακο σε φυσιολογικές συνθήκες (T=37 °C, pH=7.4). Με σκοπό την ενεργή στόχευση σε καρκινικούς όγκους, οι Blanco et al. [214] τροποποίησαν την επιφάνεια μικροπηκτών με βάση το PNiPAm με φολικό οξύ καθώς είναι γνωστό ότι οι υποδοχείς του φολικού οξέος υπερεκφράζονται σε ορισμένα καρκινικά κύτταρα. Ενθυλακώθηκαν δύο χημειοθεραπευτικά, η 5-φλουορακίλη (5-FU, υδρόφιλο) και η ταμοξιφένη (υδρόφοβο), τα οποία επέδειξαν σημαντικά διαφορετικά προφίλ αποδέσμευσης. Το 5-FU έχει επίσης ενθυλακωθεί σε μικροπηκτές P(NiPAm-co-GMA) [215], όπου GMA: γλυκιδυλικός μεθακρυλεστέρας, αξιοποιώντας την ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ του φαρμάκου και των εποξειδικών ομάδων στις μικροπηκτές. Η ενθυλάκωση του χημειοθεραπευτικού δοσεταξέλη σε νανοφορείς P(NiPAm-co-Am), όπου Am: ακρυλαμίδιο, έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία [216]. Όπως αποδείχθηκε στην μελέτη *in vivo*, η συστηματική χορήγηση του νανοθεραπευτικού επέφερε μεγαλύτερη επιβράδυνση της ανάπτυξης καρκινικών όγκων σε σχέση με την περίπτωση όπου η δοσεταξέλη χορηγούνταν αυτούσια.

Οι νανοϋβριδικοί φορείς με βάση το PNiPAm μπορούν να προσφέρουν περαιτέρω οφέλη, όπως η αύξηση των παραμέτρων ελέγχου της αποδέσμευσης πέρα από τις μεταβολές της θερμοκρασίας ή/και του pH (ακτινοβολία, μαγνητικά πεδία) ενώ ταυτόχρονα να παρέχουν διαγνωστική λειτουργικότητα. Εμφορούμενη από αυτή την ιδέα, η ομάδα της Shuiqin Zhou [217] παρασκεύασε core/shell νανοϋβριδικές πηκτές οι οποίες αποτελούνταν

από πυρήνα ΝΣ Ag και κέλυφος από P(NiPAm-co-AAc). Η νανοφάση του ευγενούς μετάλλου παρείχε την οπτική λειτουργικότητα, καθιστώντας τους νανοφορείς ανιχνεύσιμους σε μελέτες κυτταρικής απεικόνισης ενώ στο “μαλακό” κέλυφος ενθυλακώθηκε η διπυριδαμόλη ένα αντιαιμοπεταλιακό/αντιπηκτικό φάρμακο. Η απελευθέρωση του φαρμάκου στους 37 °C βρέθηκε ότι εξαρτάται από το pH ενώ το ποσοστό φόρτωσης ήταν συνάρτηση τους πάχους του πολυμερικού κελύφους. Ακολουθώντας μία τροποποιημένη εκδοχή του πρωτόκολου των Zafeiropoulos et al. [101], οι Lawes et al. [218] εναπόθεσαν προσχηματισμένα ΝΣ Fe₃O₄ στην επιφάνεια μικροπηκτών P(NiPAm-co-SA), οι οποίες εξυπνρήσαν ως φορείς του αντικαρκινικού παράγοντα μιτοξανδρόνη. Η παρουσία της μαγνητικής νανοφάσης επέτρεψε την ελεγχόμενη μετάβαση στην “υδρόφοβη” κατάσταση πλην όμως ο ρυθμός απελευθέρωσης του φαρμάκου δεν παρουσίασε ισχυρή εξάρτηση από την μετάπτωση φάσης όγκου του φορέα. Σε μία αρκετά ενδιαφέρουσα εφαρμογή, μικροπηκτές PNiPAm και επιφανειακά τροποποιημένα ΝΣΟΣ χρησιμοποιήθηκαν ως πληρωτικά υλικά σε μακροσκοπικές πηκτές PNiPAm παραγόμενες από την *in-situ* πήκτωση προπαρασκευασμένων λειτουργικών πολυμερών [219]. Η θέρμανση της νανοςύνθετης δομής από τους 37 στους 43 °C με εφαρμογή εναλλασσόμενου μαγνητικού πεδίου προκάλεσε την συρρίκνωση των διάσπαρτων μικροπηκτών. Επακόλουθα, αυξήθηκε ο ελεύθερος όγκος στο εσωτερικό της μακροπηκτής και προήχθη η διάχυση μίας πρότυπης μακρομοριακής θεραπευτικής ένωσης (δεξτράνη επισημασμένη με φθορεσίνη). Η αντιστρεπτότητα της διεργασίας (αυξομείωση της διάχυσης ανάλογα με την θερμοκρασία) επέτρεψε την παλμική απελευθέρωση (pulsatile release) της ουσίας. Το αντικείμενο της ενθυλάκωσης και αποδέσμευσης από μικροπηκτές PNiPAm και συναφή νανοϋβριδικά επανεξετάζεται στο Κεφ. 6, εστιάζοντας σε μελέτες όπου ως δραστική ένωση χρησιμοποιήθηκε η δοξορουβικίνη.

Κεφάλαιο 3

Τεχνικές Χαρακτηρισμού - Οργανολογία

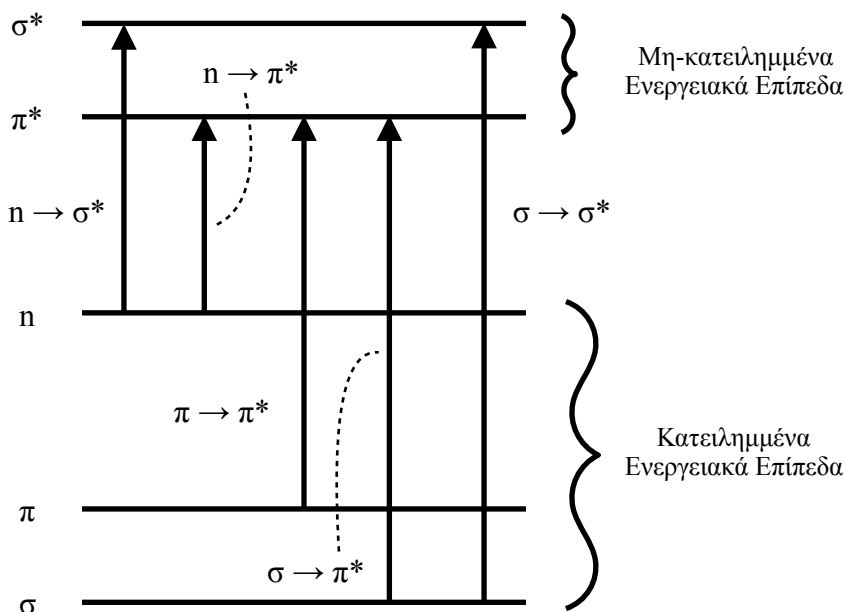
ΣΥΝΟΨΗ: Οι εφαρμοσθείσες τεχνικές χαρακτηρισμού στην παρούσα διατριβή κατηγοριοποιούνται ως *i)* φασματοσκοπικές *ii)* κολλοειδείς και *iii)* στερεάς κατάστασης. Οι τεχνικές της πρώτης κατηγορίας περιλάμβαναν τις φασματοσκοπίες UV-Vis, FT-IR, φθορισμού και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου ($^1\text{H-NMR}$) και άνθρακα ($^{13}\text{C-NMR}$). Στις κολλοειδείς τεχνικές συγκαταλέχθηκαν η δυναμική σκέδαση φωτός (dynamic light scattering, DLS) και η ηλεκτροφορητική σκέδαση φωτός (electrophoretic light scattering, ELS). Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην θεωρητική θεμελίωση της DLS καθώς αποτέλεσε την κύρια τεχνική χαρακτηρισμού. Ο χαρακτηρισμός σε στερεά κατάσταση πραγματοποιήθηκε με θερμική σταθμική ανάλυση (thermogravimetric analysis, TGA) και μαγνητομετρία παλλόμενου δείγματος (vibrating sample magnetometry, VSM). Η βασικές αρχές της συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με laser (confocal laser scanning microscopy) περιγράφονται συνοπτικά.

3.1 Χαρακτηρισμός σε Διάλυμα

3.1.1 Φασματοσκοπία UV-Vis [220, 221]

Η ατομική και μοριακή φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) παρέχει πληροφορία σχετικά με τις ηλεκτροδονητικές-περιστροφικές ενεργειακές μεταβάσεις και η καταγραφή ενός φάσματος UV-Vis συνίσταται στην μέτρηση της απορροφούμενης έντασης ακτινοβολίας συναρτήσει του μήκους κύματος στην περιοχή από 180 έως 800 nm (6.89 - 1,55 eV). Στην περίπτωση μελέτης πολυατομικών μορίων, η τεχνική δεν χαρακτηρίζεται από υψηλή διακριτική ικανότητα όσον αφορά την λεπτή υφή των δονητικών-περιστροφικών ενεργειακών επιπέδων και πρακτικά αποτυπώνει τις μεταβάσεις μεταξύ ηλεκτρονικών επιπέδων. Για το λόγο αυτό καλείται επίσης ηλεκτρονιακή φασματοσκοπία. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, γενεσιουργός αιτία της απορρόφησης αποτελεί η μετάβαση ηλεκτρονίων από την κατάσταση ελάχιστης ενέργειας (θεμελιώδης κατάσταση) σε μία ενεργειακά υψηλότερη στάθμη (διεγερμένη κατάσταση). Σύμφωνα με την θεωρία των μοριακών τροχιακών, η απορρόφηση στην περιοχή ενεργειών UV-Vis σχετίζεται με την μετάβαση ενός ηλεκτρονίου από το ανώτερο κατειλημμένο μοριακό τροχιακό (HOMO) στο κατώτερο μη-κατειλημμένο μοριακό τροχιακό (LUMO) που αποτελεί την πιθανότερη διεργασία, χωρίς να αποκλείονται μεταβάσεις από μοριακά τροχιακά χαμηλότερης ενέργειας από το HOMO σε μοριακά τροχιακά υψηλότερης ενέργειας από το LUMO. Στο Σχήμα 3.1

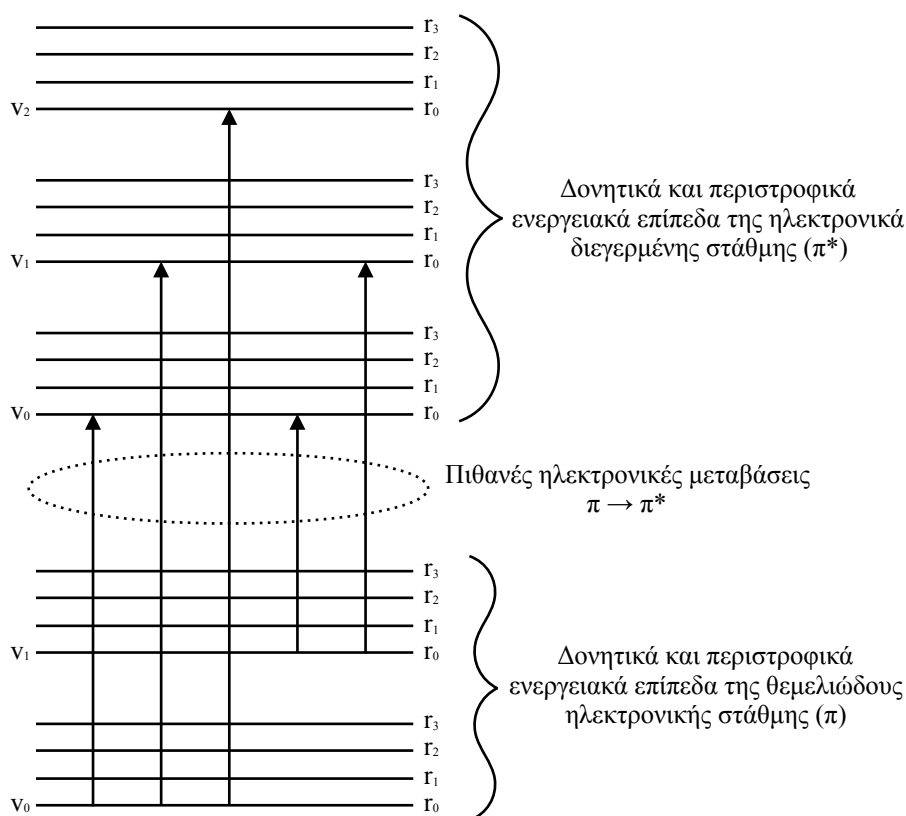
αποδίδονται σχηματικά οι μεταβάσεις μεταξύ των κατειλημμένων επιπέδων που συγκροτούν τα π , σ δεσμικά τροχιακά μαζί με το n αδεσμικό τροχιακό και των μη-κατειλημμένων επιπέδων που συγκροτούν τα π^* , σ^* αντιδεσμικά τροχιακά.



Σχήμα 3.1 Διάγραμμα ηλεκτρονικών μεταβάσεων μεταξύ μοριακών τροχιακών για το ενεργειακό φάσμα που καλύπτει η φασματοσκοπία UV-Vis.

Η κβαντική θεωρία υπαγορεύει ότι η ενεργειακή διαφορά μεταξύ δύο επιπέδων λαμβάνει αυστηρά διακριτές τιμές, συνεπώς ακτινοβολία με συγκεκριμένο μήκος κύματος και μόνο είναι δυνατόν να απορροφηθεί. Σε αντίθεση με τα ατομικά φάσματα τα οποία απαρτίζονται από οξείες κορυφές απορρόφησης, τα μοριακά φάσματα χαρακτηρίζονται από ευρείες κορυφές με διαπλάτυνση γύρω από την μέγιστη τιμή απορρόφησης, η οποία αντιστοιχεί στην ηλεκτρονική μετάβαση. Η αιτία όπως έχει ήδη αναφερθεί εδράζεται στην υπέρθεση των περιστροφικών-δονητικών ενεργειακών επάνω στα ηλεκτρονικά ενεργειακά επίπεδα όπως αποδίδεται στο Σχήμα 3.2. Η κατανόηση του μηχανισμού απορρόφησης στο φάσμα UV-Vis είναι απαραίτητη για την ερμηνεία των φαινομένων φωταύγειας στην συνέχεια. Αξίζει σε αυτό το σημείο να τονιστεί ότι τα χρωματικά φαινόμενα λόγω ηλεκτρονικών μεταβάσεων οφείλονται στην απορρόφηση σε ορισμένη περιοχή του ορατού φάσματος: ενώ το σύνολο των λειτουργικών ομάδων που απορροφούν στο UV-Vis καλούνται χρωμοφόρες, μόρια με συγκεκριμένη δομή και υποκαταστάτες προκαλούν την εμφάνιση χρώματος με την συμβατική έννοια του όρου. Συγκεκριμένα για τα οργανικά μόρια διακρίνουμε τρεις κατηγορίες χρωστικών: τα γραμμικά πολυένια, τα μη-αρωματικά συστήματα δακτυλίων και τα αρωματικά συστήματα. Κοινός τόπος των οργανικών χρωστικών αποτελεί η παρουσία συζυγιακών μοριακών τροχιακών που προέρχονται από την

εναλλαγή απλών και διπλών δεσμών. Όσο ο βαθμός της συζυγίας αυξάνεται με την προσθήκη περισσότερων ζευγών δεσμών τόσο το ενεργειακό χάσμα μεταξύ HOMO και LUMO μειώνεται προοδευτικά προκαλώντας την βαθοχρωμική μετατόπιση του φάσματος απορρόφησης. Ο βαθμός της συζυγίας είναι δυνατόν να επεκταθεί με την ομοιοπολική προσθήκη υποκαταστατών οι οποίοι δρουν είτε ως δότες (αμινομάδες, υδροξυλομάδες) είτε ως δέκτες (κυανομάδες, καρβοξυλομάδες) ηλεκτρονίων.



Σχήμα 3.2 Διάγραμμα των ηλεκτρονικών μεταβάσεων μεταξύ μοριακών τροχιακών όπου απεικονίζονται τα δονητικά και περιστροφικά ενεργειακά επίπεδα.

Η μοριακή φασματοσκοπία UV-Vis ποιοτικά χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση λειτουργικών ομάδων (αλδεϋδικών ή κετονικών καρβονυλίων, αρωματικών δακτυλίων) και την μελέτη συζυγιακών συστημάτων. Η τεχνική βρίσκει εξαιρετική χρησιμότητα στον ποσοτικό προσδιορισμό οργανικών ενώσεων (π.χ. φάρμακα, χρωστικές) σε διάλυμα μέσω της σχέσης Beer-Lambert:

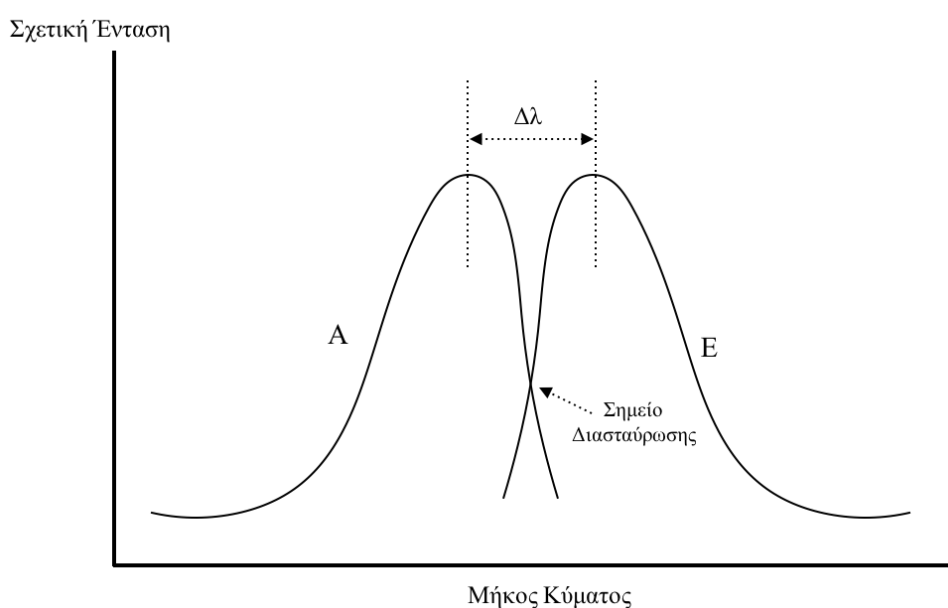
$$\log(I/I_0) = A = \varepsilon \cdot C \cdot l$$

όπου I : ένταση διερχόμενης δέσμης ακτινοβολίας, I_0 : ένταση προσπίπτουσας δέσμης ακτινοβολίας, A : απορρόφηση, C : συγκέντρωση (mol.lit^{-1}), l : μήκος διαδρομής κυψελίδας

(cm) και ϵ : συντελεστής απορρόφησης ($\text{lit.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Η γραμμική εξάρτηση της απορρόφησης από την συγκέντρωση επιτρέπει τον κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης για ουσίες όπου ο συντελεστής απορρόφησης ϵ δεν είναι διαθέσιμος βιβλιογραφικά, καθιστώντας εύκολη την τιτλοδότηση διαλυμάτων άγνωστης συγκέντρωσης.

3.1.2 Φασματοσκοπία Φθορισμού [222, 223]

Ο όρος φωταύγεια χρησιμοποιείται για να περιγράψει φαινόμενα αυθόρμητης εκπομπής ακτινοβολίας κατά την αποδιέγερση ηλεκτρονικά ή δονητικά διεγερμένων ενεργειακών καταστάσεων σε συστήματα τα οποία δεν βρίσκονται απαραίτητως σε θερμική ισορροπία με το περιβάλλον. Η τελευταία πρόταση υποδηλώνει την ανεξαρτησία του φαινομένου από την θερμοκρασία και για το λόγο αυτό η φωταύγεια είναι συνώνυμη του ψυχρού φωτισμού. Συγκεκριμένα, όταν η διέγερση προκαλείται με απορρόφηση φωτός το φαινόμενο ονομάζεται φωτοφωταύγεια (photoluminescence) και ο φθορισμός μαζί με τον φωσφορισμό αποτελούν τις συνηθέστερες εκδηλώσεις του φαινομένου. Ένα τυπικό φάσμα διέγερσης (απορρόφησης) - εκπομπής (φθορισμού) για μία οργανική φθορίζουσα ένωση αποδίδεται στο Σχήμα 3.3.



Σχήμα 3.3 Τυπικό φάσμα απορρόφησης-εκπομπής οργανικής φθορίζουσας ένωσης. Η κορυφή εκπομπής εμφανίζεται μετατοπισμένη στο ερυθρό εξαιτίας ενεργειακών απωλειών που οφείλονται μέσω στην μετατόπιση Stokes.

Η αλληλουχία των διεργασιών για την εμφάνιση του φθορισμού και οι χαρακτηριστικοί χρόνοι ζωής που συνοδεύουν κάθε στάδιο μπορούν να συνοψιστούν ως εξής:

α) Απότομη διέγερση του μορίου σε ανώτερο ηλεκτρονικό επίπεδο. Σύμφωνα με την αρχή Frank-Condon² το στάδιο της διέγερσης πραγματοποιείται ακαριαία ($\sim 10^{-15}$ s).

β) Κατά την παραμονή στην ηλεκτρονικά διεγερμένη κατάσταση λαμβάνει χώρα ανταλλαγή θερμικής ενέργειας μέσω κρούσεων με περιβάλλοντα μόρια (εσωτερική μετατροπή, EM) και αποδιέγερση σε χαμηλότερες δονητικές στάθμες (δονητική αποδιέγερση, ΔΑ). Ως αποτέλεσμα το διεγερμένο μόριο χάνει ενέργεια χωρίς την εκπομπή ακτινοβολίας με χαρακτηριστικούς χρόνους δονητικής αποδιέγερσης της τάξης των 10^{-12} s.

γ) Στην πλειονότητα των περιπτώσεων το μόριο μέσω της δονητικής αποδιέγερση μεταπίπτει στο κατώτερο δονητικό επίπεδο της διεγερμένης στάθμης όπου μπορεί να παραμείνει για χρόνους της τάξης των 10^{-8} s προτού επιστρέψει σε κάποιο δονητικό επίπεδο της θεμελιώδους.

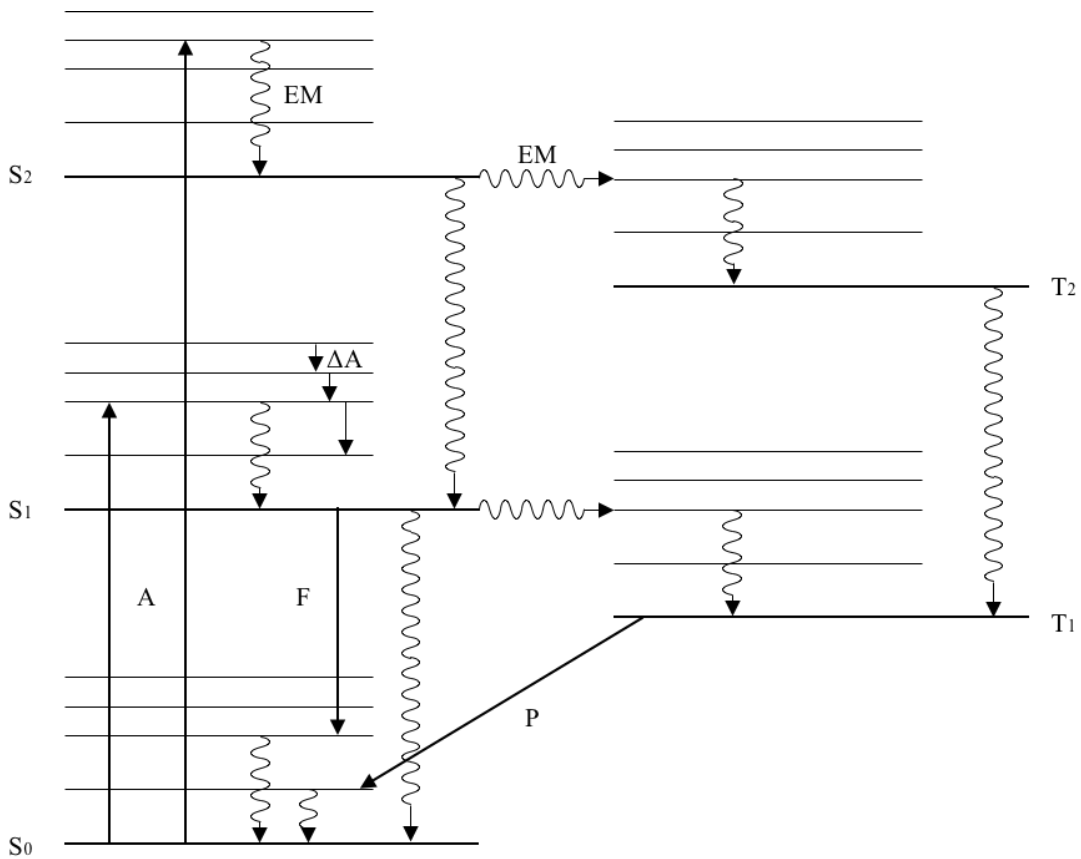
δ) Όντας στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της διεγερμένης κατάστασης και εφόσον τα περιβάλλοντα μόρια δεν είναι δυνατόν να δεχθούν το ποσό της ενεργειακής διαφοράς για την μετάβαση στην θεμελιώδη, πραγματοποιείται αυθόρμητη εκπομπή ακτινοβολίας δηλαδή φθορισμός. Η παραπάνω πορεία μπορεί να αποδοθεί σχηματικά σε ένα διάγραμμα Jablonski (Σχήμα 3.4).

Οι λεπτομέρειες του μηχανισμού εκπομπής φθορισμού αποτυπώνονται στο φάσμα διέγερσης - εκπομπής (Σχήμα 3.3). Η πρώτη παρατήρηση σχετίζεται με την βαθοχρωμική μετατόπιση του φάσματος εκπομπής σε σχέση με το φάσμα απορρόφησης και οφείλεται στο μικρότερο ενεργειακό περιεχόμενο της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας σε σχέση με αυτό της απορροφούμενης εξαιτίας των απωλειών Stokes (EM και ΔΑ). Περαιτέρω, σε πολλές περιπτώσεις το φάσμα εκπομπής εμφανίζεται ως κατοπτρικό είδωλο του φάσματος απορρόφησης. Ο συμμετρική φύση των φασμάτων είναι αποτέλεσμα της παρεμφερούς δομής των δονητικών επιπέδων της θεμελιώδους και των διεγερμένων ηλεκτρονικών καταστάσεων. Δηλαδή η διέγερση και αποδιέγερση μεταξύ δονητικών επιπέδων με παρεμφερές ενεργειακό χάσμα παράγει μία κατοπτρικά όμοια περιβάλλουσα καμπύλη γύρω από την μέγιστη κορυφή η οποία αντιπροσωπεύει την πιθανότερη μετάβαση, τόσο στο φάσμα απορρόφησης όσο και στο φάσμα εκπομπής όπως υπαγορεύεται από την αρχή Franck-Condon. Τέλος, το σημείο διασταύρωσης στο Σχήμα 3.3 αντιστοιχεί σε αμιγώς ηλεκτρονικές μεταβάσεις³. Η εισχώρηση του φάσματος εκπομπής μέσα στο φάσμα απορρόφησης δεν παραβιάζει την αρχή διατήρησης της ενέργειας καθώς ένα μικρό ποσοστό

² Αμελητέα μοριακή κίνηση σε αυτή την χρονική κλίμακα → η απορρόφηση παρέχει πληροφορία μόνο για το κατώτερο δονητικό επίπεδο. Πυρήνες πρακτικά αμετακίνητοι → δονητικά επίπεδα μεταξύ διεγερμένης και θεμελιώδους συναφή.

³ Ως αμιγώς ηλεκτρονικές μεταβάσεις ορίζονται οι μεταβάσεις μεταξύ των θεμελιωδών δονητικών επιπέδων σε δύο ηλεκτρονικές στάθμες και για το λόγο αυτό καλούνται επίσης "0-0" μεταβάσεις. Σημειώνεται ότι για τις 0-0 μεταβάσεις τόσο η ενέργεια (λ) όσο και η πιθανότητα (σχ. ένταση) είναι η ίδια και στα δύο φάσματα.

μορίων μπορεί να βρίσκεται σε ανώτερο δονητικό επίπεδο όπως προβλέπεται από την στατιστική Boltzmann. Η επικάλυψη των φασμάτων αίρεται σε χαμηλές θερμοκρασίες.



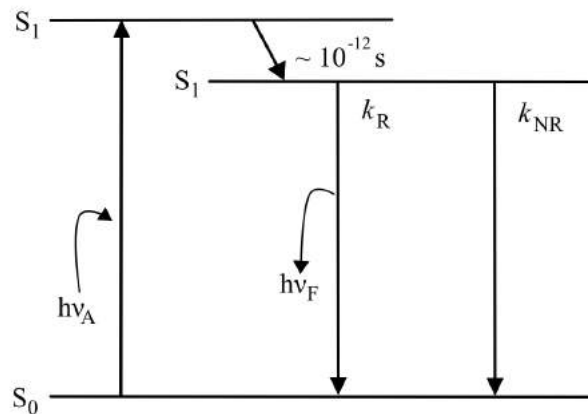
Σχήμα 3.4 Απλοποιημένο διάγραμμα Jablonski. EM: εσωτερική μετατροπή, ΔA: δονητική αποδιέγερση, A: απορρόφηση, F: φθορισμός, P: φωσφορισμός, S_x: μονή κατάσταση και T_x: τριπλή κατάσταση.

Μία από τις σημαντικότερες πληροφορίες που μπορούν να εξαχθούν μέσω της φασματοσκοπίας φθορισμού σχετίζεται με την ένταση της φθορίζουσας ακτινοβολίας ενός διαλύματος χρωμοφόρας δεδομένης συγκέντρωσης. Η ισχύς του φθορισμού μίας ένωσης περιγράφεται φωρμαλιστικά μέσα από την *κβαντική απόδοση* (*quantum yield*), Φ , δηλαδή τον λόγο του αριθμού των εκπεμπόμενων προς τον αριθμό των απορροφούμενων φωτονίων από το δείγμα. Οι ουσίες με $\Phi \rightarrow 1$ επιδεικνύουν την υψηλότερη λαμπρότητα φθορισμού. Είναι εύκολα αντιληπτό ότι η Φ δεν μπορεί να υπερβεί ή να λάβει την τιμή της μονάδας εξαιτίας των απωλειών Stokes. Εξίσου σημαντικό μέγεθος αποτελεί και ο χρόνος ζωής φθορισμού τ_F διότι ορίζει το χρονικό πλαίσιο κατά το οποίο η χρωμοφόρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη του άμεσου μικροπεριβάλλοντος. Ο χρόνος ζωής φθορισμού απουσία φαινομένων αποδιέγερσης χωρίς εκπομπή καλείται φυσικός ή ενδογενής χρόνος ζωής φθορισμού, τ_{FN} . Τονίζεται ότι η αποδιέγερση είναι μία τυχαία διεργασία και ως εκ τούτου ένα μέρος των μορίων εκπέμπουν σε $t = \tau_{FN}$. Όταν η αποδιέγερση διέπεται από έναν

εκθετικό νόμο, το 63% των μορίων θα εκπέμψει με φθορισμό σε $t < \tau_{FN}$ και το 37% θα σε $t > \tau_{FN}$. Τα παραπάνω μεγέθη μπορούν να παρασταθούν μέσω του ρυθμού εκπομπής με ακτινοβολία, k_R , και του ρυθμού αποδιέγερσης χωρίς ακτινοβολία, k_{NR} σύμφωνα με τις εξής σχέσεις:

$$\Phi = N \text{ εκπεμπόμενων φωτονίων} / N \text{ απορροφούμενων φωτονίων} = k_R / k_R + k_{NR}$$

$$\tau_F = 1 / k_R + k_{NR} \text{ και } \tau_{FN} = 1 / k_R, \text{ συνεπώς } \Phi = \tau_F / \tau_{FN}.$$



Σχήμα 3.5 Απεικόνιση χαρακτηριστικών χρόνων αποδιέγερσης σε απλοποιημένο διάγραμμα Jablonski.

Ο απόλυτος προσδιορισμός της Φ απαιτεί την χρήση εξεζητημένης οργανολογίας για την ακριβή μέτρηση της έντασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στο δείγμα. Για τις περισσότερες εφαρμογές αρκεί ο προσδιορισμός της σχετικής κβαντικής απόδοσης, Φ_R , όπου η αποδοτικότητα μίας άγνωστης φθορίζουσας ένωσης συσχετίζεται με αυτή μίας πρότυπης ένωσης σύμφωνα με την σχέση:

$$\Phi_X = (A_S/A_X) (F_X/F_S) (n_X/n_S)^2 \Phi_S$$

όπου A είναι η απορρόφηση στο μήκος κύματος της διέγερσης, F είναι το εμβαδό κάτω από καμπύλη του φάσματος εκπομπής και n είναι ο δείκτης διάθλασης του διαλύτη. Οι όροι A και F αντιστοιχούν στον αριθμό των απορροφούμενων και εκπεμπόμενων φωτονίων. Το πηλίκο των δεικτών διάθλασης υπεισέρχεται ως διορθωτικός παράγοντας για την περίπτωση όπου υπάρχουν σημαντικές αποκλίσεις μεταξύ του πρότυπου και του μετρούμενου διαλύματος, πρακτικά όμως λόγω των πολύ χαμηλών πειραματικών συγκέντρωσεων ταυτίζεται με την μονάδα.

Η ένταση του φθορισμού είναι δυνατόν να υποστεί μείωση (ή επικρατέστερα απόσβεση, quenching) με πληθώρα μηχανισμών. Η απόσβεση μέσω κρούσης

πραγματοποιείται όταν η διεγερμένη χρωμοφόρα απενεργοποιείται κατά την επαφή με έταίρο μόριο στο διάλυμα. Πρόκειται για δυναμική δυναμική διεργασία καθώς βασίζεται στον ρυθμό διάχυσης μικρών μορίων και στις αντίστοιχες μοριακές κρούσεις. Στην στατική απόσβεση η χρωμοφόρα και το μόριο-αποσβέστης σχηματίζουν ένα μη-φθορίζον σύμπλοκο στην θεμελιώδη κατάσταση. Τέλος, σημαντική είναι η απόσβεση φθορισμού λόγω μεταφοράς ενέργειας με συντονισμό (fluorescence resonance energy transfer, FRET). Για να σημειωθεί FRET, είναι απαραίτητο να υφίσταται επικάλυψη του φάσματος εκπομπής φθορισμού της χρωμοφόρας (δότης) με το φάσμα απορρόφησης έταίρου μόριου (αποδέκτης). Η FRET δεν εμφανίζεται ως το αποτέλεσμα εκπομπής ενός φωτονίου από τον δότη και απορρόφησης από τον αποδέκτη αλλά εξαρχής τα δύο μόρια είναι συζευγμένα με αλληλεπίδραση διπόλου-διπόλου.

3.1.3 Φασματοσκοπία NMR [224, 225]

Η φασματοσκοπία NMR βασίζεται στην κβαντομηχανική ιδιότητα του spin. Τα πρωτόνια (^1H) όπως και ο άνθρακας-13 (^{13}C) διαθέτουν ημιακέραιο κβαντικό αριθμό spin ($1/2$). Όταν τοποθετούνται εν μέσω μαγνητικού πεδίου υιοθετούν δύο διακριτές καταστάσεις spin (up και down) με μία μικρή ενεργειακή διαφορά, ΔE , μεταξύ τους, με παρεπόμενη μία επίσης μικρή διαφορά μεταξύ των δύο πληθυσμών η οποία παράγει το σήμα στην φασματοσκοπία NMR. Το μέτρο της ΔE δίνεται από την σχέση

$$\Delta E = \frac{\gamma h B}{2\pi}$$

όπου γ , ο γυρομαγνητικός λόγος, h , η σταθερά του Planck και B , το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο. Η ποσότητα της ενέργειας είναι τόσο μικρή που εμπίπτει στην περιοχή των ραδιο συχνοτήτων. Ως αποτέλεσμα, όταν οι πυρήνες (^1H ή ^{13}C) απορροφούν στα ραδιοκύματα, αλλάζει ο προσανατολισμός του άξονα της μαγνήτισης. Η μελέτη της απορρόφησης σε ένα εύρος συχνοτήτων παρέχει πληροφορία σχετικά με το χημικό περιβάλλον του κάθε ατόμου, καθώς άτομα σε διαφορετικά χημικά περιβάλλοντα απορροφούν σε διαφορετικές συχνότητες ή όπως είναι αποκαλείται συνηθέστερα *απορροφούν σε διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις*, δ .

Το μέτρο της δ δίνεται μέσω της σχέσης

$$\delta = \frac{V_{\text{sample}} - V_{\text{ref}}}{V_{\text{ref}}}$$

όπου ν_{ref} , η χημική μετατόπιση ενός προτύπου το οποίο συνήθως είναι το τετραμέθυλ σιλάνιο (TMS). Η δ εκφράζεται σε *ppm* επί της συχνότητας.

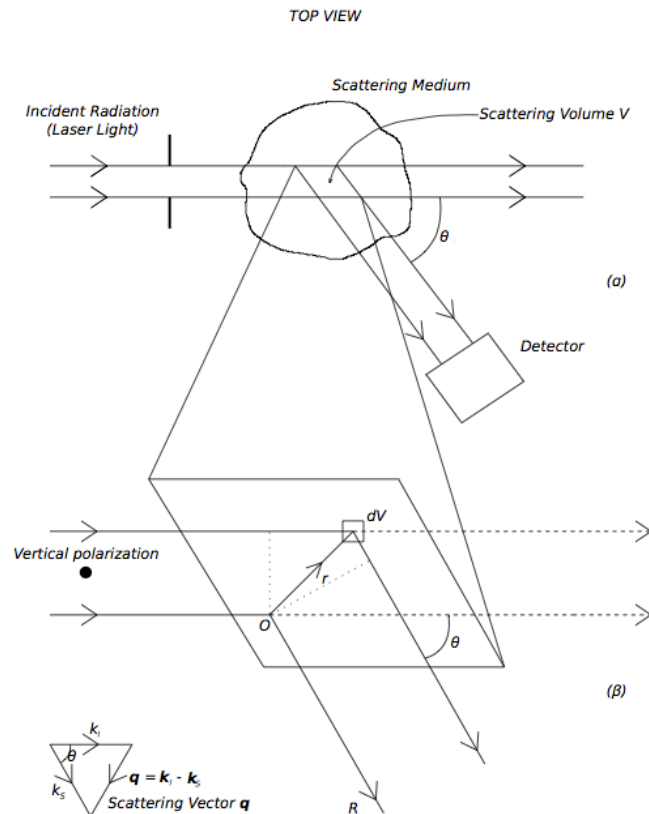
3.2 Χαρακτηρισμός σε Αιώρημα

3.2.1 Προσδιορισμός Υδροδυναμικής Διαμέτρου με Δυναμική Σκέδαση Φωτός

Στο Σχήμα 3.6 αποδίδεται η κάτοψη μίας κλασσικής διάταξης για την διεξαγωγή πειράματων σκέδασης. Το δείγμα ακτινοβολείται από πηγή ορατού φωτός και η δευτερογενής ακτινοβολία σκεδάζεται προς όλες τις διευθύνσεις. Η περιοχή του δείγματος η οποία δέχεται την ακτινοβολία και ταυτόχρονα σκεδάζει φως προς τον ανιχνευτή καλείται σκεδάζων όγκος. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία μπορεί να περιγραφεί μαθηματικά ως ένα επίπεδο ηλεκτρομαγνητικό κύμα, το ηλεκτρικό πεδίο του οποίου στην θέση \mathbf{r} δίνεται μέσα από την σχέση:

$$\vec{E}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{n}E_0 \exp[i(\mathbf{k}\mathbf{r} - \omega t)]$$

όπου \mathbf{k} το κυματόνισμα με μέτρο k , ω η γωνιακή συχνότητα, \mathbf{n} , E_0 το διάνυσμα πόλωσης και το πλάτος ταλάντωσης του ηλεκτρικού πεδίου αντίστοιχα.

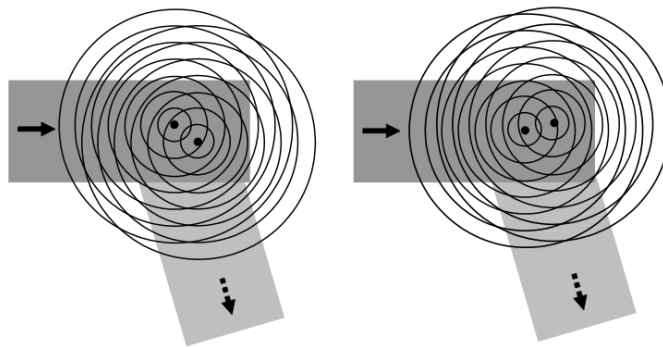


Σχήμα 3.6 Κάτοψη πειραματικής διάταξης δοκιμών σκέδασης φωτός.

Τα μεγέθη \mathbf{n} και το \mathbf{k} ορίζουν αντίστοιχα το επίπεδο πόλωσης και την διεύθυνση διάδοσης του προσπίπτοντος κύματος. Το μέγεθος \mathbf{q} ονομάζεται διάνυσμα σκέδασης και το μέτρο του είναι ίσο με

$$|\mathbf{q}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

Το φαινόμενο της σκέδασης εκδηλώνεται όταν *i)* υπάρχει διαφορά στην τιμή του δείκτη διάθλασης των διάσπαρτων σωματιδίων συγκριτικά με την τιμή του μέσου διασποράς και *ii)* όταν τα διάσπαρτα σωματίδια διαθέτουν διαστάσεις συγκρίσιμες με το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Για σταθερή γωνία σκέδασης, οποιαδήποτε μεταβολή στην καταγραφόμενη ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας οφείλεται αποκλειστικά στην τυχαία, περιστροφική και μεταφορική, κίνηση των σκεδαστών. Πρέπει να υπογραμμιστεί πως η ανάλυση που ακολουθεί προϋποθέτει σφαιρική συμμετρία. Ειδάλλως, είναι απαραίτητη η πραγματοποίηση πειραμάτων δυναμικής σκέδασης φωτός σε πολλαπλές γωνίες (Multi Angle DLS). Σε κάθε δεδομένη χρονική στιγμή το μέτρο της έντασης αντικατοπτρίζει την δυναμική του σκεδάζοντος όγκου, καθώς η ανααιρετική ή ενισχυτική συμβολή των επιμέρους σκεδαζόμενων κυμάτων εξαρτάται από την σχετική θέση των σκεδαστών. Το αποτέλεσμα της κίνησης Brown δύο σκεδάζοντων σωματιδίων στο μοτίβο συμβολής αναπαρίσται στο Σχήμα 3.7.



Σχήμα 3.7 Αναπαράσταση της μεταβολής του σκεδαζόμενου πεδίου προς τον ανιχνευτή εξαιτίας της αλλαγής της σχετικής θέσης των δύο σωματιδίων [226].

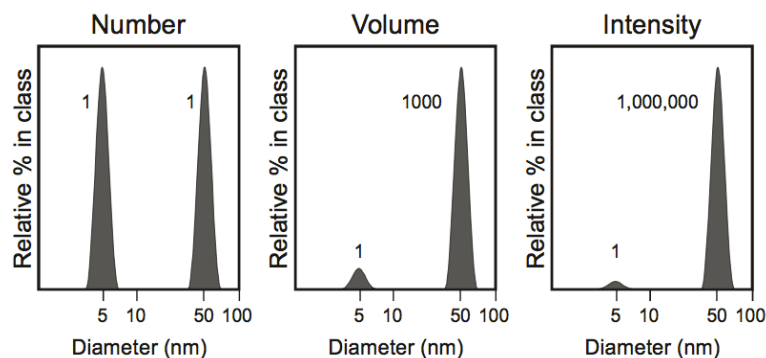
Το συνολική ένταση του προσπίπτοντος πεδίου στον ανιχνευτή λαμβάνει συνεχώς μεταβαλλόμενες τιμές και έχει τα χαρακτηριστικά σήματος θορύβου. Το μέτρο της σκεδαζόμενης έντασης για την περίπτωση σκεδαστών με χαρακτηριστικές διαστάσεις αρκετά μικρότερες από το μήκος κύματος της προσπίπτουσας δέσμης ($d < \lambda/20$) [227] δίνεται προσεγγιστικά από την σχέση του Rayleigh [228]:

$$I = I_0 \frac{16\pi^4 \alpha^2}{\lambda^4 R^2} (1 + \cos^2\theta)$$

όπου α η πολωσιμότητα λ το μήκος κύματος και R η απόσταση από τον ανιχνευτή. Διάφορα συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν από την παραπάνω σχέση. Η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, I , εξαρτάται αντιστρόφως ανάλογα από το μήκος κύματος της προσπίπτουσας υψωμένο στην τέταρτη δύναμη, με συνέπεια να υφίσταται ισχυρή μη γραμμική εξασθένηση όσο το λ αυξάνεται. Για το λόγο αυτό μία πηγή laser πράσινου φωτός (532 nm) θα προκαλούσε την παραγωγή εντονότερης δευτερογενούς ακτινοβολίας συγκριτικά με ένα κόκκινο laser (633 nm) για την ίδια φωτεινή ροή. Ο όρος της πολωσιμότητας δίνεται από την σχέση

$$\alpha = p/E$$

όπου E , το προσπίπτον ηλεκτρικό πεδίο και p , η επαγόμενη διπολική ροπή [229]. Η πολωσιμότητα αποτελεί το μέτρο της ευκολίας με την οποία μετατοπίζεται το ηλεκτρονικό νέφος των ατόμων του σκεδαστή και στο Ηλεκτροστατικό Σύστημα Μονάδων (esu) λαμβάνει διαστάσεις όγκου (cm^3). Μέσω της εξίσωσης Rayleigh προκύπτει ότι η ένταση του σκεδαζόμενου πεδίου εξαρτάται από την χαρακτηριστική διάσταση του σκεδαστή υψωμένη στην έκτη δύναμη ($I \sim d^6$). Ως εκ τούτου, μεταβολή μίας τάξης μεγέθους στην διάμετρο των σκεδαζόντων σωματιδίων επιφέρει 10^6 φορές αύξηση της έντασης (Σχήμα 3.8).



Σχήμα 3.8 Η διαφορά ανάμεσα στις ποσοστιαίες κατανομές ως προς τον αριθμό, τον όγκο και την ένταση της σκεδαζόμενης έντασης για μία 1:1 συλλογή νανοσωματιδίων 5 και 50 nm [230].

Πρακτικά, η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας από μία υποθετική κolloειδή διασπορά με όμοια σύσταση, αποτελούμενη από ένα εκατομμύριο σωματίδια διαμέτρου 5 nm και ενός σωματιδίου 50 nm είναι μοιρασμένη ισόποσα μεταξύ των δύο ειδών.

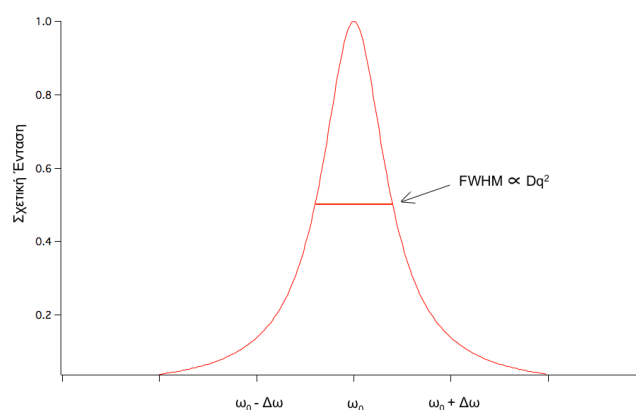
Η θεωρία στην οποία βασίζεται ο πειραματικός προσδιορισμός του μεγέθους των κolloειδών σωματιδίων προϋποθέτει ότι η καταγραφόμενη ένταση στον ανιχνευτή προέρχεται αποκλειστικά από την υπέρθεση των σκεδαζόμενων πεδίων από το κάθε σωματίδιο ξεχωριστά. Συνεπώς, το εξεταζόμενο δείγμα απαιτείται να έχει χαμηλή

συγκέντρωση για την εξάλειψη φαινομένων πολλαπλής σκέδασης. Στην αντίθετη περίπτωση το καταγραφόμενο σήμα θα περιείχε πληροφορίες όχι μόνο για την δυναμική του δείγματος αλλά και για την δομή του ή την φύση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των σκεδαστών. Το μεγαλύτερο μέρος της ακτινοβολίας διέρχεται από το δείγμα χωρίς να αλληλεπιδράσει με τα σωματίδια με συνέπεια να απαιτούνται φωτεινές πηγές που διαθέτουν υψηλή λαμπρότητα (πλήθος φωτονίων / διατομή δέσμης) και ικανές να παράγουν πολωμένη και σύμφωνη (coherent) ακτινοβολία. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά δεν πληρούνται από τις συμβατικές φωτεινές πηγές και για το λόγο αυτό η δυναμική σκέδαση φωτός αναπτύχθηκε και καθιερώθηκε ως τεχνική χαρακτηρισμού μόνο μετά από την ανακάλυψη των laser.

Στο πλαίσιο της προσέγγισης Rayleigh θεωρείται ότι η το φως αλληλεπιδρά ελαστικά με τους σκεδαστές χωρίς να ανταλλάσσεται ενέργεια. Στην πραγματικότητα το σκεδαζόμενο πεδίο υπόκειται σε ολίσθηση φάσης $\Delta\omega$ η οποία οφείλεται στην σχετική κίνηση των σκεδαστών ως προς τον ανιχνευτή. Σωματίδια με συνιστώσα ταχύτητας κάθετη στην επιφάνεια του ανιχνευτή σκεδάζουν φως υψηλότερης ή χαμηλότερης συχνότητας, όταν πλησιάζουν ή απομακρύνονται αντίστοιχα, εξαιτίας του φαινομένου Doppler. Μπορεί να αποδειχθεί ότι η κατανομή συχνοτήτων της έντασης των σκεδαζόμενων φωτονίων περιγράφεται από μία λορεντζιανή συνάρτηση (Σχήμα 3.9) [231, 232].

$$I(\omega) \sim \frac{Dq^2}{(\omega - \omega_0)^2 + Dq^2}$$

Η τιμή του πλάτους της κατανόμης στο ήμισυ του μέγιστου ύψους (Full Width at Half-Maximum) είναι ανάλογη του γινομένου του συντελεστή αυτοδιάχυσης, D , των διάσπαρτων σωματιδίων και του τετραγώνου του διανύσματος σκέδασης, q^2 .



Σχήμα 3.9 Διεύρυνση της συχνότητας του σκεδαζόμενου H/M πεδίου εξαιτίας του φαινομένου Doppler.

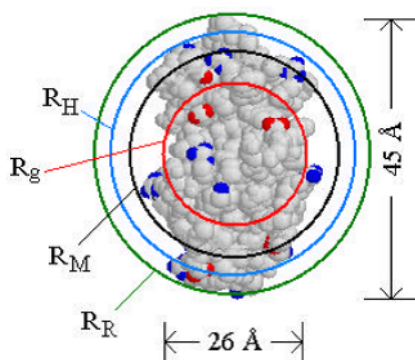
Τα πειράματα δυναμικής σκέδασης πραγματοποιούνται συνήθως υπό σταθερή γωνία, οπότε από τα πρωτογενή δεδομένα μπορεί να υπολογιστεί ο D . Η υδροδυναμική διάμετρος, d_H , προσδιορίζεται μέσω της σχέσης Stokes - Einstein

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d_H}$$

όπου k_B , η σταθερά του Boltzmann, T , η θερμοκρασία σε Kelvin και η , το ιξώδες. Η μέτρηση στηρίζεται στην διαχυτική ικανότητα των νανοσωματιδίων μέσα στο ρευστό, οπότε ως υδροδυναμική διάμετρος ορίζεται η ισοδύναμη διάμετρος μίας σκληρής σφαίρας με συντελεστή αυτοδιάχυσης ίσο με τον μετρούμενο [233]. Για την αποσαφήνιση της έννοιας της υδροδυναμικής διαμέτρου στο Σχήμα 3.10 παρατίθενται τα χαρακτηριστικά μεγέθη για μία πρωτεΐνη. Με κόκκινο χρώμα αναπαρίσταται η μέση γυροσκοπική ακτίνα, R_g , η οποία μαθηματικά ορίζεται από την σχέση:

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum m_i r_i^2}{\sum m_i}}$$

όπου m_i η μάζα του i -οστού ατόμου στην πρωτεΐνη και r_i η απόσταση του i -οστού ατόμου από το κέντρο μάζας. Με μαύρο χρώμα απεικονίζεται η ακτίνα R_M η οποία θα χαρακτήριζε ένα απόλυτα σφαιρικό μόριο με την ίδια ακριβώς μάζα και πυκνότητα με την πρωτεΐνη, ενώ με πράσινο η περιφέρεια του κύκλου με ακτίνα R_R , ο οποίος παράγεται από την περιστροφή του μορίου γύρω από το γεωμετρικό του κέντρο. Η υδροδυναμική διάμετρος, R_H , προσδιορίζεται ανάμεσα στις R_M και R_R . Όσον αφορά την φυσική σημασία, η R_H εμπεριέχει τόσο την συνεισφορά του διαλύτη στον τελικό όγκο του κολλοειδούς όσο και το φαινόμενο μέγεθος λόγω δυναμικών φαινομένων (περιστροφή).



Σχήμα 3.10 Σύγκριση της υδροδυναμικής διαμέτρου με λοιπά χαρακτηριστικά μεγέθη για ένα βιομόριο [234].

Η ΔΣΦ εναλλακτικά ονομάζεται Φασματοσκοπία Συσχετισμού Φωτονίων (Photon Correlation Spectroscopy, PCS). Η ονομασία ΦΣΦ οφείλεται στην μαθηματική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της υδροδυναμικής διαμέτρου των σκεδαστών. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η κυματομορφή $I(t)$ λαμβάνει πλήρως τυχαίες τιμές καθώς αποτυπώνει μία στοχαστική διεργασία, την κίνηση Brown των διάσπαρτων σκεδαστών. Κατασκευάζοντας την κανονικοποιημένη χρονική συνάρτηση αυτοσυσχέτισης $g^2(\tau)$ από τα πρωτογενή δεδομένα της σκεδαζόμενης έντασης είναι δυνατή η ποσοτική ανάλυση της κινητικότητας των σωματιδίων στο σκεδάζοντα όγκο: μικρά σωματίδια με μεγάλο συντελεστή αυτοδιάχυσης D θα χαρακτηρίζονται από χαμηλότερες τιμές της $g^2(\tau)$ σε σχέση με μεγαλύτερα σωματίδια της ίδιας σύστασης και μορφολογίας και για το ίδιο χρονικό διάστημα συσχέτισης, τ . Η $g^2(\tau)$ ορίζεται ως:

$$g^2(t) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (1)$$

$$\langle I(t)I(t + \tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \int_0^T I(t)I(t + \tau) dt \quad (2)$$

Η σχέση (2) ορίζει την χρονική συνάρτηση αυτοσυσχέτισης της σκεδαζόμενης έντασης. Για τις περισσότερες περιπτώσεις πρακτικού ενδιαφέροντος η $g^2(\tau)$ συνδέεται με την συνάρτηση αυτοσυσχέτισης του σκεδαζόμενου πεδίου

$$g^1(t) = \frac{\langle E(t)E(t + \tau) \rangle}{\langle E(\tau) \rangle^2}$$

μέσω της σχέσης Siegert:

$$g^2(\tau) = \beta + B[g^1(\tau)]^2$$

όπου β , σταθερά που εξαρτάται από την πειραματική διάταξη και B , σταθερά που ορίζει το επίπεδο ευαισθησίας του ανιχνευτή (baseline) και στις συνήθεις περιπτώσεις λαμβάνει την τιμή 1. Η αναλυτική έκφραση της $g^1(\tau)$ για σκέδαση μονοδιάσπαρτων σκεδαστών είναι μία φθίνουσα εκθετική συνάρτηση και δίνεται από την σχέση $g^1(\tau) = \exp(-\Gamma\tau)$, όπου $\Gamma = Dq^2$. Η μορφή του καταγραφόμενου σήματος και της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης αποδίδονται στο Παράρτημα του Κεφαλαίου. Η αριθμητική προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων πάνω στην θεωρητική έκφραση αποδίδει τον συντελεστή αυτοδιάχυσης και επακόλουθα την υδροδυναμική διάμετρο από την σχέση Stokes-Einstein. Η αντίστροφη ποσότητα του ρυθμού εκθετικής απόσβεσης Γ ονομάζεται χρόνος χαλάρωσης ($\tau_{rel} = 1/Dq^2$) και ισούται με το χρονικό διάστημα στο οποίο ένα νανοσωματίδιο έχει μετακινηθεί κατά q^{-1} .

Ανακεφαλαιώνοντας, το σήμα $I(t)$ καταγράφεται ανα χρονικό διάστημα Δt της τάξης των μs στον ανιχνευτή, οδηγείται σε ηλεκτρονική διάταξη συσχετιστή όπου κατασκευάζεται η $g^2(\tau)$ και εν συνεχεία γίνεται η προσαρμογή στην εκθετική συνάρτηση.

Στην ανάλυση που προηγήθηκε δεν λαμβάνεται υπόψιν η πολυδιασπορά του εξεταζόμενου δείγματος. Η πλειονότητα των συνθετικών κolloειδών χαρακτηρίζεται από κατανομή μεγεθών με συνέπεια το δείγμα να περιγράφεται πλέον από μία κατανομή τιμών των συντελεστών αυτοδιάχυσης, $G(\Gamma)$ [235, 236]. Η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης του πεδίου $g^1(\tau)$ αναπαρίσταται ως ένα ολοκλήρωμα όπου η κάθε εκθετική συνάρτηση σταθμίζεται με το ανάλογο στατιστικό βάρος $G(\Gamma)$:

$$g^1(\tau) = \int_0^{\infty} G(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma \equiv M(-\tau, \Gamma)$$

όπου η $G(\Gamma)$ είναι κανονικοποιημένη έτσι ώστε $\int_0^{\infty} G(\Gamma) d\Gamma = 1$. Έπεται από μαθηματικούς χειρισμούς (βλ. Παράρτημα Κεφαλαίου), εξάγεται η σχέση:

$$\ln[g^2(t) - 1] = \ln \beta - 2\bar{\Gamma}\tau + \kappa_2\tau^2 - \frac{\kappa_3}{3}\tau^3 + \dots$$

Τα πρωτογενή δεδομένα προσαρμόζονται στο πολυώνυμο με την μέθοδο των γραμμικών ελάχιστων τετραγώνων, οι συντελεστές του οποίου ταυτίζονται με τις ροπές της αθροιστικής κατανομής. Η ροπή πρώτης τάξης αντιστοιχεί στον μέσο ρυθμό απόσβεσης $\bar{\Gamma}$ και από αυτήν την υπολογίζεται η μέση υδροδυναμική διάμετρος κατά z (z -average). Η ροπή δεύτερης τάξης αντιστοιχεί στην τυπική απόκλιση $\bar{\sigma}$, ενώ η ροπή τρίτης τάξης σχετίζεται με την ασυμμετρία (skewness) της κατανομής. Το πηλίκο

$$(2\bar{\sigma})/(\bar{\Gamma}^2)$$

ορίζεται ως ο δείκτης πολυδιασπορά της κατανομής (polydispersity index, PDI) σύμφωνα με το πρότυπα ISO 13321:1996 E και 22412.

Υπογραμμίζεται ότι η παραπάνω συζήτηση προϋποθέτει οιονεί σημειακούς σκεδαστές, όμως η δυναμική σκέδαση φωτός χρησιμοποιείται εξίσου για την μελέτη δειγμάτων με υδροδυναμικές διαμέτρους συγκρίσιμες με το μήκος κύματος της προσπίπτουσας δέσμης. Μέχρι τώρα υποτέθηκε εμμέσως ότι δεν υπάρχει επιπλέον εξάρτηση της σκεδαζόμενης έντασης ως προς την γωνία σκέδασης πέρα από αυτήν που ορίζει η σχέση του Rayleigh $I \propto I + \cos^2 \vartheta$. Αποδεικνύεται ότι η συνεισφορά των μεγαλύτερων σωματιδίων στην σκεδαζόμενη ένταση σε ένα πολυδιάσπαρτο δείγμα μειώνεται όσο το μέτρο του διανύσματος σκέδασης q αυξάνεται, εξαιτίας φαινομένων συμβολής που οφείλονται στην σκέδαση από διαφορετικές περιοχές των σωματιδίων [226]. Δεδομένου ότι τα μεγαλύτερα σωματίδια σκεδάζουν 10^6 φορές εντονότερα, ζητούμενο είναι η προαγωγή

της συνεισφοράς των μικρότερων σωματιδίων στο καταγραφόμενο σήμα. Για το λόγο αυτό, το όργανο δυναμικής σκέδασης φωτός Zetasizer της Malvern Instruments υιοθετεί οπισθοσκεδαζόμενη γεωμετρία (backscattering geometry) με τον ανιχνευτή τοποθετημένο στις 173°, ελαχιστοποιώντας παράλληλα το ποσοστό της σκεδαζόμενης έντασης που οφείλεται σε σωματίδια σκόνης..

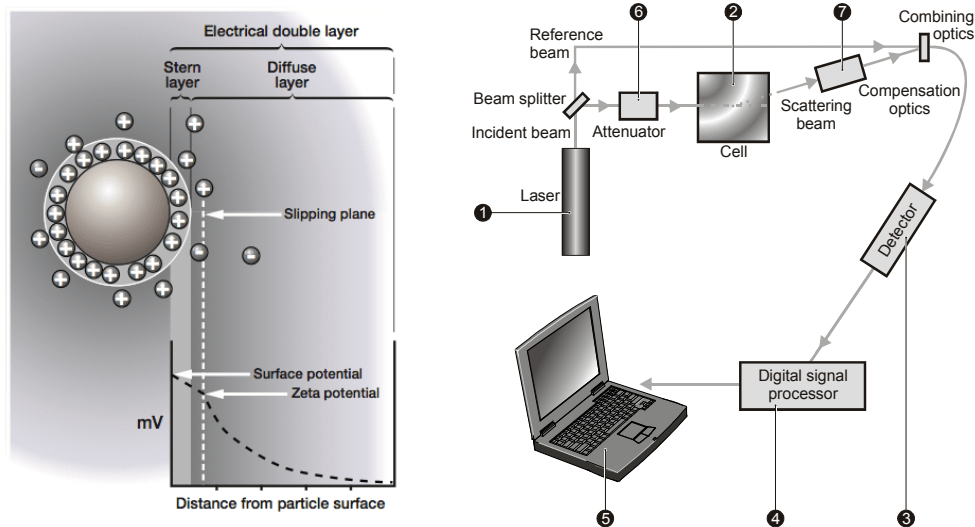
3.2.2 Προσδιορισμός Δυναμικού-ζ με Ανάλυση Φάσης Σκεδαζόμενης Ακτινοβολίας Φωτός (PALS)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, μεταξύ των σωματιδίων μίας διασποράς αναπτύσσονται μέσω επαγόμενων διπόλων ελκτικές δυνάμεις Van der Waals, με απόρροια την τάση για σχηματισμό συσσωματωμάτων. Η σταθερότητα της διασποράς επιτυγχάνεται με την εισαγωγή πρόσθετων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των σωματιδίων οι οποίες αντιτίθενται στις ελκτικές δυνάμεις Van der Waals. Μία από τις τεχνικές σταθεροποίησης των κολλοειδών αποτελεί η ανάπτυξη ενός καθαρού φορτίου στην επιφάνεια τους με σκοπό την επαγωγή απωστικών αλληλεπιδράσεων. Η παρουσία της επιφανειακής κατανομής φορτίου έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός κελύφους αντισταθμιστικών ιόντων, φορτίων δηλαδή με αντίθετο πρόσημο, γύρω από τα κολλοειδή. Καθώς η επιφάνεια απαρτίζεται από δύο αντίθετα φορτισμένα είδη, γίνεται λόγος για την ανάπτυξη *ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας* (electric double layer, EDL) [237].

Σύμφωνα με την θεωρία των Gouy και Chapman τα αντισταθμιστικά ιόντα αντιμετωπίζονται ως σημειακά φορτία τα οποία κατανέμονται διάχυτα όσο η απόσταση από την επιφάνεια δυναμικού ψ_s αυξάνει. Η τιμή του δυναμικού σε απόσταση x από την επιφάνεια παρέχεται από την προσεγγιστική λύση του προβλήματος από τους Debye και Huckel σύμφωνα με την σχέση:

$$\psi(x) = \psi_s \exp(-κx)$$

Το μέγεθος κ έχει διαστάσεις αντιστρόφου μήκους και ως $1/\kappa$ ορίζεται το μήκος της διάχυτης διπλοστοιβάδας (μήκος Debye), η απόσταση δηλαδή όπου το δυναμικό έχει μειωθεί στο 37% του ψ_s . Τυπικές τιμές του $1/\kappa$ είναι της τάξης του 1 nm για συγκέντρωση αντισταθμιστικών ιόντων $C = 10^{-1}$ M εως και 100 nm για $C = 10^{-5}$ M. Η θεωρία των Gouy και Chapman επεκτάθηκε περαιτέρω από τον Stern λαμβάνοντας υπόψιν τις διαστάσεις των ιόντων: σύμφωνα με το μοντέλο Stern η ηλεκτρική διπλοστοιβάδα συνίσταται από μία εσωτερική περιοχή όπου τα αντισταθμιστικά ιόντα βρίσκονται σε επαφή με την φορτισμένη επιφάνεια και από μία εξωτερική περιοχή όπου τα ιόντα είναι διάχυτα (Σχήμα 3.11) [238].



Σχήμα 3.11 Οι περιοχές της ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας φορτισμένου σωματιδίου: στοιβάδα Stern, διάχυτη στοιβάδα και θέση του δυναμικού-ζ (αριστερά). Πειραματική διάταξη PALS του οργάνου Zeatasizer Nano (δεξιά) [230].

Στην προηγούμενη περιγραφή της ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας τόσο τα διάσπαρτα σωματίδια όσο και τα αντισταθμιστικά ιόντα θεωρήθηκε ότι βρίσκονται ακίνητα. Η μελέτη της σχετικής κίνησης των σωματιδίων έναντι των αντισταθμιστικών ιόντων μέσα στο αιώρημα είναι αντικείμενο της ηλεκτροκινητικής. Από την ποσοτική ανάλυση των ηλεκτροκινητικών χαρακτηριστικών ενός συστήματος μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την φύση της επιφάνειας των σωματιδίων, όσον αφορά το είδος και την κατανομή του φορτίου και τις αλλαγές που επιφέρει σε αυτό η προσθήκη ηλεκτρολύτη ή η μεταβολή του pH. Είναι επίσης δυνατό να εκτιμηθεί η έκταση της επίδρασης που έχει πάνω στο επιφανειακό φορτίο των σωματιδίων η προσρόφηση υδατοδιαλυτών πολυμερών ή τασιενεργών. Η προσρόφηση, για παράδειγμα, πολυμερικής τασιενεργής ένωσης στην επιφάνεια διάσπαρτων κolloειδών τα οποία αρχικά φέρουν ελάχιστο ή μηδενικό φορτίο θα προκαλέσει μία μετρήσιμη αλλαγή στην κινητικότητα των σωματιδίων όταν αυτά τοποθετηθούν σε ηλεκτρικό πεδίο.

Τα κύρια μεγέθη που προσδιορίζονται μέσω ηλεκτροκινητικών πειραμάτων είναι η ηλεκτροφορητική κινητικότητα, μ , δηλαδή ο λόγος της ταχύτητας των σωματιδίων όταν υπόκεινται σε ομογενές ηλεκτρικό πεδίο προς το μέτρο του πεδίου ($\mu = u/E$) και το δυναμικό-ζ, το μετρούμενο δυναμικό στο επίπεδο διάτμησης (shear plane) το οποίο εντοπίζεται μεταξύ της στοιβάδας Stern και της διάχυτης στοιβάδας. Το σημείο στο οποίο το δυναμικό-ζ λαμβάνει την τιμή μηδέν καλείται *ισοηλεκτρικό σημείο* (isoelectric point). Το απλούστερο μοντέλο για την συσχέτιση της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας και του δυναμικού-ζ σε ισχυρά πολικούς διαλύτες όπως το νερό, θεωρώντας σφαιρικά σωματίδια με καλά

καθορισμένες διαστάσεις, δίνεται από την σχέση Smoluchowski $\mu = \epsilon_0 \epsilon_r \zeta / \eta$, όπου ϵ_0, ϵ_r οι διηλεκτρική σταθερά του μέσου και των κolloειδών αντίστοιχα, ζ το δυναμικό-ζ και η το ιξώδες. Τυπικές τιμές της μ για $\zeta = 10-100$ mV, $\eta = 10^{-3}$ Pa και $\epsilon_r = 80$ είναι της τάξης των $0.7-7.0 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$ [239]. Η εξίσωση Smoluchowski είναι εφαρμόσιμη στην περίπτωση όπου το μέγεθος των μετρούμενων σωματιδίων είναι αρκετά μεγαλύτερο από το μήκος Debye [240] κάτι που ισχύει πρακτικά για όλα τα μελετούμενα κolloειδή στην παρούσα διατριβή. Η μέτρηση της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας πραγματοποιείται με πειράματα Ανάλυσης Φάσης Σκεδαζόμενης Ακτινοβολίας Φωτός (Phase Analysis Light Scattering, PALS), η οποία αποτελεί εξέλιξη της Ταχυμετρίας Laser-Doppler (Laser-Doppler Velocimetry, LDV). Οι δύο τεχνικές στηρίζονται στην μεταβολή της συχνότητας που υφίσταται η σκεδαζόμενη ακτινοβολία εξαιτίας της συλλογικής κίνησης των φορτισμένων σκεδαστών μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο και αναλύονται εκτενέστερα στο Παράρτημα του Κεφαλαίου.

3.3 Χαρακτηρισμός σε Στερεά Κατάσταση

3.3.1 Θερμική Σταθμική Ανάλυση [225]

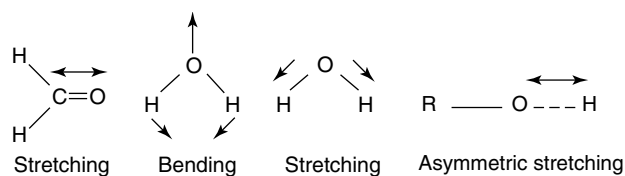
Μέσω της τεχνικής της θερμοσταθμικής ανάλυσης (thermogravimetric analysis, TGA) προσδιορίζεται η μεταβολή της μάζας (βάρος) ενός δείγματος όταν αυτό θερμαίνεται κάτω υπό συγκεκριμένες συνθήκες (ατμοσφαιρικές ή αδρανείς). Στα πιο κοινά πειράματα, η θερμοκρασία αυξάνεται γραμμικά σαν συνάρτηση του χρόνου, ενώ υπάρχει η δυνατότητα εκτέλεσης ισόθερων πειραμάτων ή πειραμάτων όπου η θερμοκρασία μεταβάλλεται βηματικά (temperature ramp). Στα πλαίσια της παρούσης διατριβής πραγματοποιήθηκαν πειράματα γραμμικής αύξησης της θερμοκρασίας και από τα δεδομένα εξήχθη η απώλεια μάζας (%) ως προς την θερμοκρασία. Μία καμπύλη αυτού του τύπου καλείται θερμογράφημα, από την οποία είναι δυνατόν να εξαχθούν ποικίλες πληροφορίες. Πρωτίστως, αναγνωρίζονται οι θερμοκρασίες στις οποίες το δείγμα χάνει (ή κερδίζει) βάρος. Η απώλεια βάρους σηματοδοτεί την αποικοδόμηση ή εξάτμιση του δείγματος. Για την περίπτωση στερεών υγροσκοπικών δειγμάτων μπορεί να προσδιοριστεί το ποσοστό προσροφημένης υγρασίας. Από την άλλη πλευρά, η πρόσληψη βάρους μπορεί να συνεπάγεται την προσρόφηση ενός συστατικού από την ατμόσφαιρα ή την χημική οξείδωση του δείγματος (αντίδραση με τον ατμοσφαιρικό αέρα). Δευτερευόντως, οι περιοχές της καμπύλης όπου το βάρος παραμένει αμετάβλητο υποδεικνύουν το εύρος της θερμικής σταθερότητας του δείγματος. Η τρίτη παράμετρος που προσδιορίζεται από ένα θερμογράφημα αφορά την σύσταση του δείγματος, καθώς η απώλεια μάζας σε συγκεκριμένη θερμοκρασία μπορεί να συσχετιστεί με το % κ.β ποσοστό ενός συστατικού.

3.3.2 Μαγνητομετρία Παλλόμενου Δείγματος [241]

Η μαγνητομετρία παλλόμενου δείγματος (vibrating sample magnetometry, VSM) παρέχει πληροφορία σχετικά με τις μαγνητικές ιδιότητες ενός δείγματος. Συγκεκριμένα, αποτελεί μία εύκολη και γρήγορη τεχνική για την λήψη της καμπύλης μαγνήτισης. Το δείγμα τοποθετείται μέσα σε ένα ομογενές μαγνητικό πεδίο, το οποίο παράγεται από έναν ηλεκτρομαγνήτη, με αποτέλεσμα τα μαγνητικά δίπολα που απαρτίζουν το δείγμα να προσανατολιστούν στην διεύθυνση του πεδίου. Κοντά στο δείγμα βρίσκονται τοποθετημένα τα πηνία λήψης (pickup coils). Το δείγμα τίθεται σε περιοδική κίνηση χρησιμοποιώντας συνήθως πιεζοηλεκτρικό κρύσταλλο. Ανάλογα με την ισχύ του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου, η μαγνητική ροή στα πηνία μεταβάλλεται. Συνακόλουθα, στα άκρα του πηνίου παραγεται ηλεκτρικό σήμα ανάλογο με την μαγνητική ροπή του δείγματος. Αν αυτή η διαδικασία επαναληφθεί για πολλές διαφορετικές τιμές του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου λαμβάνεται η καμπύλη μαγνήτισης από την οποία εξάγονται σημαντικές πληροφορίες όπως είδος το είδος του δείγματος (παραμαγνητικό, σιδηρομαγνητικό) και η τιμή της μαγνήτισης κόρου.

3.3.3 Φασματοσκοπία FT-IR [242]

Το φάσμα απορρόφησης στο μέσο υπέρυθρο (mid IR, 400 cm^{-1} - 4000 cm^{-1}) συνιστά μία αποτύπωση των ομοιοπολικών δεσμών σε ένα μόριο ή υλικό. Η κύρια χρησιμότητα της τεχνικής έγκειται στην γρήγορη ποιοτική αναγνώριση λειτουργικών ομάδων. Η ακτινοβολία IR είναι υψηλότερης ενέργειας από τα ραδιοκύματα και χαμηλότερης από την ορατή. Ο κανόνας επιλογής για την εμφάνιση απρρόφησης στο IR αποτελεί η μεταβολή της διπολικής ροπής του μορίου στην διεγερμένη κατάσταση. Η απορρόφηση πραγματοποιείται όταν η συχνότητα της ακτινοβολίας συμπίπτει με τις ιδιοσυχνότητες δόνησης των δεσμών και δόνησης-περιστροφής του μορίου. Οι πιο κοινοί τρόποι δόνησης είναι οι *δονήσεις έκτασης* (stretching) και οι *δονήσεις κάμψης* (bending). Κατά την διέγερση κάποιοι δεσμοί εκτείνονται συμφασικά (συμμετρική έκταση) και κάποιοι εκτός φάσης (ασύμμετρη έκταση). Τα σύγχρονα φασματοφωτόμετρα δεν περιλαμβάνουν μονοχρωμάτορες για την σάρωση του δείγματος και βασίζονται στην παραγωγή *συμβολογραμμάτων* (interferograms). Η πληροφορία που φέρουν τα συμβολογράμματα εξάγεται μέσω μεταχηματισμών Fourier.



Σχήμα 3.12 Σχηματική αναπαράσταση των δονήσεων έκτασης και κάμψης.

3.4 Συνεστιακή Μικροσκοπία Σάρωσης με laser [243, 244]

Η συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με laser (confocal laser scanning microscopy, CLSM) χρησιμοποιείται για την οπτική παρατήρηση ενός δείγματος σε μικρές κλίμακες μεγέθους, οι οποίες είναι αδύνατον να προσεγγιστούν σε την συμβατική μικροσκοπία. Στην πλειονότητα των συνεστιακών μικροσκοπιών, η εικόνα σχηματίζεται είτε από την ανάκλαση του φωτός από την επιφάνεια του δείγματος, είτε από το φως που προκύπτει από φθορίζουσα εκπομπή στο δείγμα. Η δεύτερη εκδοχή είναι συνηθέστερη για την μελέτη βιολογικών δειγμάτων και χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσης διατριβής. Ουσιαστικά, το συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού με laser αποτελεί μία αναβαθμισμένη μορφή του μικροσκόπιου φθορισμού. Στην συμβατική μικροσκοπία φθορισμού, η παρεμβολή της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας φθορισμού από τμήματα του δείγματος τα οποία εντοπίζονται στον κάθετο άξονα παρατήρησης έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια λεπτομερειών από την εικόνα. Το φαινόμενο γίνεται ιδιαίτερα έντονο σε δείγματα πάνω από ένα κρίσιμο πάχος (~2 μm). Στην συνεστιακή μικροσκοπία, ο στόχος είναι η λήψη φωτεινής ακτινοβολίας από ένα μόνο επίπεδο εστίασης (focal plane) κάθετο στον άξονα παρατήρησης. Αυτό επιτυγχάνεται με την παρεμβολή ενός πετάσματος με οπή ανάμεσα στην μονάδα παρατήρησης και στον αντικειμενικό φακό, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο την σημειακή εστίαση την δέσμης. Ο όρος “συνεστιακή μικροσκοπία” απόδόθηκε στην τεχνική διότι το κάθε επίπεδο παρατήρησης βρίσκεται συζευμένο με το επίπεδο το οποίο ορίζει το πέτασμα με την οπή. Για την καλύτερη εστίαση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, ακόμα ένα πέτασμα με οπή τοποθετείται έπειτα από την φωτεινή πηγή. Οι πηγές laser έχουν επιτρέψει την ακτινοβολία μικρών διατομών με υψηλή λαμπρότητα. Επίσης, η χρήση ευαίσθητων φωτοπολλαπλασιαστών στην μονάδα ανίχνευσης ελαχιστοποιεί την ανάγκη για υψηλή ένταση προσπίπτουσας ακτινοβολίας και τα παρεπόμενα φαινόμενα δευτερογενούς φθορισμού από μόρια εκτός του επιπέδου εστίασης. Καθώς, η εικόνα από το συνεστιακό μικροσκόπιο αποτελεί μία “οπτική τομή” του δείγματος, μέσω της ανασύνθεσης της εικόνας από το λογισμικό μπορεί να προκύψει τρισδιάστατη αναπαράσταση. Με την χρησιμοποίηση δύο διαφορετικών χρωμοφόρων παρέχεται χωρική πληροφορία που αντιστοιχεί στην κατανομή των μορίων στο δείγμα.

Κεφάλαιο 4

Ανάπτυξη Πρωτοκόλλου Πολυμερισμού για την Παρασκευή Πολυμερικών Μικροπηκτών Πολυ(*N*-ισοπροπυλακρυλαμιδίου-*co*-ακρυλικού νατρίου) [P(NiPAm-*co*-SA)] με Αριστοποιημένα Χαρακτηριστικά

ΣΥΝΟΨΗ: Στο παρόν Κεφάλαιο περιγράφεται η διαδικασία ανάπτυξης του πρωτοκόλου πολυμερισμού για την παρασκευή μικροπηκτών με αριστοποιημένα χαρακτηριστικά. Ως πρωταρχικοί στόχοι ετέθησαν *i)* ο έλεγχος των υδροδυναμικών διαστάσεων, του λόγου διόγκωσης και της πολυδιασποράς, *ii)* η ρύθμιση της κρίσιμης θερμοκρασίας μετάπτωσης φάσης κοντά στη φυσιολογική θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος και *iii)* ο εμπλουτισμός της επιφάνειας των νανοσωματιδίων με δραστικές θέσεις για την διενέργεια αντιδράσεων μετατροποποίησης και την *in-situ* εναπόθεση ανόργανης νανοφάσης. Σε δεύτερο επίπεδο, κριτήριο στη διαδικασία ανάπτυξης αποτέλεσε η δυνατότητα παρασκευής των μικροπηκτών σε κλίμακα άνω του ενός γραμμαρίου. Η θερμοκρασιακή απόκριση των μικροπηκτών σε διαφορετικά pH μελετήθηκε με δυναμική σκέδαση φωτός και για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων προτείνονται κατάλληλα μορφολογικά μοντέλα. Το τελικό αριστοποιημένο προϊόν χαρακτηρίστηκε με pH-μετρική και πολυηλεκτρολυτική τιτλοδότηση με σκοπό τον προσδιορισμό του λόγου μεταξύ του επιφανειακού και του συνολικού φορτίου, καθώς επίσης και για τον υπολογισμό των δραστικών ομάδων ανά μονάδα επιφάνειας.

4.1 Εισαγωγή

Μία συνηθισμένη συνθετική στρατηγική για την αύξηση ή μείωση της VPTT θερμοαποκρίσιμων μικροπηκτών συνίσταται στην προσθήκη μονομερών με υδρόφιλο ή υδρόφοβο χαρακτήρα αντίστοιχα. Οι επαγόμενες αλλαγές είναι δυνατόν να κυμαίνονται από λίγους βαθμούς °C [245] έως την εξάλειψη της VPTT στο εξεταζόμενο θερμοκρασιακό εύρος [246]. Για ενδεχόμενες βιοϊατρικές εφαρμογές ελεγχόμενης αποδέσμευσης είναι επιθυμητή η ρύθμιση της VPTT σε θερμοκρασιακό παράθυρο το οποίο επιτρέπει δυνητικά την ελεγχόμενη μετάβαση στην συρρικνωμένη κατάσταση σε περιβάλλον *in vivo*. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο συμπολυμερισμός μονομερών με όξινες [247] ή βασικές [55] ομάδες, αφού ο ελεγχόμενος από το pH βαθμός ιοντισμού προσδίδει περαιτέρω αποκρισιμότητα. Το ακρυλικό νάτριο (SA) επιλέχθηκε ως το δεύτερο μονομερές καθώς έχει αναφερθεί ότι κατά τον συμπολυμερισμό της πρωτονιωμένης του μορφής (ακρυλικό οξύ, AA_c) με το NiPAm προς παρασκευή μικροπηκτών, η ενσωμάτωση επιτυγχάνεται σχεδόν

ποσοτικά [248] ή σε μεγάλη απόδοση [249]. Επιπρόσθετα, ο έλεγχος της χωρικής κατανομής των δραστικών θέσεων στο σώμα των μικροπηκτών και η επιδεκτικότητα σε αντιδράσεις μετατροποποίησης υπήρξαν παράγοντες οι οποίοι αξιολογήθηκαν κατά την προεργασία του πρωτοκόλου αριστοποίησης. Η πρόρρηση της κατανομής των δομικών μονάδων όξινων συμμοномерών κατά τον πολυμερισμό με NiPAM μπορεί να συντελεστεί με υφιστάμενα κινητικά μοντέλα [248] ή να επιτευχθεί *a priori* υιοθετώντας *seed-feed* πολυμερισμούς δύο σταδίων [246].

Εναλλακτικά, σε ένα σύνολο εργασιών έχει αναφερθεί η εφαρμογή της *semi-batch* τεχνικής για τον έλεγχο των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών σε μικροπηκτές με βάση το PNIPAM. Συνοπτικά, κατά τους *semi-batch* πολυμερισμούς κατακρήμνισης, διάλυμα μονομερούς/ων τροφοδοτείται στον αντιδραστήρα κατά την διάρκεια του πολυμερισμού. Μέσω της *semi-batch* μεθόδου έχει επιτευχθεί η ομοιογενέστερη κατανομή σταυροδεσμών και κατ' επέκταση η αύξηση του λόγου διόγκωσης και η μείωση της πολυδιασποράς [250, 251], ο έλεγχος της μορφολογίας και των υδροδυναμικών διαστάσεων [252-254] αλλά και η παρασκευή μικροπηκτών σε μεγάλη κλίμακα [255]. Παρ' όλα αυτά, πέρα από την απαίτηση εξειδικευμένης οργανολογίας όπως η χρήση αυτόματης αντλίας έγχυσης, στις εγγενείς αδυναμίες της μεθόδου συγκαταλέγεται το μικρό ποσοστό ενσωμάτωσης του προστιθέμενου συμμοномерού σε χαμηλούς ρυθμούς προσθήκης [253], πιθανότατα εξαιτίας της παραγωγής ενός σημαντικού κλάσματος υδρόφιλου ομοπολυμερούς.

Από την άλλη πλευρά, η τεχνική της *one-shot* εισαγωγής του συμμοномерού σε χρονική στιγμή μεταγενέστερη της έναρξης του πολυμερισμού, απλοποιεί την συνθετική διαδικασία και έχει επίσης εφαρμοστεί επιτυχώς για τον εμπλουτισμό της επιφάνειας μικροπηκτών PNIPAM με δραστικές καρβοξυλικές ομάδες [101]. Για τον λόγο αυτό, στο πρώτο στάδιο της ανάπτυξης του πρωτοκόλου αριστοποίησης, μελετήθηκε συστηματικά η επίδραση της προσθήκης του SA σε δεύτερο χρόνο επάνω στο μέγεθος, την VPTT και την συνδυαστική θερμο-pH αποκρισσιμότητα των μικροπηκτών.

4.2 Παράμετροι Αριστοποίησης και Συνθετικός Έλεγχος

Οι τιμές-στόχοι των φυσικοχημικών παραμέτρων και η ζητούμενη μορφολογία των αριστοποιημένων μικροπηκτών παρατίθενται αρχικώς, μαζί με μία σύντομη επεξήγηση της σχετικής επιλογής.

- Οι υδροδυναμικές διαστάσεις θα πρέπει να κυμαίνονται περί τα 200 nm στην διογκωμένη κατάσταση και 100 nm συρρικνωμένη κατάσταση. Μεταξύ των δεδομένων διαστασιακών ορίων έχει αναφερθεί παράταση του χρόνου παραμονής πολυμερικών νανοφορέων στην κυκλοφορία του αίματος, καθώς αποφεύγεται η βιοσυσώρευση στο ήπαρ, στον σπλήνα ή

στα νεφρά [256], ενώ παράλληλα μπορεί να αξιοποιηθεί το φαινόμενο της *αυξημένης διαπερατότητας και κατακράτησης (Enhanced Permeability and Retention, EPR)* [257-259] σε καρκινικούς ιστούς. Ταυτόχρονα, αφού η κατανομή μεγεθών των νανοσωματιδίων επηρεάζει την βιοκατανομή τους [260], είναι επιθυμητή η ελαχιστοποίηση του *δείκτη πολυδιασποράς*.

- Η *θερμοκρασία μετάπτωσης φάσης όγκου (VPTT)* θα πρέπει να προσεγγίζει την τιμή των $36,7\text{ }^{\circ}\text{C}$, εξασφαλίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο ότι ο εν δυνάμει φορέας δεν θα βρίσκεται στην συρρικνωμένη κατάσταση σε φυσιολογική θερμοκρασία. Επιπλέον, όσον αφορά *in vivo* εφαρμογές, η διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ φυσιολογικών και παθολογικών ιστών σε κατάσταση φλεγμονής μπορεί να αξιοποιηθεί ως ερέθισμα για την στοχευμένη απελευθέρωση φαρμάκου [260].
- Οι αριστοποιημένες μικροπηκτές θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από μορφολογία *πυρήνα/ κελύφους (core/shell)*. Σύμφωνα με τους Hoare και Pelton [261]: "... η ιδανική μικροδομή μίας λειτουργικής (functionalized) μικροπηκτής συνίσταται σε πυρήνα πλούσιο σε pNiPAm και σε επιφανειακό στρώμα-κέλυφος αποτελούμενο από χαλαρώς διασταυρωμένες αλυσίδες pNiPAm οι οποίες φέρουν καρβοξυλομάδες.". Η παραπάνω προσέγγιση λήφθηκε υπόψιν κατά την ανάπτυξη του πρωτοκόλου αριστοποίησης: ο αμιγώς θερμοαποκρίσιμος πυρήνας αναμένεται να εξυπηρετήσει ως "αποθηκευτικός χώρος" σε εφαρμογές ενθυλάκωσης μικρών μορίων ενώ το λειτουργικό κέλυφος αποτελεί την περιοχή όπου λαμβάνουν χώρα *i)* οργανικές αντιδράσεις σύζευξης και *ii)* εκλεκτική πυρήνωση και ανάπτυξη ανόργανης νανοφάσης.

Ακολούθως, εξετάζεται ο αναμενόμενος αντίκτυπος των συνθετικών παραμέτρων του πολυμερισμού κατακρήμνισης επάνω στις ιδιότητες των μικροπηκτών P(NiPAm-co-SA). Παράλληλα, επεξηγείται συνοπτικά η επιλογή μεταβολής ή μη της εκάστοτε παραμέτρου με γνώμονα την επίδραση επάνω στα μεγέθη προς αριστοποίηση.

- Η *αρχική συγκέντρωση του NiPAm* συνιστά βασική παράμετρο ελέγχου των διαστάσεων και του δείκτη πολυδιασποράς των μικροπηκτών, όπως επίσης και του τελικού στερεού περιεχομένου της αντίδρασης πολυμερισμού. Μέσα από προπαρασκευαστικά πειράματα βρέθηκε ότι υφίσταται μία κρίσιμη ελάχιστη συγκέντρωση NiPAm, μεταξύ 4 mM και 10 mM, κάτω από την οποία δεν είναι δυνατή η συσσωμάτωση των αναπτυσσόμενων αλυσίδων προς σχηματισμό των αρχικών πυρήνων. Με πρότερο δεδομένο ότι για $[\text{NiPAm}] = 10\text{ mM}$ έχουν ληφθεί ικανοποιητικά αποτελέσματα, η συνθήκη αρχικοποίησης της πρώτης σειράς πειραμάτων βασίστηκε στην συγκεκριμένη τιμή. Στην δεύτερη σειρά η

συγκέντρωση διπλασιάστηκε στα 20 mM με σκοπό την ικανοποίηση της απαίτησης για υψηλή απόδοση σε πολυμερές. Η συγκέντρωση αυξήθηκε στα 55 mM για το τελικώς αριστοποιημένο προϊόν.

- Ο έλεγχος του μεγέθους θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί *διακόπτοντας την αντίδραση σε μικρούς χρόνους πολυμερισμού* μέσω της εισαγωγής αναστολέα πολυμερισμού όπως η μέθυλοϋδροκινόνη [250], πρακτική η οποία όμως θα συνεπάγετο δυσκολία στο στάδιο καθαρισμού και αυξημένο πειραματικό κόστος. Η αντίδραση πολυμερισμού επιλέχθηκε να προχωρήσει για τέσσερις ώρες μέχρι την τυπικώς πλήρη κατανάλωση των μονομερών. Πρακτικά, η ποσοτική κατανάλωση του NiPAm επιβεβαιώνεται όταν το περιεχόμενο του αντιδραστήρα έχει χάσει την χαρακτηριστική οσμή του, η οποία είναι εξαιρετικά διαπεραστική ακόμη και σε συγκεντρώσεις της τάξης μερικών μM του μονομερούς.
- Η *θερμοκρασία της αντίδρασης* αποτελεί κρίσιμη παράμετρο όσον αφορά την κινητική του πολυμερισμού. Η ταχύτητα πολυμερισμού εξαρτάται από την συγκέντρωση του μονομερούς [262], $[M]$ και από την σταθερά διάδοσης, k_p , η οποία τυπικά έχει εκθετική εξάρτηση από την θερμοκρασία, σύμφωνα με έναν όρο Arrhenius [263]. Όσον αφορά την επίδραση της θερμοκρασίας πολυμερισμού στις διαστάσεις και την πολυδιασπορά των παραγόμενων μικροπηκτών έχει αναφερθεί ότι η κλιμακωτή αύξηση της θερμοκρασίας στο στάδιο της πυρήνωσης μπορεί να επιφέρει αλλαγή εως και μίας τάξης μεγέθους στις διαστάσεις [264]. Για την σειρά πειραμάτων συγκέντρωσης $[\text{NiPAm}] = 0.01 \text{ M}$ επιλέχθηκε η βιβλιογραφικά συνηθέστερα απαντώμενη $T = 70 \text{ }^\circ\text{C}$. Με σκοπό να αντισταθμιστεί η επίδραση του διπλασιασμού της συγκέντρωσης στο μέγεθος των σχηματιζόμενων πρωταρχικών πυρήνων για την σειρά $[\text{NiPAm}] = 0.02 \text{ M}$ η θερμοκρασία μειώθηκε στους $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Η θερμοκρασία πολυμερισμού του αριστοποιημένου προϊόντος ορίστηκε στους $T = 70 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Η *στοιχειομετρική αναλογία μεταξύ των αντιδρώντων* θεσπίστηκε σύμφωνα με παρατηρήσεις οι οποίες εξήχθησαν μέσα από προπαρασκευαστικά πειράματα και εκτενή βιβλιογραφική ανασκόπηση (βλ. Πίνακες 4.1 και 4.2 στο τέλος της παραγράφου). Για τις δύο πρώτες πειραματικές σειρές η στοιχειομετρική αναλογία διατηρήθηκε σταθερή. Η μοριακή αναλογία $[\text{NiPAm}]:[\text{SA}]$ ρυθμίστηκε στην τιμή 10:1 [101] καθώς έχει αναφερθεί ότι για συναφείς τιμές του λόγου [137, 265] επιφέρεται επαρκής αύξηση της VPTT. Αντίστοιχα, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, στο εύρος μοριακών λόγων $[\text{NiPAm}]:[\text{MBA}]$ από 4.5 εως 164.5 (22% - 0.61% πυκνότητα σταυροδεσμών), η VPTT και ο λόγος διόγκωσης λαμβάνουν αποδεκτές τιμές. Ως εκ τούτου, η αναλογία $[\text{NiPAm}]:[\text{MBA}] = 23$

επιλέχθηκε για τις δύο πρώτες πειραματικές σειρές, αφού λήφθηκε υπόψιν ότι η αύξηση της συνεκτικότητας του δικτύου επιδρά ευεργετικά στην μείωση των διαστάσεων, με ζητούμενο όμως ταυτόχρονα την διατήρηση της ελαστικότητας η οποία εξασφαλίζει αυξημένο λόγο διόγκωσης. Η αναλογία [NiPAm]:[KPS] = 52 επιλέχθηκε γιατί αφενός εξασφαλίζει ταχεία έναρξη του πολυμερισμού και αφετέρου συνάδει με το εύρος το οποίο αναφέρεται στην βιβλιογραφία. Σύμφωνα με την κλασική κινητική θεωρία του ριζικού πολυμερισμού [266], το μέσο κινητικό μήκος μακρόριζας, ν , εξαρτάται από την συγκέντρωση του εκκινητή σύμφωνα με την σχέση $\nu \sim [I]^{-1/2}$. Συνεπώς αύξηση του εκκινητή υπαγορεύει μικρότερο μοριακό βάρος σχηματιζόμενων μακροριζών και κατ' επέκταση μικρότερους πρωτογενείς πυρήνες. Ταυτόχρονα, όμως η μεγάλη αύξηση της συγκέντρωσης ελευθέρων ριζών στην επιφάνεια των πρωτογενών σωματιδίων μπορεί να οδηγήσει στην αύξηση της κολλοειδούς πολυδιασποράς, εξαιτίας της ανομοιογενούς συννέωσης στο στάδιο της δευτερογενούς πυρήνωσης [267].

- Ο χρόνος εισαγωγής του δεύτερου μονομερούς αποτέλεσε το κομβικό σημείο του συνθετικού ελέγχου. Εξετάζοντας ένα μεγάλο δείγμα πειραματικών συνθηκών παρατηρήθηκε ότι: *i*) στα συστήματα NiPAm/MBA/KPS η διατήρηση του μεγέθους κοντά στις τιμές ενδιαφέροντος συντελείται μόνο με προσθήκη SDS και *ii*) το αντίστοιχο συμβαίνει και στα συστήματα με AAc όπου επιπλέον σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται υπέρμετρη αύξηση της VPTT. Διαισθητικά, τα θεμελιώδη ερωτήματα που τέθηκαν ήταν τα εξής: *i*) “πρωταρχικά, είναι εφικτός ο έλεγχος του μεγέθους αξιοποιώντας τον αμιγώς ιοντικό χαρακτήρα των δομικών μονάδων του SA;” και *ii*) “δευτερευόντως, είναι εφικτή η σημαντική άνοδος της VPTT και ο ταυτόχρονος εμπλουτισμός του κελύφους με καρβοξυλικές ομάδες;”. Η διασύνδεση με το συνθετικό πρωτόκολο επιτεύχθη διατυπώνοντας διαφορετικά τα ερωτήματα: *i*) “υφίσταται μία χρονική στιγμή, t_{in} , μετά την έναρξη του πολυμερισμού όπου η προσθήκη του SA θα διέκοπτε την περαιτέρω συσσωμάτωση των πρωτογενών πυρήνων δρώντας ως “ψευδο-τασιενεργό;” ενώ παράλληλα, *ii*) “είναι δυνατόν, μετά από την t_{in} και με δεδομένους τους σχετικούς λόγους δραστηριότητας $r_{SA} : r_{NiPAm}$, οι δομικές μονάδες του SA να υπεισέρχονται με τέτοιο τρόπο στο δίκτυο ώστε η συγκέντρωσή τους να παρουσιάζει ακτινική βάρθρωση;”. Με σκοπό την εξακρίβωση της ορθότητας του συλλογισμού, το SA προστέθηκε σε $t_{in} = 0 - 30$ min ανά 5 min για κάθε δείγμα.

Πίνακας 4.1 Σύνοψη βιβλιογραφικών πειραματικών συνθηκών παρασκευής και χαρακτηριστικών μικροηλεκτρικών PNiPAm.

Entry	NiPAm (mg)	MBA (mg)	FRI (mg)	NiPAm (mmol)	MBA (mmol)	FRI (mmol)	[Monomers] (mM)	SDS [mM]	H ₂ O (ml)	T _{reaction} (°C)	[NiPAm]/[MBA]	[NiPAm]/[Initiator]	D _{n, Low T^a} (nm)	D _{n, High T^a} (nm)	LCST (°C)	Αναφορά								
#1	7000	700	280	61,9	4,54	1,036	138,6	0,41	500	70	13,6	59,7	~436	~240	N/A	[268]								
								2,46					~195											
#2	5000	250	500	44,2	1,62	1,850	47,4	—	1000	70	27,2	23,9	~530	~180	~33	[29]								
		500			~460								~175	~35										
		1500			9,73								53,9	~490			~180	~39						
#3	4200	420	210	37,1	4,47	0,920	138,6	—	300	70	8,3	40,3	630	380	N/A	[269]								
																	15	0,10	102,0					
#4	566	39	0,3	5,0	0,25	0,0011	105,1	—	50	70	19,8	4506,9	544	294	31,8	[270]								
																	116	0,75	115,1					
																	588	240	32,3					
#5	4413	301	82,1	39,0	1,95	0,36	136,5	0,65	300	80	20,0	108,3	~280	~150	~33	[250]								
																	7850	65	320	69,4	0,42	1,18	139,6	90
#6	7870	150	300	69,5	0,97	1,11	141,0	1,04	500	70	71,5	62,7	285	109	~32 - 34	[271]								
																	7930	320	330	70,1	2,08	1,22	144,3	95
																	7890	570	330	69,7	3,70	1,22	146,8	85,2
#7	36000	1770	540	318,1	11,48	2,00	219,7	—	1500	70	27,7	159,3	~775	~550	~32	[272]								
#8	11800	225	450	104,3	1,46	1,66	176,2	0,47	600	70	71,5	62,6	~240	~110	~32	[273]								
																	700	21	54,1	6,2	0,14	0,20	64,0	2,0
#10	4200	42	210,0	37,1	0,27	0,78	124,6	—	300	70	136,2	47,8	~1200	~325	~33	[274]								

Πίνακας 4.2 Σύνοψη βιβλιογραφικών πειραματικών συνθηκών παρασκευής και χαρακτηριστικών μικροηλεκτρικών *P(NiPAm-co-AAc)*.

Entry	NiPAm (mg)	MBA (mg)	AAc (mg)	FRI (mg)	NiPAm (mmol)	MBA (mmol)	AAc (mmol)	FRI (mmol)	[Monomers] (mM)	SDS [mM]	H ₂ O (ml)	T _{Reaction} (°C)	[NiPAm]/[MBA]	[NiPAm]/[AAc]	[NiPAm]/[Initiator]	D _{h, Low T^a} (nm)	D _{h, High T^a} (nm)	LCST (°C)	Αναφορά
#1	1347	108	101	45	11,9	0,70	1,40	0,197	140,0	—	100	65	17,0	8,5	60,4	~ 1000	—	—	[275]
#2	1402	30	101	46	12,4	0,20	1,40	0,2	140,0	—	100	70	63,2	8,9	62,0	560	605	—	[276]
#3	1300	100	72	69	11,5	0,65	1,00	0,3	65,7	1,0	200	70	17,7	11,5	38,0	480	520	—	[246]
#4	7000	450	500	210	61,9	2,92	6,94	0,78	95,6	—	750	70	21,2	8,9	79,6	~ 1000	300	~ 39	[277]
#5	760	22	10	46	6,7	0,14	0,14	0,2	70,0	2,0	100	70	48,0	48,0	33,6	172	—	—	[278]
#6	626	63	50	0,973	5,5	0,41	0,69	0,0036	132,6	—	50	65	13,5	8,0	1536	614	333	2 - Step	[249]
#7	2260	154	144	1,5	20,0	1,00	2,00	0,006	114,8	—	200	70	20,0	10,0	3599	860	352	2 - Step	[279]
#8	1256	101	94	68	11,1	0,65	1,30	0,3	65,3	2	200	70	17,0	8,5	37	321	—	—	[280]
#9	626	14,7	30	N/A	5,53	0,095	0,416	N/A	151,0	—	40	70	58,0	13,3	N/A	~ 240	~ 120	~ 41	[137]
#10	1300	100	180	70	11,5	0,65	2,50	0,26	73,3	1,0	200	70	17,7	4,6	44	~ 300	~ 100	~ 33	[281]
#11	400	4	100	50	3,5	0,026	1,39	0,185	99,0	—	50	80	136,3	2,5	19	600 - 800	100 - 300	34	[282]
#12	1400	33	100	68	12,4	0,21	1,39	0,300	139,7	2,0	100	70	57,8	8,9	41	590	480	~ 33	[283]
#13	1400	33	100	68	12,4	0,21	1,39	0,300	139,7	2,0	100	70	57,8	8,9	41	430	320	38	[265]
#14	1400	30	100	50	12,4	0,19	1,39	0,185	139,6	—	100	70	63,6	8,9	67	~ 1060	~ 460	~ 38	[284]
#15	634	108	50	68	5,6	0,70	0,70	0,300	70,0	1,0	100	70	8,0	8,0	19	~ 280	~ 200	~ 45	[274]

4.3 Πειραματικό Μέρος

4.3.1 Σύνθεση Πολυμερικών Μικροπηκτών P(NiPAm-co-SA)

Η σύνθεση των μικροπηκτών P(NiPAm-co-SA) πραγματοποιήθηκε με ελεύθερο ριζικό πολυμερισμό κατακρήμνισης απουσία τασιενεργού. Το μονομερές *N*-ισοπροπυλακρυλαμίδιο (NiPAm, Sigma 97%) ανακρυσταλλώθηκε δις χρησιμοποιώντας εξάνιο ως διαλύτη και ξηράθηκε υπό κενό για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το ακρυλικό νάτριο (SA, Sigma 99%), το *N,N'*-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο (MBA, Sigma 99%) και το υπερθειικό κάλιο (KPS, Sigma 99%) χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία. Οι αντιδράσεις πολυμερισμού διεξήχθησαν σε ειδικά διαμορφωμένη σφαιρική δίσαιμη συσκευή των 250 ml με δυνατότητα εισαγωγής θερμομέτρου Hg, παροχής αερίου N₂ και προσθήκης διαλυμάτων υπό αδρανείς συνθήκες. Η θερμοκρασία πολυμερισμού ρυθμίστηκε με χρήση λουτρού ελαίου και διατηρήθηκε στους 70±2 °C για την πειραματική σειρά συγκεντρώσεων 0.01 M και στους 60±2 °C για τις συγκεντρώσεις 0.02 M. Καθ' όλη τη διάρκεια του πολυμερισμού επιβλήθηκε ισχυρή μαγνητική ανάδευση στο μίγμα της αντίδρασης, χρησιμοποιώντας κυλινδρικό μαγνήτη επικαλυμένο με Teflon (L 250 mm × Ø 100 mm) και μαγνητικό αναδευτήρα της εταιρίας VELP Scientifica (Model ARE), ο οποίος λειτουργούσε στην μεγαλύτερη δυνατή κλίμακα στροφών ανά λεπτό. Ο ρυθμός ανάδευσης αποτελεί σημαντική παράμετρο στον πολυμερισμό κατακρήμνισης με ελεύθερες ρίζες, καθώς είναι δυνατόν να επηρεάσει το μέγεθος και την κατανομή μεγεθών των παραγόμενων νανοσωματιδίων [264, 285, 286].

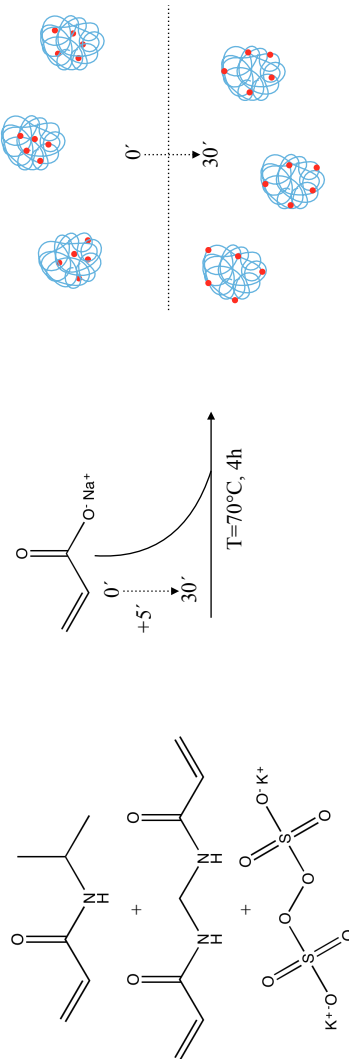
Αρχικά, δις απεσταγμένο νερό (185 ml) το οποίο προηγουμένως έχει διέλθει από φίλτρο 0.4 μm προστίθεται στην συσκευή πολυμερισμού η οποία τοποθετείται στο λουτρό ελαίου και ρυθμίζεται η θερμοκρασία. Εξαιτίας της υψηλής θερμοχωρητικότητας του H₂O απαιτείται ~1 h για την εξισορρόπηση της θερμοκρασίας. Στην συνέχεια, αφαιρείται το προσαρμοσμένο θερμομέτρο Hg, η συσκευή σφραγίζεται με ελαστομερικό πώμα και εφαρμόζεται απαέρωση με ήπια ροή N₂ για 30 min. Η απουσία του διαλυμένου οξυγόνου στις αντιδράσεις ριζικού πολυμερισμού ελαχιστοποιεί την παραγωγή μη-διασταυρωμένων/διακλαδισμένων παραπροϊόντων [287]. Έπειτα, κατάλληλες ποσότητες NiPAm, MBA και SA (Πίνακας 4.3) διαλύονται σε 10 ml H₂O μέσα σε ποτήρι ζέσεως και μεταφέρονται σε φιαλίδιο εξοπλισμένο με ελαστομερικό πώμα, όπου απαερώνονται με ήπια διέλευση N₂. Το διάλυμα των μονομερών εισάγεται γρήγορα στην συσκευή πολυμερισμού με ένεση, διατηρώντας αδιάλειπτα αδρανή ατμόσφαιρα. Έπειτα από 2 min και ενώ επικρατούν συνθήκες έντονης ανάδευσης, εισάγονται με τον ίδιο τρόπο 2,5 ml διαλύματος KPS για την έναρξη της αντίδρασης πολυμερισμού, αφού προηγουμένως είχε απαερωθεί. Η δεδομένη αλληλουχία εισαγωγής μονομερών και εκκινητή εξασφαλίζει την ελαχιστοποίηση

παραγωγής παραπροϊόντων η οποία θα οφείλονταν αφενός στην θερμική έναρξη του πολυμερισμού και αφετέρου στην αργή αποικοδόμηση του KPS προς σχηματισμό ελευθέρων ριζών κατά τη διάρκεια της θερμικής σταθεροποίησης [250]. Στα πειράματα όπου το SA εισάγεται σε δεύτερο χρόνο, ο χειρισμός είναι ακριβώς ίδιος με αυτόν για την εισαγωγή του KPS. Η αδιακύμαντη θερμοκρασία πολυμερισμού εξασφαλίστηκε με θέρμανση των διαλύματων αμέσως πριν την εισαγωγή τους στην αντίδραση. Η όψη του αντιδραστήρα πολυμερισμού σε διαφορετικούς χρόνους αντίδρασης παρουσιάζεται στις Εικόνες 4.1A και 4.1B.

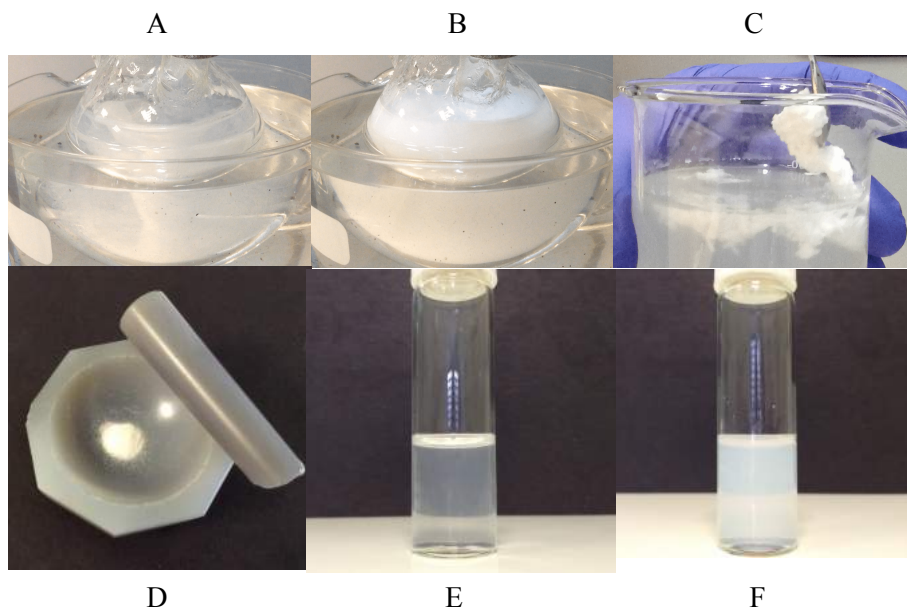
Για τον καθαρισμό των παραγόμενων κολλοειδών εφαρμόστηκε η τεχνική της θρόμβωσης και επαναδιασποράς [140, 288-290]. Περιγραφικά, ο συνδυασμός θέρμανσης-αυξημένης ιοντικής ισχύος για τις ομοπολυμερικές μικροπηκτές PNiPAm ή θέρμανσης-χαμηλού pH για τις συμπολυμερικές μικροπηκτές P(NiPAm-co-SA) έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ισχυρών ελκτικών αλληλεπιδράσεων Van der Waals και τον σχηματισμό μεσοσκοπικών συσσωματωμάτων. Τελικώς σχηματίζονται μικροσκοπικοί θρόμβοι οι οποίοι κατακρημνίζονται υπό την επίδραση της βαρύτητας. Ίχνη μονομερών και παραπροϊόντα χαμηλού μοριακού βάρους παραμένουν στο υπερκείμενο διάλυμα με αποτέλεσμα τον επιτυχή διαχωρισμό. Έπειτα από τον τερματισμό του πολυμερισμού με εισαγωγή αέρα στον αντιδραστήρα, το περιεχόμενο μεταφέρεται σε ποτήρι ζέσεως των 250 ml και παραμένει υπό θέρμανση (45 - 50 °C) στον απαγωγό έως ότου ο όγκος μειωθεί στα ~ 100 ml. Εφαρμόζοντας ανάδευση, στην συμπυκνωμένη διασπορά προστίθεται στερεό NaCl ή στάγδην ο ελάχιστος δυνατός όγκος διαλύματος HCl 1 M. Το λευκό κατακρήμνισμα συλλέγεται με την βοήθεια μεταλλικής σπάτουλας (Εικόνα 4.1C) και αφήνεται προς ξήρανση σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από το πρώτο στάδιο της ξήρανσης το προϊόν χαρακτηρίζεται από δυσκαμψία και ψαθυρότητα (συμπεριφορά σκληρού θερμοπλαστικού καθώς για το PNiPAm έχουν αναφερθεί τιμές θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης $T_g = 130 - 154$ °C [272, 291, 292]), πλην όμως εμπεριέχεται σημαντική ποσότητα φυσιοροφημένου H₂O. Το κλάσμα μάζας του H₂O είναι απαραίτητο να απομακρυνθεί διότι εισάγει σφάλμα στα πειράματα τιτλοδότησης και παρεμποδίζει αντιδράσεις σύζευξης σε επόμενο στάδιο. Για τον λόγο αυτό η άμορφη μάζα τεμαχίζεται, λειοτριβείται σε χωνευτήρι αχάτη και ξηραίνεται μέχρι σταθερού βάρους υπό κενό. Η λεπτά διαμερισμένη σκόνη (Εικόνα 4.1D) φυλάσσεται σε σφραγισμένα φιαλίδια μακριά από το φως και την υγρασία.

Πίνακας 4.3 Πειραματικές συνθήκες και στοιχειομετρίας των συνθεμένων δειγμάτων μικροηλεκτρονικών PNiPAm και P(NiPAm-co-SA).

	NiPAm (mg)	SA (mg)	MBA (mg)	KPS (mg)	Χρόνος Προσθήκης SA	[NiPAm]/[SA]	[NiPAm+SA]/[MBA]	[NiPAm+SA+MBA]/[KPS]	[NiPAm] (M)	T (°C)
PN_001	226,3	0	13,5	11,9	—	—	23	47	0,01	70
PNS_001_0-30_min	226,3	18,7	13,5	11,9	0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min, 30 min	10	25	52	0,01	70
PN_002	452,6	0	27	23,8	—	—	23	47	0,02	60
PNS_002_0-30_min	452,6	37,4	27	23,8	0 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min, 30 min	10	25	52	0,02	60
PNS_055_Opt	1250	120	80	80	40 mg 0 min -80 mg 8,5 min	8,7	24	43	0,055	70



Σχήμα 4.1 Αντίδραση πολυμερισμού κατακρήμνισης P(NiPAm-co-SA). Με γαλάζιο χρώμα αποδίδονται οι αλυσίδες του PNiPAm και με κόκκινο οι ομάδες -COOH.



Εικόνα 4.1 Στιγμιότυπο αντιδραστήρα έπειτα από την έναρξη του πολυμερισμού: A) 90 sec (γαλάζια/γκρι θόλερότητα) και B) 8.5 min (γαλακτόχρωμο). C) Κατακρήμνιση της διασποράς και συλλογή πολυμερούς. D) Λειοτριβιμένο δείγμα, E) εμφάνιση μετά από επαναδιασπορά σε συγκέντρωση 0.1% κ.β., pH = 7 στους 25 °C και F) στους 40 °C.

4.3.2 Χαρακτηρισμός Πολυμερικών Μικροπηκτών P(NiPAm-co-SA)

4.3.2.1 Δυναμική Σκέδαση Φωτός (DLS)

Οι μετρήσεις DLS πραγματοποιήθηκαν με το όργανο Zetasizer Nano ZS της εταιρίας Malvern σε οπισθοσκεδαζόμενη γεωμετρία (173°) και στο θερμοκρασιακό εύρος 298.15 - 318.15 K, με βήμα 2 K στο διάστημα 303.15 - 313.15 K. Παρασκευάστηκαν στοκ αιωρήματα των 15 ml με αρχική συγκέντρωση $C_{pol} = 2 \text{ mg.ml}^{-1} = 0.2 \%$ κ.β., εξασφαλίζοντας την συλλογή ισχυρού σκεδάζοντος σήματος και παράλληλα αποκλείοντας τα φαινόμενα δευτερογενούς σκέδασης.

Η επαναδιασπορά επιτεύχθη προσθέτοντας λειοτριβιμένη ποσότητα μικροπηκτών σε ειδικά διαμορφωμένο γυάλινο κυλινδρικό περιέκτη, ο οποίος περιείχε δις απεσταγμένο H₂O σε pH=7. Ο περιέκτης τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων Elmasonic S30H της εταιρίας Elma στην συνεχή λειτουργία για $t_{max} = 30 \text{ min}$, διάστημα κατά το οποίο η θερμοκρασία δεν υπερέβη τους 25 °C. Ποιοτικά, η καλή επαναδιασπορά ταυτοποιήθηκε οπτικά από την ομοιογενή, αμυδρά θολερή γαλάζια/γκρι εμφάνιση και ποσοτικά με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ανά 1 min έπειτα από την παρέλευση χρόνου $t = 20 \text{ min}$. Η πλήρης επαναδιασπορά ταυτοποιήθηκε όταν η απόκλιση μεταξύ δύο διαδοχικών μετρήσεων

μεγέθους ήταν μικρότερη από $\pm 5\%$. Εξαιτίας της πλήρους πρωτονίωσης των καταλοίπων του SA στο στάδιο της απομόνωσης του στερεού προϊόντος, ύστερα από την επαναδιασπορά των μικροπηκτών P(NiPAm-co-SA) το pH βρίσκεται μικρότερο από την αρχική τιμή του διαλύματος. Η επαναφορά σε pH=7 πραγματοποιήθηκε με την στάγδην προσθήκη διαλύματος 0.01 M NaOH χρησιμοποιώντας μηχανική πιπέτα. Για την εξάλειψη της συνεισφοράς των αντισταθμιστικών ιόντων Na^+ στις υδροδυναμικές διαστάσεις στις μετρήσεις σε pH = 9 [293], η ιοντική ισχύς της διασποράς ρυθμίστηκε σε $[\text{Na}^+] = 10^{-3}$ M με προσθήκη κατάλληλου όγκου (~15 μl) διαλύματος NaCl 1 M. Από το αιώρημα αφαιρέθηκε 1 ml για τις μετρήσεις D_H ως προς T σε pH = 7, ενώ ο υπόλοιπος όγκος διαχωρίστηκε ισομερώς για την ρύθμιση του pH σε όξινες ή αλκαλικές τιμές με συνδιαστική χρήση διαλυμάτων 0.01M/0.1M HCl ή 0.01M/0.1M NaOH. Κρίσιμες παράμετροι κατά την ρύθμιση του pH αποτελούν ο χρόνος σταθεροποίησης για την λήψη αξιόπιστης μέτρησης pH και η διατήρηση της ιοντικής ισχύος και της συγκέντρωσης κοντά στην αρχικά ορισμένη.

Οι παρατιθέμενες τιμές στα γραφήματα αντιστοιχούν στις z -μέσες τιμές της υδροδυναμικής διαμέτρου (z -average). Η φυσική σημασία του μετρούμενου μεγέθους έχει συζητηθεί στο Κεφάλαιο 3. Η κρίσιμη θερμοκρασία μετάπτωσης όγκου, VPTT ορίζεται στο σημείο αλλαγής καμπυλότητας της προσαρμοσμένης συνεχούς συνάρτησης $D_H(T)$. Από την μορφή της συνάρτησης $\partial D_H/\partial T$ είναι δυνατόν να εξαχθούν πληροφορίες σχετικά με την φύση της μετάβασης καθώς:

1. Το εύρος της συνάρτησης είναι ανάλογο της γραμμικότητας της μεταβολής, συνεπώς στενότερες καμπύλες υποδεικνύουν πιο απότομες μεταβολές.
2. Το ελάχιστο της τιμής αποτελεί ποιοτικό μέτρο του λόγου διόγκωσης: όσο μικρότερη η τιμή της παραγώγου, τόσο μεγαλύτερος ο λόγος διόγκωσης.
3. Η παρουσία παραπάνω του ενός τοπικών ελαχίστων στην παράγωγο αποτυπώνει μηχανισμό μετάβασης στην συρρικνωμένη κατάσταση σε πολλαπλά στάδια.

4.3.2.2 Ηλεκτροφορητική Σκέδαση Φωτός (ELS)

Οι μετρήσεις ELS πραγματοποιήθηκαν με το όργανο Zetasizer Nano ZS της εταιρίας Malvern σε γεωμετρία εμπρόσθια σκέδασης (13°). Χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες PS προσαρμόζοντας το επαναχρησιμοποιούμενο εμβαπτιζόμενο κελί μέτρησης (dip cell). Τα πρωτογενή δεδομένα ηλεκτροφορητικής κινητικότητας μετατράπησαν από το λογισμικό σε τιμές δυναμικού-ζ μέσω της σχέσης Einstein-Smoluchowski. Για τον προσδιορισμό του δυναμικού-ζ συναρτήσεως του pH, χρησιμοποιήθηκε 1 ml από προπαρασκευασμένες διασπορές 0.2% κ.β σε pH=7 με διαφορετικές τιμές [NaCl] και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε δύο στάδια για την αποφυγή υπέρμετρης αύξησης της ιοντικής

ισχύος. Προκαθορισμένοι όγκοι διαλύματων HCl ή NaOH χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε στάδιο για την λήψη των πειραματικών σημείων σε όξινο ή αλκαλικό pH.

4.3.2.3 pH-μετρική/ELS τιτλοδότηση με HCl. ELS τιτλοδότηση με PDADMAC

Το αυτόματο σύστημα MPT-2 Autotitrator της εταιρίας Malvern χρησιμοποιήθηκε και στα δύο είδη τιτλοδότησης. Η διακριτική ικανότητα του οργάνου επιτρέπει την ελεγχόμενη έγχυση με ελάχιστο βήμα 10 μ l. Παρασκευάστηκαν 10 ml αιωρήματος ανά πείραμα τιτλοδότησης, υιοθετώντας τις ίδιες συνθήκες με τις μετρήσεις DLS ($C_{pol} = 2 \text{ mg.ml}^{-1}$, $[\text{NaOH}] = 10^{-3} \text{ M}$, $\text{pH}=7$). Ακολουθήθηκε πορεία “αντίστροφης” τιτλοδότησης, κατά την οποία προστίθεται όξινο διάλυμα τίτλου ($[\text{HCl}] = 10^{-2} \text{ M}$) στην αποπρωτονιωμένη διασπορά [294] και καταγράφεται το δυναμικό-ζ έως ότου προσεγγιστεί το ισοηλεκτρικό σημείο (IEP). Σε αμέσως επόμενο πείραμα καταγράφηκε η καμπύλη τιτλοδότησης του “κενού” πειράματος: σε υδατικό διάλυμα με αρχικό $\text{pH} = 7$ προστίθενται οι ίδιοι όγκοι, σε ίσο αριθμό διαστημάτων και καταγράφεται η μεταβολή του pH. Η “αντίστροφη” τιτλοδότηση προτιμήθηκε έναντι της “ευθείας” διότι: *i*) το αρχικώς ουδέτερο pH εξασφαλίζει την κολλοειδή σταθερότητα της διασποράς ενώ η επιβολή συνθηκών για την “ευθεία” τιτλοδότηση θα είχε ως αποτέλεσμα την αδυναμία μέτρησης του δυναμικού-ζ εξαιτίας της υπέρμετρης αύξησης της ιοντικής ισχύος και *ii*) υποτέθηκε ότι ελαχιστοποιείται ο ρόλος του πολυηλεκτρολυτικού φαινομένου [295], εξαιτίας της μεγαλύτερης διαχυτότητας των πρωτονίων προς το δίκτυο των μικροπηκτών σε σχέση με την εκδοχή της αποπρωτονίωσης του δικτύου. Για την σταθεροποίηση του pH, μεσολαβούσε χρονικό διάστημα 300 s ανάμεσα σε κάθε βήμα προσθήκης HCl [296]. Ο προσδιορισμός του επιφανειακού φορτίου πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας διάλυμα κατιοντικού πολυηλεκτρολύτη 0.1 % κ.β. (PDADMAC, $\langle M_w \rangle = 150000 \text{ Da}$, 20 wt% σε H_2O , Aldrich).

4.4 Αποτελέσματα

4.4.1 Αποτελέσματα DLS

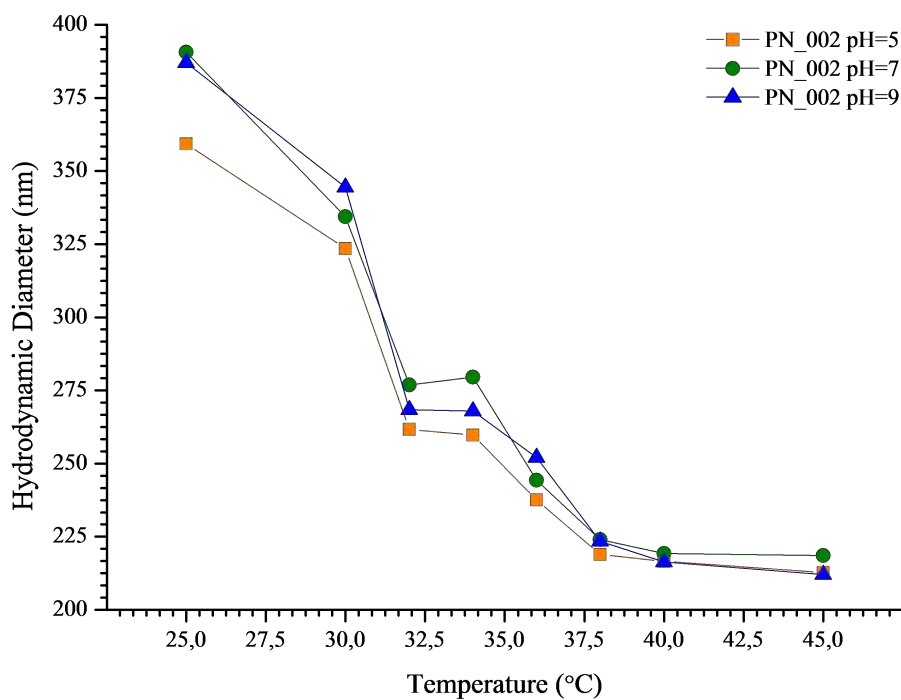
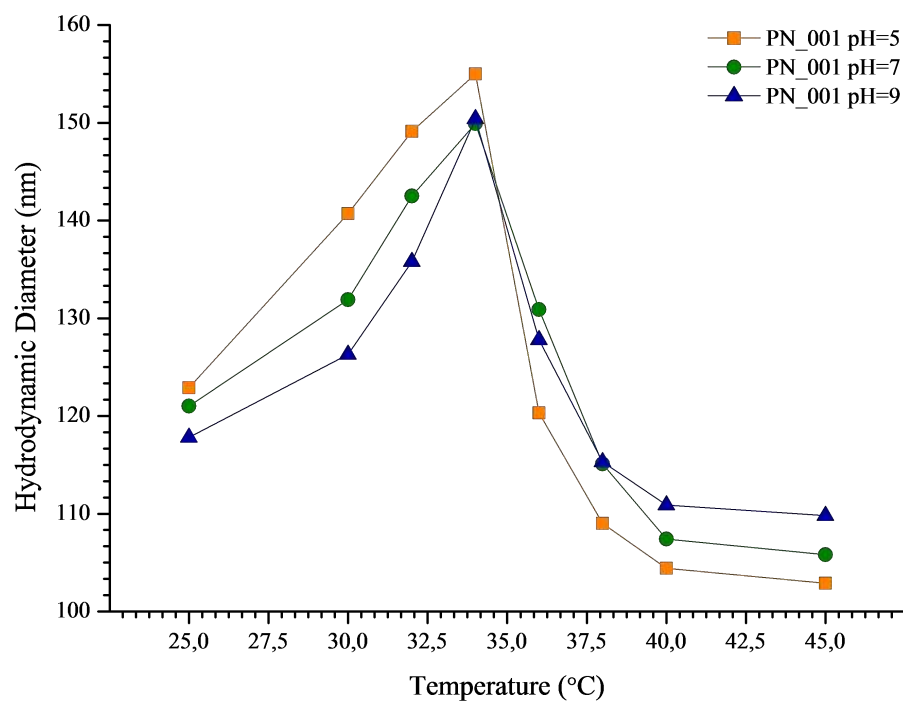
Στα γραφήματα που ακολουθούν παρουσιάζεται η μεταβολή της υδροδυναμικής διαμέτρου των μικροπηκτών P(NiPAm-co-SA) συναρτήσει της θερμοκρασίας, D_h vs T , σε ασθενώς αλκαλικές ($\text{pH} = 9$), ουδέτερες ($\text{pH} = 7$) και ασθενώς όξινες ($\text{pH} = 5$) συνθήκες. Οι μετρήσεις σε ενδιάμεσες ή/και χαμηλότερες τιμές pH πραγματοποιούνται όπου κρίνεται αναγκαίο για την ανάδειξη της παράλληλης αποκρισιμότητας ως συνάρτηση του pH.

Η μορφή των διαγραμμάτων D_h vs T για τα δείγματα όπου το SA απουσίαζε από την αντίδραση πολυμερισμού (Εικόνα 4.2) είναι ενδεικτική της επίδρασης του δίπτυχου

συγκέντρωση μονομερούς/θερμοκρασία πολυμερισμού επάνω στο μέγεθος και στο προφίλ θερμικής απόκρισης των μικροπηκτών. Το δείγμα PN_001, όπως και ένας σημαντικός αριθμός από τα υπόλοιπα συντεθειμένα δείγματα, επέδειξαν ιδιόμορφη συμπεριφορά κατά την θέρμανση, γεγονός το οποίο οδήγησε σε μία υπόθεση εργασίας η οποία βασίζεται στην παραδοχή ενός μορφολογικού μοντέλου για την ερμηνεία των δεδομένων σκέδασης. Συγκεκριμένα, για pH=7, η z -μέση D_h λαμβάνει την τιμή των 121 nm στους 25 °C, θερμοκρασία αρκετά χαμηλότερη από την $VPTT$ του PNiPAm (~ 32 °C), αναρριχάται στα 150 nm για T=34 °C και τελικώς μεταπίπτει σχετικά απότομα στα 106 nm για T=45 °C, στην συρρικνωμένη κατάσταση. Εκ πρώτης όψεως το δείγμα προσιδιάζει συγχρόνως την συμπεριφορά $UCST$ και $LCST$ συστημάτων, όμως μέσα από την εξέταση συμπληρωματικών αποτελεσμάτων των μετρήσεων DLS, ο ισχυρισμός αυτός για το δείγμα PN_001 δεν αποδεικνύεται ορθός.

Για την περιγραφή του μορφολογικού μοντέλου είναι αναγκαίο να δοθεί έμφαση σε δύο από τα φυσικά μεγέθη που διέπουν την ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, στο μέγεθος και στον δείκτη διάθλασης των σκεδαστών. Δίνοντας ένα ημιποσοτικό παράδειγμα, δεδομένου ότι οι διαστάσεις υπεισέρχονται στην εξίσωση Reyleigh (βλ. Παράγραφο 3.2.1) με έναν όρο υψωμένο στην έκτη δύναμη ($I \propto d^6$), είναι αναμενόμενη $2^6 = 64$ φορές μεγαλύτερη συνεισφορά στην ένταση από μικροπηκτές με $D_{h,Collapsed} = 1/2 D_{h,Swollen}$. Από την άλλη πλευρά, η παρατηρούμενη θολερότητα όταν ένα δείγμα σταθερής συγκέντρωσης θερμαίνεται και μεταπίπτει στην συρρικνωμένη κατάσταση (Εικόνα 4.1E και 4.1F) αποτελεί αδιαφιλονίκητη επιβεβαίωση της κυριαρχίας του ανταγωνιστικού όρου στην εξίσωση, όπου εμπεριέχεται ο δείκτης διάθλασης των σκεδαστών και του μέσου διασποράς. Για λόγους συντομίας, η διαφορά μεταξύ του δείκτη διαθλασης του περιβάλλοντος H₂O και των μικροπηκτών θα αναφέρεται απλά ως αντίθεση. Σε μία μέτρηση DLS, η ένταση του καταγραφόμενου σήματος (*Derived Count Rate, DCR*) σχετίζεται με το πλήθος των προσπίπτοντων φωτονίων στον ανιχνευτή και είναι ένα ποσοτικό μέτρο της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Μαζί με τον δείκτη πολυδιασποράς, PDI, όπως ορίστηκε στο Κεφάλαιο 3, μπορούν να προσφέρουν επικουρικά χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τις μορφολογικές αλλαγές κατά την θέρμανση της διασποράς PN_001.

Το προφίλ της μεταβολής D_h vs T αντικατοπτρίζει αφενός την μικρή ευαισθησία του PN_001 έναντι στο pH η οποία οφείλεται στην παρουσία των όξινων καταλοίπων SO₄⁻ από τον εκκινητή. Σημαντικότερα όμως, καταμαρτυρά ότι η ίδια διεργασία επιφέρει τα αντίθετα αποτελέσματα επάνω στην ανιχνευόμενη D_h με DLS. Πάνω από την $VPTT$ οι ελεύθερες και ασθενώς διασταυρωμένες αλυσίδες που απαρτίζουν το κέλυφος τείνουν να αναδιπλωθούν υπό την επίδραση ασθενών Van der Waals ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων, καθώς η μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτονίων είναι ικανή να προκαλέσει τοπικά την εξουδετέρωση ηλεκτροστατικών απώσεων που οφείλονται στην παρουσία των SO₄⁻. Κάτω

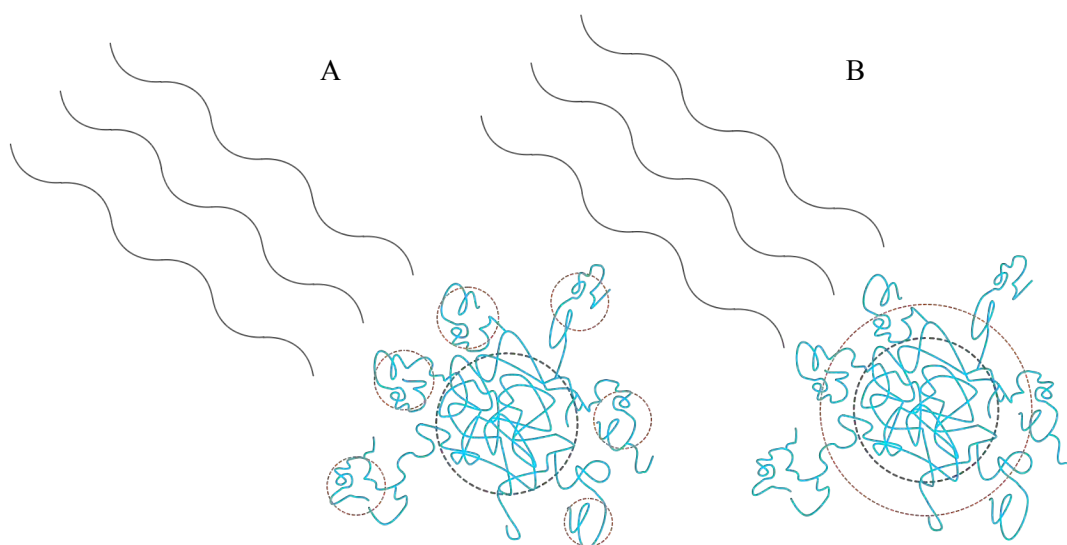


Εικόνα 4.2 Θερμοκρασιακή απόκριση μικροπηκτών *P(NiPAm)* για συγκέντρωση NiPAM 10 mM (A) και 20 mM (B) σε pH = 5, 7, 9.

από την *VPTT*, ο κυρίαρχος μηχανισμός συρρίκνωσης των μικροπηκτών οφείλεται στην εντροπική προέλευσης αποβολή του H₂O και την ανάπτυξη περαιτέρω *διαμοριακών*

αλληλεπιδράσεων. Κοινό χαρακτηριστικό και στις δύο περιπτώσεις αποτελεί η αύξηση της τοπικής πυκνότητας σε πολυμερές και κατ' επέκταση η ενίσχυση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Το ερώτημα που τίθεται εύλογα είναι το εξής: “για πιο λόγο η αύξηση της αντίθεσης και μόνο, επάγει απόκλιση από την κλασσικά αναμενόμενη συμπεριφορά για $T < VPPT (D_{h,pH=5} > D_{h,pH=9})$ και επαναφορά για $T > VPPT (D_{h,pH=9} > D_{h,pH=5})$ ”.

Στο Σχήμα 4.2 αποδίδεται το πιθανό μορφολογικό μοντέλο για το PN_001, βάσει του οποίου ερμηνεύεται η “μη-κανονική” θερμική συμπεριφορά που καταγράφεται στις μετρήσεις DLS. Το δείγμα PN_001 μπορεί να υποθεθεί ότι απαρτίζεται από δύο διακριτές περιοχές: τον πυκνώς διασταυρωμένο πυρήνα και την περιφέρεια που αποτελείται από διακλαδισμένα, ακαθόριστης μορφολογίας και χαμηλού βαθμού διασταυρώσεως τμήματα αλυσίδων (Σχήμα 4.2A). Ως αποτέλεσμα, οι μικροπηκτές απέχουν από την ιδανική μορφολογία μαλακών σφαιρικών σωματιδίων και η υδροδυναμική διάμετρος δεν συμπίπτει με την διάμετρο μίας υποθετικής περιγεγραμμένης σφαίρας. Παράλληλα, κατά την θέρμανση σημειώνεται μείωση του *PDI* και αύξηση του *DCR*, με ενίσχυση του μοτίβου για ελλατούμενο pH (Εικόνα Π4.1, Παράρτημα Κεφαλαίου 4), υποδηλώνοντας ότι οι περιφερειακές αλυσίδες οριοθετούνται περισσότερο σε αυτές τις συνθήκες.



Σχήμα 4.2 Μορφολογικό μοντέλο μικροπηκτών PN001, όπου με γαλάζιο χρώμα αποδίδονται οι αλυσίδες του PNiPAm. Η γκρι διακεκομμένη καμπύλη αναπαριστά τα όρια του πυκνώς διασταυρωμένου πυρήνα, ενώ οι πορτοκαλί διακεκομμένες αναπαριστούν τις ανιχνεύσιμες υποπεριοχές με DLS.

Με βάση την παραπάνω ανάλυση, είναι λογικό να υποθεθεί ότι η κατά τον προσδιορισμό της D_h για $T < VPPT$ με DLS λαμβάνεται υπ' όψιν η συνεισφορά ενός μικρότερου πληθυσμού και ως εκ τούτου η υδροδυναμική διάμετρος στο PN_001 βρίσκεται

φαινομενικά μικρότερη. Με μία συμπληρωματική διατύπωση μπορεί να λεχθεί ότι η καταγραφόμενη D_h συμπίπτει με την διάμετρο ενός υποφλοιού, στην διεπιφάνεια του οποίου το φως σκεδάζεται αρκούτως ισχυρά για την παραγωγή ανιχνεύσιμου σήματος, $I_{scattered}$ (Σχήμα 4.1B). Αυτή η διεργασία αποτυπώνεται υπόρρητα στην κατανομή της σκεδαζόμενης έντασης συναρτήσει του μεγέθους πληθυσμού, I vs D_h . Η μεταβολή της μορφολογίας αυξούσης της θερμοκρασίας, με ακόλουθη την σταδιακή ελάττωση της συνεισφοράς του φαινόμενου πληθυσμού με τις μικρότερες διαστάσεις στην σκεδαζόμενη ακτινοβολία, εκδηλώνεται εναργέστερα σε επόμενα δείγματα (Εικόνες Π4.3-4). Η δοθείσα υπόθεση εργασίας και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων DLS επανεξετάζονται στην Παράγραφο 4.5.

Η εικόνα που παρουσιάζει το PN_002 διαφέρει σημαντικά από το PN_001, υπογραμμίζοντας την μεγάλη ευαισθησία του συστήματος σε αλλαγές της αρχικής συγκέντρωσης NiPAM. Στους 25 °C, η μέση υδροδυναμική διάμετρος του PN_002 βρέθηκε στα 387 nm και 391 nm για pH=9 και pH=7 αντίστοιχα, ενώ σε pH=5 ελαττώθηκε στα 359 nm. Ο PDI παρέμεινε σε πολύ χαμηλό επίπεδο (σε pH=7, $PDI_{T=25^\circ C} = 0.095$ και $PDI_{T=25^\circ C} = 0.079$), καθιστώντας τα δείγματα πρακτικά μονοδιάσπαστα. Από την άλλη πλευρά, το προφίλ θερμικής απόκρισης είναι ενδεικτικό μορφολογικής ανομοιογένειας καθώς αναγνωρίζεται μηχανισμός συρρίκνωσης δύο σταδίων ($VPTT_1 \sim 31$ °C, $VPTT_2 \sim 36$ °C). Σε αυτό το σημείο, το PN_002 εμφανίζει μορφολογική ομοιότητα με το PN_001, πλην όμως μπορεί να υποτεθεί ότι το κέλυφος στερείται της ακαθόριστης, έντονα διακλαδισμένης δομής και χαρακτηρίζεται από διασταυρωμένες αλυσίδες με ακτινικά μειούμενη πυκνότητα σημείων διασύνδεσης από το εσωτερικό προς το εξωτερικό της μικροπηκτής. Σύμφωνα με αυτή την προσέγγιση, επάνω από την $VPTT$ οι ασθενώς διασταυρωμένες αλυσίδες διαθέτουν αρκετά μεγάλη κινητικότητα με αποτέλεσμα να επιδεικνύουν όμοια συμπεριφορά με αυτή ελευθέρων ομοπολυμερών PNiPAM σε διάλυμα και συνεπώς η $VPTT_1$ να συμπίπτει με την αντίστοιχη $LCST$. Αντιστρόφως, τα σημεία διασταύρωσης περιορίζουν την κίνηση των αλυσίδων και η $VPTT_2$ αυξάνεται, γεγονός που συνάδει με βιβλιογραφικές αναφορές [29]. Η άνοδος της $VPTT_2$ έχει επίσης συσχετιστεί με την αύξηση του υδρόφιλου χαρακτήρα όταν υψηλότερο ποσοστό MBA βρίσκεται συμπολυμερισμένο στο δίκτυο [269].

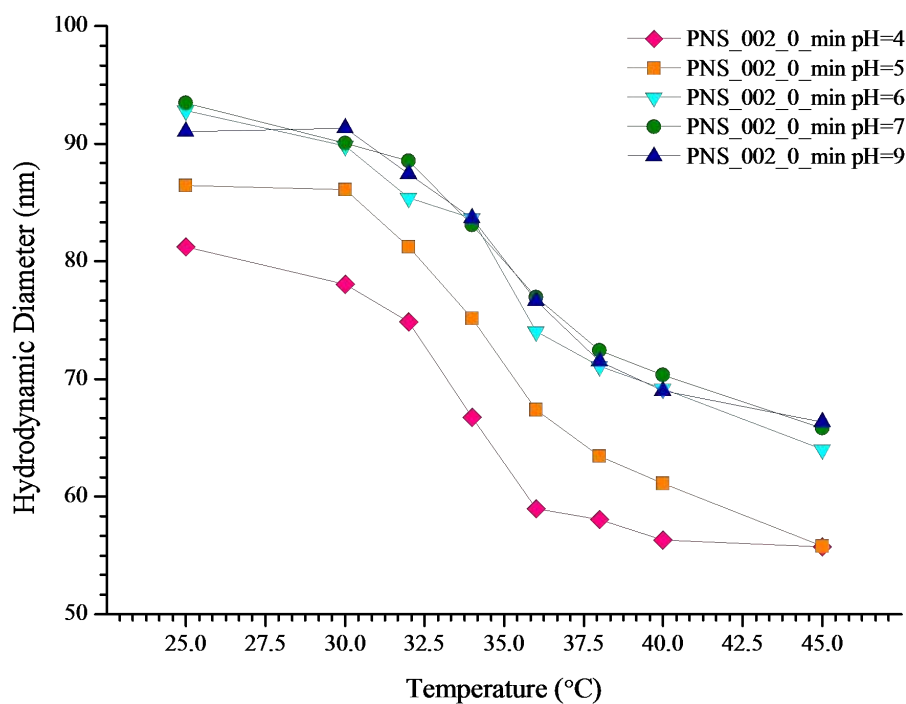
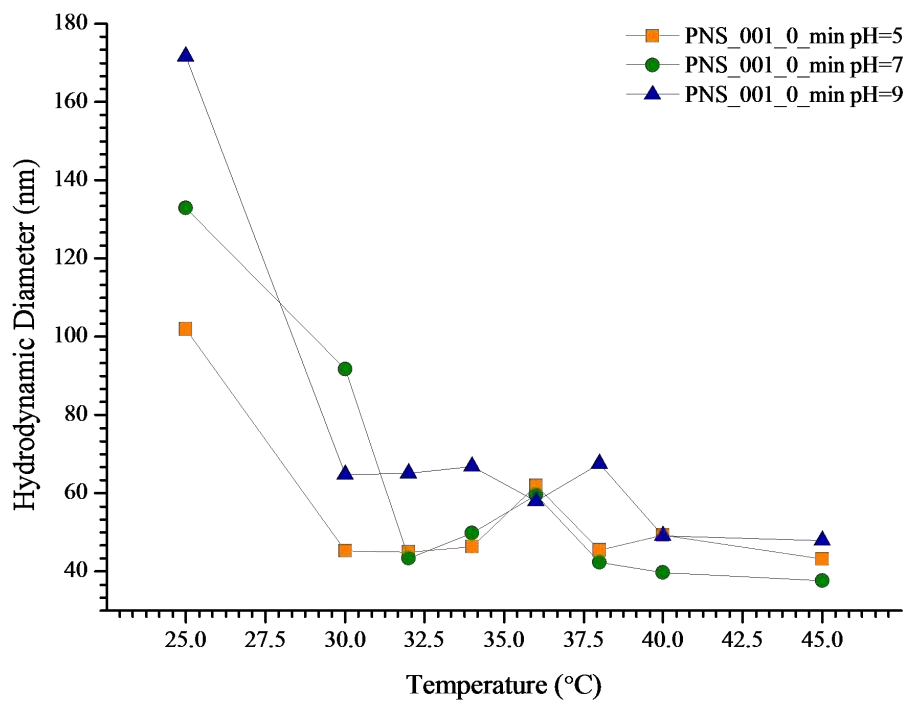
Το μεγαλύτερο μέγεθος του PN_002 σε σχέση με το PN_001 οφείλεται αφενός στην μεγαλύτερη διαθέσιμότητα μονομερών και αφετέρου στην ανάπτυξη μεγαλύτερων δευτερογενών πυρήνων. Κοινό χαρακτηριστικό και των δύο δειγμάτων αποτελεί η ανομοιογενής μορφολογία του δικτύου. Σύμφωνα με την κινητική μελέτη του συστήματος από τους Wu et al. [268], αιτία αποτελεί η γρηγορότερη κατανάλωση του MBA έναντι του NiPAm. Σχετικά πρόσφατα, η ερευνητική ομάδα του Varga [250] επιβεβαίωσε τα ευρήματα των Wu et al. και ανέδειξε ότι ο λόγος δραστηριότητας $[NiPAm]:[MBA]$ ελαττώνεται περαιτέρω, όταν η αντίδραση πολυμερισμού επιβραδύνεται. Με βάση την τελευταία παρατήρηση, η υψηλή πολυδιασπορά μεγεθών και μορφολογική ανομοιογένεια του PN_001

μπορεί να αποδοθεί στην μεγαλύτερη ελάττωση της ταχύτητας πολυμερισμού εξαιτίας της υποδιπλάσιας συγκέντρωσης μονομερούς συγκριτικά με το PN_002, όπου το αντίστοιχο αποτέλεσμα οφείλεται στην χαμηλότερη θερμοκρασία της αντίδρασης.

Η συμμετοχή του SA στην αντίδραση πολυμερισμού χωρίς καθυστέρηση στην προσθήκη επέφερε την θεαματική διαφοροποίηση των παραμέτρων αριστοποίησης στα δείγματα PNS_001_0_min και PNS_002_0_min (Εικόνα 4.3), συγκριτικά με τα δείγματα όπου το SA απουσίαζε, όπως φαίνεται από την μορφή των γραφημάτων D_h vs T για διαφορετικές τιμές του pH. Η θερμική απόκριση του PN_001_0_min χαρακτηρίζεται από την απότομη μετάπτωση του μεγέθους για $T \sim 30$ °C και είναι συναφής με το προφίλ του PN_002. Αντιθέτως, το μέγεθος και η πολυδιασπορά αποκλίνουν σημαντικά, αντανακλώντας την παρουσία διαφορετικού μηχανισμού πυρήνωσης και ανάπτυξης κατά τον πολυμερισμό. Συγκεκριμένα, το PN001_0_min επέδειξε πολύ μικρό μέγεθος στην συρρικνωμένη κατάσταση σε σχέση με τα μελετούμενα δείγματα ($D_{h,T=45^\circ C} = 38$ nm), ενώ παράλληλα ο *PDI* βρέθηκε αρκετά υψηλός ανεξαρτήτως του pH. Η πολυδιασπορά είναι παρεπόμενο της ανομοιογενούς πυρήνωσης, η οποία μπορεί να αποδοθεί στον συνδυασμό χαμηλής συγκέντρωσης πρωτογενών μακροριζών και συμπολυμερισμού φορτισμένων ανιοντικών ομάδων εξαρχής. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, υφίσταται σημαντική αύξηση της υδροφιλικότητας των αναπτυσσόμενων αλυσίδων και απαιτείται η παρέλευση μεγαλύτερου χρόνου, έως ότου πολυμεριστεί ένας κρίσιμος αριθμός δομικών μονάδων NiPAm, για την κατάρρευση και συσσωμάτωση τους. Δεδομένου ότι αυτή η διαδικασία δεν είναι ελεγχόμενη, οι πρωτογενείς πυρήνες χαρακτηρίζονται από αυξημένη ανομοιογένεια μεγεθών.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η μορφολογία του PN001_0_min πιθανώς μοιράζεται κοινά χαρακτηριστικά με το PN_002 όσον αφορά την ύπαρξη δύο διακριτών περιοχών με διαφορετική φυσικοχημική συμπεριφορά. Με βάση αυτή την εικόνα, οι περιφερικές αλυσίδες θεωρείται ότι αποτελούνται κυρίως από μονομερικά στοιχεία NiPAm, γεγονός το οποίο συνεπάγεται ότι είτε ένα σημαντικό κλάσμα SA έχει συμμετάσχει στον σχηματισμό ολιγομερικών παραπροϊόντων τα οποία απομακρύνθηκαν στο στάδιο του καθαρισμού ή ότι το SA έχει ενσωματωθεί στον πυρήνα του δικτύου. Η δεύτερη εκδοχή κρίνεται πιθανότερη, καθώς το πολύ μικρό μέγεθος στην συρρικνωμένη κατάσταση συνηγορεί στην συμμετοχή του SA στην αντίδραση σε μεγάλο ποσοστό. Επιπρόσθετα, το πλατώ της D_h vs T ενδεχομένως οφείλεται σε παρεμπόδιση της κατάρρευσης του δικτύου εξαιτίας των ισχυρών ηλεκτροστατικών απώσεων, οι οποίες ασκούνται μεταξύ φορτισμένων καρβοξυλικών ομάδων σε μεγάλη εγγύτητα, λόγω της ενσωμάτωσής τους στο πολυμερικό δίκτυο σε αρχικό στάδιο.

Αν και συμπολυμερισμός του SA με το NiPAm υπήρξε η μοναδική συνθετική διαφοροποίηση ανάμεσα στα δείγματα PN_002 και PNS_002_0_min, η ευεργετική



Εικόνα 4.3 Θερμοκρασιακή απόκριση μικροπηκτών *P(NiPAM-co-SA)* για εισαγωγή SA εξαρχής και αρχική συγκέντρωση NiPAM 10 mM (A) και 20 mM (B) σε pH = 5, 7, 9.

επίδραση του φορτισμένου μονομερούς στις παραμέτρους αριστοποίησης των μικροπηκτών είναι εντυπωσιακή. Το συνθετικό πρωτόκολο παρασκευής του PNS_002_0_min επέφερε τον

εξαιρετικά αποτελεσματικό έλεγχο του μεγέθους και την συγκράτηση του *PDI* σε χαμηλά επίπεδα. Η παρασκευή κολλοειδών με διαστάσεις κάτω από 100 nm μέσω πολυμερισμού κατακρήμνισης αναφέρεται σπάνια στην βιβλιογραφία και συγκεκριμένα δεν έχει υποπέσει στην αντίληψη του συγγραφέα κάποια περίπτωση όπου η δεδομένη κλίμακα μεγέθους προσεγγίζεται χωρίς την χρήση υψηλής συγκέντρωσης τασιενεργού [278]. Επιπλέον, το δείγμα PNS002_0_min επιδεικνύει αξιοσημείωτη απόκριση στο pH καθώς ο λόγος διόγκωσης βρίσκεται ίσος με $\alpha_{T=35^{\circ}\text{C}} = (V_{\text{pH}=4} / V_{\text{pH}=9})^3 = 2.22$.

Η ερμηνεία για την εικόνα που παρουσιάζει το PNS_002_0_min βασίζεται στην σταθεροποιητική δράση που επάγουν τα κατάλοιπα του SA, μέσω ενός διττού μηχανισμού στερεοχημικής και ηλεκτροστατικής σταθεροποίησης. Η “ψευδο-τασιενεργός” δράση του SA περιγράφεται αναλυτικότερα στην Παράγραφο 4.5. Ένα ακόμα ποιοτικό χαρακτηριστικό του PNS002_0_min, ενδεικτικό της ομοιογενούς κατανομής τόσο του SA όσο και του MBA, αποτελεί το γεγονός ότι ενώ η *VPTT* αυξάνεται από 33.5 °C σε pH=4, στους 35.4 °C σε pH=9 (Εικόνα Π4.4), ο *PDI*_{T=25°C} παραμένει πρακτικά αμετάβλητος, από 0.163 σε 0.173. Πρακτικά, η πολυδιασπορά του PNS_002_0_min οφείλεται αποκλειστικά σε ανομοιογένεια των υδροδυναμικών διαστάσεων και όχι σε ανομοιογένεια κατανομής φορτίου ή πυκνότητας σταυροδεσμών. Περαιτέρω επιβεβαίωση σχετικά με την ομοιογένεια της μικροπηκτής, προσδίδουν η μονότονη συμπεριφορά της καμπύλης D_h vs T και η βαθμιαία μετάβαση του προφίλ θερμικής απόκρισης από σιγμοειδές σε γραμμικό αυξανόμενου του pH, καθώς $\partial D_h / \partial T|_{\text{pH}=4} = -4.33 \text{ nm.K}^{-1}$ και $\partial D_h / \partial T|_{\text{pH}=7} = -3.32 \text{ nm.K}^{-1}$ (Εικόνα Π4.4 ένθεση). Παρεμφερή προφίλ έχουν αναφερθεί για το σύστημα P(NiPAm-co-AAc) [279, 281] και για μικροπηκτές PNiPAM με αυξημένη πυκνότητα σταυροδεσμών [29]. Ενώ στην δεύτερη περίπτωση το προφίλ καθορίζεται από το θερμοκρασιακό εύρος εντός του οποίου τα τμήματα των αλυσίδων μεταξύ των σημείων διασύνδεσης λαμβάνουν διαμορφώσεις ισορροπίας (εξαιτίας της συνεχούς κατανομής μοριακών βαρών και συνεπώς των διαφορετικών LCST [297]), στο εξεταζόμενο σύστημα είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τον βαθμό ιονισμού των καταλοίπων SA. Επίσης, η τιμή της *VPTT* του PNS002_0_min σε pH=9 καταδεικνύει ποσοτικά το μέτρο της αναμενόμενης αύξησης σε σχέση με την *LCST* του PNiPAm, για την στοιχειομετρική αναλογία [NiPAm]:[SA] = 10:1.

Τα δείγματα όπου το SA εισήχθη 5 min μετά την έναρξη της αντίδρασης (Εικόνα 4.3) επέδειξαν αξιοσημείωτα ασυνήθιστη θερμική αποκρισσιμότητα. Το PNS_002_5_min σε pH=7 χαρακτηρίζεται από $D_h = 100 \text{ nm}$, *PDI* = 0.259 σε T=25 °C και $D_h = 98 \text{ nm}$, *PDI* = 0.144 σε T=45 °C, με ενδιάμεση ελάχιστη τιμή $D_h = 91 \text{ nm}$ και *PDI* = 0.225 στους 34 °C. Το μοτίβο καθίσταται πιο χαρακτηριστικό σε pH=4, όπου στους 25 °C βρέθηκε $D_h = 89 \text{ nm}$, *PDI* = 0.259, στους 45 °C $D_h = 85 \text{ nm}$, *PDI* = 0.113 και ενδιάμεσως στους 36 °C, $D_h = 76 \text{ nm}$ και *PDI* = 0.125. Για να αποκλειστεί ενδεχόμενο κατά το οποίο η ασυνήθιστη συμπεριφορά οφείλεται σε πλασματικό εύρημα (artefact), διενεργήθηκαν συμπληρωματικές μετρήσεις σε

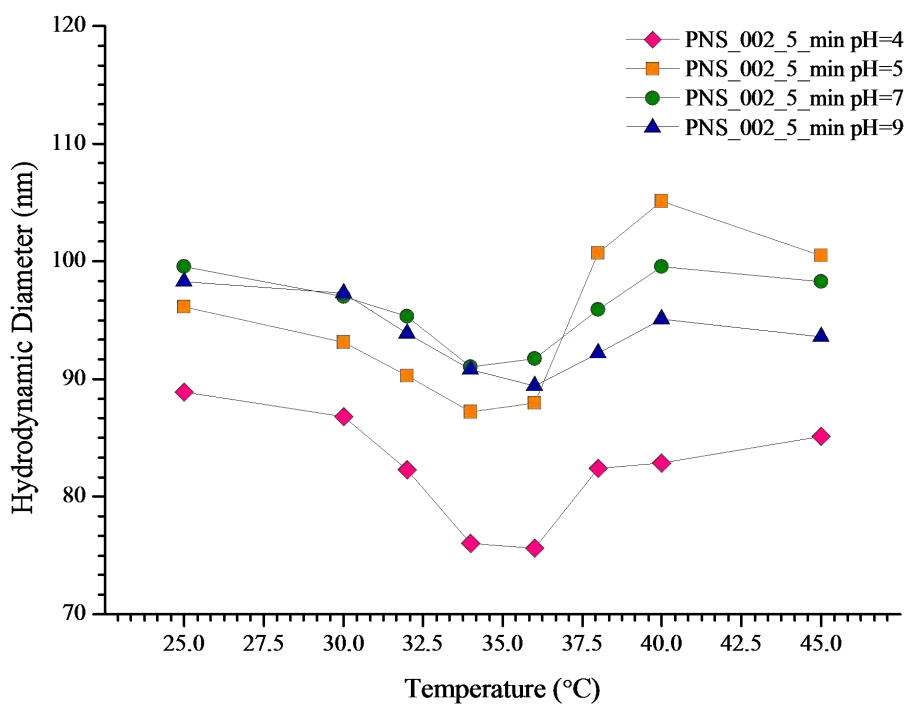
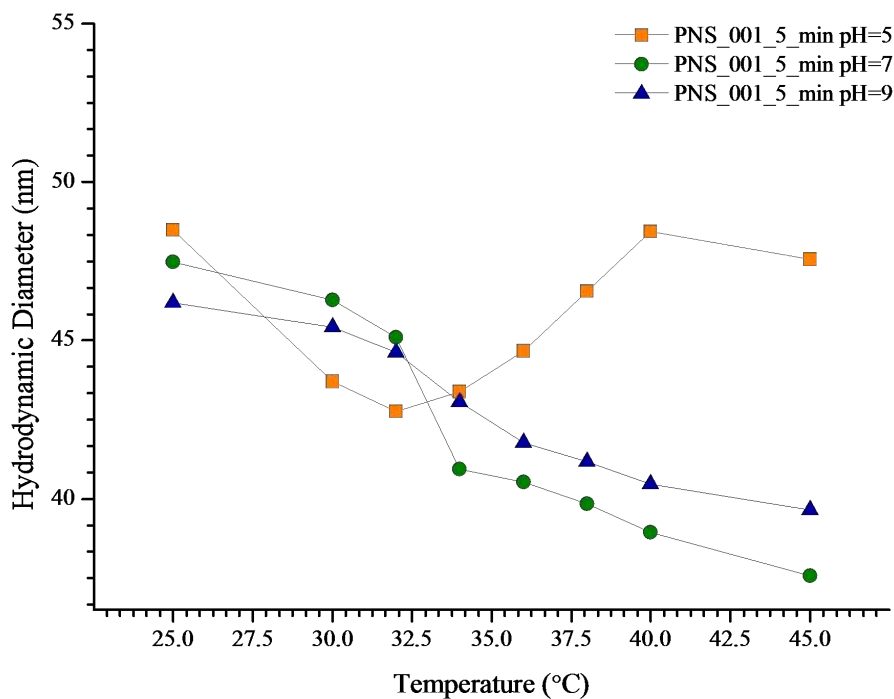
μικρότερη συγκέντρωση για την εξάλειψη πιθανής αλληλεπίδρασης μεταξύ των μικροπηκτών. Οι μετρήσεις βρέθηκαν επαναλήψιμες για διπλάσια αραίωση (0.1 % κ.β.), απ' όπου επιβεβαιώνεται ότι το σύστημα επιδεικνύει διττή *LCST* και *UCST* συμπεριφορά. Στα πλαίσια της παρούσας βιβλιογραφικής ανασκόπησης δεν βρέθηκε σύστημα μικροπηκτών P(NiPAm-co-AAc) το οποίο επιδεικνύει παρόμοια συμπεριφορά. Η φαινομενολογικά πληρέστερα ομοιότερη περίπτωση αφορά *core/shell* μικροπηκτές οι οποίες παρασκευάστηκαν με συνδυασμό πολυμερισμού γαλακτώματος για τον πυρήνα και *seeded* πολυμερισμού κατακρήμνισης για το κέλυφος [298]. Ο πυρήνας των μικροπηκτών συνίστατο από ηλεκτροστατικό σύμπλοκο δικτυομένης πολυ(2-βινυλοπυριδίνης) στην πρωτονιωμένη της μορφή με την χρωμοφόρα 2,6-δισουλφονικό ναφθαλένιο στην κατάσταση του άλατος νατρίου (P2VPH⁺/SO₃⁻²NDS) και το κέλυφος από δικτυομένο ομοπολυμερές PNiPAM. Οι συγγραφείς απέδωσαν την *UCST* συμπεριφορά στην ηλεκτροστατική αποσύμπλεξη του πυρήνα στο θερμοκρασιακό εύρος 20 - 38 °C και την *LCST* σε συρρίκνωση του κελύφους από τους 38 °C έως τους 55 °C. Οι δύο μεταβάσεις συνοδεύονταν από μεταβολή της σκεδαζόμενης έντασης, η οποία ακολούθησε ένα κατοπτρικά αντίθετο μοτίβο σε σχέση με την μεταβολή των υδροδυναμικών διαστάσεων.

Στην περίπτωση του PNS_002_5_min, το μέτρο της σκεδαζόμενης έντασης, *DCR*, είναι αύξουσα συνάρτηση της θερμοκρασίας στο εξεταζόμενο εύρος, παρά την *UCST* μετάβαση ($DCR_{T=25\text{ }^{\circ}\text{C}} = 12464 \text{ kcps}$, $A = 7$ και $DCR_{T=45\text{ }^{\circ}\text{C}} = 108951 \text{ kcps}$, $A = 6$)⁴. Συνεπώς στο μοτίβο *DCR vs T* αντικατοπτρίζεται μονομερώς η διεργασία αναδίπλωσης των αλυσίδων PNiPAM στο κέλυφος των μικροπηκτών, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η *LCST/UCST* συμπεριφορά είναι απόρροια μίας διεργασίας στο *εσωτερικό* του δικτύου. Παράλληλα, η ανάδειξη του φαινομένου για pH=4 σε συνδυασμό με τον εντονότερο *UCST* χαρακτήρα σε pH=5, παρείχε ισχυρές ενδείξεις σχετικά με την συνεισφορά δευτερογενών αλληλεπιδράσεων στην εμφάνιση του φαινομένου. Αναδιατάσσοντας την εξίσωση Henderson-Hasselbalch [295], ο βαθμός ιονισμού των καταλοίπων του SA δίνεται από την σχέση:

$$i = \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}}$$

απ' όπου θεωρώντας ότι η pK_a είναι ίση με 4.2 [299], βρίσκεται ότι $i=0.39$ σε pH=4 και $i=0.86$ σε pH=5. Αν και το ποσοστό $[\text{COO}^-]:[\text{COOH}] = 39\%$ κρίνεται αρκετά ακριβές για την πρώτη περίπτωση, δεν μπορεί να υποτεθεί το ίδιο για την τιμή του 86% σε pH = 5, αν

⁴ Το σύμβολο *A* χρησιμοποιείται για την κλίμακα του attenuator (αποσβέστης, εξασθενητής) στο Zetasizer, σύμφωνα με την οποία ρυθμίζεται το ποσό της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στον ανιχνευτή: όσο μικρότερη η τιμή του *A*, τόσο λιγότερο φως διέρχεται.

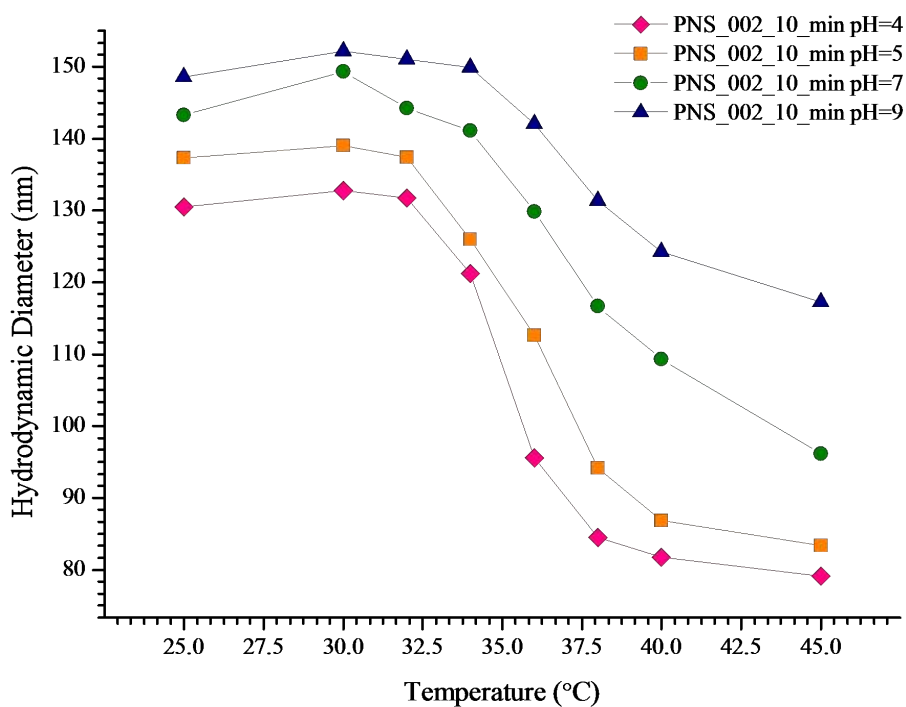
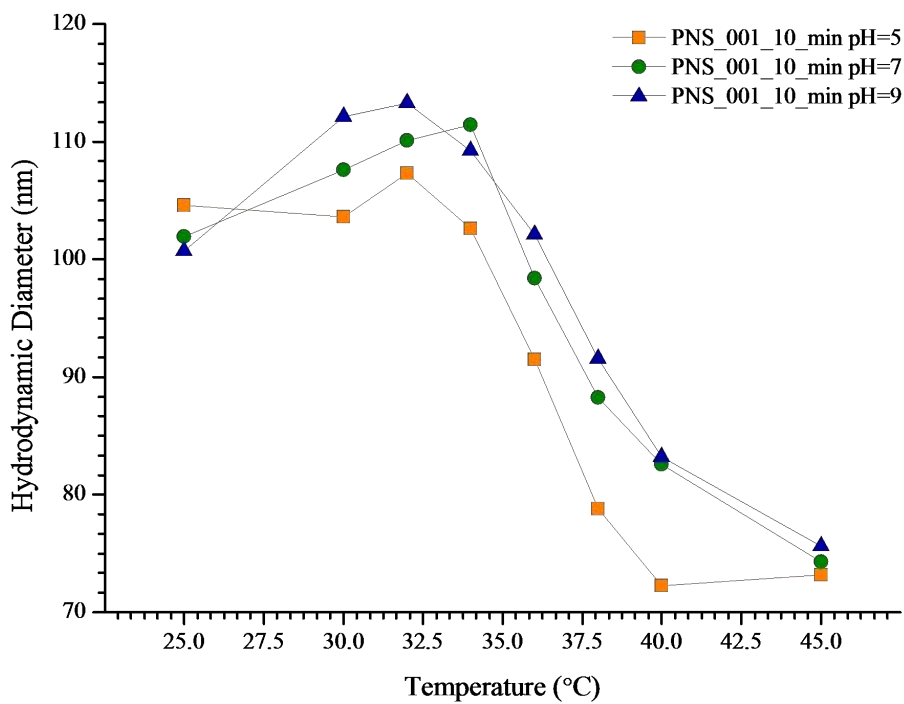


Εικόνα 4.4 Θερμοκρασιακή απόκριση μικροπηκτών *P(NiPAm-co-SA)* για εισαγωγή SA 5 min μετά την έναρξη και αρχική συγκέντρωση NiPAM 10 mM (A) και 20 mM (B) σε pH = 5, 7, 9.

ληφθεί υπόψιν η θέση των καρβοξυλικών ομάδων στο εσωτερικό του δικτύου και η συνακόλουθη συμβολή του πολυηλεκτρολυτικού φαινομένου στην πραγματική pK_a . Η pK_a ενός πολυηλεκτρολύτη είναι συνάρτηση του βαθμού ιονισμού, διότι όσο αυξάνεται η

συγκέντρωση των δισταμένων μονομερικών στοιχείων, τόσο περισσότερο παρεμποδίζεται η διάσταση των υπολοίπων όξινων θέσεων. Ως αποτέλεσμα, έχει αναφερθεί αύξηση της pK_a του PAAc εως και δύο μονάδες [296, 300], άρα για το PNS_002_5_min ισχύει ότι $i < 0.86$ σε pH=5. Στο δεδομένο ποσοστό ιονισμού ευνοείται η ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου μεταξύ ουδέτερων -COOH και φορτισμένων -COO⁻ δομικών μονάδων του PAAc [301] αλλά και μεταξύ των -COOH του PAAc και των αμιδικών -CONH του PNiPAm [300, 302, 303]. Για την ερμηνεία της ταυτόχρονης LCST/UCST εικόνας μπορεί πρώτα να υποθεθεί ασφαλώς ότι το SA εισάγεται σε μία στιγμή όπου η δευτερογενής πυρήνωση δεν έχει ολοκληρωθεί καθώς το μέγεθος των μικροπηκτών PNS_001_5_min και PNS_002_5_min συγκρατείται χαμηλά. Από την άλλη πλευρά, η πλήρης κατανάλωση του SA ενδεχομένως να πραγματοποιείται πριν από την συνολική εισαγωγή του NiPAm στο δίκτυο, γεγονός το οποίο θα επέφερε τον σχηματισμό ενός υποφλοιού εμπλουτισμένου με ομάδες -COOH, ο οποίος οριοθετείται εκατέρωθεν από περιοχές με δικτυωμένο ομοπολυμερές PNiPAm. Η LCST συμπεριφορά φαίνεται να κυριαρχεί εως τους ~34 °C, όμως η λύση των δεσμών-H αυξούσης της T προκαλεί την ανάστροφη UCST συμπεριφορά. Το φαινόμενο δεν εμφανίζεται πάνω από ουδέτερο pH στο PNS_001_5_min πιθανώς λόγω του πολύ μικρού μεγέθους, του υψηλού PDI και της ανομοιογενούς μορφολογίας σε σχέση με το PNS_002_5_min. Σε κάθε περίπτωση, τα PNS_001_5_min αποτέλεσαν τα μικρότερα παρασκευασθέντα σωματίδια, τονίζοντας την δυνατότητα επέμβασης στο στάδιο της πυρήνωσης όταν το SA εισάγεται σε δεύτερο χρόνο.

Τα δείγματα PNS_001_10_min και PNS_002_10_min χαρακτηρίζονται από έλεγχο των παραμέτρων αριστοποίησης και σηματοδότησαν την ομαλοποίηση της θερμικής συμπεριφοράς. Σε σύνδεση με το πειραματικό πρωτόκολο, γίνεται εμφανές ότι υφίσταται ένα κατώτατο χρονικό όριο, t_{cr} , πάνω από το οποίο έχει ολοκληρωθεί το στάδιο πρωταρχικού σχηματισμού πυρήνων από ομοπολυμερές PNiPAM και η προσθήκη του SA επιδρά επάνω στον μηχανισμό δευτερογενούς πυρήνωσης. Για τις δεδομένες συγκεντρώσεις το t_{cr} οριοθετείται εντός των 5-10 πρώτων λεπτών από την έναρξη του πολυμερισμού. Όπως θα γίνει σαφές στην συνέχεια, ο προσδιορισμός του t_{cr} στάθηκε κρίσιμος στην αριστοποίηση της απόδοσης της αντίδρασης. Όσον αφορά το μέγεθος, παρατηρείται συγκράτηση σε πολύ χαμηλές τιμές και στα δύο δείγματα, ενώ το PNS_002_10_min επέδειξε επιπλέον πολύ καλή pH-αποκρισιμότητα, με λόγο διόγκωσης κοντά στην φυσιολογική θερμοκρασία $\alpha_{T=36^\circ C} = (V_{pH=4} / V_{pH=9})^3 = 3.26$. Από την άλλη πλευρά ο PDI βρέθηκε σχετικά υψηλός για το PNS_001_10_min, υποδηλώνοντας ένα trade-off μεταξύ ρύθμισης του μεγέθους και ελαχιστοποίησης του PDI. Την ίδια στιγμή οι VPITs εμφανίζονται αρκούντως



Εικόνα 4.5 Θερμοκρασιακή απόκριση μικροπηκτών $P(NiPAm-co-SA)$ για εισαγωγή SA 10 min μετά την έναρξη και αρχική συγκέντρωση NiPAM 10 mM (A) και 20 mM (B) σε pH = 5, 7, 9.

μετατοπισμένες προς τους 36.7 °C, ενώ η ύστερη προσθήκη του φορτισμένου μονομερούς 10 min μετά την έναρξη ικανοποιεί την απαίτηση για επιφανειακή δραστηριότητα. Αξίζει να

σημειωθεί ότι η φαινομενική ελάττωση της D_h κάτω από την $VPTT$ χαρακτηρίζει το PNS_001_10_min σε πολύ μικρότερο βαθμό σε σχέση με το PN_001, αντανακλώντας την πυκνότερη και ομοιογενέστερη διασταύρωση του κέλυφους.

Το σύνολο των υπολοίπων δειγμάτων (χρόνος εισαγωγής SA: 15 - 20 - 25 - 30 min) επιδεικνύει παρόμοια θερμική συμπεριφορά και συνεπώς εμπίπτει στο ίδιο μορφολογικό μοντέλο. Σε συμφωνία με τα ευρήματα για χρόνο προσθήκης ίσο με 10 min, αποδεικνύεται ότι το ιοντισμένο μονομερές επιφέρει έλεγχο του μεγέθους, επιδρώντας σταθεροποιητικά στο στάδιο της δευτερογενούς πυρήνωσης. Η μικρή και αρνητική μεταβολή του μεγέθους μεταξύ των PNS_001_30_min/PNS_001_25_min και PNS_001_30_min/PNS_001_25_min υποδεικνύει ότι στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες η συμβολή του SA στον έλεγχο του μεγέθους υποβαθμίζεται στο χρονικό διαστημα μεταξύ 25 - 30 min. Κυρίως όμως, το παρατηρούμενο μοτίβο μεταβολής του μεγέθους για διαφορετικούς χρόνους προσθήκης εδραιώνει τον “ψευδοτασιενεργό” ρόλο του SA στον πολυμερισμό κατακρήμνισης του NiPAm. Στους Πίνακες 4.4-6 συγκεντρώνονται οι τιμές των παραμέτρων αριστοποίησης για χρόνους προσθήκης SA 10 - 30 min.

Πίνακας 4.4 Χαρακτηριστικά μικροπηκτών $P(NiPAm-co-SA)$ για εισαγωγή SA 15 - 20 - 25 - 30 min μετά την έναρξη του πολυμερισμού σε $pH = 5$. Σε παρένθεση περιλαμβάνονται οι τιμές του PDI .

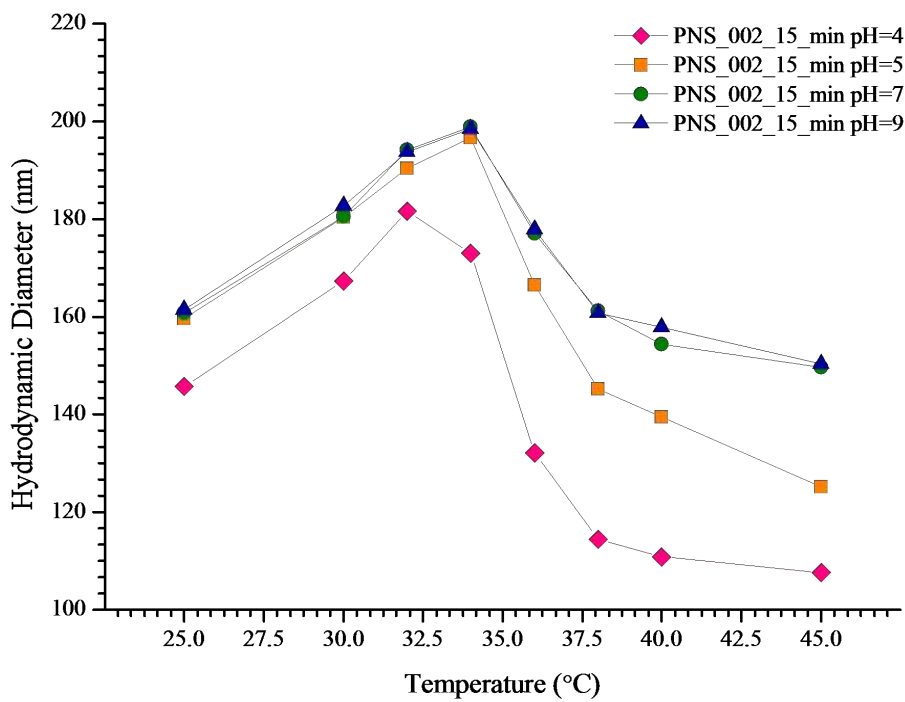
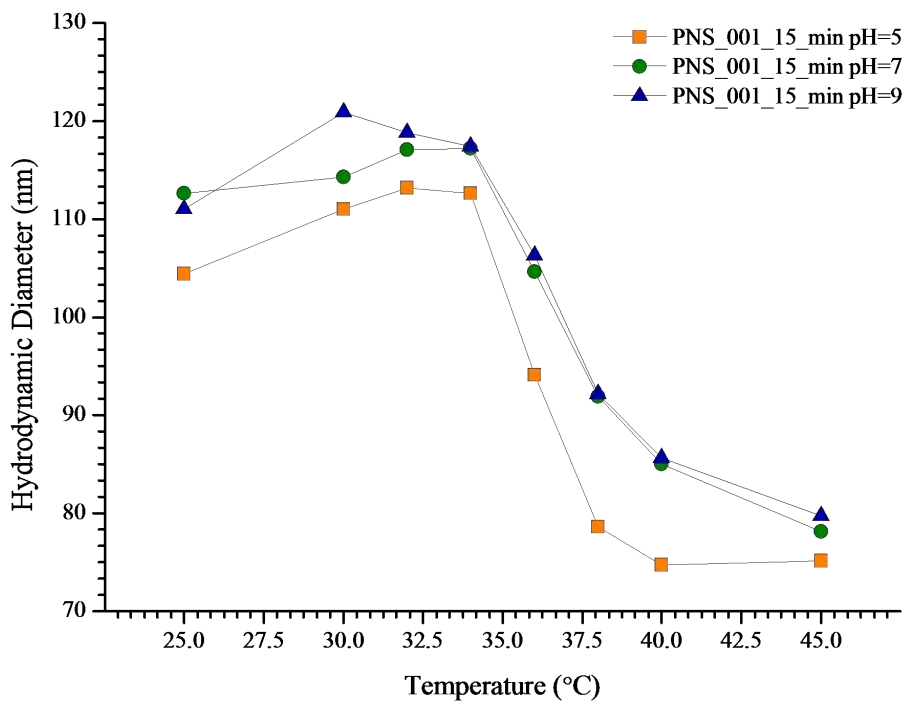
pH = 5		$D_{h,Swollen} (nm)$	$D_{h,Collapsed} (nm)$	VPTT (°C)	$a_T (nm^3/nm^3)$
	PNS_001_10'	107 (0.32)	73 (0.193)	36.4	3.15
	PNS_001_15'	113 (0.332)	75 (0.188)	36	3.42
	PNS_001_20'	171 (0.314)	91 (0.148)	36	6.63
	PNS_001_25'	167 (0.286)	99 (0.175)	36.2	4.80
	PNS_001_30'	160 (0.311)	96 (0.188)	37.1	4.62
	PNS_002_10'	139 (0.296)	84 (0.172)	36.1	4.53
	PNS_002_15'	197 (0.228)	125 (0.166)	36.6	3.91
	PNS_002_20'	225 (0.198)	147 (0.087)	35.4	3.59
	PNS_002_25'	266 (0.207)	161 (0.082)	36.9	4.51
PNS_002_30'	252 (0.219)	159 (0.118)	35.6	3.98	

Πίνακας 4.5 Χαρακτηριστικά μικροπηκτών *P(NiPAm-co-SA)* για εισαγωγή SA 15 - 20 - 25 - 30 min μετά την έναρξη του πολυμερισμού σε pH = 7. Σε παρένθεση περιλαμβάνονται οι τιμές του PDI.

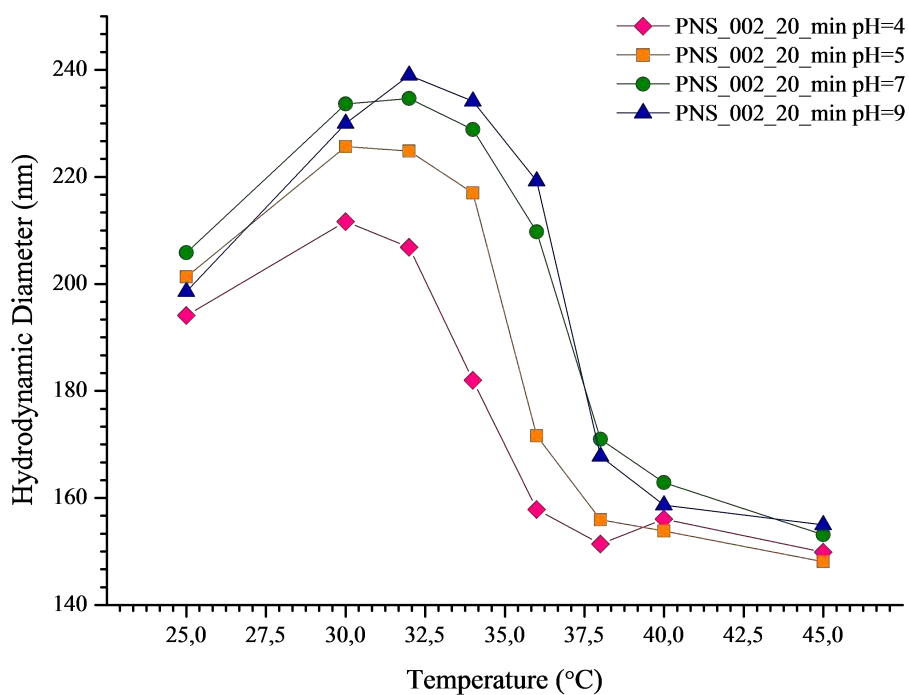
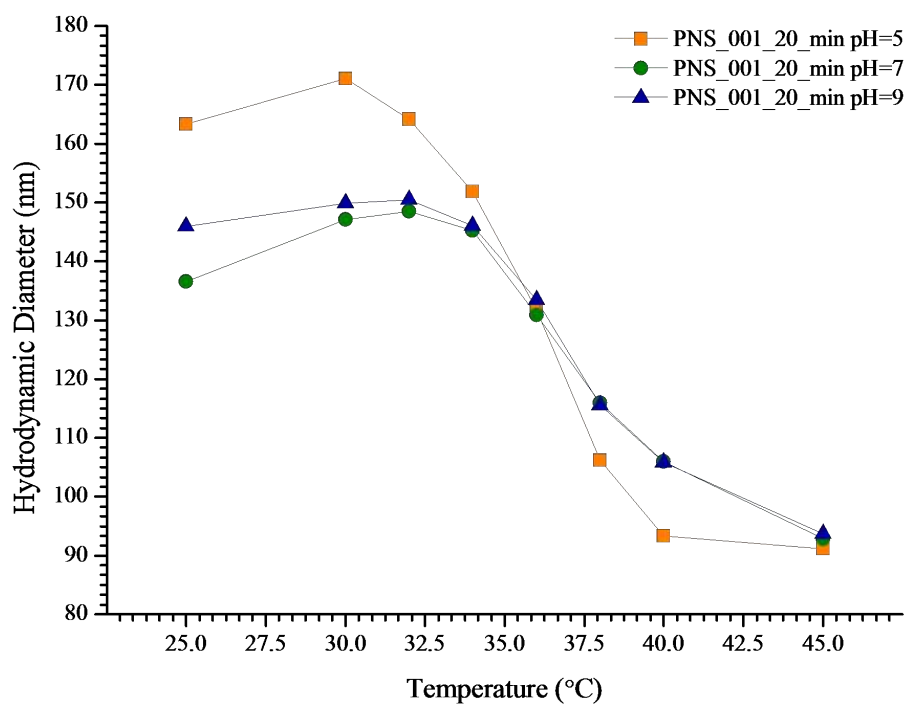
pH = 7		<i>D_{h,Swollen}</i> (nm)	<i>D_{h,Collapsed}</i> (nm)	VPTT (°C)	<i>a_T</i> (nm ³ /nm ³)
	PNS_001_10'	111 (0.319)	74 (0.208)	37	3.38
	PNS_001_15'	117 (0.328)	78 (0.181)	37	3.37
	PNS_001_20'	146 (0.315)	94 (0.160)	37.3	3.75
	PNS_001_25'	172 (0.326)	103 (0.181)	36.2	4.66
	PNS_001_30'	161 (0.284)	105 (0.175)	37.9	3.60
	PNS_002_10'	149 (0.273)	96 (0.172)	37.2	3.74
	PNS_002_15'	198 (0.215)	150 (0.15)	36.4	2.30
	PNS_002_20'	234 (0.187)	154 (0.098)	36.8	3.51
	PNS_002_25'	266 (0.174)	183 (0.069)	36.7	3.07
	PNS_002_30'	246 (0.254)	175 (0.089)	35.7	2.78

Πίνακας 4.6 Χαρακτηριστικά μικροπηκτών *P(NiPAm-co-SA)* για εισαγωγή SA 15 - 20 - 25 - 30 min μετά την έναρξη του πολυμερισμού σε pH = 9. Σε παρένθεση περιλαμβάνονται οι τιμές του PDI.

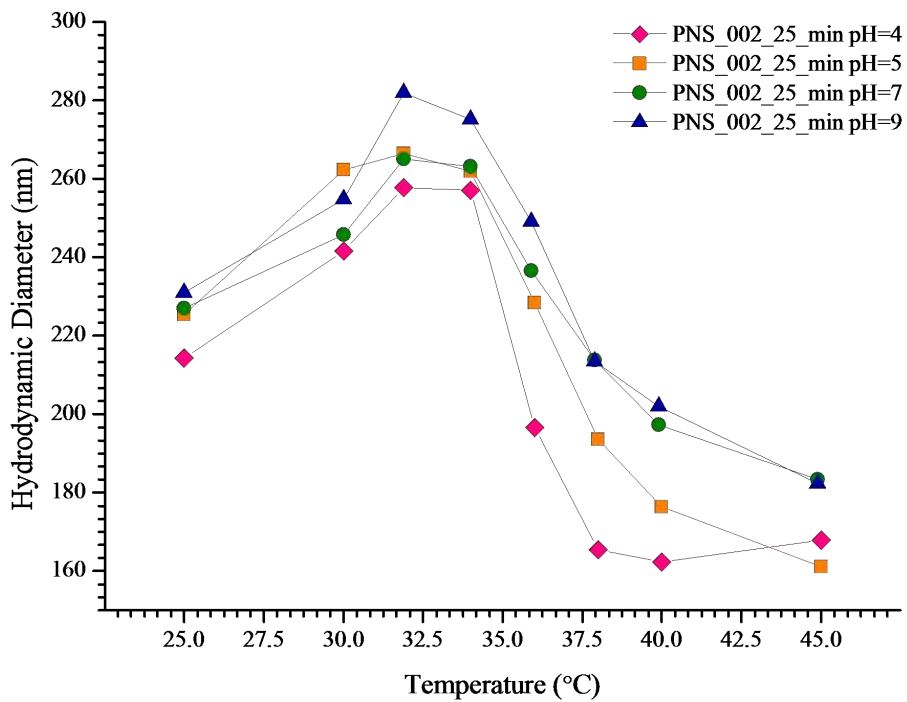
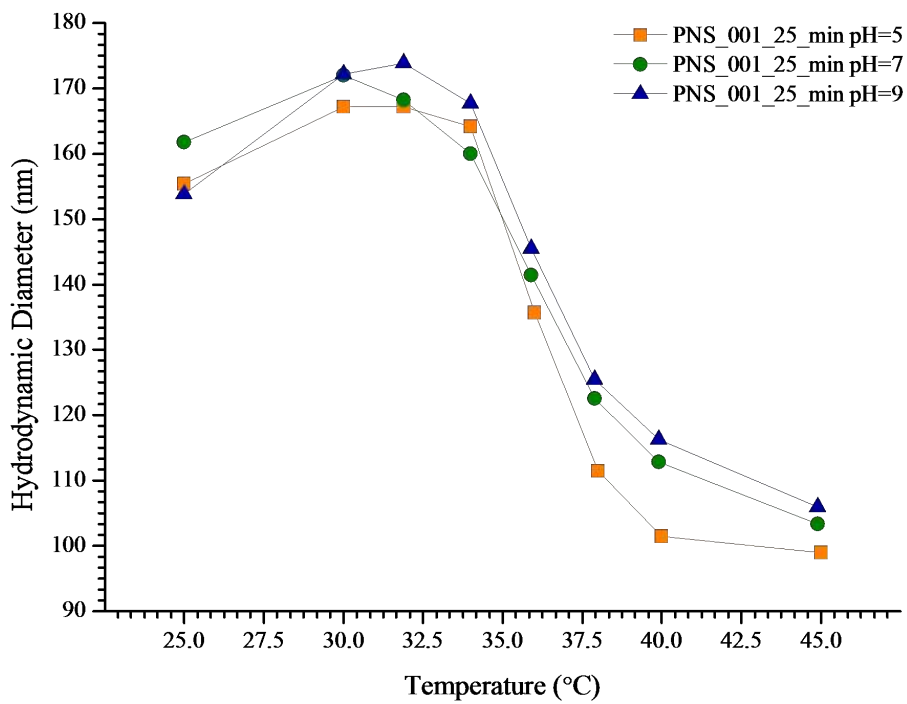
pH = 9		<i>D_{h,Swollen}</i> (nm)	<i>D_{h,Collapsed}</i> (nm)	VPTT (°C)	<i>a_T</i> (nm ³ /nm ³)
	PNS_001_10'	113 (0.337)	76 (0.197)	37.5	3.29
	PNS_001_15'	121 (0.353)	80 (0.188)	36.9	3.46
	PNS_001_20'	147 (0.316)	93 (0.162)	37.4	3.94
	PNS_001_25'	174 (0.260)	106 (0.142)	36.4	4.42
	PNS_001_30'	161 (0.290)	103 (0.139)	37.3	3.82
	PNS_002_10'	152 (0.281)	117 (0.171)	37.5	2.19
	PNS_002_15'	199 (0.218)	150 (0.132)	36.4	2.30
	PNS_002_20'	239 (0.192)	155 (0.094)	36.0	3.67
	PNS_002_25'	282 (0.291)	182 (0.082)	36.8	3.72
	PNS_002_30'	244 (0.190)	172 (0.097)	35.9	2.85



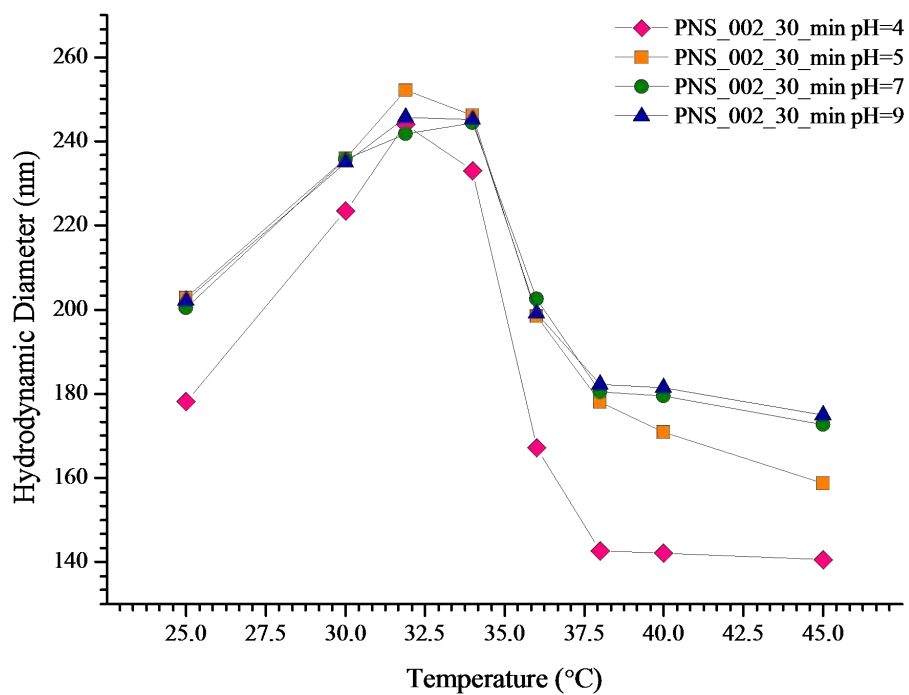
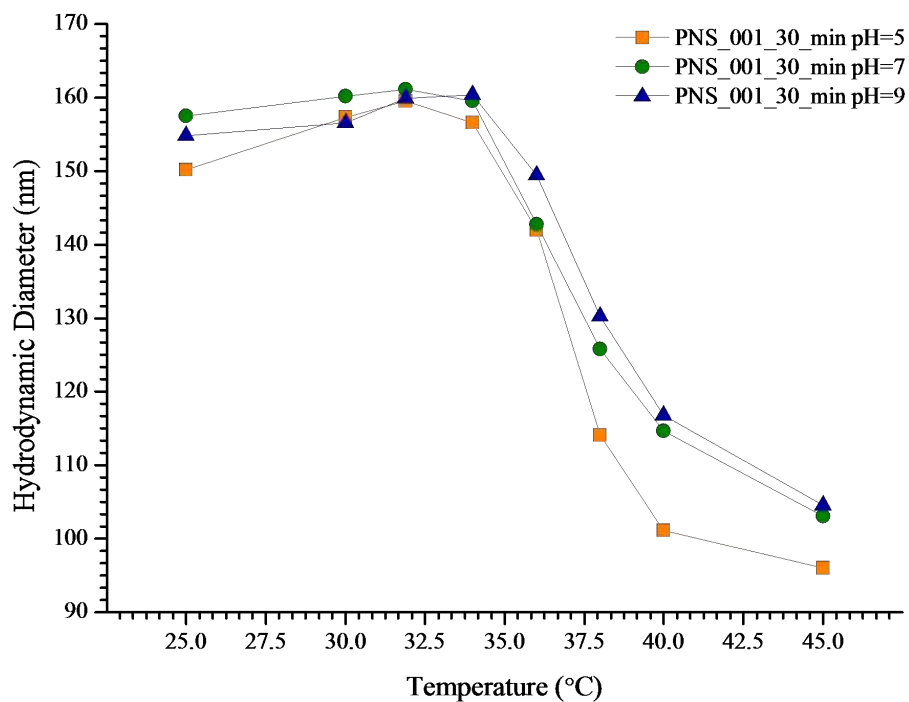
Εικόνα 4.6 Θερμοκρασιακή απόκριση μικροηλεκτρικών $P(NiPAm-co-SA)$ για εισαγωγή SA 15 min μετά την έναρξη και αρχική συγκέντρωση NiPAM 10 mM (A) και 20 mM (B) σε pH = 5, 7, 9.



Εικόνα 4.7 Θερμοκρασιακή απόκριση μικροπηκτών $P(NiPAm-co-SA)$ για εισαγωγή SA 20 min μετά την έναρξη και αρχική συγκέντρωση NiPAM 10 mM (A) και 20 mM (B) σε pH = 5, 7, 9.



Εικόνα 4.8 Θερμοκρασιακή απόκριση μικροπηκτών $P(\text{NiPAm-co-SA})$ για εισαγωγή SA 25 min μετά την έναρξη και αρχική συγκέντρωση NiPAM 10 mM (A) και 20 mM (B) σε pH = 5, 7, 9.



Εικόνα 4.9 Θερμοκρασιακή απόκριση μικροπηκτών $P(NiPAm-co-SA)$ για εισαγωγή SA 30 min μετά την έναρξη και αρχική συγκέντρωση NiPAM 10 mM (A) και 20 mM (B) σε pH = 5, 7, 9.

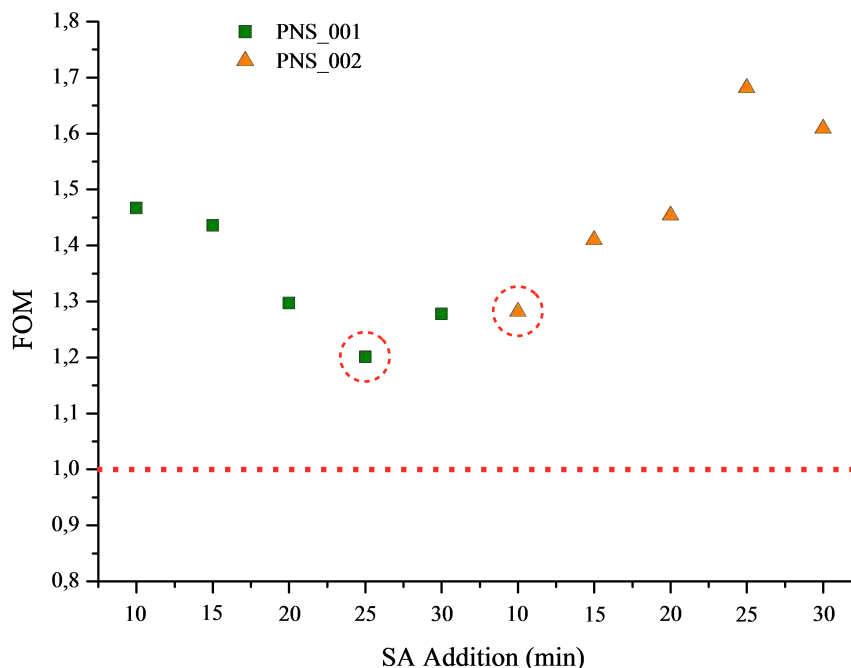
Η ανώτερη τιμή D_h του PNS_002_15_min και η VPTT συνάδουν με τις τιμές-στόχους, μολαταύτα το δείγμα χαρακτηρίζεται από χαμηλό α_T και μεγάλο PDI . Γενικότερα, τα δείγματα PNS_002_15-30_min χαρακτηρίζονται από το ανομοιογενές θερμικό προφίλ που επέδειξε το PN_001. Μπορεί να θεωρηθεί ότι η ανομοιογένεια του κελύφους δεν οφείλεται αποκλειστικά στην ακτινικά μειούμενη πυκνότητα σταυροδεσμών, αλλά επιπλέον αντανακλά την αυξημένη υδροφιλικότητα του κελύφους. Όπως και στην περίπτωση του PNS_002_0_min, ο συμπολυμερισμός του SA ανεβάζει σημαντικά το σημείο νέφωσης (*cloud point*) των αναπτυσσόμενων αλυσίδων. Είναι ενδεικτικό ότι για τυχαία συμπολυμερή P(NiPAm-co-AAc) έχει αναφερθεί αύξηση της LCST κοντά στην θερμοκρασία διαξαγωγής του πολυμερισμού όταν το ιοντικό μοριακό κλάσμα προσεγγίζει το 10% [302, 304], με συνέπεια οι πρωταρχικώς σχηματιζόμενες μακρόριζες να μην καταρρέουν άμεσα στην επιφάνεια των μικροπηκτών όταν προσεγγίσουν έναν κρίσιμο αριθμό δομικών μονάδων NiPAm [264]. Επιπλέον, η απόκλιση από την αναλογία [SA]:[NiPAm] = 1:10 στο διάλυμα αυξάνεται για υψηλότερους χρόνους προσθήκης του SA λόγω της κατανάλωσης του NiPAm. Δηλαδή, ένα σημαντικό μέρος των διαθέσιμων μονομερών αντιδρά στην συνεχή φάση του διαλύματος και οι παραγόμενες μακρομοριακές δομές αποκτούν ένα σημαντικό αριθμό διακλαδώσεων πριν ενσωματωθούν στο κέλυφος. Η διαλυτότητα των δομών αυτών είναι μεγαλύτερη όσο χαμηλότερη είναι η θερμοκρασία και το γεγονός αυτό δύναται να ερμηνεύσει την αξιοσημείωτη διαφορά των θερμικών προφίλ μεταξύ των δύο πειραματικών σειρών στην βάση της διαφορετικής θερμοκρασίας διεξαγωγής του πολυμερισμού. Για τον προσδιορισμό της VPTT στα δείγματα PNS_002_15-30_min, η σιγμοειδής καμπύλη προσαρμόστηκε στα δεδομένα D_h vs T με αρχικό σημείο τους 32 °C, όπου αίρεται η απροσδιοριστία στις μετρούμενες υδροδυναμικές διαστάσεις. Συμπερασματικά τα αποτελέσματα της σειράς PNS_002 υποδεικνύουν ότι ο έλεγχος του μεγέθους και της VPTT είναι εφικτός σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από 10 mM NiPAm, πλην όμως η θερμοκρασία πολυμερισμού $T_{pol} = 60$ °C οδήγησε σε δείγματα με υψηλό PDI και ανομοιομόρφο κέλυφος.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων βασίστηκε στην κατασκευή μίας *εμπειρικής* συνάρτησης για την απόδοση ενός *αριθμού αριστοποίησης* (*figure of merit, FOM*) σε κάθε δείγμα, μέσω της γραμμικής υπέρθεσης όρων που περιλαμβάνουν τις παραμέτρους αριστοποίησης $D_{h,Swollen}/D_{h,Collapsed}$, VPTT και α_T . Η κάθε παράμετρος “σταθμίζεται” ισόποσα στην συνάρτηση και το άριστο δείγμα λαμβάνει την τιμή 1, σύμφωνα με την αναλυτική έκφραση:

$$FOM = \left[\left(\frac{|D_{h,S} - 200|}{200} + 1 \right) * \left(\frac{|D_{h,C} - 100|}{100} + 1 \right) * 0.333 \right] + \text{Όρος Υδροδυναμικών Διαστάσεων}$$

$$\left[\frac{|VPTT - 36.7|}{36.7} + 1 \right] * 0.333 + \text{Όρος Θερμοκρασιακής Μετάπτωσης Φάσης}$$

$$\left[\frac{|\alpha_T - 8|}{8} + 1 \right] * 0.333 \text{ Όρος Λόγου Διόγκωσης}$$



Εικόνα 4.10 Διάγραμμα αριθμού αριστοποίησης, *FOM*, συναρτήσει του χρόνου εισαγωγής *SA* για τις πειραματικές σειρές *PNS_001* και *PNS_002* σε $pH = 7$.

Ο *FOM* του δείγματος *PNS_001_25_min* βρέθηκε εγγύτερα στην μονάδα και το προφίλ της θερμικής απόκρισης προσεγγίζει την ιδανικότητα. Το δείγμα αποτέλεσε εναλλακτική για την περαιτέρω τροποποίηση στα επόμενα στάδια της παρούσης διατριβής. Αντίστοιχα το *PNS_002_10_min* επέδειξε την καλύτερη εικόνα της δεύτερης πειραματικής σειράς. Ενδιαφέρον στοιχείο στο γράφημα *FOM vs SA Addition (min)* αποτελεί η αντίθεση μεταξύ συγκλίνουσας συμπεριφοράς για μεγαλύτερο χρόνο προσθήκης στα *PNS_001* και της αποκλίνουσας των *PNS_002*. Από αυτό το μοτίβο συνάγεται ότι για ζητούμενο $FOM \rightarrow 1$ σε συγκεντρώσεις $[NiPAM] > 20 \text{ mM}$, πρέπει να ισχύει ότι $SA \text{ Addition} < 10 \text{ min}$. Μηχανιστικά, μπορεί να υποθεθεί ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση μονομερών ευνοείται ο ταχύτερος σχηματισμός σωματιδίων λόγω της αυξημένης πιθανότητας συσσωμάτωσης αλλά και της γρηγορότερης κινητικής της αντίδρασης. Επίσης, πρέπει να ληφθεί υπόψιν ότι η αρχική προσθήκη του *SA* επιδρά βελτιωτικά επάνω στις παραμέτρους αριστοποίησης στην πειραματική σειρά με την υψηλή συγκέντρωση. Με βάση τις παραπάνω κατευθυντήριες κατέστη εφικτή η μεγιστοποίηση της απόδοσης σε πολυμερές, αυξάνοντας την πειραματική συγκέντρωση στα 55 mM . Το πρωτόκολλο σύνθεσης και ο χαρακτηρισμός του αριστοποιημένου δείγματος, *PNS_Opt*, πραγματεύονται στην επόμενη παράγραφο.

4.4.2 Παρασκευή σε Μεγαλύτερη Κλίμακα (*Scale-Up*) και Αριστοποίηση Δείγματος

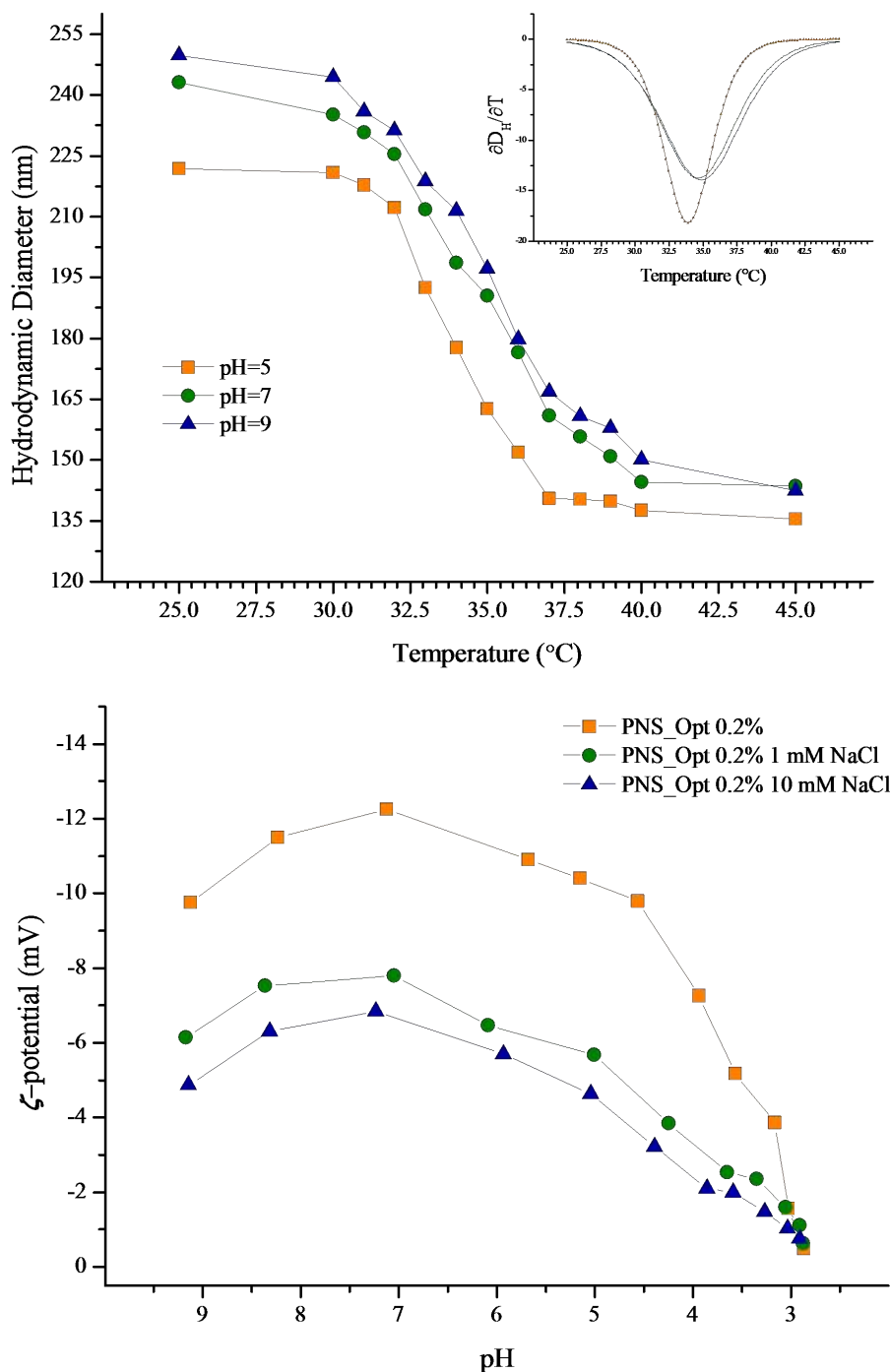
Στην Εικόνα 4.11 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα DLS για το PNS_Opt. Η αρχική συγκέντρωση [NiPAm] ρυθμίστηκε στα 0.55 M ενώ η αναλογία [SA]:[NiPAm] αυξήθηκε στην τιμή 1:8.7 από 1:10 με σκοπό την διατήρηση υψηλής επιφανειακής δραστηριότητας. Η αναλογίες [NiPAm]:[MBA] και [NiPAm]:[KPS] μεταβλήθηκαν ελάχιστα. Η ιδέα πίσω από την συνθετική πορεία του PNS_Opt ήταν η χρησιμοποίηση του SA για την επέμβαση σε δύο στάδια. Αρχικά, 1/3 των SA eq. χρησιμοποιήθηκε για την σταθεροποίηση των πρωτογενών πυρήνων και την εισαγωγή φορτισμένων δομικών μονάδων στο δίκτυο εξαρχής, με παράλληλο στόχο την αύξηση της VPTT. Σε δεύτερο χρόνο (8.5 min), προστίθεται η υπόλοιπη ποσότητα SA για την σταθεροποίηση των δευτερογενών πυρήνων και τον εμπλουτισμό της επιφάνειας με ομάδες -COOH. Οι χρόνος εισαγωγής και η αναλογία [SA eq. $t = 0$ min]:[SA eq. total] ορίστηκαν μέσω προπαρασκευαστικών πειραμάτων για $t_{SA Addition} < 10$ min.

Η σχετικά μειωμένη VPTT (34.7 °C σε pH = 7 και 34.9 °C σε pH = 9) συγκριτικά με τα προηγούμενες σειρές PNS_001 και PNS_002 αποτελεί ευθεία ένδειξη της υψηλής επιφανειακής πυκνότητας σε -COOH. Η δομή θερμοαποκρίσιμου πυρήνα και λειτουργικού κελύφους, όπως επίσης και η ομοιογενής διασταύρωση του δικτύου, υποδεικνύονται από το αμιγώς σιγμοειδές προφίλ της D_h vs T σε συνδυασμό με τον χαμηλό PDI. Στον Πίνακα 4.7 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά του PNS_Opt.

Πίνακας 4.7 Χαρακτηριστικά μικροπηκτών $P(NiPAm-co-SA)$ για εισαγωγή SA 15 - 20 - 25 - 30 min μετά την έναρξη του πολυμερισμού σε pH = 5. Σε παρένθεση περιλαμβάνονται οι τιμές του PDI.

	$D_{h,Swollen}$ (nm)	$D_{h,Collapsed}$ (nm)	VPTT (°C)	a_T (nm ³ /nm ³)
PNS_Opt (pH=5)	221 (0.023)	135 (0.045)	33.9	4.39
PNS_Opt (pH=7)	243 (0.032)	144 (0.061)	34.7	4.81
PNS_Opt (pH=9)	250 (0.007)	142 (0.055)	34.9	5.46

Η μεταβολή του επιφανειακού δυναμικού-ζ για διαφορετικές τιμές ιοντικής ισχύος σε pH = 7 παρατίθεται στην Εικόνα 4.10B. Η ελάχιστη ιοντική ισχύς (πορτοκαλί) αντιστοιχεί στην επαναδιασπορά σε απεσταγμένο H₂O και την προσθήκη ελάχιστης ποσότητας διαλύματος NaOH 0.01M για την ρύθμιση του pH. Οι διακριτές καμπύλες μεταβολής του δυναμικού-ζ συναρτήσει του pH λαμβάνουν σχήμα αψίδας με το μέγιστο στην τιμή pH = 7, ενώ κατ' απόλυτη τιμή το δυναμικό-ζ μειώνεται για αύξηση με αύξηση της ιοντικής ισχύος. Και οι δύο παρατηρήσεις υποδεικνύουν την ευαισθησία του PNS_Opt σε αλλαγές του pH και της συγκέντρωσης κατιόντων Na⁺, εξαιτίας της παρουσίας φορτισμένων επιφανειακών ομάδων.



Εικόνα 4.11 Θερμοκρασιακή απόκριση μικροπηκτών *PNS_Opt* (A) και μεταβολή του δυναμικού-ζ σε $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ για διαφορετική ιοντική ισχύ διασποράς (B) σε $\text{pH} = 5, 7, 9$.

Συγκεκριμένα στην περίπτωση της μείωσης του pH, το δυναμικό-ζ αυξάνεται λόγω της πρωτονίωσης των καρβοξυλομάδων ενώ όταν το pH αυξάνεται από 7 σε 9, η μεγαλύτερη συγκέντρωση αντισταθμιστικών ιόντων Na^+ επιφέρει την “προάσπιση” (screening) των αρνητικών φορτίων στο επίπεδο ολίσθησης και τον προσδιορισμό υψηλότερου δυναμικού-ζ.

Το ισοηλεκτρικό σημείο προσδιορίστηκε στο $pH=2.88\pm 0.03$ με πολύ καλή επαναληψιμότητα ανεξάρτητως ιοντικής ισχύος.

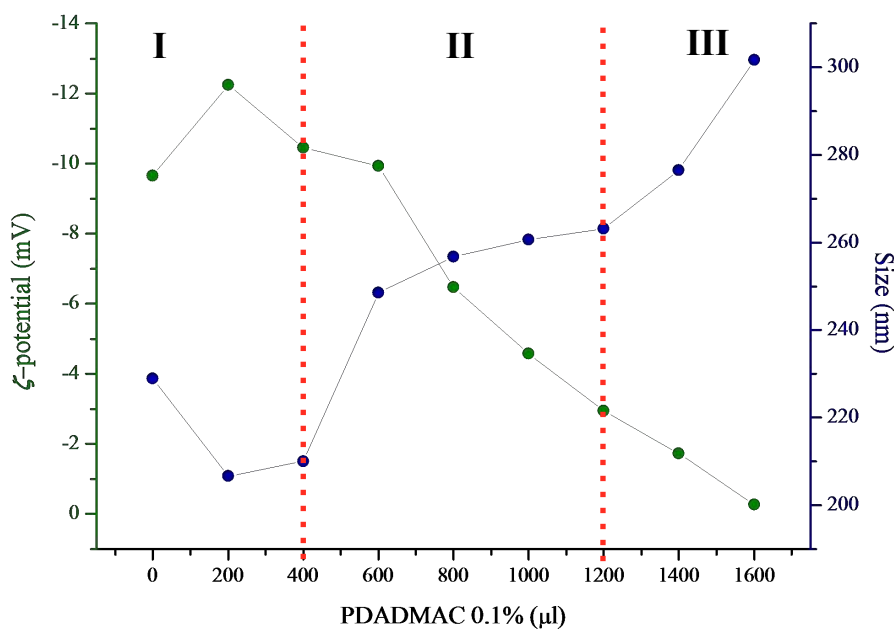
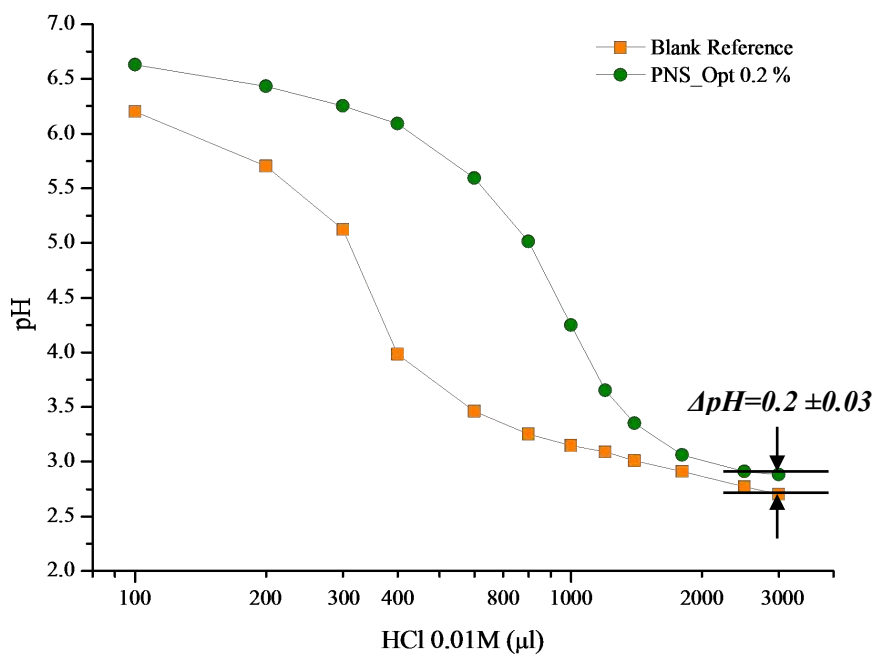
4.4.3 Αποτελέσματα Τιτλοδοτήσεων

Αρχικά, ορίστηκαν οι συνθήκες αρχικοποίησης του κενού διαλύματος και της τιτλοδοτούμενης διασποράς PNS_Opt 2 mg.ml⁻¹, επιβάλλοντας ίσους όγκους (~10 ml) σε $pH = 7$. Η σημαντική διαφορά στο μετρούμενο pH της τιτλοδοτούμενης διασποράς και του κενού διαλύματος έπειτα από την προσθήκη 100 μl HCl 10 mM είναι ενδεικτική μίας διεργασίας πρωτονίωσης (Σχήμα 4.12A). Η παρατηρούμενη υστέρηση μέχρι την προσθήκη 1800 μl HCl 10 mM είναι χαρακτηριστική της σταδιακής κατάληψης των φορτισμένων θέσεων -COO⁻ του δικτύου από H⁺. Ακολουθήθηκε η αντίστροφη πορεία σε σχέση με τις “τυπικές” τιτλοδοτήσεις κολλοειδών, όπου επιβάλλεται πλήρης πρωτονίωση της διασποράς σε pH κοντά στο ισοηλεκτρικό και ακολουθεί αργή αποπροτονίωση καταγράφοντας το pH [301]. Επίσης, αφού ο σκοπός του πειράματος δεν υπήρξε ο παράλληλος προσδιορισμός της pK_a , αλλά η ποσοτικοποίηση της διαφοράς μεταξύ των δύο τελικών τιμών pH , δεν ελήφθηκε μεγάλο πλήθος ενδιάμεσων τιμών του pH . Το ισοηλεκτρικό σημείο είχε προσδιοριστεί με μεγάλη ακρίβεια μέσω των μετρήσεων δυναμικού-ζ συναρτήσεως του pH . Αφού το pH είναι εξ ορισμού το μέτρο της συγκέντρωσης πρωτονίων, από την διαφορά του μετρούμενου pH ανάμεσα στην διασπορά και στο κενό διάλυμα, όταν προστίθεται ο ίδιος όγκος HCl για την προσέγγιση του ισοηλεκτρικού σημείου, μπορούν να υπολογιστούν το τιτλοδοτούμενο φορτίο και ο βαθμός ενσωμάτωσης -COOH μέσω των σχέσεων:

$$\begin{aligned} \text{Titration Charge (meq)} &= \left(10^{-pH_{f,blank}} - 10^{-pH_{f,PNS_Opt}} \right) * V_f \\ \% - COOH &= \text{Titration Charge} / \text{Nominal Charge} * 100 \end{aligned}$$

Ο βαθμός συμπολυμερισμού του SA βρέθηκε ίσος με 89 % σε πολύ καλή συμφωνία με βιβλιογραφικές τιμές [296]. Η διαφορά σε σχέση με το αρχικό φορτίο οφείλεται σε έναν πολύ μικρό αριθμό μη ιοντισμένων καρβοξυλίων πριν την έναρξη της τιτλοδότησης, στην παραγωγή oligομερικών παραπροϊόντων που απομακρύνθηκαν στο στάδιο του καθαρισμού και σε πειραματικό σφάλμα.

Η τιτλοδότηση του PNS_Opt με PDADMAC πραγματοποιήθηκε με την ίδια πειραματική διάταξη αυτόματης έγχυσης, καταγράφοντας εκ παραλλήλου την μεταβολή της D_h και του δυναμικού-ζ. Από το μέσο μοριακό βάρος κατά βάρος του PDADMAC $\langle M_w \rangle = 150000 \text{ g.mol}^{-1}$, ο μέσος βαθμός πολυμερισμού του PDADMAC υπολογίζεται ίσος με $\langle N_{PDADMAC} \rangle = 928$, ο οποίος ισούται με τον αριθμό των φέροντων τυπικών φορτίων ανά μακρομόριο. Με θεμελιώδεις υπολογισμούς, το φορτίο του διαλύματος τίτλου βρίσκεται ίσο



Εικόνα 4.12 Καμπύλες τιτλοδότησης: (Α) Ποτεντιομετρική τιτλοδότηση για τον προσδιορισμό του συνολικού φορτίου με διάλυμα τίτλου HCl 10 mM και (Β) Προσδιορισμός του επιφανειακού φορτίου με διάλυμα τίτλου PDADMAC 0.1 % κ.β.

με $6.4 \text{ } \mu\text{eq}\cdot\text{ml}^{-1}$. Μπορούν να αναγνωριστούν τρεις περιοχές στις καμπύλη D_h συναρτήσεως του τιτλοδοτούμενου PDADMAC 0.1%, ανάλογα με την κλίση της ευθείας που ορίζει η συνένωση των πειραματικών σημείων. Σε συνάρτηση με την καμπύλη τιτλοδότησης

δυναμικού-ζ vs PDADMAC 0.1% μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την διεργασία που λαμβάνει χώρα. Αρχικά παρατηρείται μείωση της D_h και αντίθετα με την αναμενόμενη συμπεριφορά, μείωση του δυναμικού-ζ. Η προσθήκη θετικά φορτισμένων μακρομορίων προκαλεί την συρρίκνωση των αρνητικά φορτισμένων αλυσίδων στην επιφάνεια των μικροπηκτών ως αποτέλεσμα της επιτυχημένης ηλεκτροστατικής σύμπλεξης και της εξασθένισης των απωστικών αλληλεπιδράσεων [305]. Το δυναμικό-ζ αντικατοπτρίζει την πυκνότητα επιφανειακού φορτίου στο επίπεδο ολίσθησης με συνέπεια ένα σωματίδιο μικρότερων διαστάσεων και φέροντος φορτίου να χαρακτηρίζεται από υψηλότερη κατά απόλυτη τιμή δυναμικού-ζ, συγκριτικά με σωματίδιο μεγαλύτερων διαστάσεων και φέροντος φορτίου: ενώ η διαφορά του φορτίου μεταξύ των δύο σωματιδίων χαρακτηρίζεται από μία γραμμική σχέση, δεν ισχύει το ίδιο για την σχέση επιφάνειας - διαμέτρου ($A \sim D_h^2$). Αυτό το φαινόμενο τονίζεται ιδιαίτερα σε μετρήσεις δυναμικού-ζ vs T του PNS_002_25_min (Εικόνα Π4.5), όπου παρατηρείται μείωση 17.8 mV μεταξύ διογκωμένης και συρρικνωμένης κατάστασης σε ένα σύστημα στο οποίο το μέτρο του επιφανειακού φορτίου παραμένει αμετάβλητο [306, 307]. Η δεύτερη περιοχή χαρακτηρίζεται από την βαθμιαία αύξηση της D_h και του δυναμικού-ζ και συναρτάται με την συσσώρευση του στρώματος PDADMAC στην επιφάνεια του PNS_Opt. Η διαφορά των 34 nm από την έναρξη της τιτλοδότησης ως το τέλος της δεύτερης περιοχής βρίσκεται αρκετά κοντά σε τιμές που έχουν αναφερθεί έπειτα από την προσρόφηση PDADMAC στην επιφάνεια μικροπηκτών PNIPAM [308]. Τέλος, στην τρίτη περιοχή παρατηρείται αλματώδης αύξηση της D_h , με τελική τιμή τα 301 nm. Πέρα από την συνεισφορά των αλυσίδων του PDADMAC στις υδροδυναμικές διαστάσεις, σε αυτό το αποτέλεσμα συμβάλλει και η αστάθεια του συστήματος, η οποία γίνεται εντονότερη όσο προσεγγίζεται το ισοηλεκτρικό σημείο. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε με οπτική παρατήρηση, καθώς λίγα λεπτά μετά το πέρας της τιτλοδότησης ήταν εμφανής ο σχηματισμός θρόμβων στο κελί μέτρησης. Από την τελική τιμή του διαλύματος τίτλου (1600 μ l) υπολογίστηκε ότι το 69.2% των συνολικών -COOH βρίσκεται στην επιφάνεια, εμφανίζοντας εξαιρετική συνάφεια με την θεωρητική τιμή 66.7%. Το αποτέλεσμα αυτό σχετίζεται με τον πιο αργό πολυμερισμό του SA σε σχέση με το NiPAm (βλ. Παράγραφο 4.5.4). Υπολογίζοντας προσεγγιστικά την κατ' αριθμό αριθμό συγκέντρωση της τιτλοδοτούμενης διασποράς PNS_Opt (Σχέσεις Π4.1-2), προσδιορίστηκε ότι αντιστοιχούν 2.67 δραστικές θέσεις -COOH ανά nm^2 .

4.5 Συζήτηση

4.5.1 Ανομοιογενές προφίλ D_h vs T

Προβλήματα στην πραγματοποίηση μετρήσεων δυναμικής σκέδασης έχουν αναφερθεί συχνά στην βιβλιογραφία και έχουν αποδοθεί σε ανιχνεύσιμες πολυτροπικές κατανομές [24, 250] και σε ελλιπή αντίθεση [281, 284]. Από αντιδιαμετρική σκοπιά, η αύξηση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας για ελλατούμενες υδροδυναμικές διαστάσεις έχει ερμηνευτεί φαινομενολογικά στη βάση της αυξημένης αντίθεσης [29, 309]. Στο ίδιο πλαίσιο, οι Ballard et al. [46] ερμήνευσαν την ισχυρότερη σκέδαση από μικροπηκτές PNIPAm τροποποιημένες με βενζαλδεΐδη στην επαγόμενη αύξηση της αντίθεσης, παρά τις μικρότερες υδροδυναμικές διαστάσεις συγκριτικά με τα πρόδρομα υλικά. Η αυξημένη θολερότητα χρησιμοποιήθηκε για να αποδειχθεί με ποιοτικό τρόπο η επιτυχημένη τροποποίηση.

Είναι γνωστό ότι η θερμοκρασία μετάπτωσης εξαρτάται από το μήκος της αλυσίδας μεταξύ δύο σταυροδεσμών [310], συνεπώς η ευκινησία των ασθενώς διασταυρωμένων μακρομορίων της επιφάνειας επιτρέπει την παρουσία διαφορετικών VPTT στην ίδια δομή. Επίσης, είναι λογικό να υποθεθεί ότι αφού υφίστανται μορφολογικά μοντέλα για την ερμηνεία δεδομένων σκέδασης, σύμφωνα με τα οποία περιγράφονται καλά καθορισμένες νανοπεριοχές στο εσωτερικό μικροπηκτών [311]⁵, η ανίχνευση ανομοιογενειών παρόμοιας κλίμακας μεγέθους μέσα στην ίδια δομή να καθίσταται δυνατή με DLS. Περαιτέρω στήριξη για την υιοθέτηση του μορφολογικού μοντέλου που εξετάστηκε στην Παράγραφο 4.4.1 πρόσφερε το γεγονός ότι τα πολυιόντα χαρακτηρίζονται από πολύ γρηγορότερους ρυθμούς διάχυσης συγκριτικά με τα ουδέτερα πολυμερή [312] και με βάση αυτή την παρατήρηση έχει προταθεί ερμηνεία για την παρουσία διτροπικών κατανομών σε νανοϋβριδικά κολλοειδή [313]. Ως εκ τούτου, αναμένονται πολύ μικρότεροι χρόνοι χαλάρωσης από το ισχυρότερα φορτισμένο και ασθενέστερα διασταυρωμένο κέλυφος των μικροπηκτών. Κατά συνέπεια η διτροπική κατανομή αποδίδεται στην ανίχνευση δύο διαφορετικών διεργασιών χαλάρωσης: του κελύφους και της μικροπηκτής ως σύνολο (βλ. Σχήμα 4.2). Εφόσον η z -μέση υδροδυναμική διάμετρος είναι το αποτέλεσμα μαθηματικής προσαρμογής των δεδομένων σε μία μέση τιμή (βλ. Κεφάλαιο 3), η τιμή της δεν αντικατοπτρίζει τις πραγματικές διαστάσεις των σωματιδίων όσο υφίσταται η συνεισφορά από το κέλυφος. Την ίδια στιγμή, η αναδίπλωση των αλυσίδων αυξανόμενης της θερμοκρασίας προκαλεί την βαθμιαία συρρίκνωση του κελύφους, την ελάττωση της συνεισφοράς του μικρού ρυθμού χαλάρωσης

⁵ Οι Keerl, Pedersen και Richtering κατασκεύασαν το μοντέλο της “ακάθαρτης χιονόμπαλας” για να ερμηνεύσουν τα δεδομένα SANS από συμπολυμερικές μικροπηκτές P(NiPAm-co-PNiPMAm). Εξαιτίας της διαφοράς των κρίσιμων θερμοκρασιών του κάθε συστατικού, υφίσταται θερμοκρασιακό εύρος, εντός του οποίου σχηματίζονται “ακάθαρτες” νανοπεριοχές PNIPAm (συρρικνωμένες σε $T > LCST$) μέσα στην “χιονόμπαλα” PNIPMAm (στην διογκωμένη κατάσταση για $T < LCST$).

και εν τέλει την φαινομενική αύξηση της D_h . Αξίζει να σημειωθεί ότι πολύ πρόσφατα, ο Wang [314] επιστράτευσε παρόμοια επιχειρηματολογία για την επίλυση ενός θεμελιακού προβλήματος που αφορούσε την ανίχνευση ενός αργού χρόνου χαλάρωσης σε αραιά υδατικά διαλύματα PEO. Μέχρι πρότινος και σε πλήρη αντίθεση με την διαίσθηση, ο αργός χρόνος χαλάρωσης αποδίδονταν σε συσσωματώματα ή ακαθαρσίες, αποδείχθηκε όμως ότι οφείλεται σε νανο-εγκλείσματα αέρα εξαιτίας της αμφίφιλης φύσης του πολυμερούς.

4.5.2 LCST και UCST

Συστήματα που εμφανίζουν ταυτόχρονα *LCST/UCST* συμπεριφορά αναφέρονται σπάνια στην βιβλιογραφία. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι η προσθήκη συστάδας PEO σε τυχαίο συμπολυμερές πολυ(ακρυλαμιδίου-*co*-ακρυλονιτριλίου) με *UCST* συμπεριφορά προσδίδει επιπλέον *LCST* συμπεριφορά [315]. Το σύστημα που επέδειξε την πιο συναφή φυσικοχημική συμπεριφορά και σύσταση υπήρξε ένα αλληλοεμπλεκόμενο δίκτυο (interpenetrating network, IPN) PNiPAm/PAAc [316], όπου η διττή συμπεριφορά αποδόθηκε στην μετάβαση του PNiPAm στην συρρικνωμένη κατάσταση και την στην θερμική λύση των δεσμών-H. Η εξαφάνιση της διπλής αποκρισιμότητας σε συνθήκες όπου χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα ουρίας 3M (ουσία η οποία ανταγωνίζεται τον σχηματισμό δεσμών-H) ή σε αυξημένο pH παρείχαν πρόσθετη επιβεβαίωση σχετικά με τον ρόλο που επιτελούν οι δεσμοί-H. Ομοίως, η προέλευση της *UCST* αποδόθηκε στον ίδιο μηχανισμό από τους Serano-Ruiz et. al κατά την μελέτη κολλοειδών IPN πολυ(ακρυλαμιδίου-*co*-AAc) [317]. Η συσχέτιση μεταξύ βαθμού ιονισμού των καρβοξυλικών ομάδων και των σχηματισμού δεσμών υδρογόνου με τις αμιδικές ομάδες του PNiPAm υπογραμμίζεται επίσης στην εργασία των Xia και Hu όπου παρασκευάστηκαν IPNs μέσω του πολυμερισμού AAc παρουσία προσχηματισμένων μικροπηκτών PNiPAm [318]. Το πολυηλεκτρολυτικό δίκτυο σχηματίζεται με έναρξη του πολυμερισμού αφότου είχε προηγηθεί η προσρόφηση του AAc στο εσωτερικό των μικροπηκτών PNiPAm, η οποία καθίσταται δυνατή μέσω της ανάπτυξης δεσμών-H μεταξύ των -COOH του μονομερούς και των -CONH του δικτύου. Για την περαιτέρω επιβεβαίωση του μηχανισμού, χρησιμοποιήθηκε SA (εξουδετερωμένο AAc) χωρίς όμως την αναπαραγωγή των αποτελεσμάτων λόγω της προφανούς αδυναμίας του SA να σχηματίσει δεσμούς-H με τα CONH του PNiPAm. Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, η ασυνήθιστη συμπεριφορά των PNS_001_5_min και PNS_002_5_min πιθανώς είναι απόρροια της ανάπτυξης δεσμών-H στο εσωτερικό του δικτύου. Η διατήρηση του φαινομένου για pH > 5 στο PNS_002_5_min σχετίζεται πιθανώς με την εμφάνιση ισχυρού πολυηλεκτρολυτικού φαινομένου, εξαιτίας της τοπικά υψηλής συγκέντρωσης καταλοίπων SA και την μεγάλη αύξηση της pK_a .

4.5.3 Διαδικασία *Scale-up*.

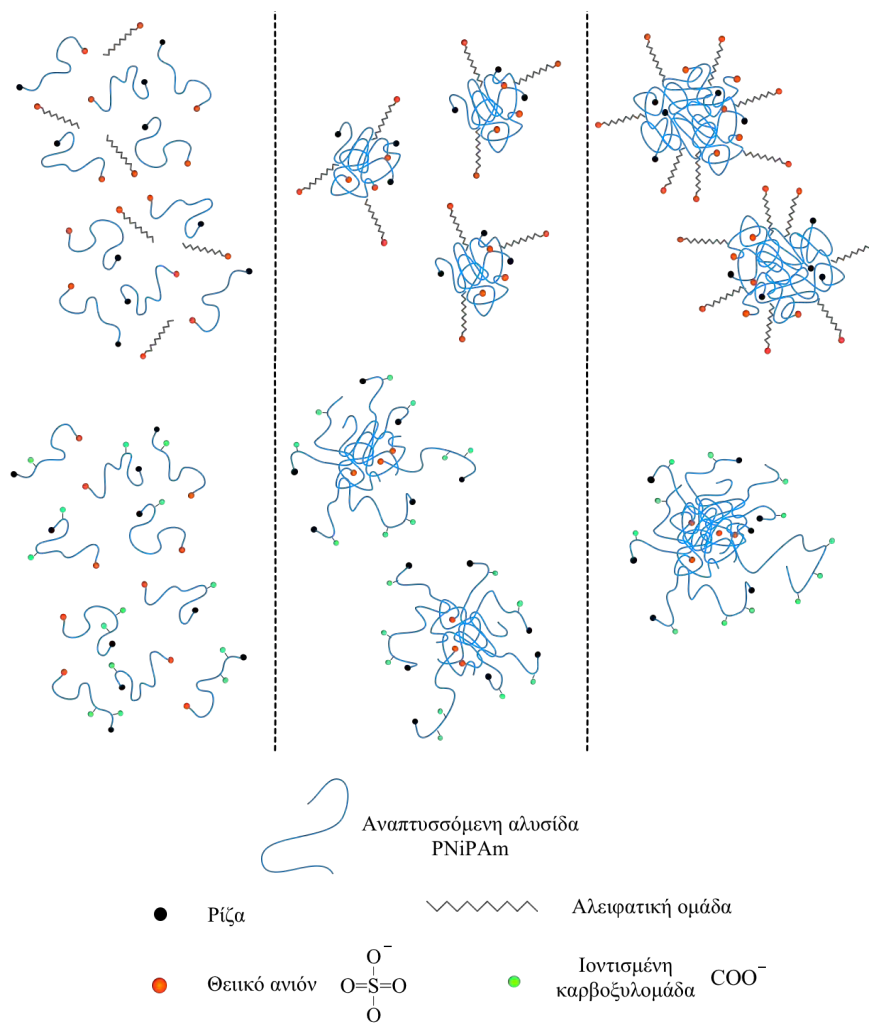
Τα τελευταία χρόνια έχει αναγνωριστεί η ανάγκη παρασκευής κολλοειδών με βάση το PNIPAM σε μεγάλη κλίμακα [319]. Η διατήρηση απλής και χαμηλού κόστους συνθετικής πορείας συνιστά την σημαντικότερη παράμετρο σε μία διαδικασία *scale-up*. Οι συμβατικές μέθοδοι παρασκευής κολλοειδών με πολυμερισμό κατακρήμνισης περιλαμβάνουν τη χρήση τασιενεργών ουσιών και για την αποφυγή τους έχουν προταθεί οι *semi-batch* [255] ή ακόμα και *non-stirred* [263] πρακτικές. Σε αυτό το πλαίσιο, η πρακτική της *one-shot* εισαγωγής φορτισμένου μονομερούς χρήζει μεγαλύτερης διερεύνησης, με σκοπό την συσχέτιση της αρχικής συγκέντρωσης μονομερών με τον κατάλληλο χρόνο προσθήκης μετά την έναρξη, για την επίτευξη επιθυμητών ιδιοτήτων. Σύμφωνα με τα ευρήματα της παρούσας διατριβής, αναγνωρίστηκε μία σχέση 10 mM - 25 min / 20 mM - 10 min / 55 mM - 8.5 min για την παρασκευή κολλοειδών με εγγύς αριστοποιημένες ιδιότητες οπότε αναμένεται οι δύο παράμετροι να συνδέονται με μία σχέση αντίστροφης αναλογίας.

4.5.4 Προτεινόμενος μηχανισμός για την “ψευδοτασιενεργό” δράση του SA

Στα πλαίσια της βιβλιογραφικής ανασκόπησης, υπήρξαν περιορισμένες αναφορές στις οποίες το pH της αντίδρασης πολυμερισμού υπεισερχόταν ως συνθετική παράμετρος [320, 321]. Οι Zhou και Chu [322] παραθέτουν $\text{pH} = 3.1 \pm 0.2$ κατά την σύνθεση μικροπηκτών P(NiPAm-co-MAAc), ενώ στην ίδια εργασία γίνεται μία εφαπτομενική παρατήρηση σχετικά με την επίδραση του βαθμού ιονισμού του MAAc στην σταθεροποίηση των πρωτογενών πυρήνων. Οι Kleinen και Richtering συσχέτισαν ακροθιγώς το ποσοστό ενσωμάτωσης του MAAc σε μικροπηκτές P(NiPAm-co-MAAc) με το pH της αντίδρασης, χωρίς όμως την παράθεση συγκεκριμένης τιμής [323]. Οι Sheikholeslami et al. μελέτησαν το ίδιο σύστημα και υπήρξε ταύτιση μεταξύ της δοθείσης πειραματικής ($\text{pH} \sim 3.5$) και της θεωρητικά αναμενόμενης τιμής από την συγκέντρωση του MAAc, θεωρώντας ότι $\text{p}K_{a, \text{MAAc}} = 4.5$ [253]. Σε αντίθεση με το σύστημα P(NiPAm-co-AAc), ο συμπολυμερισμός της εξουδετερωμένης μορφής του οξέος (NaAAc ή SA) αναφέρεται σπάνια στην βιβλιογραφία [101, 324]. Στην πραγματικότητα, υπήρξε άκαρπη η προσπάθεια εντοπισμού εργασιών όπου οργανικά άλατα συμπολυμερίζονται με το NiPAm για την παρασκευή μικροπηκτών, εν γένει. Σε αυτό το πλαίσιο, οι πιο συναφείς εργασίες για την παρασκευή πολυμερικών υλικών με βάση το NiPAm και κάποιο εξ αρχής ιοντισμένο μονομερές αφορούσαν είτε την σύνθεση *μακροπηκτών* (bulk gels) [325-327], είτε την σύνθεση γραμμικών συμπολυμερών όπου χρησιμοποιήθηκαν κατιοντικά, ανιοντικά ή αμφοτερικά μονομερή [328]. Η επίδραση της χρήσης φορτισμένου μονομερούς επάνω στις φυσικοχημικές παραμέτρους μικροπηκτών παραγόμενων με πολυμερισμό κατακρήμνισης αναφέρεται από τους Duracher et al. [329],

όπου μελετήθηκε το σύστημα πολυ{*N*-ισοπροπυλο-μεθακρυλαμιδίου-*co*-[(*N*-βινυλοβενζυλίμινο)διοξικού οξέος]}. Η παρατηρούμενη μείωση της υδροδυναμικής διαμέτρου όταν προστίθεται μεγαλύτερη ποσότητα όξινου μονομερούς αποδόθηκε στον σχηματισμό μεγαλύτερου αριθμού πρωτογενών πυρήνων ή/και στην επίτευξη μεγαλύτερης κολλοειδούς σταθερότητας λόγω της παρουσίας επιφανειακών φορτισμένων ομάδων. Παρ' όλα αυτά, στις όξινες συνθήκες που επικρατούν κατά τον πολυμερισμό, το ποσοστό των ιοντισμένων ομάδων είναι πολύ μικρό ώστε να συμβάλλει στην σταθεροποίηση, οπότε κρίνεται πιθανότερη η συνεργιστική δράση με το τασιενεργό που ούτως ή άλλως προστέθηκε στην αντίδραση. Στην μελέτη των Kratz et al. [249] σημειώνεται μείωση του μεγέθους μικροπηκτών P(NiPAm-*co*-AAc) όταν αυξάνεται η ποσότητα του συμπολυμεριζόμενου AAc, χωρίς όμως αυτό το μοτίβο να επαναλαμβάνεται στην εργασία των Burmistrova et al. [279] όπου ουσιαστικά αναφέρεται η αντίστροφη συμπεριφορά του συστήματος. Τέτοιου είδους αντικρουόμενα αποτελέσματα υπογραμμίζουν τον υψηλό βαθμό πολυπλοκότητας του συστήματος.

Η κατάσταση αλλάζει άρδην όταν επιχειρείται ο συμπολυμερισμός κατακρήμνισης του NiPAm παρουσία SA. Ως οργανικό άλας, το SA βρίσκεται μονίμως διασταμένο στις συνθήκες του πολυμερισμού, με αποτέλεσμα την μεταλλαγή του χαρακτήρα των διαδιδόμενων και αναπτυσσόμενων αλυσίδων προς την υδροφιλικότητα. Αυτό το γεγονός οδηγεί στην αλλαγή του τρόπου με τον οποίο οι σχηματίζονται οι πρωτογενείς και δευτρογενείς πυρήνες. Σύμφωνα με τον προτεινόμενο μηχανισμό, η αρχική προσθήκη του SA προκαλεί την συμμετοχή μικρότερου αριθμού διαδιδόμενων μακροριζών προς σχηματισμό ενός πρωτογενή πυρήνα, διότι αφενός το αρχικό ισοζύγιο επιφανειακής ενέργειας/φορτίου πλέον δεν εξαρτάται μόνο από την συγκέντρωση των καταλοίπων $-SO_4^-$ του εκκινητή και αφετέρου οι μακρόριζες δεν συννεώνονται τόσο εύκολα λόγω των αυξημένων ηλεκτροστατικών απώσεων και της υδροφιλικότητας. Όσο το σωματίδιο αναπτύσσεται περαιτέρω, αυξάνονται ξανά η επιφανειακή ενέργεια και η τάση για συσσωμάτωση (στάδιο δευτερογενούς πυρήνωσης). Η μεταγενέστερη προσθήκη του SA σε αυτό το σημείο έχει ως αποτέλεσμα την διακοπή του μηχανισμού συσσωμάτωσης, μέσω του σχηματισμού ενός περιφερειακού στρώματος από αμφίφιλες αλυσίδες, πλούσιες σε φορτισμένα κατάλοιπα $-COO^-$. Τελικά, ένας συνδυασμός διεργασιών συμβάλλει στην σταθεροποίηση των δευτερογενών πυρήνων. Πέρα από τις ηλεκτροστατικές απώσεις, σημαίνων ρόλο διαδραματίζουν στερεοτακτικοί περιορισμοί εξαιτίας του αμφίφιλου κελύφους. Επίσης μπορεί να υποθεθεί ότι λόγω της αυξημένης τοπικής συγκέντρωσης αντισταθμιστικών φορτίων Na^+ όταν αλυσίδες γειτονικών σωματιδίων αλληλεπικαλύπτονται, αναδύονται ωσμωτικοί όροι που μπορεί να συμβάλλουν στην άπωση. Ο μηχανισμός σταθεροποίησης αποδίδεται στο Σχήμα 4.3 και συγκρίνεται με την κλασική περίπτωση σταθεροποίησης με SDS.



Σχήμα 4.3 Σύγκριση μηχανισμών σταθεροποίησης πολυμερισμού κατακρήμνισης με SDS (επάνω σειρά) και σταθεροποίησης με χρήση φορτισμένου συμμοномерού (κάτω σειρά).

Η κατανομή των καρβοξυλικών θέσεων σε μικροπηκτές με βάση το PNIPAm έχει ερευνηθεί διεξοδικά [13] και μπορεί να προσδιοριστεί με επιλεκτική χρώση και μελέτη με TEM [248]. Είναι γνωστό ότι το σύστημα NiPAm/AAc χαρακτηρίζεται από παρεμφερείς λόγους δραστηριότητας ($r_{\text{NiPAm}} = 0.57$, $r_{\text{AAc}} = 0.32$) [296], το γινόμενο των οποίων είναι μικρότερο της μονάδας (0.18). Σύμφωνα με την κλασική θεωρία του ριζικού πολυμερισμού, υπό αυτές τις συνθήκες αναμένεται η εναλλασσόμενη προσθήκη του AAc στο δίκτυο [266] και με δεδομένη την χαμηλή στοιχειομετρική αναλογία στα εξεταζόμενα συστήματα, εξομοιώνεται ο ομοιογενής και τυχαίος συμπολυμερισμός. Από την άλλη πλευρά, έχει βρεθεί ότι η κινητική της διάδοσης πολυμερισμού του AAc σε υδατικά περιβάλλοντα εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από τον βαθμό ιοντισμού του μονομερούς [330]. Συγκεκριμένα, η σταθερά διάδοσης πολυμερισμού, k_p , ελαττώνεται κατά μία τάξη μεγέθους όταν το AAc περνά στην πλήρως ιοντισμένη μορφή.

Επίσης, ενδιαφέρον παρουσιάζει ο μεγάλος βαθμός (89%) του SA στο τελικό προϊόν σε συνδυασμό με την πολύ καλή σύγκλιση μεταξύ θεωρητικής και πειραματικής επιφανειακής συγκέντρωσης φορτίου (66.7% vs 69.2%). Την στιγμή της εισαγωγής (8.5 min), το SA συμμετέχει στον πολυμερισμό στην συνεχή φάση του διαλύματος και σύμφωνα με τα παραπάνω αλυσίδες πλούσιες σε NiPAM ενσωματώνονται στην επιφάνεια των σωματιδίων είτε υπό την δράση του MBA, είτε με συννένωση ριζών. Μετά από κάποια χρονική στιγμή, η συγκέντρωση του NiPAm γίνεται πολύ μικρότερη από αυτή του SA, καθώς ήδη την στιγμή της εισαγωγής η στοιχειομετρική αναλογία στην αντίδραση έχει αποκλίνει από την συνολική αρχική $[SA]:[NiPAm] = 1:10$. Το ερώτημα που τίθεται είναι πως το SA εισάγεται στην επιφάνεια ελλείψει της κινούσας δύναμης που περιγράφηκε παραπάνω; Σύμφωνα με την υπόθεση της σταθερής κατάστασης, η συνολική συγκέντρωση των διαδιδόμενων/ενεργών ειδών, των μακροριζών στην συνεχή φάση του διαλύματος και των ενεργών άκρων στην επιφάνεια των αναπτυσσόμενων κolloειδών σωματιδίων εν προκειμένω, παραμένει σταθερή. Άρα είναι εύλογο να υποθεθεί περαιτέρω ότι όσο ελαττώνεται η συγκέντρωση των διαθέσιμων μονομερών προς όφελος της ανάπτυξης των μικροπηκτών, η συγκέντρωση των μακροριζών μειώνεται. Αφού η επιφάνεια των μικροπηκτών αυξάνεται ως προς d^2 , η συγκέντρωση των ενεργών θέσεων στην επιφάνεια είναι αύξουσα συνάρτηση της προόδου της αντίδρασης πολυμερισμού. Με άλλα λόγια, όσο προχωράει η αντίδραση πολυμερισμού το ισοζύγιο των ενεργών θέσεων μετατοπίζεται προς την πλευρά της επιφάνειας των αναπτυσσόμενων μικροπηκτών, έναντι των διαλυμένων μακροριζών. Ως εκ τούτου, ένα ελεύθερο μονομερές SA έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να εισαχθεί απευθείας στην επιφάνεια των μικροπηκτών παρά στην φάση του διαλύματος, ακόμα και όταν η κινούσα δύναμη της εισαγωγής στην επιφάνεια λόγω του συμπολυμερισμού με NiPAm είναι απύσχα. Προϋπόθεση για την παραπάνω ανάλυση αποτελεί η αμελητέα συνεισφορά των αντιδράσεων τερματισμού με συννένωση, ανακατανομή ή μεταφορά, στην εξεταζόμενη χρονική κλίμακα.

4.5.5 Τιτλοδοτήσεις - Πυκνότητα Φορτίου

Οι τιτλοδοτήσεις ισοηλεκτρικού σημείου, ποτεντιομετρικά με χρήση NaOH για τον προσδιορισμό του συνολικού φορτίου και με χρήση PDADMAC για τον προσδιορισμό του επιφανειακού φορτίου αποτελούν συνεπείς (consistent) τεχνικές χαρακτηρισμού [294, 323]. Το περιεχόμενο σφάλμα προέρχεται από παραμέτρους όπως η διακριτική ικανότητα του pH-μετρικού ηλεκτροδίου, η ακρίβεια της μηχανικής αντλίας έγχυσης στον αυτόματο τιτλοδότη και η κατανομή μοριακών βαρών του PDADMAC. Αντίθετα, κατά τον προσδιορισμό της επιφανειακής πυκνότητας φορτίου, όπου είναι απαραίτητος ο υπολογισμός της κατ' αριθμό συγκέντρωσης των περιεχόμενων κolloειδών, N_p/V , στην τιτλοδοτούμενη διασπορά, το

σφάλμα είναι σημαντικά μεγαλύτερο. Η N_p/V μπορεί να υπολογιστεί με απόλυτο τρόπο μέσω του υπολογισμού του $\langle M_w \rangle$ των μικροπηκτών [23, 318] ή μέσω ιξωδομετρικών μεθόδων [268]. Στην παρούσα εργασία υποτέθηκε ότι οι διαστάσεις των ξηρών κολλοειδών συμπίπτουν με τις διαστάσεις της συνεπτυγμένης μορφολογίας στο αιώρημα. Στην παρούσα απλουστευτική προσέγγιση δεν έχει ληφθεί υπόψη η υψηλή παραμορφωσιμότητα των κολλοειδών εξαιτίας της “χαλαρής” τους δομής, καθώς επίσης και το γεγονός ότι “το PNiPAm δεν είναι ποτέ υδρόφοβο [35]”, με αποτέλεσμα να συγκρατεί έως και ~70 % H₂O στην συρρικνωμένη κατάσταση.

Συγκρινόμενη με δημοσιευμένα αποτελέσματα για το σύστημα μικροπηκτών P(NiPAm-co-AAc), η επιφανειακή πυκνότητα φορτίου ($\sigma = 2.67 \text{ e.nm}^{-2}$) βρέθηκε περίπου δύο τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη [49]. Παράλληλα όμως στην εν λόγω μελέτη: *i*) η θερμική απόκριση του συστήματος σε pH = 8.6 (συνθήκες προσδιορισμού σ) είναι αμελητέα, γεγονός που οφείλεται στην ισχυρή παρεμπόδιση μετάβασης της *VPT* λόγω ηλεκτροστατικών απώσεων, *ii*) ο λόγος διόγκωσης μεταξύ ιοντισμένης (pH = 8.6) και ουδέτερης κατάστασης (pH = 3.6) υπολογίζεται ίσος με $\alpha_{pH} = 78.2$, παρέχοντας ευθεία απόδειξη της ομοιογενούς κατανομής των -COOH και *iii*) οι παραπάνω δύο προτάσεις πιστοποιούνται από την παρατιθέμενη τιμή της αναλογίας μεταξύ επιφανειακού και συνολικού φορτίου (1:1300). Επίσης είναι ενδεικτικό ότι για μικροπηκτές pNiPAm έχουν αναφερθεί τιμές $\sigma = 0.005 \text{ e.nm}^{-2}$, όπου τα φορτία οφείλονται αποκλειστικά σε κατάλοιπα -SO₄⁻ από τον εκκινητή [331]. Η επιφανειακή πυκνότητα φορτίου του PNS_Opt βρίσκεται σε πολύ καλή συμφωνία με αποτελέσματα για συστήματα πολυμερικών νανοσωματιδίων P(St-co-AAc) παραγόμενων με πολυμερισμό μίνι-γαλακτώματος [332] και *core/shell* πολυμερικών νανοσωματιδίων P(*n*BMA-co-MAAc) από πολυμερισμό γαλακτώματος [294]. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η υψηλή πυκνότητα φορτίου έχει προέλευση στον εξ ορισμού προτιμητέο πολυμερισμό του υδατοδιαλυτού μονομερούς στην επιφάνεια της υδρόφοβης σκληρής σφαίρας/πυρήνα. Κατ’ αντιστοιχία η υψηλή πυκνότητα φορτίου του PNS_Opt οφείλεται στον εκλεκτικό εμπλουτισμό της επιφάνειας με -COOH.

4.6 Συμπεράσματα

Η ανάγκη για την παρασκευή μικροπηκτών P(NiPAm-co-SA) με αριστοποιημένα χαρακτηριστικά και δυνατότητα χημικής μετατροποποίησης αποτέλεσε το κίνητρο για την ανάπτυξη ενός καινοτόμου συνθετικού πρωτοκόλου. Με βασικό γνώμονα την εν δυνάμει χρησιμοποίηση σε βιολογικές εφαρμογές, αποκλείστηκε η χρήση του SDS στην αντίδραση. Η μελέτη της επίδρασης του χρόνου εισαγωγής του SA οδήγησε στην παρασκευή μικροπηκτών με ποικιλόμορφη θερμική αποκρισσιμότητα ως απόρροια διαφορετικών μορφολογικών χαρακτηριστικών. Η κατασκευή μίας αλγεβρικής σχέσης επέτρεψε τον

ορισμό ενός κατάλληλου αριθμού αξιοπιστίας, μέσω του οποίου κατέστη εφικτή η αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης. Το τελικώς αριστοποιημένο προϊόν χαρακτηρίστηκε με τιτλοδότηση, απ' όπου πιστοποιήθηκε ο εκλεκτικός πολυμερισμός του SA στην επιφάνεια και υπολογίστηκε προσεγγιστικά η επιφανειακή πυκνότητα φορτίου. Σύμφωνα με τον προτεινόμενο μηχανισμό συνθετικού ελέγχου, το SA επάγει αμφιφιλικό χαρακτήρα στην επιφάνεια των αναπτυσσόμενων δευτερογενών πυρήνων, γεγονός που φαινομενολογικά δρα ως τασιενεργή ένωση επιτρέποντας την ομοιογενή πυρήνωση. Παράλληλα η διαφορά στους λόγους δραστηρότητας μεταξύ NiPAm/SA οδηγεί εγγενώς στην υιοθέτηση *core/shell* μορφολογίας. Οι μικροπηκτές PNS_Opt αποτέλεσαν την βάση για την παρασκευή πολυλειτουργικών νανοϋβριδικών υλικών.

Κεφάλαιο 5

Σύνθεση και Χαρακτηρισμός Φθορίζοντων και Φθορίζοντων/Μαγνητικών Πολυμερικών Μικροπηκτών με Βάση το PNIPAm

ΣΥΝΟΨΗ: Στο παρόν Κεφάλαιο περιγράφεται η πορεία παρασκευής και χαρακτηρισμού των Προηγμένων Νανοϋβριδικών Υλικών που αποτέλεσαν τον κεντρικό στόχο της παρούσης διατριβής. Στο πρώτο σκέλος περιγράφεται η μοριακή σύνθεση των λειτουργικών χρωμοφόρων οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την χημική μετατροποποίηση του αριστοποιημένου δείγματος PNS_Opt. Στην συνέχεια συζητείται η παρασκευή των θερμοαποκρίσιμων/φθορίζοντων, θερμοαποκρίσιμων/μαγνητικών και τριλειτουργικών νανοϋβριδικών υλικών. Ο μοριακός χαρακτηρισμός περιελάμβανε τις φασματοσκοπίες $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ και FT-IR. Οι φωτοφυσικές ιδιότητες των λειτουργικών χρωμοφόρων, των φθορίζοντων μικροπηκτών και των τριλειτουργικών νανοϋβριδικών υλικών εξετάστηκαν συνδυαστικά με φασματοσκοπία φθορισμού και φασματοσκοπία UV-Vis. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των παρασκευασθέντων υλικών στη φάση του αιωρήματος μελετήθηκαν με DLS ενώ ο χαρακτηρισμός στην στερεά κατάσταση πραγματοποιήθηκε με VSM και TGA.

5.1 Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε στο εισαγωγικό Κεφάλαιο 2, οι μικροπηκτές PNIPAm έχουν χρησιμοποιηθεί ως βάση για την παρασκευή *θερμοαποκρίσιμων/φθορίζοντων* υλικών και *θερμικά/μαγνητικά* αποκρίσιμων νανοϋβριδικών. Συμπληρωματικά, στο σημείο αυτό παρατίθενται ορισμένες ακόμα αντιπροσωπευτικές εργασίες, δίνοντας έμφαση στις στρατηγικές προετοιμασίας αυτής της κατηγορίας των νανοϋλικών και στις πιθανές εφαρμογές τους. Οι Wong et al. [333] παρασκεύασαν μαγνητικές μικροπηκτές PNIPAm μέσω της επιφανειακής εναπόθεσης πολλαπλών στρωμάτων PDADMAC/PSS και της ένθεσης προσχηματισμένων ΝΣΟΣ στον διαστρωματικό χώρο. Το υλικό επέδειξε απόκριση σε εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο, επάγοντας την μετάβαση στην συρρικνωμένη κατάσταση, καταδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο την δυνατότητα ενσωμάτωσης σε εφαρμογές υπερθερμίας και ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων. Οι Liz-Martan et al. [334] εναπόθεσαν *in situ* ΝΣ Ag στην επιφάνεια θερμοαποκρίσιμων νανοϋβριδικών μικροπηκτών με πυρήνα ΝΣΟΣ και κέλυφος PNIPAm για την παρασκευή κολλοειδών υποστρωμάτων SERS με αυξημένη ευαισθησία ανίχνευσης οργανικών ρύπων. Πολύ πρόσφατα, οι Jaiswal et al. [335] ενθυλάκωσαν ΝΣΟΣ στον πυρήνα μικροπηκτών PNIPAm, μέσω του συμβατικού πολυμερισμού κατακρήμνισης του NiPAm παρουσία προσχηματισμένων ΝΣΟΣ με επιφάνεια τροποποιημένη με PEG ή POSS. Η υβριδική

νανοδομή εξυπηρέτησε ως θεραγωγικό (θεραπευτικό/διαγνωστικό, theranostic) σύστημα για την ταυτόχρονη απεικόνιση με MRI και την πυροδοτούμενη αποδέσμευση της δοξορουβικίνης με ραδιοκύματα. Με δεδομένο λοιπόν το πολύ μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον γύρω από αυτή την κατηγορία υλικών, σχετικά λίγες εργασίες πραγματοποιούνται την σύνθεση *τριπλά λειτουργικών θερμοαποκρίσιμων/μαγνητικών/φθορίζοντων νανοϋλικών* [336-340]. Στα πλαίσια της βιβλιογραφικής ανασκόπησης δεν κατέστη δυνατός ο εντοπισμός αναφοράς σύμφωνα με την οποία η μαγνητική φάση και η φθορίζουσα λειτουργικότητα να ενσωματώνονται *απ' ευθείας* σε ικρίωμα από μικροπηκτική PNIPAm. Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε μία καινοτόμα διαδικασία παρασκευής τριλειτουργικών νανοϋβριδικών μικροπηκτών. Αρχικά, το αριστοποιημένο δείγμα PNS_Opt εξυπηρέτησε ως μήτρα για την επιφανειακή χημική τροποποίηση με χρωμοφόρα μόρια. Για αυτό τον σκοπό, συντέθηκε ένα νέο παράγωγο της φθορεσίνης με άμινο δραστηκότητα. Τα τελικά τριλειτουργικά υλικά προήλθαν μέσω της *in situ* εναπόθεσης μαγνητικών ΝΣΟΣ στην επιφάνεια των χημικά τροποποιημένων μικροπηκτών, χρησιμοποιώντας πρόδρομα διαλύματα αλάτων $\text{Fe}(\text{Cl})_3/\text{Fe}(\text{Cl})_2$. Στο στάδιο της εφαρμογής, τα υλικά εξυπηρέτησαν ως νανοφορείς για την ενθυλάκωση του αντικαρκινικού φαρμάκου δοξορουβικίνη.

5.2 Πειραματικό Μέρος

Στην πειραματική πορεία που ακολουθεί περιγράφεται *i*) η διαδικασία σύνθεσης δύο διαφορετικών χρωμοφόρων παραγώγων της φθορεσίνης, *ii*) η διαδικασία επιφανειακής χημικής τροποποίησης του PNS_Opt με φθορίζουσα χρωμοφόρα και *iii*) η διαδικασία εναπόθεσης των ΝΣΟΣ στην επιφάνεια των πρόδρομων και χημικά τροποποιημένων PNS_Opt@FL.

5.2.1 Μοριακή Σύνθεση

5.2.1.1 Καθαρισμός *N*-Διμεθυλοφορμαμίδιου (DMF) [341]

Ειδικά διαμορφωμένη συσκευή απόσταξης διαλυτών υψηλού σημείου ζέσεως (sort path) και σφαιρικές φιάλες των 500 ml εξοπλισμένες με κατάλληλα εσφυρίσματα καθαρίστηκαν σχολαστικά με ακετόνη και υδροφθόριο έπειτα από την τοποθέτησή τους σε φούρνο υψηλής θερμοκρασίας (6 h, 450 °C). Ποσότητα λεπτά διαμερισμένου υδριδίου του ασβεστίου (Acros Organics, CaH_2) εισήχθη στην σφαιρική φιάλη και προστέθηκε το DMF (Fisher, 300 ml). Το περιεχόμενο της φιάλης απαερώθηκε δις στην γραμμή υψηλού κενού και αφέθηκε υπό ανάδευση σε υψηλό κενό για 24 h για την εξάλειψη της προσροφημένης υγρασίας από τον διαλύτη. Την επόμενη ημέρα, έπειτα από δύο κύκλους απαέρωσης, το

απαλλαγμένο από υγρασία DMF αποστάχθηκε σε δεύτερη φιάλη 500 ml η οποία περιείχε πορώδη ρητίνη βενζυλοϊσοκυανικού εστέρα (ScavengePore benzyl isocyanate, Sigma) όπου και αφέθηκε για επιπλέον 24 h προς απομάκρυνση ιχνών υγρασίας και παραπροϊόντων που σχηματίστηκαν λόγω της θερμικής αποικοδόμησης κατά την απόσταξη. Στην συνέχεια η φιάλη με τον καθαρό διαλύτη απομακρύνθηκε από την γραμμή υψηλού κενού και μετά την διέλευση από ηθμό για την απομάκρυνση της ρητίνης, μεταφέρθηκε σε νέα φιάλη και αποθηκεύθηκε υπό αδρανή ατμόσφαιρα Ar προς αποφυγή της αποικοδόμησης του DMF, μακριά από υγρασία και ηλιακό φως. Ποιοτικό χαρακτηριστικό του επιτυχημένου καθαρισμού αποτελεί η απουσία της πρότερης δυσάρεστης ιχθυώδους οσμής του διαλύτη.

5.2.1.2 Σύνθεση Υδροβρωμικού Άλατος της 2-βρωμοαιθυλαμίνης (2-BEA•HBr) [342]

Σε σφαιρική φιάλη των 250 ml με εσμύρισμα η οποία περιέχει 100 ml διαλύματος υδροβρωμικού οξέος (8.92M, Sigma, 48%) προστέθηκαν στάγδην 15 ml (0.25 mol) αιθανολαμίνης (Sigma, 98%). Πρέπει να τονιστεί ότι η φιάλη παρέμεινε σε λουτρό πάγου πριν και κατά την διάρκεια της προσθήκης της αιθανολαμίνης καθώς αρχικά η αντίδραση είναι ισχυρά εξώθερμη. Η φιάλη προσαρμόστηκε σε αποστακτική συσκευή με δυνατότητα ρύθμισης του εφαρμοζόμενου κενού. Το μίγμα της αντίδρασης θερμάνθηκε σε ατμοσφαιρική πίεση έως το σημείο όπου παρατηρείται ήπια επαναρροή στα τοιχώματα της φιάλης και παρέμεινε σε αυτές τις συνθήκες για 3 h. Στο σημείο αυτό εφαρμόστηκε κενό στην διάταξη και αποστάχθηκαν 28 ml σε βαθμονομημένη φιάλη συλλογής. Το κενό μειώθηκε έως ότου παρατηρηθεί ξανά ήπια επαναρροή στα τοιχώματα της φιάλης και αφέθηκε για 1 h. Η διαδικασία επαναλήφθηκε αυτούσια για κλάσματα 10 ml, 9 ml, 4.5 ml, 4ml, 2 ml και 1.5 ml, ενώ στο τελικό στάδιο της αντίδρασης αποστάχθηκαν υπό κενό 35 ml από το διάλυμα της αντίδρασης. Το τελικό προϊόν της αντίδρασης είναι ένα πυκνότερο υγρό, σκούρου πορτοκαλί χρώματος και περιέχει το υδροβρωμικό άλας της 2-βρωμοαιθυλαμίνης μαζί με υδροβρωμικό οξύ και αιθανολαμίνη η οποία δεν έχει αντιδράσει. Κατά την ψύξη του ρευστού παρατηρείται η ανάπτυξη λευκών βελονοειδών κατακρημνισμάτων που συνίστανται στο καθαρό άλας. Έπειτα από την τοποθέτηση σε χαμηλή θερμοκρασία (3 °C) για 24 h ολοκληρώθηκε η διαδικασία ανάπτυξης των κρυστάλλων με τον σχηματισμό φυλλοειδών κατακρημνισμάτων. Το προϊόν εκπλύθηκε πολλαπλώς με ακετόνη και φιλτραρίστηκε με ηθμό Buchner έως ότου το διάλυμα έκπλυσης εμφανίζεται άχρωμο και διαυγές. Το τελικό λευκό κρυσταλλικό στερεό αφέθηκε να στεγνώσει διαδοχικά στον απαγωγό και σε φούρνο κενού πριν από την χρήση χωρίς περαιτέρω χαρακτηρισμό.

5.2.1.3 Σύνθεση *N*-(*tert*-βουτοξυκαρβονυλο)-2-βρωμοαιθύλο αμίνης (2-BEA-Boc) [343]

Σε σφαιρική φιάλη των 250 ml τοποθετήθηκαν 1.95 g (9 mmol) δι-(*tert*-βούτυλο) δικαρβονικού εστέρα (Di-*tert*-butyl dicarbonate, Alfa Aesar, 97%), 3.7 g (18 mmol) υδροβρωμικού άλατος της 2-βρωμοαιθυλαμίνης, 33 ml διχλωρομεθανίου (Sigma) και 13.7 ml απιονισμένου H₂O. Στο διφασικό διάλυμα που σχηματίζεται προστέθηκαν στάγδην 36 ml διαλύματος NaOH 1M υπό ισχυρή ανάδευση σε περίοδο 30 min. Η αντίδραση αφέθηκε υπό ισχυρή ανάδευση για 6 h σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ ανά τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν μικροποσότητες από την οργανική φάση για την παρακολούθηση της προόδου της αντίδρασης με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (thin layer chromatography, TLC) και χρώση με KMnO₄, καθώς η παραγόμενη ένωση *N*-(*tert*-βουτοξυκαρβονυλο)-2-βρωμοαιθυλαμίνη δεν εμφανίζει χρώμα ή φθορισμό. Η οργανική φάση εκπλύθηκε δις με διάλυμα όξινο ανθρακικού νατρίου 1M για την απομάκρυνση ιχνών υδροβρωμικού άλατος της 2-βρωμοαιθυλαμίνης καθώς η αντίδραση είναι σχεδόν ποσοτική (απόδοση ~95%). Η οργανική φάση συλλέχθηκε με διαχωριστική χοάνη και προστέθηκε στερεό θειϊκό νάτριο (Na₂SO₄, Sigma, anhydrous, 99%) για την απομάκρυνση της υγρασίας. Ακολούθησε φιλτράρισμα του διαλύματος με ηθμό Buchner και το διχλωρομεθάνιο απομακρύνθηκε στον περιστροφικό εξατμιστή (rotary evaporator). Η φιάλη με το παραγόμενο διαυγές ιξώδες ρευστό προϊόν τοποθετήθηκε σε γραμμή υψηλού κενού προς απομάκρυνση εγκλωβισμένου διαλύτη εως ότου ο ήχος από το πηνίο Tesla υποδηλώσει απουσία πτητικών στην διάταξη. Στην συνέχεια η φιάλη τοποθετήθηκε σε χαμηλή θερμοκρασία (3 °C) για 24h προς λήψη του τελικού προϊόντος με όψη και υφή διαυγούς κηρώδους στερεού το οποίο χρησιμοποιήθηκε χωρίς περαιτέρω χαρακτηρισμό.

5.2.1.4 Σύνθεση αιθυλ-2-(6-υδροξυ-3-οξο-3H-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκού εστέρα (FL Ester) [118]

Για την εστεροποίηση κατά Fischer της ελεύθερης καρβοξυλομάδας στο τμήμα του φθαλικού ανυδρίτη της φθορεσίνης (FL, Fluorescein, Sigma, free acid, dye content 95%), τοποθετήθηκαν σε σφαιρική φιάλη των 250 ml με εσμύρισμα, 10 g FL (30 mmol) και 150 ml αιθανόλης (EtOH, Sigma, reagent grade). Στο σχηματιζόμενο αιώρημα χαρακτηριστικού κεραμιδί-κόκκινου χρώματος προστέθηκαν στάγδην 8 ml (0.15 mol) πυκνού θειϊκού οξέος (H₂SO₄, Sigma, 95.0-98.0%). Παρατηρήθηκε απ' ευθείας αλλαγή στο χρώμα το οποίο μετετρέπη σε σκούρο καφέ, καθώς επίσης και σημαντική αύξηση της διαλυτότητας του στερεού περιεχομένου. Το διάλυμα αφέθηκε σε συνθήκες επαναρροής, σε θερμοκρασία ελαφρώς μεγαλύτερη από το σημείο βρασμού το μίγματος της αντίδρασης (~72 °C) για 24 h. Στην συνέχεια η EtOH απομακρύνθηκε στον περιστροφικό εξατμιστή και το υπόλειμμα

ξηράνθηκε σε φούρνο. Το στερεό διαλύθηκε σε χλωροφόρμιο (CHCl_3 , reagent grade, Fischer Scientific) με μερικές σταγόνες μεθανόλη (MeOH, reagent grade, Fischer Scientific), μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως για περαιτέρω επεξεργασία και προστέθηκε στερεό όξινο ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3 , Sigma) έως ότου παρατηρηθεί παύση του αφρισμού λόγω παραγωγής αερίου CO_2 από την αντίδραση εξουδετέρωσης με το H_2SO_4 . Το ιλυώδες προϊόν διαλύθηκε εκ νέου στην ίδια αναλογία διαλυτών και φιλτραρίστηκε με ηθμό Buchner. Η οργανική φάση εκπλύθηκε δις με διάλυμα NaOH 0.1M προς απομάκρυνση μη εστεροποιημένης FL, συλλέχθηκε στην διαχωριστική χοάνη, προστέθηκε στερεό Na_2SO_4 και φιλτραρίστηκε με ηθμό Buchner. Έπειτα από την απομάκρυνση των διαλυτών, το τελικό στερεό προϊόν εμφανίζει σκούρο καφέ χρώμα και διαλύεται εύκολα στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες και σε αλκαλικό H_2O . Η επιτυχής σύνθεση και απομόνωση της ένωσης πιστοποιήθηκε με $^1\text{H-NMR}$ και FT-IR (βλ. Παράρτημα Κεφαλαίου Σχήμα Π5.2 και Π5.8).

5.2.1.5 Σύνθεση αιθυλ-2-(6-(2-((*tert*-βουτοξυκαρβονυλο)αμινο)αιθοξυ)-3-οξο-3H-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκού εστέρα (FL-NH-Boc)

Σε σφαιρική φιάλη των 100 ml με εσμύρισμα τοποθετήθηκαν 1 g (2.78 mmol) FL Ester, 2.32 g (16.81 mmol) ανθρακικό κάλιο (K_2CO_3 , και 5 ml ξηρού DMF. Πρέπει να σημειωθεί ότι το στερεό K_2CO_3 αρχικά έχει ιλυώδη υφή εξαιτίας της φυσιοροφημένης υγρασίας. Για την πλήρη εξάλειψη της υγρασίας, η ποσότητα του K_2CO_3 τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσεως και ξηράνθηκε σε ελεύθερη φλόγα αποκτώντας τελικά υφή λεπτομερούς κόνεως. Έπειτα από την ανάδευση του μίγματος για 1 h σε RT, επιβεβαιώνεται ο σχηματισμός του ενεργοποιημένου φαινοξειδίου από την αλλαγή του χρώματος σε ζωηρό κόκκινο. Στην συνέχεια 1.88 g (8.39 mmol) 2-BEA-Boc διαλυμένα σε 5 ml DMF προστέθηκαν στάγδην και η αντίδραση αφέθηκε για 24 h σε RT υπό αδρανή ατμόσφαιρα αερίου αργού (Ar). Η πρόοδος της αντίδρασης μελετήθηκε με TLC της οργανικής φάσης χρησιμοποιώντας το σύστημα CH_2Cl_2 . Η κατανάλωση του FL Ester υπήρξε ατελής σε αυτές τις συνθήκες και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 40 °C χρησιμοποιώντας λουτρό ελαίου. Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε στο ~ 60 % έπειτα από 48 h και η αντίδραση διεκόπη. Για την απομάκρυνση του DMF χρησιμοποιήθηκε ειδικά διαμορφωμένη συσκευή απόσταξης σε υψηλό κενό ενώ για την λήψη του προϊόντος της αντίδρασης ακολουθήθηκε παρόμοια πορεία με την ένωση FL Ester. Στο τελικό στάδιο επεξεργασίας, το προϊόν της αντίδρασης διαλύθηκε σε μίγμα CH_2Cl_2 95% - MeOH 5% και διήλθε μέσα από στήλη πληρωμένη με πηκτική πυριτίας για την απομόνωση του FL-NH-Boc. Μετά από παρατεταμένη ξήρανση υπό κενό ούτως ώστε να απομακρυνθούν ίχνη διαλύτη, η καθαρή ένωση είναι ένα στερεό σκούρου κόκκινου χρώματος. Η ένωση χαρακτηρίστηκε με $^1\text{H-NMR}$ (Σχήμα Π5.3), $^{13}\text{C-NMR}$ (Σχήμα Π5.5) και FT-IR (Σχήμα Π5.8).

5.2.1.6 Σύνθεση αιθυλ-2-(6-(2-αμινοαιθοξύ)-3-οξο-3H-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκού εστέρα (FL-NH₂)

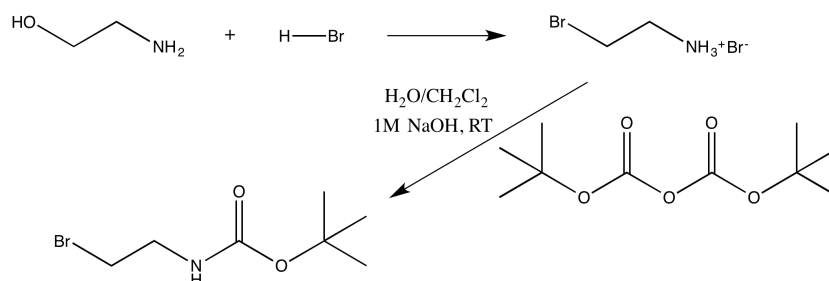
Η αποπροστασία της Boc ομάδας από την ένωση FL-NH-Boc πραγματοποιήθηκε μέσω της αντίδρασης με περίσσεια τριφθοροξικού οξέος (TFA) για 24 h. Το TFA απομακρύνθηκε σε ελεύθερη ροή χρησιμοποιώντας υδραντλία και διαδοχικές εκπλύσεις με εξάνιο. Η αντίδραση απέδωσε σχεδόν ποσοτικά το τριφθοροξικό 2-((9-(2-(αιθόξυ)φαινυλο)-3-οξο-3H-ξανθεν-6-υλ)οξυ)αιθαν-1-αμμωνιακό άλας (FL-NH₃⁺•TFA⁻) ως ενδιάμεσο προϊόν. Για την απομάκρυνση ιχνών πρόδρομης ένωσης FL-NH-Boc, το προϊόν της αντίδρασης αποπροστασίας εκχυλίστηκε στο σύστημα EtAc / H₂O. Το FL-NH₃⁺•TFA⁻ απομονώθηκε στην υδατική φάση, συμπυκνώθηκε στον περιστροφικό εξατμιστή, ξηράνθηκε με διαδοχικές εκπλύσεις διαιθυλαιθέρα/εξανίου και ακολούθησε λυοφιλοποίηση. Το FL-NH₃⁺•TFA⁻ λήφθηκε ως σκληρό ιλύώδες στερεό και φυλάχθηκε στους 4 °C μακριά από το ηλιακό φως. Η καθαρή ένωση FL-NH₂ προετοιμάστηκε αμέσως πριν την πραγματοποίηση των πειραμάτων χημικής τροποποίησης των PNS_Opt διαλύοντας κατάλληλη ποσότητα FL-NH₃⁺•TFA⁻ σε DMF και εξουδετερώνοντας το σύμπλοκο με 2 eq. άνδρης τριαιθυλαμίνης (TEA, Sigma, 99%). Η ένωση χαρακτηρίστηκε με ¹H-NMR (Σχήμα Π5.4), ¹³C-NMR (Σχήμα Π5.6) και (Σχήμα Π5.8) FT-IR.

5.2.1.7 Σύνθεση Χλωριδίου του Μεθακρυλικού Οξέος (MAAcCl)

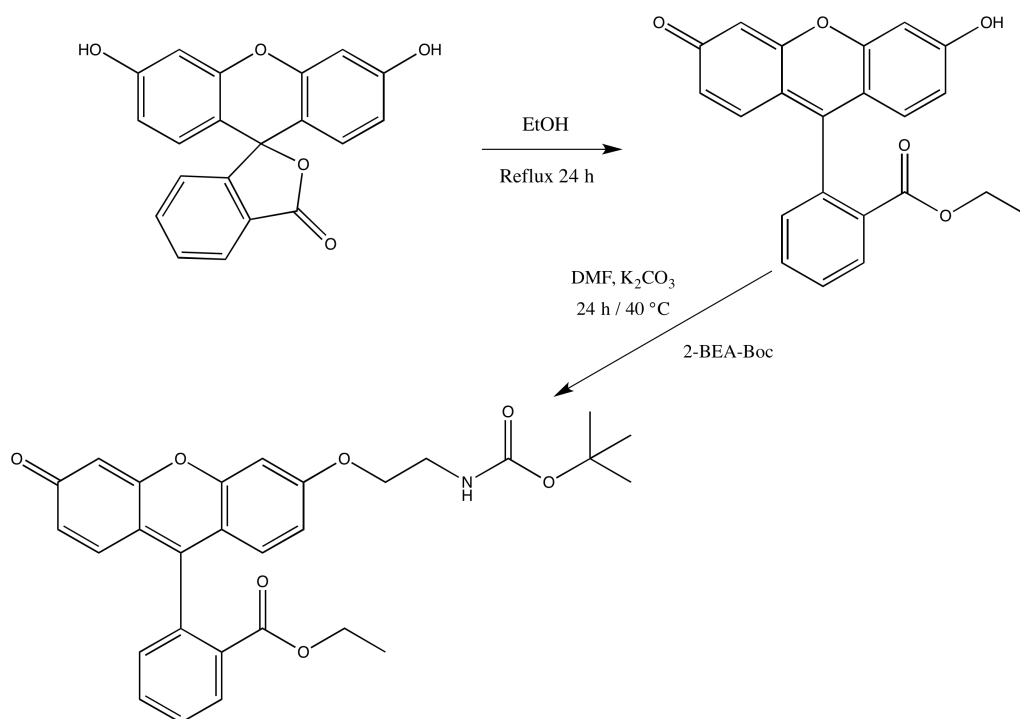
Σε σφαιρική φιάλη των 100 ml η οποία αμέσως πριν είχε ξηραθεί σε ελεύθερη φλόγα τοποθετήθηκαν γρήγορα 5 ml (68.8 mmol) θειόνυλο χλωριδίου (SOCl₂, Riedel-de Haën, reagent grade, 97%) και εν συνεχεία 3.89 ml (45.9 mmol) μεθακρυλικού οξέος (MAAc, Sigma, 99%). Η φιάλη ήταν τοποθετημένη σε λουτρό πάγου και το μίγμα βρισκόταν υπό ήπια ανάδευση. Στην φιάλη προσαρμόστηκε διάταξη επαναροής και αφέθηκε στους ~ 75 °C σε λουτρό ελαίου. Αρχικά παρατηρήθηκε ήπιος βρασμός που οφείλεται στην παρουσία ελεύθερου SOCl₂ (σ.β. SOCl₂ = 74.6 °C, σ.β. MAAcCl = 96 °C, σ.β. MAAc = 161 °C). Όσο η αντίδραση προχωρούσε, η ένταση του βρασμού μειωνόταν σταδιακά υποδεικνύοντας την κατανάλωση του SOCl₂ προς σχηματισμό MAAcCl. Έπειτα από ~2 h το επίπεδο βρασμού παρέμεινε σταθερό και ελάχιστο, ενώ το χρώμα της αντίδρασης είχε μεταβληθεί από διαυγές σε υποκίτρινο. Η περίσσεια του SOCl₂ απομακρύνθηκε στον περιστροφικό εξατμιστή στους 78 °C μέχρι επίτευξης σταθερού όγκου. Η φιάλη πληρώθηκε με αδρανές αέριο Ar, σφραγίστηκε και τοποθετήθηκε στους 4 °C για μελλοντική χρήση.

5.2.1.8 Σύνθεση 2-(6-(μεθακρυλοϋλ)-3-οξο-3H-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκού οξέος (FL-MAAc)

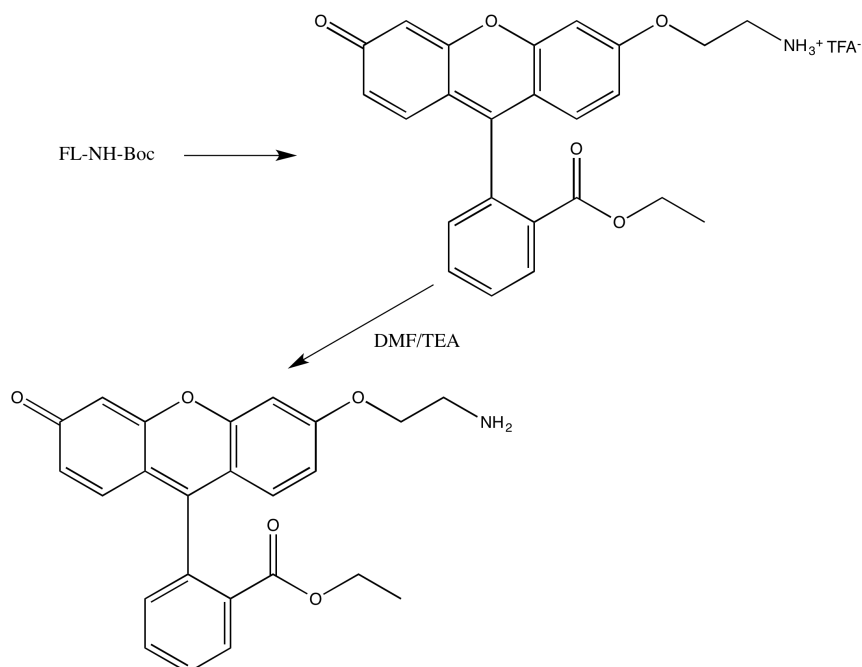
Σε σφαιρική φιάλη των 100 ml εξοπλισμένη με εσμύρισμα, η οποία αμέσως πριν είχε ξηραθεί σε ελεύθερη φλόγα, προστέθηκε 1 g (3 mmol, 1 eq.) FL. Η φιάλη προσαρμόστηκε σε αποστακτική συσκευή για την απ' ευθείας προσθήκη 100 ml άνυδρου τετραϋδροφουρανίου (THF, reagent grade, Fischer Scientific). Το THF είχε παραμείνει σε συνθήκες επαναροής παρουσία λεπτά διαμερισμένου μεταλλικού καλίου για ~ 4 h. Η φιάλη σφραγίστηκε με ελαστομερικό πώμα και το περιεχόμενο απαερώθηκε με διέλευση ξηρού Ar. Στο ερυθρόχρουν αιώρημα προστέθηκαν 3 eq. άνυδρης TEA (1.25 ml) σε ήπια ανάδευση και ενώ η φιάλη είχε τοποθετηθεί σε λουτρό πάγου. Η παρουσία της TEA εξασφαλίζει αφενός την εξουδετέρωση του παραγόμενου HCl από την αντίδραση εστεροποίησης και αφετέρου την υιοθέτηση της κινουειδούς μορφής συντονισμού της FL λόγω των βασικών συνθηκών, ελαχιστοποιώντας με αυτό τον τρόπο την παραγωγή της διυποκατεστημένης μορφής του FL-MAAc. Στην συνέχεια προστέθηκαν 1.25 eq. (366 μl) MAACl και αμέσως παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή του χρώματος σε έντονο πορτοκαλί, ενώ επίσης σημαντική ήταν και η κατακρήμνιση λευκού στερεού το οποίο αναγνωρίστηκε ως το υδροχλωρικό άλας της TEA. Η αντίδραση αφέθηκε για 24 h και τα στερεά υπολείματα απομακρύνθηκαν με φιλτράρισμα Buchner. Το THF απομακρύνθηκε στον περιστροφικό εξατμιστή και το προϊόν διαλύθηκε εκ νέου σε EtAc για την περαιτέρω επεξεργασία. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση με όξινο υδατικό διάλυμα για την απομάκρυνση της περίσσειας TEA. Στην συνέχεια ακολούθησαν δύο κύκλοι εκχύλισης με κορεσμένο υδατικό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου για την απομάκρυνση μη αντιδρώσας FL και παραπροϊόντων MAAC από ενδεχόμενη υδρόλυση του MAACl. Κατά την υδατική επεξεργασία σε αλκαλικές συνθήκες, ένα κλάσμα του FL-MAAc διέφυγε μαζί με μή αντιδρώσα FL στην υδατική φάση. Το τελικό προϊόν, χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ (Σχήμα Π5.7).



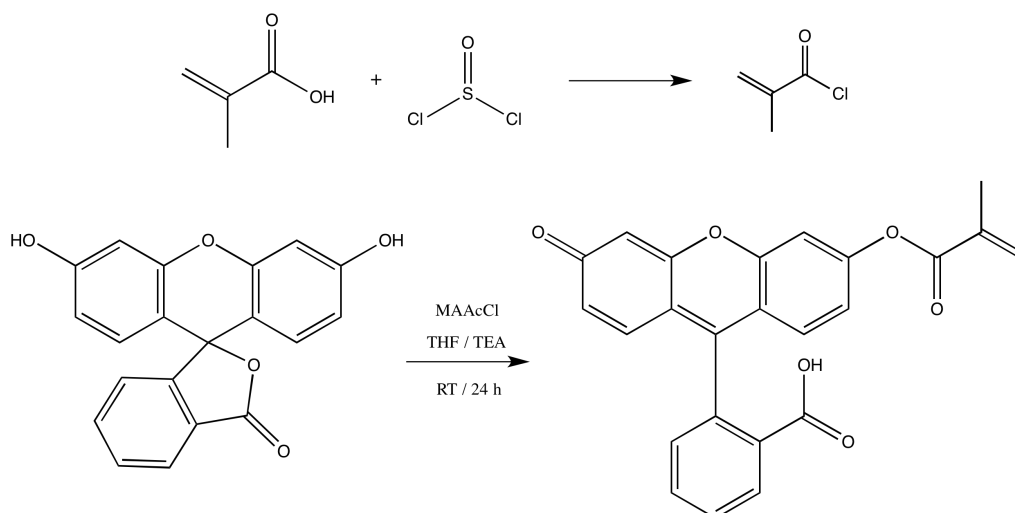
Σχήμα 5.1. Πειραματική πορεία σύνθεσης υδροβρωμικού άλατος της αιθylaμίνης (2-BEA•HBr) και N-(tert-βουτοξυκαρβονυλο)-2-βρωμοαιθυλο αμίνης (2-BEA-Boc).



Σχήμα 5.2 Πειραματική πορεία σύνθεσης αιθυλ-2-(6-(2-((*tert*-βουτοξυκαρβονυλο)αμινο)-αιθοξυ)-3-οξο-3*H*-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκού εστέρα (FL-NH-Boc).



Σχήμα 5.3 Πειραματική πορεία σύνθεσης αιθυλ-2-(6-(2-αμινοαιθοξυ)-3-οξο-3*H*-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκού εστέρα (FL-NH₂).



Σχήμα 5.4 Πειραματική πορεία σύνθεσης 2-(6-(μεθακρυλοϋλ)-3-οξο-3H-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκού οξέος (FL-MAAc).

5.2.2 Χημική Τροποποίηση PNS_Opt με Χρωμοφόρες - Παράγωγα Φθορεσίνης

5.2.2.1 Παρασκευή Φθορίζοντων Μικροπηκτών (PNS@FL) με Χημική Τροποποίηση της Επιφάνειας μετά τον Πολυμερισμό (post-polymerization modification)

Σε ένα τυπικό πείραμα, 250 mg PNS_Opt, το οποίο έχει προηγουμένως υποστεί την κατεργασία που περιγράφηκε στην Παράγραφο 4.3.1, τοποθετούνται σε ελεύθερη υγρασία σφαιρική φιάλη των 50 ml, προστίθενται 25 ml άνυδρου DMF ($C_p = 1\% \text{ w.v}$) και η φιάλη σφραγίζεται με ελαστομερικό πώμα. Καθ' όλη την διάρκεια της αντίδρασης επικρατούσαν αδρανείς συνθήκες προσαρμόζοντας μπαλόνι πληρωμένο με Ar στην φιάλη. Οι μικροπηκτές διεσπάρθηκαν με χρήση λουτρού υπερήχων για $\sim 1 \text{ hr}$ σε θερμοκρασία δωματίου. Η πλήρης διασπορά και η απουσία συσσωματωμάτων επιβεβαιώθηκε μέσω μετρήσεων DLS χρησιμοποιώντας κυψελίδα Quartz. Στην συνέχεια η διασπορά ψύχθηκε σε λουτρό νερού/πάγου στους $\sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$ και αφέθηκε μέχρι επίτευξης θερμικής ισοροπίας ($\sim 30 \text{ min}$). Η στοιχειομετρία της αντίδρασης εξήχθη από τα πρότερα αποτελέσματα χαρακτηρισμού του PNS_Opt. Το θεωρητικό κλάσμα μάζας του SA στο PNS_Opt είναι ίσο με 0.079 mg/mg , το οποίο αντιστοιχεί σε $0.84 \text{ } \mu\text{mol SA / mg PNS}_\text{Opt}$. Μέσω της pH-μετρικής τιτλοδότησης βρέθηκε ότι το πειραματικό κλάσμα είναι 89% του θεωρητικού, συνεπώς ενυπάρχουν $0.89 \times 0.84 = 0.75 \text{ } \mu\text{mol SA / mg of PNS}_\text{Opt}$. Τα επιφανειακά φορτία αντιστοιχούν στο 68.4% των συνολικών, άρα βρίσκεται ότι εντοπίζονται $0.51 \text{ } \mu\text{mol επιφανειακών -COOH / mg of PNS}_\text{Opt}$. Η βέλτιστη στοιχειομετρία προσδιορίστηκε στο 25% επί των συνολικών -COOH, συνεπώς για το δεδομένο πείραμα $32 \text{ } \mu\text{mol επιφανειακών -COOH}$ συμμετείχαν στην αντίδραση σύζευξης. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων σύζευξης ορίστηκαν σε 10%

περίσσεια. Η ποσότητα της TEA ορίστηκε στα 2 eq. επί των συνολικών -COOH. Όλα τα στερεά αντιδραστήρια διαλύθηκαν αμέσως πριν την εισαγωγή σε ελάχιστη ποσότητα άνυδρου DMF. Μέσω ένεσης εισήχθησαν με αυτή την σειρά: 57 μl TEA, 5.7 mg υδροξυβενζοτριαζολίου (HOBT, 97%, Sigma), 7.2 mg δικυκλοεξυλοκαρβοδιμιδίου (DCC, 99%, Aldrich) και 14.1 mg FL-NH₂. Το μίγμα της αντίδρασης χαρακτηρίζεται από έντονα φωτεινό πορτοκαλί χρώμα. Η θερμοκρασία της αντίδρασης αφέθηκε να ανέβει πολύ αργά (~ 8 h) στους 35 °C όπου και αφέθηκε για επιπλέον 48 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το DMF αποστάχθηκε σε υψηλό κενό χρησιμοποιώντας ειδικά διαμορφωμένη συσκευή. Οι τροποποιημένες μικροπηκτές PNS@FL25 επαναδιαεσπάρθηκαν σε ήπια αλκαλικές συνθήκες (0.5 mM NaOH) μέσω υπερήχησης, σε τελική συγκέντρωση 1% w. Στην διασπορά περιέχεται αδιάλυτη δικυκλοεξυλουρία (DCU) που αποτελεί παραπροϊόν της αντίδρασης σύζευξης. Η DCU απομακρύνθηκε με φυγοκέντριση στις 3000 RPM για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου, καθώς σε αυτές τις συνθήκες κατακρημνίζεται η DCU ενώ τα PNS@FL25 παραμένουν στο υπερκείμενο. Η καθαρή διασπορά PNS@FL25 τοποθετήθηκε σε μεμβράνη διαπίδησης (Spectrapore, 3 kDa cutoff) για την απομάκρυνση περίσσειας FL-NH₂. Η τελική συγκέντρωση του αιωρήματος υπολογίστηκε λαμβάνοντας υπόψιν την μάζα του κατακρημνίσματος έπειτα από την ξήρανση των δοκιμαστικών σωλήνων και τον τελικό όγκο στην μεμβράνη διαπίδησης έπειτα από 48 h. Για την μελέτη με DLS, η στοκ διασπορά αραιώθηκε σε συγκέντρωση 0.2% w.v με ρύθμιση του pH χρησιμοποιώντας διαλύματα HCl 0.01M και NaOH 0.01M. Για την μελέτη με φασματοσκοπία UV-Vis και φασματοσκοπία φθορισμού, οι διασπορές αραιώθηκαν κατάλληλα (βλ. Παράγραφο 5.3.4). Τα PNS@FL25 θρομβώθηκαν σε όξινο pH και $T > VPTT$ για την λήψη στερεού και την μελέτη με φασματοσκοπία FT-IR και φασματοσκοπία NMR. Τα PNS@FL25 αποθηκεύτηκαν για μελλοντική χρήση στους 4 °C μακριά από το ηλιακό φως.

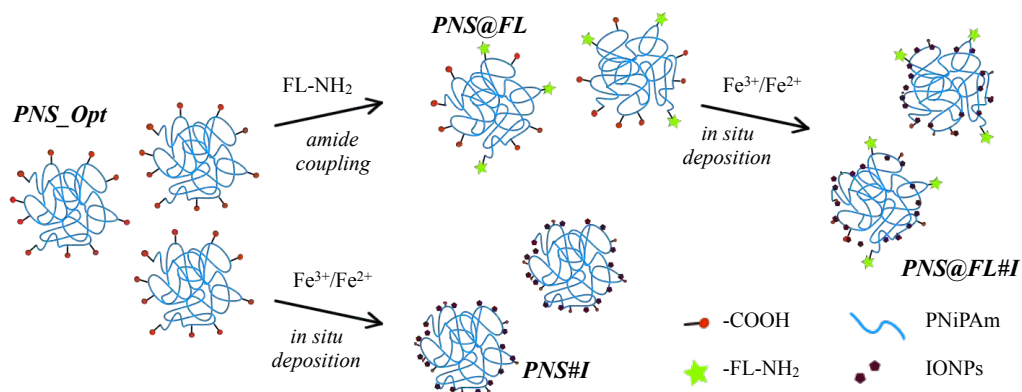
5.2.2.2 Παρασκευή Φθορίζοντων Μικροπηκτών [P(NS-co-FL)] με Συμπολυμερισμό Λειτουργικού Μονομερούς (functional monomer copolymerization)

Αρχικά, για την παρασκευή φθορίζοντων μικροπηκτών του τύπου P(NiPAm-co-SA-co-FL-MAAc), επιχειρήθηκε ανεπιτυχώς η απευθείας διάλυση του FL-MAAc στο υδατικό διάλυμα της αντίδρασης λόγω της φτωχής διαλυτότητας του φθορίζοντος μονομερούς. Για την διαλυτοποίηση του ακολουθήθηκε τέχνασμα, όπου το FL-MAAc διαλυόταν σε καλό και αναμίξιμο με το H₂O διαλύτη (ακετονιτρίλιο) και προστέθηκε στάγδην στην αντίδραση. Μετά την έναρξη του πολυμερισμού η διασπορά, το χρώμα της διασποράς παρέμεινε σχετικά διαυγές υποδηλώνοντας ανεπιτυχή σχηματισμό πρωτογενών σωματιδίων, ενώ την ίδια στιγμή παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση του φθορισμού. Η

στρατηγική παρασκευής των φθορίζοντων μικροπηκτών του τύπου P(NiPAm-co-SA-co-FL-MAAc) εγκαταλείφθηκε για λόγους που παρατίθενται στο Παράρτημα του Κεφαλαίου.

5.2.3 Εναπόθεση *in situ* Μαγνητικών ΝΣΟΣ στην Επιφάνεια Μικροπηκτών του Τύπου PNS_Opt και PNS@FL25

Οι αντιδράσεις εναπόθεσης των ΝΣΟΣ στην επιφάνεια των μικροπηκτών πραγματοποιήθηκαν σε αλκαλικές συνθήκες (0.1 M NaOH) και τελική συγκέντρωση 0.2% w.v. Τυπικά, 50 mg PNS_Opt ή PNS@FL25 διασπάρθηκαν αρχικά σε ουδέτερο pH με υπερήχηση σε συγκέντρωση 4 mg/ml, ακολούθησε προσθήκη 2.5 ml NaOH 1M και 10 ml H₂O ($C_p = 2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) και η διασπορά απαερώθηκε με ήπια ροή N₂. Καθ' όλη την διάρκεια της αντίδρασης επικρατούσαν αδρανείς συνθήκες και ανάδευση με σχηματισμό της ελάχιστης δυνατής περιδίνησης. Στην συνέχεια παρασκευάστηκε διάλυμα Fe³⁺/ Fe²⁺ 36 mM: 18mM (48.7 mg Fe(Cl)₃•6H₂O, 97%, Sigma και 17.9 mg Fe(Cl)₂•4H₂O, 97%, Sigma) σε 0.1M HCl, το οποίο απαερώθηκε σε ρεύμα N₂ χρησιμοποιώντας σωληνάκι Teflon (το διάλυμα είναι ισχυρά διαβρωτικό). Ακολούθησε περαιτέρω αραιώση 1:10 προς λήψη του τροφοδοτούμενου διαλύματος αλάτων σιδήρου συγκέντρωσης 3.6 mM:1.8 mM Fe³⁺/ Fe²⁺ σε 0.1 M HCl. Για την επίτευξη διαφορετικών ποσοστών φόρτωσης ανόργανης φάσης προστέθηκαν οι εξής όγκοι διαλύματος τροφοδοσίας: για τα PNS#14 (PNS_Opt με 4% w.w ανόργανη φάση) και PNS#8, 4.65 ml και 9.3 ml αντίστοιχα, ενώ για τα PNS@F25#I6 και PNS@F25#I10, 7 ml και 11.7 ml αντίστοιχα. Ο ρυθμός ενστάλαξης ορίστηκε στο 0.5 ml.min⁻¹ χειροκίνητα με σύριγγα PP των 5 ml. Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης η αντίδραση αφέθηκε για 1 h και έπειτα ακολούθησε καθαρισμός με μεμβράνη διαπίδησης για την εξάλειψη της αυξημένης ιοντικής ισχύος. Μετά τον καθαρισμό η διασπορά είναι ασταθής εξαιτίας: *i*) των μαγνητικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των νανοϋβριδικών κολλοειδών και *ii*) της εξουδετέρωσης της ηλεκτροστατικής/στερεοχημικής συμβολής λόγω της εξουδετέρωσης του επιφανειακού φορτίου. Με σκοπό την προαγωγή κολλοειδούς σταθερότητας, προστέθηκε μικρή ποσότητα πολυ(σουλφονικού νατρίου στυρενίου) (PSS, $\langle M_w \rangle \approx 70 \text{ kDa}$, Aldrich) (57 μg / mg υβριδικού υλικού) πριν από την σύντομη υπερήχηση για 3 min και την επίτευξη πλήρους επαναδιασποράς. Η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων για τον χαρακτηρισμό είναι όμοια με την διαδικασία που περιγράφηκε στην παράγραφο 5.2.2. Τα νανοϋβριδικά υλικά μελετήθηκαν επιπρόσθετα με TGA και VSM. Η θρόμβωση του υλικού για την μελέτη στην στερεά κατάσταση πραγματοποιήθηκε πριν από την προσθήκη PSS, χρησιμοποιώντας μικρή ποσότητα αδιάλυτου οξικού οξέος αντί του HCl, καθώς το τελευταίο μπορεί να προσβάλλει χημικά τα ΝΣΟΣ.



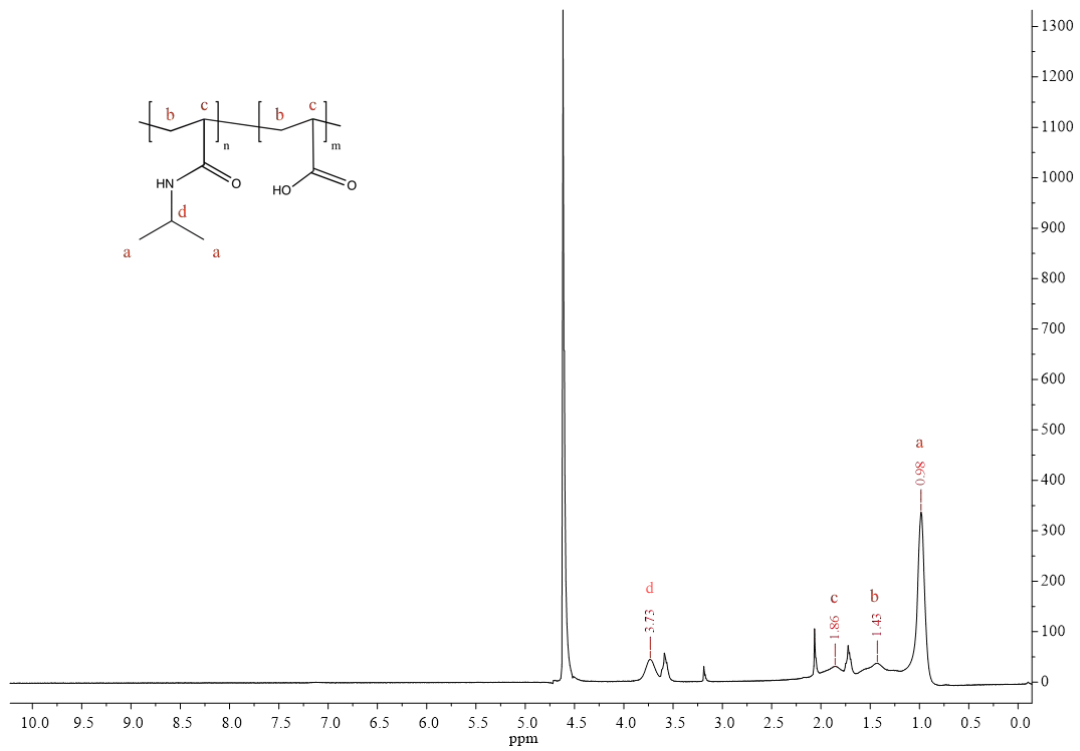
Σχήμα 5.5 Σχηματική αναπαράσταση πορείας παρασκευής θερμοαποκρίσιμων/φθορίζοντων μικροπηκτών $PNS@FL$, θερμοαποκρίσιμων/μαγνητικών νανοϋβριδικών $PNS\#I$ και τριπλά λειτουργικών θερμοαποκρίσιμων/φθορίζοντων/μαγνητικών νανοϋβριδικών $PNS@FL\#I$.

5.3 Αποτελέσματα - Συζήτηση

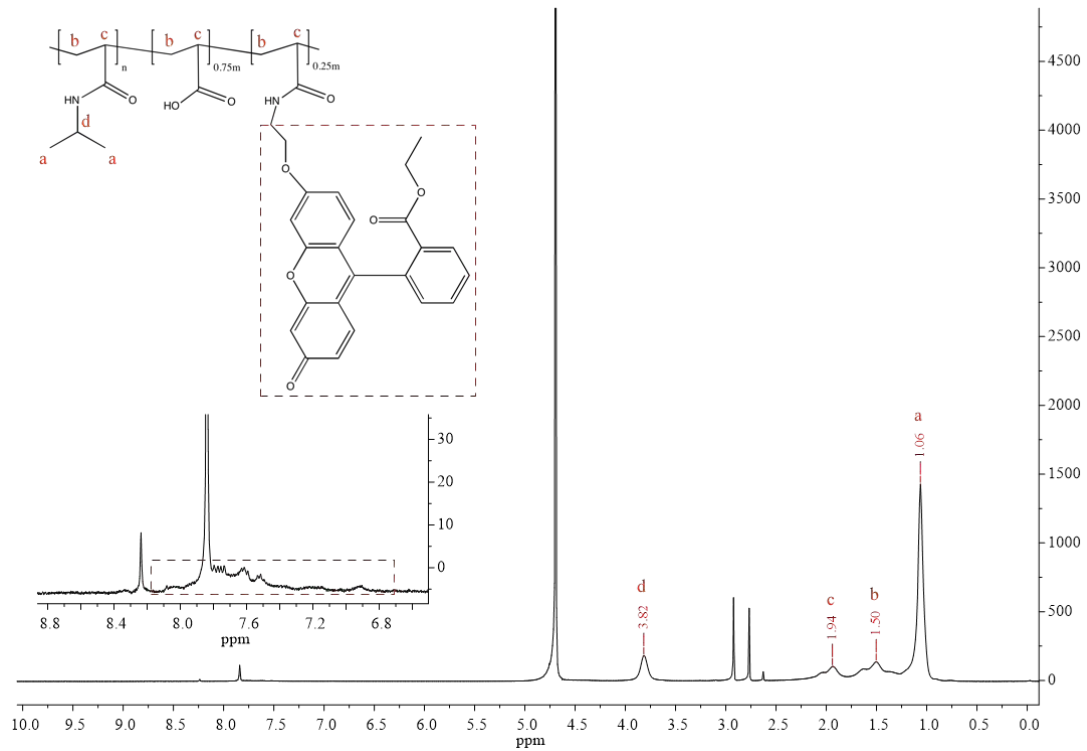
5.3.1 Αποτελέσματα Μοριακού Χαρακτηρισμού PNS_Opt , $PNS@FL$ και $PNS@FL\#I$

5.3.1.1 Αποτελέσματα Φασματοσκοπίας NMR

Η συγκέντρωση του πολυμερούς για τα φάσματα 1H -NMR ορίστηκε στα 5 mg/ml και χρησιμοποιήθηκε D_2O (Deuterium oxide, Sigma, 99.9% atom D). Για τον σχηματισμό ομοιογενούς αιωρήματος τα υλικά τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων για 10 min σε $T = 25\text{ }^\circ C$ πριν την τοποθέτηση στους δειγματοφορείς. Στο φάσμα 1H -NMR για το PNS_Opt (Σχήμα 5.6) είναι ευδιάκριτες οι ευρείες κορυφές των πρωτονίων της κύριας ανθρακικής αλυσίδας και των ισοπροπυλικών υποκαταστατών. Οι οξείες κορυφές οφείλονται στην παρουσία ιχνών του μίγματος διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό του δειγματοφορέα (MeOH, Ac, THF). Η οξεία κορυφή στα 4.62 ppm οφείλεται στην παρουσία ~0.1 % H_2O στον δευτεριωμένο διαλύτη. Η επιτυχημένη χημική τροποποίηση του $PNS@FL25$ πιστοποιήθηκε μέσω του συνδυασμού τεχνικών χαρακτηρισμού. Τα αποτελέσματα από τις φασματοσκοπικές τεχνικές 1H -NMR και FT-IR αξιολογήθηκαν μαζί με τα αποτελέσματα του χαρακτηρισμού με DLS και ποιοτική οπτική εξέταση. Για την ερμηνεία του φάσματος 1H -NMR για το $PNS@FL25$ (Σχήμα 5.7) είναι απαραίτητο να υπολογιστεί το θεωρητικό ποσοστό των τροποποιημένων δομικών μονάδων. Η πειραματικά



Σχήμα 5.6 Φάσμα 1H -NMR πρόδρομων μικροπηκτών PNS_{Opt} .



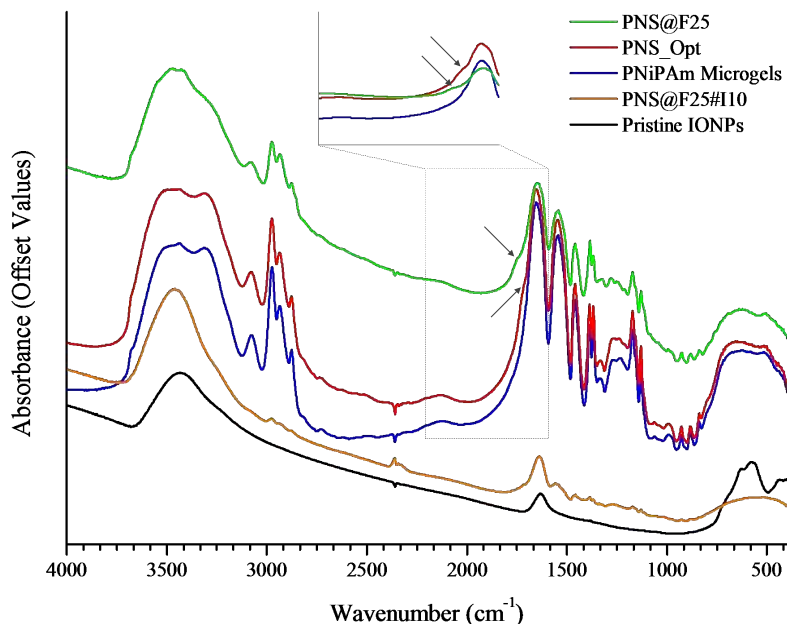
Σχήμα 5.7 Φάσμα 1H -NMR τροποποιημένων μικροπηκτών $PNS@FL25$.

προσδιορισμένη στοιχειομετρική αναλογία [SA]:[NiPAm] βρίσκεται ίση με $0.89 \times (1:8.7) = 1:9.8$. Σύμφωνα με τους θεωρητικούς υπολογισμούς (Παρ. 5.2.2.1), το μοριακό κλάσμα των τροποποιημένων καρβοξυλομάδων σε σχέση με το NiPAm ισούται με $(0.68) \times (0.25) \times (1:9.8) = 1:57.7$, με άλλα λόγια για κάθε 57.7 δομικές μονάδες NiPAm αντιστοιχεί μία ομάδα -CONH@FL. Η δεδομένη αναλογία, ενώ στάθηκε ικανή να προσδώσει σημαντική ένταση φθορισμού στις μικροπηκτές, αφήνει φτωχό φασματοσκοπικό αποτύπωμα. Παρ' όλα αυτά, το άθροισμα των ολοκληρωμάτων των διακρινόμενων αρωματικών κορυφών από τα 6.8 έως τα 8.4 ppm βρέθηκε ίσο ότι αντιστοιχεί σε ~ 0.19 πρωτόνια, λαμβάνοντας ως αναφορά την τιμή του ολοκληρώματος του H στα 3.82 ppm. Με δεδομένο ότι οι αρωματικοί δακτύλιοι της FL φέρουν 10 πρωτόνια, υπολογίζεται ότι το θεωρητικό ολοκλήρωμα πρέπει να ισούται με $(1:57.7) \times 10 = 0.17$. Η ασυμφωνία μεταξύ των δύο τιμών είναι απόρροια του ανακριβούς προσδιορισμού του υποβάθρου (baseline) και της παρουσίας ακαθαρσίας διαλύτη DMF στον δειγματοφορέα. Παρόμοια φασματοσκοπικά προφίλ πολυμερών έχουν αναφερθεί για εξίσου χαμηλά ποσοστά υποκατάστασης με παράγωγα φθορεσίνης [344, 345] ή χρωμοφόρες με αρωματικές ομάδες [283].

5.3.1.2 Αποτελέσματα Φασματοσκοπίας FT-IR

Σε αντιστοιχία με τον χαρακτηρισμό των μοριακών ενώσεων (βλ Παράρτημα Κεφαλαίου 5), τα υλικά λειοτριβήθηκαν μαζί με KBr πριν την μελέτη με FT-IR (Σχήμα 5.8). Για λόγους σύγκρισης, παρατίθενται τα φάσματα μικροπηκτών PNiPAm και “καθαρών” ΝΣΟΣ που έχουν παραχθεί με την μέθοδο της συγκαταβύθισης αλάτων σιδήρου. Στο φάσμα των “καθαρών” ΝΣΟΣ διακρίνονται τρεις περιοχές απορρόφησης: η κορυφή στους 574 cm^{-1} σχετίζεται με τις δονήσεις τάσης των δεσμών Fe-O, η κορυφή στους 1631 cm^{-1} οφείλεται στις δονήσεις κάμψης των επιφανειακών υδροξυλομάδων [346], ενώ η ευρεία μπάντα πάνω από 2900 cm^{-1} είναι χαρακτηριστική της παρουσίας προσροφημένου H_2O [347]. Στα φάσματα των PNiPAm και PNS_Opt αποτυπώνεται η δυσκολία πιστοποίησης των οργανικών τροποποιήσεων με φασματοσκοπικές μεθόδους, όταν υπάρχει ταύτιση των περιοχών απορρόφησης των επιμέρους ομάδων. Η ισχυρή κορυφή στους 1652 cm^{-1} είναι κοινή και στα δύο υλικά και αντιπροσωπεύει τις δονήσεις κάμψης των αμιδικών καρβονυλίων ($1690 - 1630 \text{ cm}^{-1}$). Ο χαρακτηριστικός “ώμος” στο PNS_Opt οφείλεται στην συνεισφορά των όξινων καρβονυλίων ($1780 - 1710 \text{ cm}^{-1}$) και συμπληρωματικά με τις υπόλοιπες τεχνικές χαρακτηρισμού μπορεί να πιστοποιηθεί ο επιτυχημένος συμπολυμερισμός του SA. Αντιστοίχως, στο οργανικά τροποποιημένο υλικό PNS@FL25 είναι χαρακτηριστική η ανάδυση του μικρού ώμου στους $\sim 1735 \text{ cm}^{-1}$ λόγω της απορρόφησης των εστερικών ομάδων στην χρωμοφόρα-υποκαταστάτη. Το φάσμα του τελικού νανούβριδικού υλικού PNS@F25#I10 χαρακτηρίζεται από την υπέρθεση της απορρόφησης

της οργανικής φάσης PNS@FL25 επάνω στην απορρόφηση των ΝΣΟΣ, όπως γίνεται εμφανές στην περιοχή “δακτυλικού αποτυπώματος” και στην παρουσία της κορυφής στους $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$.

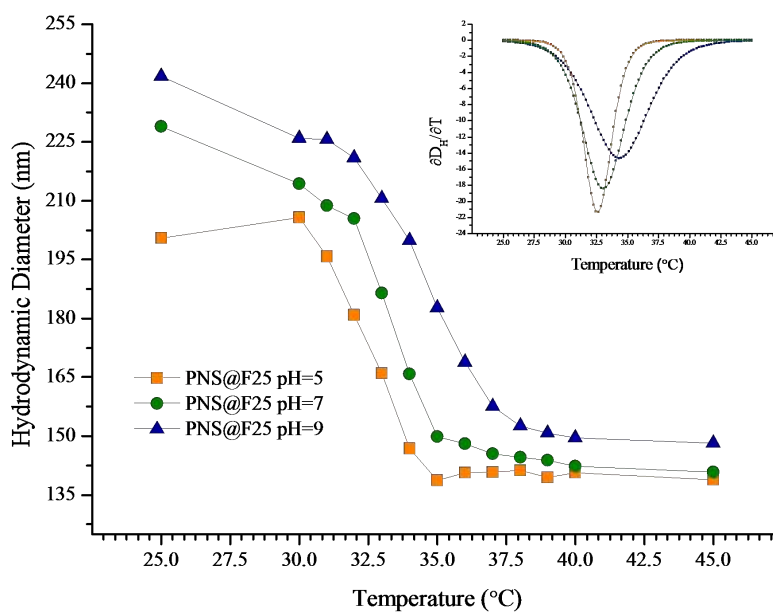


Σχήμα 5.8 Συγκεντρωτικά φάσματα FT-IR μικροπηκτών PNiPAm, PNS_Opt, PNS@F25, PNS@F25#I10 και απροποποίητων ΝΣΟΣ.

5.3.2 Αποτελέσματα Χαρακτηρισμού PNS@FL, PNS#I και PNS@FL#I με DLS

Στο Σχήμα 5.9 παρατίθενται τα αποτελέσματα χαρακτηρισμού του PNS@FL25 με DLS στο θερμοκρασιακό εύρος 25 - 45 °C και σε pH = 5, 7, 9. Τόσο από τις μετρηθείσες τιμές D_h και PDI (229 nm και 0.079 για $T = 25\text{ °C}$), όσο και από το προφίλ της θερμικής μετάβασης επιβεβαιώνεται περαιτέρω η ελεγχόμενη χημική τροποποίηση. Επιπλέον, μέσω της παρατεταμένης κolloειδούς σταθερότητας και της έντονα φθορίζουσας εμφάνισης του αιωρήματος επιβεβαιώνεται ποιοτικά η μερική και ελεγχόμενη υποκατάσταση των επιφανειακών καρβοξυλομάδων. Σε ουδέτερο και ελαφρά αλκαλικό pH, δεν σημειώθηκε ιδιαίτερη μείωση των υδροδυναμικών διαστάσεων και η θερμική απόκριση/VPTT βρέθηκε άμεσα συγκρίσιμη με αυτή του πρόδρομου PNS_Opt. Η διαστατική και θερμοαποκριτική ομοιότητα συνυφαίνεται με την μερική ενσωμάτωση ενός χαμηλού μοριακού βάρους υποκαταστάτη, όπως επίσης και με τον υψηλό βαθμό ιονισμού των υπολοίπων ομάδων -COOH. Αντιθέτως, ο υδροφοβικός χαρακτήρας των υποκατεστημένων θέσεων αποκτά υπόσταση σε ελαφρά όξινο pH, καθώς σε αυτή την περίπτωση υφίσταται μερική πρωτονίωση των επιφανειακών καρβοξυλικών θέσεων. Η παρατηρούμενη μείωση των υδροδυναμικών διαστάσεων και της VPTT, καθώς και όξυνση της θερμικής μετάβασης

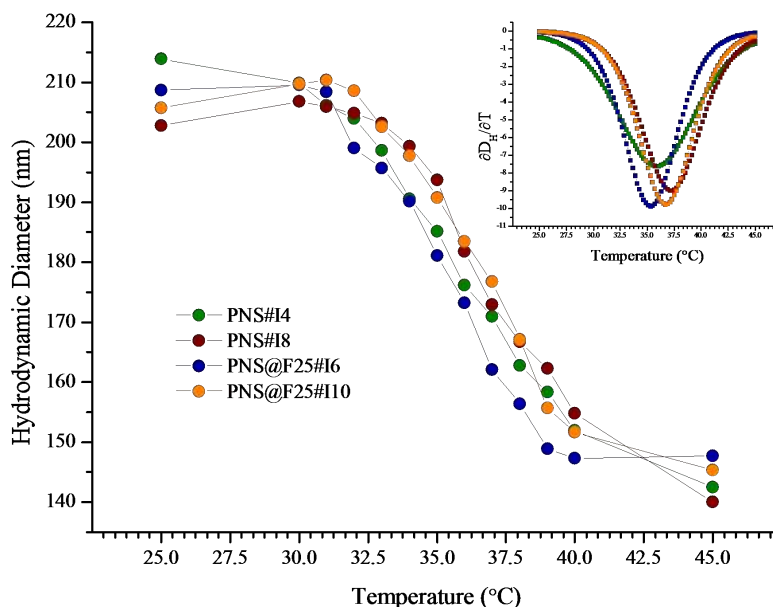
απορρέουν από αυτή την μεταβολή στον βαθμό ιοντισμού. Μηχανιστικά, η ισχυρότερη εξάρτηση των φυσικοχημικών παραμέτρων από το pH στο PNS@FL25 σε σχέση με το PNS_Opt, αντικατοπτρίζει την ανάπτυξη ισχυρότερων μη-ειδικών υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων που οδηγούν στην συρρίκνωση του κελύφους και ευνοούν την θερμική μετάπτωση σε μικρότερη θερμοκρασία.



Σχήμα 5.9 Θερμοκρασιακή απόκριση μικροπηκτών PNS@FL25 σε pH = 5, 7, 9.

Η επίδραση του ποσοστού παρουσίας των ΝΣΟΣ στην θερμοκρασία και στο προφίλ μετάπτωσης θερμοαποκρίσιμων μικροπηκτών έχει αποτελέσει αντικείμενο ερευνητικής δραστηριότητας [101, 348]. Εν τούτοις όμως, η εκλεκτική εναπόθεση ΝΣΟΣ στην επιφάνεια “μαλάκων” δομών, με συγκρίσιμες διαστάσεις δεν κατέστη δυνατό να εντοπιστεί στην βιβλιογραφία. Μελέτες QENS κατέδειξαν ότι τα ΝΣΟΣ δρουν ως σημεία διασταύρωσεως, τα οποία διαπερνούν το κέλυφος και επιφέρουν σημαντική παρεμπόδιση της κίνησης των αλυσίδων, σε σημείο που παρατηρείται εξάλειψη της θερμικής μετάπτωσης πάνω από ένα κρίσιμο ποσοστό ανόργανης φόρτωσης [349]. Με σκοπό την ποσοτικοποίηση της επαγόμενης μετατόπισης της VPTT και τον προσδιορισμό του βέλτιστου ποσοστού % ΝΣΟΣ στο τελικό νανοϋβριδικό υλικό, πραγματοποιήθηκε σειρά προκαταρκτικών πειραμάτων χρησιμοποιώντας τα πρόδρομα PNS_Opt. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων DLS σε pH = 7 για θεωρητικό ποσοστό φόρτωσης 4% (PNS#I4) και 8% (PNS#I8) παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.17. Η μικρή συρρίκνωση του κελύφους σε $T < VPTT$ εμφανίζεται ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης δεσμών-H μεταξύ των καρβονυλίων στις αμιδικές και καρβοξυλικές (δέκτες δεσμού-H) του πολυμερικού ικρίωματος και των επιφανειακών υδροξυλομάδων στα ΝΣΟΣ (δότες δεσμού-H) [349]. Η μικρορύθμιση της

VPTT αποδείχθηκε ότι μπορεί να επιτευχθεί διαφοροποιώντας σημαντικά το ποσοστό φόρτωσης. Ως εκ τούτου, μέσω του διπλασιασμού του ποσοστού της ανόργανης φάσης, η VPTT βρέθηκε αυξημένη από τους 36 °C (PNS#I4) στους 37,3 °C (PNS#I8).



Σχήμα 5.10 Θερμοκρασιακή απόκριση νανοϋβριδικών μικροπηκτών *PNS#I4*, *PNS#I8*, *PNS@FL25#I6*, *PNS@FL25#I10* σε $pH = 7$.

Στα αποτελέσματα του χαρακτηρισμού με DLS (Σχήμα 5.10) αναγνωρίζεται η επίδραση του υδροφοβικού χαρακτήρα του φορίζοντα υποκαταστάστη στα *PNS@FL25#I6* και *PNS@FL25#I10*. Ενώ το θεωρητικό ποσοστό φόρτωσης είναι κατά 50% και 25% μεγαλύτερο συγκριτικά με τα παρατιθέμενα *PNS#I*, η VPTT βρέθηκε κατά τι μειωμένη στους 35.4 °C και 36.9 °C, για ποσοστό φόρτωσης 6% και 10% αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, η κατάληψη επιφανειακών δραστικών θέσεων με -CONHFL ενδεχομένως να επιφέρει διαφοροποιήσεις στον μηχανισμό πυρήνωσης και ανάπτυξης των ΝΣΟΣ. Πρέπει να σημειωθεί ότι η υπέρμετρη αύξηση του ποσοστού της ανόργανης νανοφάσης έχει ως αποτέλεσμα την μεγάλη απόσβεση, ακόμα και απώλεια του φθορισμού εξαιτίας της αυξημένης εγγύτητας των χρωμοφώρων με την επιφάνεια των ΝΣΟΣ. Το φαινόμενο επανεξετάζεται στις Παραγράφους 5.3.3 και 5.4.

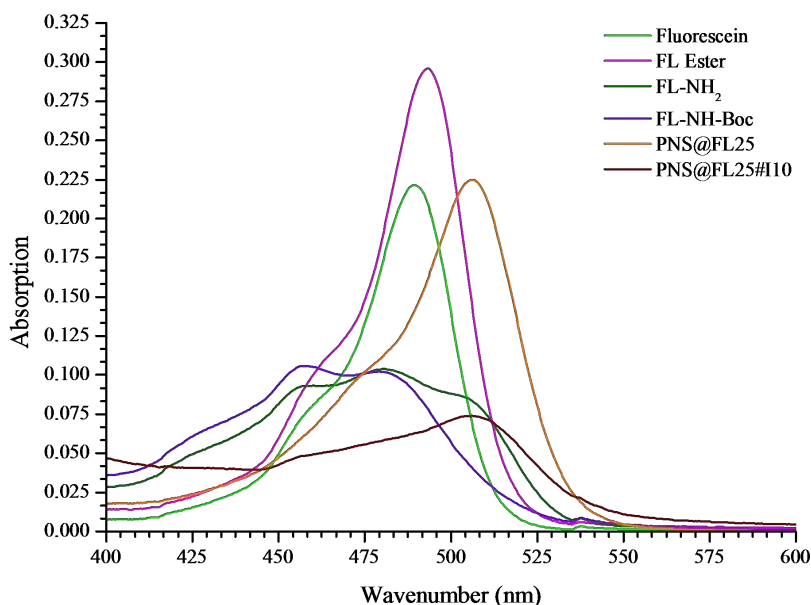
5.3.3 Αποτελέσματα Φωτοφυσικού Χαρακτηρισμού με UV-Vis και Φασματοσκοπία Φθορισμού

Ο φωτοφυσικός χαρακτηρισμός των μοριακών ενώσεων και των τροποποιημένων υλικών περιλάμβανε την μελέτη με φασματοσκοπία UV-Vis και φασματοσκοπία φθορισμού

(Σχήματα 5.11 και 5.12). Σε όλες τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν τα φασματοφωτόμετρα ορατού/υπεριώδους Shimadzu 1240 και φθορισμού Perkin-Elmer LS55. Για την διάλυση και επαναδιασπορά των ουσιών χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο H₂O σε pH = 7.4, αφότου είχε προηγηθεί διέλευση με N₂ για την ελάττωση του ποσοστού διαλυμένου O₂ το οποίο μπορεί να δράσει ως αποσβέστης του φθορισμού. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη με UV-Vis (βλ. λεζάντα Σχήματος 5.11) παρείχαν απορροφήσεις στα 460 nm της τάξης του $A_{460} = 0.05 - 0.1$. Η δεδομένες τιμές απορρόφησης επέτρεψαν την απ' αυθείας καταγραφή των φασμάτων φθορισμού με εξαιρετική ποιότητα σήματος, χωρίς φαινόμενα κορεσμού. Μέσω της συγκεκριμένης προσέγγισης το πειραματικό σφάλμα κατά τον υπολογισμό της κβαντικής απόδοσης διατηρήθηκε ελάχιστο.

Τα φάσματα απορρόφησης και εκπομπής του παραγώγου μορίου FL Ester (ροζ) παρουσιάζουν ταύτιση σε μεγάλο βαθμό με αυτά της πρόδρομης ένωσης φθορεσίνη (ανοιχτό πράσινο), όσον αφορά τη θέση των κορυφών απορρόφησης/εκπομπής και το προφίλ των αντίστοιχων καμπυλών. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μικρή μετατόπιση προς το ερυθρό της τάξης των 4 nm, τόσο στην κορυφή απορρόφησης όσο και στην κορυφή εκπομπής. Αυτή η εικόνα καταδεικνύει την μικρή εξάρτηση των φωτοφυσικών ιδιοτήτων από χημικές τροποποιήσεις στον βενζολικό δακτύλιο του φθαλικού τμήματος του μορίου. Αντιθέτως, σε σχέση με την FL ($A_{max} = 489$ nm), το παράγωγο FL-NH₂ εμφανίζει σημαντική διεύρυνση της κορυφής απορρόφησης, η οποία επιπλέον εμφανίζεται υψοχρωμικά μετατοπισμένη με μέγιστο στα 480 nm. Σημειώνεται ότι για το δεδομένο pH η ένωση υιοθετεί την αποπρωτονιωμένη μορφή FL-NH₂. Το φασματοσκοπικό προφίλ του FL-NH₂ εμφανίζει ομοιότητες με ανάλογα δημοσιευμένα φάσματα για παράγωγα στα οποία η χαρακτηριστική ομάδα του βενζοϊκού εστέρα συνδυάζεται με παρουσία αιθερικού δεσμού στην ξανθενική ομάδα [124, 125]. Παρόλο που μία αναλυτική ερμηνεία του φαινομένου δεν εντοπίστηκε βιβλιογραφικά, στην περίπτωση της FL-NH₂ η υψοχρωμική μετατόπιση μοιάζει λογικό να συσχετιστεί με την ελάττωση της ενεργειακής στάθμης της θεμελιώδους κατάστασης εξαιτίας του σχηματισμού δεσμών-H [350]. Μπορεί να υποτεθεί ότι καθώς η αμινομάδα του ξανθενικού τμήματος περιστρέφεται ως το τερματικό άκρο του αιθυλικού τμήματος, σχηματίζει ενδομοριακούς δεσμούς-H με το εστερικό καρβονύλιο του φθαλικού τμήματος ή με το κεντρικό οξυγόνο του ξανθενικού τμήματος. Στο ίδιο πλαίσιο, παρουσιάζει ενδιαφέρον η βαθοχρωμική μετατόπιση που παρατηρείται στην κορυφή απορρόφησης του PNS@FL25 στα 506 nm. Το φαινόμενο μπορεί να οφείλεται στην συνεργιστική επίπτωση της εξάλειψης της ελεύθερης αμινομάδας μέσω του σχηματισμού σταθερού αμιδικού δεσμού με επιφανειακές καρβοξυλικές θέσεις και της ενσωμάτωσης της χρωμοφόρας σε ένα εγγενώς πολικό περιβάλλον, λόγω της ταυτόχρονης γειννίασης με μη υποκατεστημένες καρβοξυλομάδες και αμιδικές ομάδες από τα κατάλοιπα του PNiPAm. Ως εκ τούτου, οι αναπτυσσόμενες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μπορούν να εξηγήσουν την μετατόπιση της

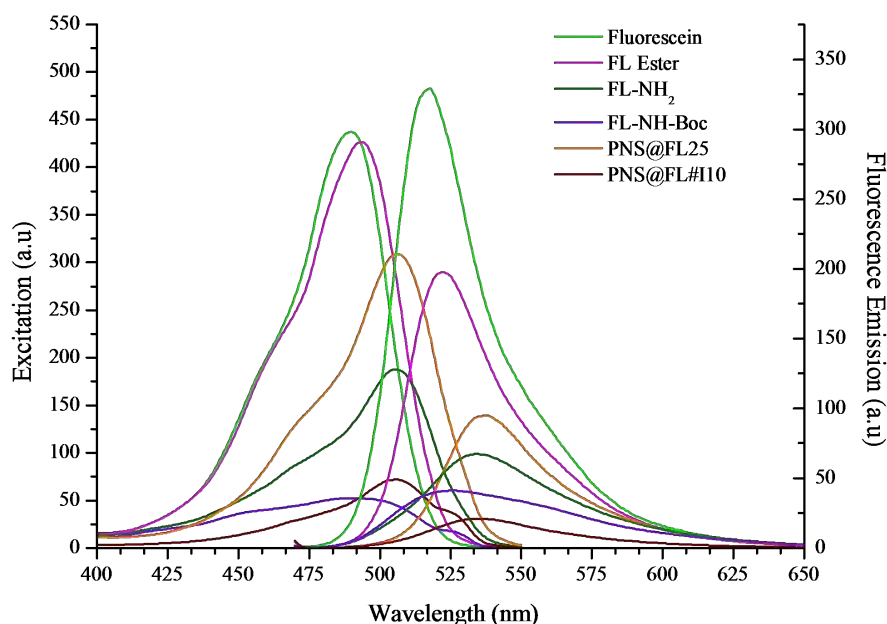
κορυφής προς το ερυθρό. Η υπόθεση αυτή μπορεί να υποστηριχθεί επιπλέον από την απουσία της κορυφής στα 506 nm στο FL-NH-Boc, παρά το γεγονός ότι μοιράζεται το ίδιο προφίλ απορρόφησης με το FL-NH₂, όπου ο αντίστοιχος “ώμος” είναι διακρίσιμος. Συνεπώς, η υψηλής έντασης απορρόφηση στα 506 nm μπορεί να αποδοθεί αποκλειστικά σε πολικές αλληλεπιδράσεις του -CONHFL με το περιβάλλον.



Σχήμα 5.11 Φάσματα UV-Vis μοριακών ενώσεων, φθορίζοντων και νανοϋβριδικών μικροπηκτών. Για τον υπολογισμό της κβαντικής απόδοσης χρησιμοποιήθηκε η τιμή απορρόφησης στα 460 nm (A_{460}). Πειραματικές συγκεντρώσεις: $[Fluorescein] = 4 \mu M$, $[FL Ester] = 10 \mu M$, $[FL-NH_2] = 7.14 \mu M$, $[FL-NH-Boc] = 7.14 \mu M$, $[PNS@F25] = 13.56 \mu M$, $[PNS@F25\#110] = 13.56 \mu M$.

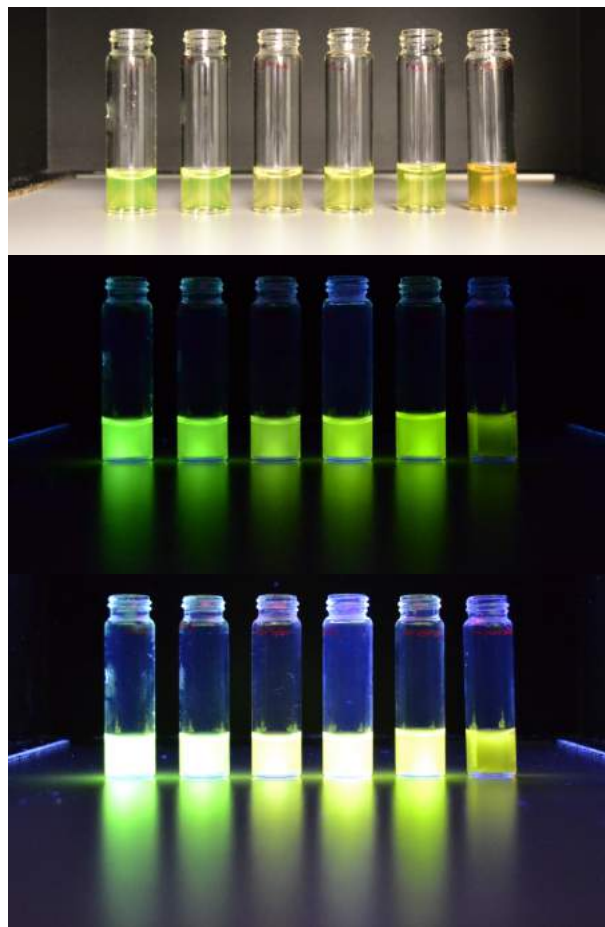
Για την μελέτη των μορίων και των παράγωγων υλικών με φασματοσκοπία φθορισμού επιβλήθηκαν κοινές παράμετροι στην οργανολογία, όσον αφορά τις σχισμές στα φίλτρα εκπομπής/απορρόφησης, τις ρυθμίσεις του εξασθενητή και το μήκος κύματος διέγερσης (Excitation Slit = 15 nm, Emission Slit = 2.5 nm, $\lambda_{Excitation} = 460$ nm). Οι παραπάνω συνθήκες προαπαιτούνται για την λήψη φασμάτων εκπομπής τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό της κβαντικής απόδοσης Φ . Ο υπολογισμός της κβαντικής απόδοσης, Φ , βασίστηκε σε δημοσιευμένη μέθοδο [117]. Συνοπτικά, η σχέση που περιγράφει την Φ (βλ. Παράγραφο 3.1.2) μετασχηματίζεται στην $\Phi_x = k \times \Phi_s$, για $n_s = n_x$, όπου ως k ορίζεται η σταθερά αναλογίας μεταξύ της κβαντικής απόδοσης του εξεταζόμενου δείγματος και του προτύπου και είναι ίση με $(A_s / A_x) \times (F_x / F_s)$. Οι τιμές A_{460} χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της k , χρησιμοποιώντας ως πρότυπο την καθαρή φθορεσίνη με βιβλιογραφική τιμή $\Phi_s = 0.91$. Οι τιμές F εξήχθησαν με αριθμητική

ολοκλήρωση των καμπυλών των φασμάτων εκπομπής χρησιμοποιώντας το λογισμικό Origin.



Σχήμα 5.12 Φάσματα απορρόφησης/εκπομπής μοριακών ενώσεων, φθορίζοντων και νανοϋβριδικών μικροπηκτών. Για την λήψη των φασμάτων εκπομπής πραγματοποιήθηκε διέγερση σε μήκος κύματος 460 nm.

Η Φ του παραγώγου FL Ester βρέθηκε ίση με 0.47 και έλαβε την υψηλότερη τιμή από όλα τα παράγωγα μόρια και υλικά, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας UV-Vis. Από την άλλη πλευρά, η Φ του παραγώγου FL-NH₂ υπέστη σημαντική μείωση ($\Phi_{FL-NH_2} = 0.23$) ως απόρροια της χημικής τροποποίησης του ξανθενικού τμήματος, το οποίο έχει μεγαλύτερη συνεισφορά στον φθορισμό. Η χρωμοφόρα FL-NH₂ φέρει την λειτουργική αμινομάδα μέσω μίας αιθυλικής ομάδας και ενός αιθερικού δεσμού. Η παρουσία του άκυκλο υποκαταστάση σε συνδυασμό με τον δεσμό μεταξύ ετεροατόμων C-O προσδίδει ευκαμψία και συνεπώς αυξάνει τους δονητικούς βαθμούς ελευθερίας, παρέχοντας επιπλέον τρόπους με τους οποίους το μόριο μπορεί να ανταλλάξει ενέργεια με το περιβάλλον. Την ίδια στιγμή, το αιθερικό οξυγόνο μπορεί να δράσει ως δότης ηλεκτρονίων επηρεάζοντας το βαθμό συζυγίας στο ξανθενικό τμήμα. Τελικώς, η συνεργιστική δράση των δύο όρων συνεισφέρει στην απόσβεση του φθορισμού. Αρκετά εντυπωσιακά, η ένταση του φθορισμού επαναφέρεται σε υψηλά επίπεδα με την ομοιοπολική πρόσδεση του FL-NH₂ στην επιφάνεια της μικροπηκτής. Αυθυπόστατα, η παρατήρηση τούτη συνηγορεί στην επιτυχημένη τροποποίηση του ικρίωματος. Η αλλαγμένη φωτοφυσική συμπεριφορά αποδίδεται σε δομικούς περιορισμούς που επιβάλλει η σύνδεση με την μικροπηκτική και στην φύση του αμιδικού δεσμού: η επίπεδη



Εικόνα 5.1 Εμφάνιση των εξεταζόμενων δειγμάτων για 20× συγκέντρωση συγκριτικά με την πειραματική κάτω από τεχνητό φως λαμπτήρα φθορισμού (πρώτη σειρά) και λαμπτήρα UV (δεύτερη και τρίτη σειρά). Από αριστερά προς τα δεξιά: FL, FL Ester, FL-NH-Boc, FL-NH₂, PNS@FL25, PNS@FL25#I10.

δομή της ομάδας -CONH καθιστά τον υποκαταστάτη περισσότερο άκαμπτο, περιορίζοντας έτσι τους δονητικούς βαθμούς ελευθερίας, ενώ την ίδια στιγμή είναι γνωστό ότι ομάδες δέκτες ηλεκτρονίων, όπως οι αμιδικές, ενισχύουν τον φθορισμό των χρωμοφώρων. Την ίδια στιγμή η ακινητοποίηση στην επιφάνεια αφαιρεί επίσης περιστροφικούς ελευθερίας και ακόμα έναν μηχανισμό ενεργειακών απωλειών χωρίς εκπομπή. Η χαμηλότερη από τις μετρούμενες τιμή της Φ για το FL-NH-Boc ($\Phi_{FL-NH-Boc} = 0.15$) παρέχει ποιοτικές ενδείξεις οι οποίες υποστηρίζουν τον παραπάνω συλλογισμό. Ανεξάρτητα από την επίπεδη δομή της καρβαμιδικής ομάδας, το μόριο μπορεί να ανταλλάσει ενέργεια με το περιβάλλον μέσω των αυξημένων περιστροφικών βαθμών ελευθερίας των μεθυλικών υποκαταστατών της Boc ομάδας. Το τελικό νανοϋβριδικό υλικό PNS@FL25#I10 χαρακτηρίζεται από έντονη απόσβεση του φθορισμού εξαιτίας της γειννίας των φθορίζοντων υποκαταστατών με την επιφάνεια των ΝΣΟΣ. Το φαινόμενο της απόσβεσης του φθορισμού έχει περιγραφεί στην

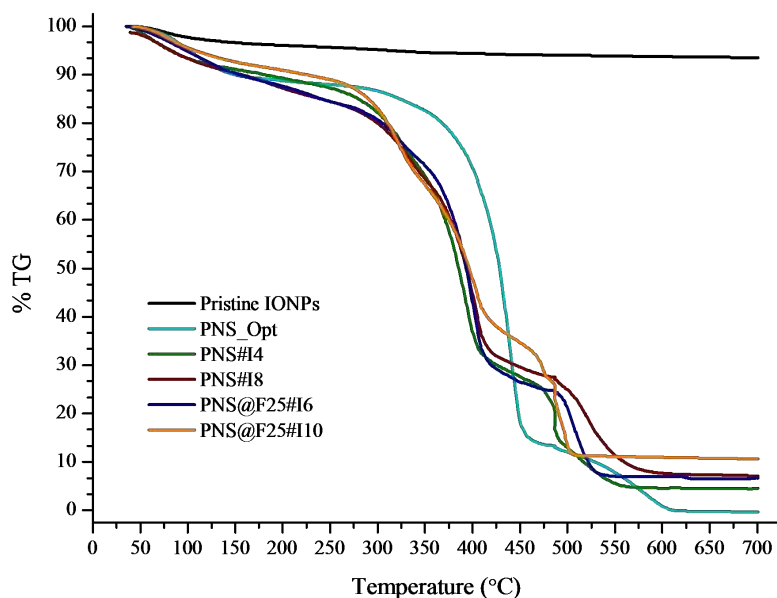
Παράγραφο 2.5.2, ενώ συνθετικές στρατηγικές παράκαμψης του προβλήματος εκτέθηκαν στην Παράγραφο 2.5. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής ζητούμενο υπήρξε η πρόσδωση πολλαπλών ιδιοτήτων σε μία μοναδική νανοκατασκευή, με γνώμονα την εφαρμοσιμότητα σε βιολογικές εφαρμογές. Η τιμή $\Phi_{PNS@FL25\#I10} = 0.13$ στάθηκε ικανή, όπως θα παρουσιαστεί στο επόμενο Κεφάλαιο, να παράσχει ισχυρό φθορίζων σήμα σε εφαρμογές κυτταρικής απεικόνισης και ως εκ τούτου κρίνεται απόλυτα ικανοποιητική. Για την ευκρινέστερη οπτική απεικόνιση στην Φωτογραφία 5.1 παρουσιάζονται τα μελετούμενα δείγματα σε συγκεντρώσεις $20\times$ συγκριτικά με τις πειραματικές συγκεντρώσεις. Στην πρώτη σειρά, τα δείγματα φωτογραφήθηκαν σε κοινές συνθήκες φωτισμού (λαμπτήρες φθορισμού), ενώ στις επόμενες δύο σειρές ενόσω εκτίθεντο σε φως λάμπας UV η οποία εξέπεμπε στα 365 nm. Ο χρόνος έκθεσης του CCD αισθητήρα (Nikon D3000, 16.2 MP) στην δεύτερη σειρά ήταν 1/20 s και για την τρίτη σειρά 1 s. Οι διαφορές στο χρώμα εκπομπής και στην ισχύ της ακτινοβολίας, σε συμφωνία με τα αντίστοιχα φάσματα του Σχήματος 5.12, είναι περισσότερο ευκρινείς στην αντανάκλαση του εκπεμπόμενου φωτός στην τρίτη σειρά.

5.3.4 Χαρακτηρισμός στην Στερεά Κατάσταση

5.3.4.1 Θερμική Σταθμική Ανάλυση (TGA)

Τα πειραματικά ποσοστά φόρτωσης ΝΣΟΣ προσδιορίστηκαν με την τεχνική της θερμικής σταθμικής ανάλυσης σε ατμοσφαιρικές συνθήκες (καύση με ατμοσφαιρικό O_2). Για λόγους σύγκρισης μελετήθηκαν “καθαρά” ΝΣΟΣ και οι πρόδρομες μικροπηκτές PNS_Opt. Στην θερμοσταθμική καμπύλη των ΝΣΟΣ (Σχήμα 5.13 μαύρο) παρατηρείται πολύ μικρή απώλεια μάζας πάνω από τους 100 °C λόγω της εξάτμισης του επιφανειακά φυσιοροφημένου H_2O . Από την άλλη πλευρά από την καμπύλη του “καθαρού” PNS_Opt (Σχήμα 5.20 γαλάζιο) είναι εμφανής η ολική απώλεια μάζας πάνω από τους 600 °C και η σταθεροποίηση έως τους 700 °C, γεγονός που υποδηλώνει άρτιο πειραματικό “υπόβαθρο” (reference). Τα θεωρητικά ποσοστά φόρτωσης βρέθηκαν σε ικανοποιητική συμφωνία με τα πειραματικά. Συγκεκριμένα, για τα θερμοαποκρίσιμα μαγνητικά νανοϋβριδικά PNS#I4 και PNS#I6 το πειραματικό ποσοστό βρέθηκε ίσο με 4.31% και 7.51%, ενώ αντιστοίχως για τα πολλαπλώς λειτουργικά PNS@F25#I6 και PNS@F25#I10 βρέθηκε ίσο με 6.47% και 10.56%. Από την μορφή των θερμοσταθμικών καμπυλών είναι προφανές ότι στην περίπτωση των νανοϋβριδικών, η αποικοδόμηση ξεκινά σε χαμηλότερη θερμοκρασία σε σχέση με την “καθαρή” μήτρα PNS_Opt. Επίσης, λόγω της υψηλότερης θερμοχωρητικότητας της ανόργανης κεραμικής νανοφάσης, μπορεί να υποτεθεί ότι σχηματίζονται “θερμές” περιοχές στην μήτρα του πολυμερούς, οι οποίες ευνοούν την γρηγορότερη αποικοδόμηση εξαιτίας της μικρότερης διάχυσης της θερμικής ενέργειας από

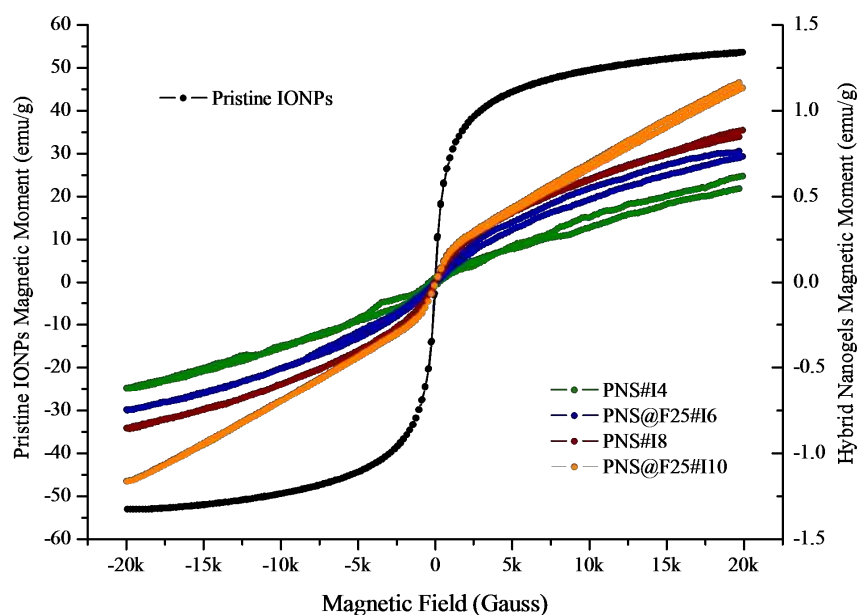
το σύστημα προς το περιβάλλον. Από την άλλη πλευρά, το προφίλ της αποικοδόμησης ήταν κοινό για όλα τα δείγματα, εμφανίζοντας χαρακτηριστική απώλεια μάζας δύο σταδίων.



Σχήμα 5.13 Αποτελέσματα χαρακτηρισμού πρόδρομου *PNS_Opt*, “καθαρών” ΝΣΟΣ και παραγώγων νανοϋβριδικών υλικών με θερμοβαρυντική ανάλυση (TGA).

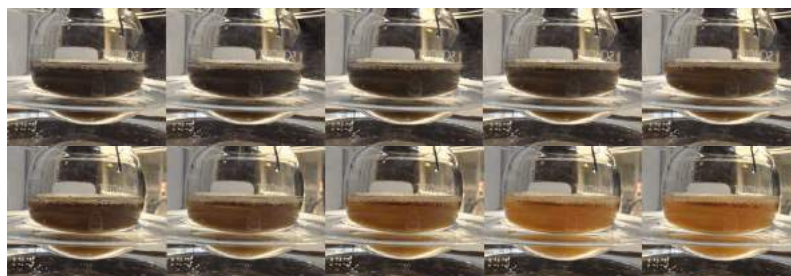
5.3.4.2 Μαγνητομετρία Παλλόμενου Δείγματος (VSM)

Η απόκριση των νανοϋβριδικών υλικών σε γραμμικά μεταβαλλόμενο μαγνητικό μελετήθηκε με εφαρμογή μαγνητομετρίας παλλόμενου δείγματος (Σχήμα 5.14). Κανένα από τα εξεταζόμενα δείγματα δεν επέδειξε παραμένουσα μαγνήτιση, γεγονός το οποίο αποτέλεσε σαφή ένδειξη της υπερ-παραμαγνητικής φύσης των υλικών. Η μαγνήτιση κόρου $M_s = 53.77$ emu.g⁻¹ για τα “καθαρά” ΝΣΟΣ συνάδει με βιβλιογραφικές τιμές για νανοσωματίδια μαγγελίτη που έχουν παρασκευαστεί με την μέθοδο της συγκαταβύθισης αλάτων Fe [351]. Επιπλέον, η τιμή της μαγνήτισης κόρου των ΝΣΟΣ βρίσκεται εγγύτερα στην βιβλιογραφική τιμή της ογκώδους φάσης του μαγγελίτη (76 emu.g⁻¹) παρά στην αντίστοιχη της φάσης του μαγνητίτη (emu.g⁻¹) [352]. Ένα ακόμα ποιοτικό χαρακτηριστικό το οποίο συνεπικουρεί στην ταυτοποίηση των ΝΣΟΣ ως ΝΣ μαγγελίτη αποτελεί το γεγονός ότι η φάση του μαγνητίτη είναι μετασταθής και μεταπίπτει, έστω και με αργό ρυθμό, στην θερμοδυναμικά σταθερή φάση του μαγγελίτη όταν εκτείθεται σε ήπιες οξειδωτικές συνθήκες (ατμοσφαιρικό O₂, RT) [353].



Σχήμα 5.14 Αποτελέσματα μαγνητομετρίας για “καθαρά” ΝΣΟΣ παράγωγα νανοϋβριδικά υλικά.

Όσον αφορά τα θερμοαποκρίσιμα νανοϋβριδικά υλικά, η ταυτοποίηση του μαγγελίτη ως το ανόργανο νανοσυστατικό έχει επιβεβαιωθεί από την ομάδα του Zafeiropoulos [101], εφαρμόζοντας περιθλασιμετρία ηλεκτρονίων για υλικά τα οποία παρασκευάστηκαν με το ίδιο πρωτόκολλο. Το αποτέλεσμα αυτό αποτέλεσε την βάση για την ερμηνεία της αλλαγής του χρώματος του αιωρήματος της αντίδρασης απο σκούρο καφέ - μαύρο σε ανοιχτό καφέ - πορτοκαλί, έπειτα από την εισαγωγή ατμοσφαιρικού αέρα (Εικόνα 5.2). Η χαρακτηριστική αλλαγή στο χρώμα αποτέλεσε ασφαλή ένδειξη της οξείδωσης του μαγγελίτη προς σχηματισμό της θερμοδυναμικά σταθερής φάσης του μαγγελίτη [351], ενώ το σύντομο χρονικό διάστημα κατά το οποίο συντελείται ο μετασχηματισμός είναι χαρακτηριστικό του μικρού μεγέθους των ΝΣΟΣ [354].



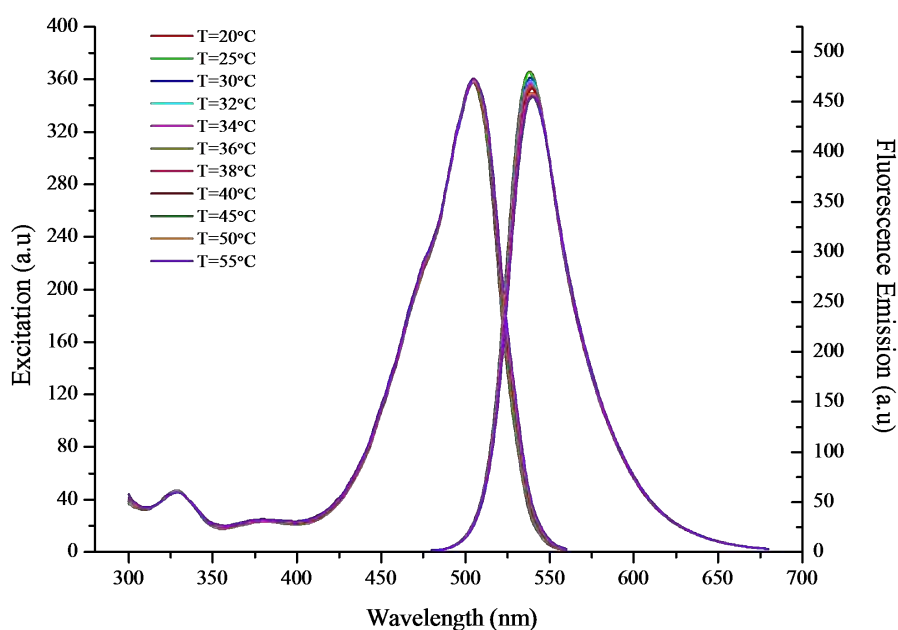
Εικόνα 5.2 Στιγμιότυπα του αντιδραστήρα παρασκευής PNS#I μετά το πέρας της προσθήκης του διαλύματος συγκαταβύθισης και της εισαγωγή ατμοσφαιρικού αέρα για τον άμεσο μετασχηματισμό του μαγγελίτη σε μαγγελίτη. Το μεσοδιάστημα μεταξύ των λήψεων ρυθμίστηκε στα 4 s.

Η παρασκευή μαγνητικών νανοσύνθετων δομών και η μελέτη των μαγνητικών τους ιδιοτήτων δεν είναι ασυνήθιστη στην βιβλιογραφία. Η σημαντική μείωση της μαγνήτισης κόρου, M_s , νανοσωματιδίων μαγγεμίτη, παρασκευασθέντων με συγκαταβύθιση πρόδρομων αλάτων σιδήρου παρουσία οργανικής φάσης πολυσακχαρίτη έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά [355]. Συγκρίσιμα χαμηλές τιμές M_s έχουν αναφερθεί για συναφή ποσοστά φόρτωσης μαγνητικής ανόργανης νανοφάσης σε πολυμερικές μήτρες [352, 356, 357]. Στα ίδια συστήματα, απουσιάζει το πλατώ κόρου και η καμπύλη M vs H ακολουθεί γραμμικό προφίλ. Το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό απαντάται επίσης στις πειραματικές καμπύλες των PNS#I4-8 και PNS@F25#I6-10 και υποδηλώνει την ομοιογενή και ισχυρή πρόσδεση και ενσωμάτωση του ανόργανου συστατικού στο πολυμερικό κρίωμα των μικροπηκτών, καθώς πρακτικά παρεμποδίζεται ο προσανατολισμός των μαγνητικών μονοκρυστάλλων με το εφαρμοζόμενο πεδίο [101]. Επιπροσθέτως, περιπτώσεις όπου βιβλιογραφικά αναφέρονται τιμές $M_s < 1 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$ περιλαμβάνουν νανοσφαίρες ΝΣ- Fe_3O_4 /πολυπυρρολίου [358], όπως και νανοσυνθέτα $\text{SiO}_2/\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ [359, 360], PP/Fe@FeO [361] και GO@ Fe_3O_4 [362]. Απεναντίας, αποτελέσματα μαγνητομετρίας σε συναφείς νανοσύνθετες δομές με άμεσα συγκρίσιμα ποσοστά φόρτωσης επιδεικνύουν αποδοτικότερα ποσοστά μαγνήτισης κόρου [345, 363-365]. Η πιθανότερη αιτιολόγηση για την απόκλιση με τις παραπάνω μελέτες στηρίζεται στις εξής παρατηρήσεις: Πρώτον, αφορούν υβριδικές νανοδομές όπου η παρασκευή των μαγνητικών ΝΣ προηγείται της ενσωμάτωσης στην δομή, γεγονός το οποίο συνεπάγεται μεγαλύτερο μέγεθος και εγγενώς μικρότερο αριθμό επιφανειακών ατελειών [366]. Δεύτερον, η ανόργανη νανοφάση βρίσκεται συγκεντρωτικά στον πυρήνα, όπου συνίσταται σε συγκροτήματα (clusters) ΝΣ, με αποτέλεσμα τα υβριδικά υλικά να εμφανίζουν μεγαλύτερη μαγνητική επιδεκτικότητα [367] και αν το μέγεθος των cluster ξεπερνά ένα κρίσιμο μέγεθος, φερρομαγνητική συμπεριφορά [368].

5.4 Εφαρμογή: Συσχέτιση Οπτικής Εκπομπής με την Θερμοκρασία

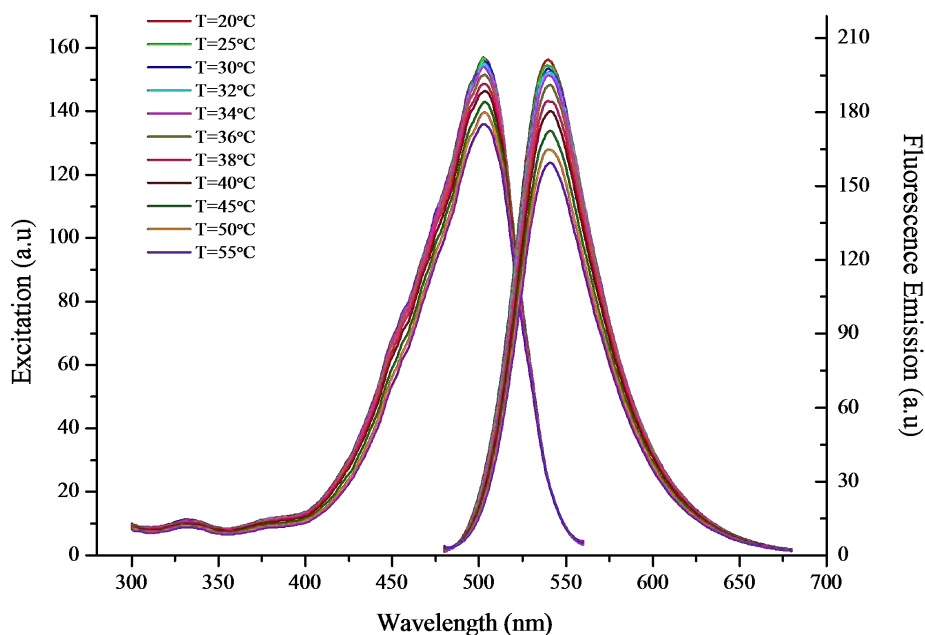
Η φωτοφυσική συμπεριφορά της χρωμοφόρας FL-NH₂ και των μικροπηκτών PNS@F25 και PNS@F25#I10 μελετήθηκε σαν συνάρτηση της θερμοκρασίας με φασματοσκοπία φθορισμού, χρησιμοποιώντας το όργανο Perkin Elmer LS55 και θερμοστατούμενο κελί μέτρησης συνδεδεμένο με τον εξωτερικό κυκλοφορητή Peltier PCB 1500 της ίδιας εταιρίας (χρόνος σταθεροποίησης δείγματος = 300 s). Για την συλλογή ισχυρότερου φθορίζοντος σήματος, επιβλήθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με την φασματοσκοπική μελέτη της Παραγράφου 5.3.4 (βλ. λεζάντα Σχήματος 5.11). Το σμήνος των φασμάτων διέγερσης του PNS@F25 (Σχήμα 5.15) αποτελείται από ένα μοναδικό ίχνος, υποδηλώνοντας την πλήρη ανεξαρτησία της απορρόφησης από μεταβολές της θερμοκρασίας. Αντίθετα, μία ελάχιστη (πλην όμως μετρήσιμη) μείωση της έντασης

φθορισμού παρατηρείται όσο αυξάνεται η θερμοκρασία. Το φαινόμενο είναι ενδεικτικό της ευαισθησίας των χρωμοφώρων σε μεταβολές της πολικότητας του μικροπεριβάλλοντος και συμφωνεί με την περιγραφή που έχει προηγηθεί στην Παράγραφο 2.4.3. Στις δεδομένες συνθήκες οξύτητας (pH = 7), το σύστημα υπό μελέτη χαρακτηρίζεται από αυξημένη υδροφιλικότητα: όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι μικροπηκτές διατηρούν ένα σημαντικό ποσοστό H₂O ακόμα και αρκετά πάνω από την VPTT. Περαιτέρω, οι αρνητικά φορτισμένες μη υποκατεστημένες καρβοξυλικές θέσεις εξασφαλίζουν την διατήρηση ενός έντονα πολικού μικροπεριβάλλοντος ακόμα και όταν συνολικά υφίσταται συρρίκνωση του δικτύου σε T > VPTT. Συνεπώς, η μικρή διαφορά στην ένταση φθορισμού μεταξύ T = 20 °C και T = 55 °C αντικατοπτρίζει πιθανώς είτε την ανεπαίσθητη διαφορά στην πολικότητα της επιφάνειας της μικροπηκτικής μεταξύ των δύο θερμοκρασιών, είτε την μικρή συνεισφορά ενός FRET φαινομένου στην εξασθένηση του φθορισμού λόγω της αυξημένης εγγύτητας των χρωμοφώρων-υποκαταστατών. Στο ίδιο πλαίσιο μπορεί να αξιολογηθεί και η πολύ μικρή μετατόπιση της κορυφής στην καμπύλη του φάσματος φθορισμού από τα 538 nm (20 °C), στα 540 nm (55 °C).



Σχήμα 5.15 Φάσμα διέγερσης/εκπομπής φθορίζουσας μικροπηκτικής PNS@F25 σε συγκέντρωση 25 μM και pH=7.

Η εικόνα μεταβάλλεται άρδην στην περίπτωση όπου το ίδιο σύστημα εξετάζεται σε όξινο περιβάλλον (Σχήμα 5.16). Τα φάσματα φθορισμού βρέθηκαν μετατοπισμένα τόσο υποχρωμικά (534 nm για T = 20 °C και 537 για T = 55 °C), όσο και υποχρωμικά σε σύγκριση με τα φάσματα φθορισμού σε ουδέτερες συνθήκες. Αν και η μεταβολή του



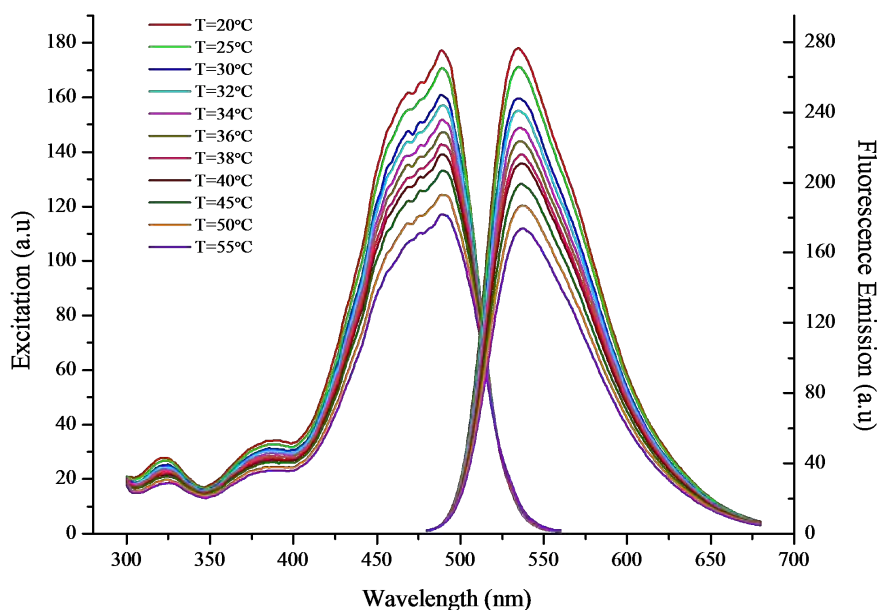
Σχήμα 5.16 Φάσμα διέγερσης/εκπομπής φθορίζουσας μικροπηκτής *PNS@F25* σε συγκέντρωση $[-CONHFL]=25 \mu M$ και $pH=3$.

φθορισμού σαν συνάρτηση του pH δεν μελετήθηκε συστηματικά στα πλαίσια της παρούσης διατριβής, η ευαισθησία του συστήματος σε αλλαγές της οξύτητας ανεξάρτητα από την θερμοκρασία δεν μπορεί να παραγνωριστεί. Σημειώνεται, ότι η % κ.β. συγκέντρωση σε μικροπηκτική για την ρύθμιση της μοριακής συγκέντρωσης σε -CONHFL (25 μM), υπήρξε αρκούτως χαμηλή (0.02 %) για την αποφυγή σχηματισμού συσσωματωμάτων στο κελί μέτρησης, γεγονός το οποίο επιβεβαιώθηκε από την αντιστρεπτότητα του φαινομένου, δηλαδή την επαναφορά της έντασης φθορισμού κατά την ψύξη. Πρωτίστως, στο φάσμα εκπομπής παρατηρείται μικρή μείωση της έντασης φθορισμού για τις θερμοκρασίες όπου $T < VPTT$. Η αλματώδης ελάττωση της έντασης για $T = 30 \text{ }^\circ C$ σηματοδοτεί την ένταξη στην θερμοκρασιακή περιοχή της VPTT και της επακόλουθης μεταβολής της πολικότητας του μικροπεριβάλλοντος. Η βαθμιαία ελάττωση της έντασης συνάδει με το σιγμοειδές προφίλ μεταβολής των υδροδυναμικών διαστάσεων συναρτήσει της θερμοκρασίας, όπως αυτό καταγράφηκε για το σύστημα σε $pH=5$ (Σχήμα 5.16). Διατυπωμένο διαφορετικά, η βαθμιαία μεταβολή της έντασης φθορισμού αποτυπώνει ευκρινώς την επαγόμενη από την θερμοκρασία μεταβολή του μεγέθους. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η συνέχιση της εξασθένησης του φθορισμού για $T \gg VPTT$. Η μέση D_H όπως εξετάζεται με DLS παραμένει σταθερή για $T \gg VPTT$, δεν παύει όμως να αποτελεί την μέση τιμή μίας κατανομής. Τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας φθορισμού υποδεικνύουν ότι η τεχνική υπερτερεί έναντι του DLS στην ανίχνευση ελάχιστων μεταβολών στο μέγεθος, καθώς το σήμα προέρχεται από πολύ λεπτές διαφορές στην πολικότητα. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η φωτοφυσική συμπεριφορά της

μοριακής ένωσης FL-NH₂ επέδειξε ισχυρή εξάρτηση από το pH και σημαντικά ασθενέστερη εξάρτηση από την θερμοκρασία (Σχήμα Π5.9). Κατά συνέπεια μπορεί να συναχθεί ασφαλώς ότι η FL-NH₂, συμπεριφέρεται ως ασθενής βάση και ότι υφίσταται μία εγγενής εξάρτηση του συντελεστή απόσβεσης, ϵ , του μορίου από την θερμοκρασία.

Το φάσμα διέγερσης/εκπομπής του τελικού νανοϋβριδικού υλικού PNS@F25#I10 σαν συνάρτηση της θερμοκρασίας για pH = 7, παρατίθεται στο Σχήμα 5.17. Συμβαδίζοντας με την μελέτη του PNS@F25, η συγκέντρωση σε πολυμερές αυξήθηκε για την συλλογή ισχυρότερου σήματος. Η άριστη κολλοειδής σταθερότητα του συστήματος σε αυξημένη θερμοκρασία επιβεβαιώθηκε μέσω μετρήσεων DLS και οφείλεται στην ηλεκτροστατική/στερεοχημική σταθεροποίηση που επάγει το επιφανειακά προσροφημένο στρώμα του PSS. Η διαφοροποίηση στα φάσματα διέγερσης/εκπομπής συγκριτικά με το PNS@F25 είναι εμφανής και οφείλεται *de facto* στην επίδραση της μαγνητικής νανοφάσης επάνω στις φωτοφυσικές ιδιότητες. Η ένταση του φθορισμού του PNS@F25#I10 υφίσταται μικρή μείωση στο εύρος 20 °C - 32 °C. Ουσιαστικά, όπως φαίνεται στο γράφημα D_H vs T (Σχήμα 5.10), η μετάπτωση στην υδρόφοβη κατάσταση και η συνακόλουθη ελάττωση της διαμοριακής απόστασης μεταξύ των αλυσίδων ξεκινά μετά τους 32 °C. Σε ταύτιση με το καταγεγραμμένο προφίλ D_H vs T και την ευρεθείσα VPTT, ο φθορισμός παρουσιάζει μεγαλύτερη εξασθένηση μετά τους 34 °C. Επιπλέον, η σχετικά χαμηλή τιμή της $\partial D_H/\partial T$, ευνοεί την ομοιογενέστερη διακριτοποίηση της έντασης φθορισμού για θερμοκρασίες εκατέρωθεν της VPTT. Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην Παρ. 2.5.2, η παρουσία ανόργανων νανοδομών σε εγγύτητα με χρωμοφόρες μπορεί να επιφέρει την μεταλλαγή του φάσματος εκπομπής. Συγκεκριμένα, η απόσβεση του σήματος φθορισμού της FL έχει εξακριβωθεί ότι εξαρτάται από την απόσταση των μορίων από την επιφάνεια των ΝΣΟΣ. Η ταυτόχρονη παρουσία υποκαταστατών -CONHFL και της μαγνητικής νανοφάσης των ΝΣΟΣ στο κέλυφος των θερμοαποκρίσιμων μικροπηκτών επιτρέπει τον έλεγχο της έντασης φθορισμού από την θερμοκρασία. Μηχανιστικά, με την θερμικά επαγόμενη αναδίπλωση των αλυσίδων, οι υποκατεστημένες με FL θέσεις πλησιάζουν ολοένα και περισσότερο στην επιφάνεια των ΝΣΟΣ και με τον τρόπο αυτό προκαλείται η βαθμιαία απόσβεση.

Η καλή διακριτότητα μεταξύ των τιμών της έντασης φθορισμού για 36 °C - 38 °C - 40 °C και η αντιστρεπτότητα με ψύξη θα μπορούσαν να επιτρέψουν την ακριβή συσχέτιση του σήματος φθορισμού με την θερμοκρασία. Μέσα από διαδικασία βαθμονόμησης στο δεδομένο θερμοκρασιακό εύρος, το PNS@F25#I10 αποτελεί δυνητικά έναν νανοσκοπικό οπτικό βιοσένσορα θερμοκρασίας. Ο μη επεμβατικός προσδιορισμός της θερμοκρασίας μέσα σε κύτταρα, η ανίχνευση του θερμικού αποτυπώματος ενδοκυτταρικών βιολογικών διεργασιών και η ενσωμάτωση σε συστήματα μικρορευστονικής (microfluidics) συνιστούν μερικές από τις πιθανές εφαρμογές του συστήματος.



Σχήμα 5.17 Φάσμα διέγερσης/εκπομπής τελικού νανοϋβριδικού PNS@F25#110 σε συγκέντρωση $C = 1 \text{ mg.ml}^{-1}$ (0.1% κ.β) και $\text{pH}=7$.

5.5 Συμπεράσματα

Η αριστοποιημένη μικροπηκτή PNS_Opt αποτέλεσε την μήτρα για την ανάπτυξη ενός τριπλά λειτουργικού θερμοαποκρίσιμου/φθορίζοντος/μαγνητικού νανοϋβριδικού υλικού. Κατά την ανάπτυξη του πρωτοκόλου, δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στην ταυτόχρονη διατήρηση των επιμέρους ιδιοτήτων: το τελικό λειτουργικό υλικό χαρακτηρίζεται από $D_{H,swol} \sim 205 \text{ nm}$ και $D_{H,col} \sim 145 \text{ nm}$, ικανοποιητική ένταση φθορισμού, σημαντικά αυξημένη VPTT ($36.9 \text{ }^\circ\text{C}$) και μαγνήτιση κόρου $1,16 \text{ emu.g}^{-1}$. Η αύξηση της VPTT, μεταφράζεται σε ελάττωση του υδροδυναμικού όγκου του PNS@F25#10 της τάξης του 67,1%, μεταξύ της φυσιολογικής θερμοκρασίας ($36,7 \text{ }^\circ\text{C}$) και της θερμοκρασίας φλεγμονωδών περιοχών ($40 \text{ }^\circ\text{C}$). Όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν το υλικό ελκυστικό για ενσωμάτωση σε βιοϊατρικές εφαρμογές ελεγχόμενης μεταφοράς και αποδέσμευσης φαρμακευτικών ουσιών.

Συμπληρωματικά, τα δείγματα PNS@F25 και PNS@F25#10 χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία φθορισμού σε μεταβαλλόμενη θερμοκρασία. Ταυτοποιήθηκαν ποιοτικά, δύο διαφορετικοί μηχανισμοί ελέγχου της έντασης φθορισμού από την θερμοκρασία: στο πρώτο υλικό η μεταβολή της έντασης φθορισμού ελέγχεται από την πολικότητα του μικροπεριβάλλοντος σε όξινο pH ενώ στο δεύτερο υλικό είναι απόρροια της μειούμενης απόστασης μεταξύ των χρωμοφώρων και της μαγνητικής φάσης. Το δεύτερο σετ ιδιοτήτων μπορεί να αξιοποιηθεί σε εφαρμογές μη-επεμβατικού προσδιορισμού της θερμοκρασίας.

Κεφάλαιο 6

Εφαρμογές των Νανοϋβριδικών Υλικών στην Βιολογία: Κυτταρική Πρόσληψη - Ενθυλάκωση και Ελεγχόμενη Αποδέσμευση Φαρμάκου - Μελέτη Κυτταροτοξικότητας

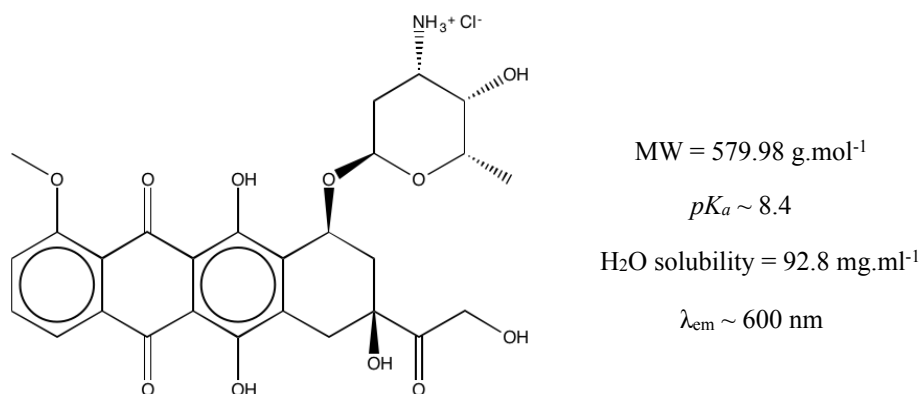
ΣΥΝΟΨΗ: Η προοπτική χρήσης των συνθετιμένων νανοϋλικών σε *in vivo* βιοϊατρικές εφαρμογές αποτέλεσε το αντικείμενο του παρόντος Κεφαλαίου. Αρχικά εξετάστηκε η κυτταρική πρόσληψη των δειγμάτων PNS@F25 και PNS@F25#I10 από καρκινικά κύτταρα της σειράς HeLa με συνεστιακή μικροσκοπία. Έπειτα από τον καθορισμό του πειραματικού πρωτοκόλου κυτταρικής πρόσληψης, πραγματοποιήθηκε ποιοτική μελέτη ενθυλάκωσης και ελεγχόμενης αποδέσμευσης του αντικαρκινικού φαρμάκου δοξορουβικίνη στα δείγματα PNS@F25, PNS@F25#I10 και PNS#I6. Ο σχηματισμός συμπλόκου μεταξύ των νανοϋβριδικών υλικών και του φαρμάκου επιβεβαιώθηκε συνδυαστικά μέσω οπτικής παρατήρησης, φασματοσκοπίας UV-Vis και φθορισμομετρίας. Η απομόνωση των δειγμάτων με ενθυλακωμένη δοξορουβικίνη επιτεύχθηκε μέσω υπερφυγοκέντρισης, ενώ η μελέτη της ελεγχόμενης αποδέσμευσης του φαρμάκου πραγματοποιήθηκε σε θερμοστατούμενο αντιδραστήρα χρησιμοποιώντας μεμβράνη διαπίδσης. Η κυτταρική πρόσληψη και κυτταροτοξικότητα των συμπλεγμένων με φάρμακο δειγμάτων σε κύτταρα HeLa προσδιορίστηκε αντίστοιχα με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με laser και δοκιμή MTT.

6.1 Εισαγωγή

Η μελέτη της μεταφοράς και της ελεγχόμενης αποδέσμευσης ενεργών μορίων και φαρμακευτικών ουσιών εξελίσσεται ταχύτατα, έχοντας αποκτήσει πλέον υπόσταση ως ξεχωριστός επιστημονικός κλάδος. Έπειτα από τα ορόσημα που έθεσαν οι εργασίες των Peppas [369], Langer [370] και Courver [371] στις αρχές της δεκαετίας του 1980, η αξιοποίηση των πολυμερικών κολλοειδών σε εφαρμογές της βιοϊατρικής γνώρισε τεράστια άνθηση. Οι κυριότεροι λόγοι που ώθησαν την ανάπτυξη του πεδίου υπήρξαν η ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων ενεργειών που προκύπτουν από την συστηματική κυκλοφορία κυτταροτοξικών ουσιών, η ενθυλάκωση και βιοδιαθεσιμότητα μη-υδατοδιαλυτών φαρμάκων [372], η προστασία και η βελτίωση της φαρμακοκινητικής ευαίσθητων ενεργών συστατικών όπως για παράδειγμα τα πεπτίδια ή οι πρωτεΐνες [373], η γρήγορη και στοχευμένη απόδοση μεγάλων θεραπευτικών φορτίων και ο έλεγχος της αποδέσμευσης με εξωτερικά ερεθίσματα όπως η θερμοκρασία, το pH, η ακτινοβολία [374] και τα εναλλασσόμενα μαγνητικά πεδία [375].

Οι ανθρακυκλίνες αποτελούν μία κατηγορία χημειοθεραπευτικών παραγόντων, με την δοξορουβικίνη και την δαναορουβικίνη να συνιστούν τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα μόρια. Έχει εξακριβωθεί ότι ο μηχανισμός της αντικαρκινικής δράσης των ανθρακυκλινών οφείλεται στην παρεμβολή ζευγών βάσεων του DNA [376]. Ένας πολυσχιδές πλήθος νανοδιάστατων συστημάτων έχει αναπτυχθεί με σκοπό την ελεγχόμενη μεταφορά και απόδοση ανθρακυκλινών [377]. Μεταξύ αυτών το Doxil, μία εκδοχή τροποποιημένων με PEG λιποσωμάτων με ενθυλακωμένη δοξορουβικίνη, αποτελεί σκεύασμα εγκεκριμένο από τον FDA από το 1995 και ένα από τα λίγα παραδείγματα εμπορικά διαθέσιμων νανοχημειοθεραπευτικών [95, 378]. Η ενθυλάκωση βιολογικών παραγόντων σε πολυμερικά κολλοειδή και σε νανοϋλικά εν γένει, ελέγχεται από το ισοζύγιο ηλεκτροστατικών, Van der Waals και υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων [379-381]. Από την άλλη πλευρά, η ελεγχόμενη αποδέσμευση συντελείται έπειτα από μεταβολές του είδους ή/και της ισχύος των αλληλεπιδράσεων.

Ο συντακτικός τύπος και μερικά από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του υδροχλωρικού άλατος της δοξορουβικίνης (DOX) παρατίθενται στο Σχήμα 6.1.



Σχήμα 6.1 Υδροχλωρικό άλας της δοξορουβικίνης.

Το μόριο της DOX μπορεί να αλληλεπιδρά πολλαπλώς με υποστρώματα, όπως προκύπτει από την απλή αναγνώριση των υπάρχουσών χημικών λειτουργικών ομάδων. Η αμινομάδα στον δακτύλιο του τετραϋδροπυρανίου είναι δυνατόν να αλληλεπίδρα ηλεκτροστατικά με αρνητικά φορτισμένες ομάδες σε ένα μεγάλο εύρος pH, όπως υποδηλώνεται από την τιμή της *pK_a*. Παράλληλα, υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να αναπτυχθούν μέσω των φαινολικών ομάδων ενώ θέσεις ανάπτυξης δεσμών-Η εντοπίζονται στις κέτο ομάδες και στα υδροξύλια-υποκαταστάτες. Ελκυστικά χαρακτηριστικά αποτελούν επίσης η σημαντική υδατοδιαλυτότητα και η εμφάνιση ζοηρού (εύκολα αναγνωρίσιμου και ανιχνεύσιμου) κόκκινου χρώματος στο διάλυμα. Με βάση την παραπάνω εικόνα, δεν προξενεί εντύπωση το γεγονός ότι η μελέτη της ενθυλάκωσης και ελεγχόμενης αποδέσμευσης της DOX από νανοϋλικά διατρέχει την βιβλιογραφία. Η βιβλιογραφική επισκόπηση επικεντρώθηκε σε

νανοδιάστατα συστήματα που βασίζονται σε μικροπηκτές PNIPAm για την ενθυλάκωση/ αποδέσμευση της DOX.

Οι Das et al. [257] έδωσαν το έναυσμα για την χρησιμοποίηση μικροπηκτών με βάση το PNIPAm σε εφαρμογές ενθυλάκωσης DOX. Συγκεκριμένα, αναφέρθηκε η ενσωμάτωση DOX σε σύστημα μικροπηκτών P(NiPAm-co-AAc) με ελεγχόμενες διαστάσεις ($D_H \sim 150$ nm σε pH = 7.4) μέσω της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης με τα αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα -COOH. Πολύ πρόσφατα, στο ίδιο σύστημα ενθυλακώθηκε DOX και μελετήθηκε η επίδραση σε σφαιροειδής όγκους, παραγόμενους από 3D κυτταρική καλλιέργεια [282], ενώ η αντικατάσταση του παραδοσιακού παράγοντα σχηματισμού σταυροδεσμών MBA από την αποικοδομήσιμη *N,N'*-δισ(ακρυλοϋλ)κυσταμίνη έχει αναφερθεί ότι προκαλεί την αύξηση του ποσοστού ενθυλάκωσης και προάγει την ταχύτερη απελευθέρωση του φαρμάκου [382]. Η κινητική της απελευθέρωσης DOX από νανοπηκτές P(NiPAm-co-Am-co-AIAm), όπου Am: ακρυλαμίδιο και AIAm: αλλουλαμίνη, μελετήθηκε επίσης στα πλαίσια της εργασίας των Rahimi et al., όπου υποδείχθηκε γρηγορότερη απελευθέρωση του φαρμάκου αυξανόμενης της θερμοκρασίας, σε pH = 7.4 [383]. Παρόμοια συμπεράσματα σημειώθηκαν κατά την μελέτη ενός παρεμφερούς συστήματος, για το οποίο επιπλέον βρέθηκε ότι η προσθήκη του μαλεϊκού οξέος ως συμμονομερές σε μικροπηκτές PNIPAM, ευνοεί την ενθυλάκωση της DOX [384].

Η ενθυλάκωση και ελεγχόμενη αποδέσμευση της DOX από νανοϋβριδικές μικροπηκτές μορφολογίας core/shell, με φθορίζον πυρήνα από κοίλα ΝΣ SiO₂ “εμποτισμένα” με FITC και κέλυφος από P(NiPAm-co-AAc) έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία [385]. Αξιοσημείωτο εύρημα υπήρξε το υπέρτερο προφίλ (ταχύτερης και σχεδόν πλήρους) απελευθέρωσης της DOX από το core/shell σύστημα έναντι των υπολοίπων εξεταζόμενων στην εργασία [SiO₂@DOX, P(NiPAm-co-AAc)@DOX]. Υβριδικές μικροπηκτές PNIPAm με διάσπαρτη νανοφάση γραφενίου χρησιμοποιήθηκαν για την φωτο-επαγόμενη αποδέσμευση της DOX [90], αξιοποιώντας την ευαισθησία του γραφενίου στο εγγύς υπέρυθρο (NIR). Το ίδιο NIR φωτοθερμικό ερέθισμα χρησιμοποιήθηκε για την αποδέσμευση της DOX από νανοϋβριδικά με πυρήνα νανοράβδων Au επικαλυμένων με SiO₂ και κέλυφος P(NiPAm-co-AAc) [386]. Όσον αφορά την κατηγορία των θερμοαποκρίσιμων/μαγνητικών νανοϋβριδικών, πολύ πρόσφατα ένα core/shell σύστημα με πυρήνα που αποτελείται από υαλωμένες πλειάδες (clusters) νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου (NΣΟΣ) και κέλυφος μικροπηκτής P(NiPAM-co-MAAc) (MAAc: μεθακρυλικό οξύ) επέδειξε σχεδόν ποσοτικά ποσοστά ενθυλάκωσης DOX και πολλαπλώς ελεγχόμενη αποδέσμευση [387]. Συγκεκριμένα, το πολυμερικό κέλυφος διασταυρώθηκε με BAC, με αποτέλεσμα την ελεγχόμενη αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών σε χαμηλές συγκεντρώσεις γλουταθειόνης, ενώ αναφέρεται η ταχύτερη αποδέσμευση της DOX για $T > VPTT$ και pH = 5. Σε συγγενικά συστήματα, η ομάδα της Pellegrino έχει επιδείξει

σημαντική ερευνητική δράση στο πεδίο της ελεγχόμενης αποδέσμευσης DOX με εφαρμογή εναλλασόμενων μαγνητικών πεδίων, αξιοποιώντας το φαινόμενο της μαγνητικής υπερθερμίας. Παρ' όλα αυτά οι εργασίες πραγματοποιούνται είτε νανοϋβριδικά με μη-διασταυρωμένο κέλυφος [388, 389], είτε συστήματα με κέλυφος μικροπηκτικής των οποίων το μέγεθος εντοπίζεται κοντά στο 1 μm [390]. Η DOX έχει επίσης συνδεθεί ομοιοπολικά σε μικροπηκτές PNIPAm μέσω του σχηματισμού δεσμού υδραζόνης [391]. Η λύση του δεσμού σε χαμηλό pH παρέχει το ερέθισμα για την ενεργητική απελευθέρωση του φαρμάκου. Πρέπει να τονιστεί ότι ο έλεγχος των υδροδυναμικών διαστάσεων και η διατήρησή τους σε χαμηλά επίπεδα, σε όσες από τις παραπάνω εργασίες αναφέρεται η χρήση μικροπηκτών με βάση το PNIPAm, έχει ανεξαιρέτως πραγματοποιηθεί μέσω της προσθήκης SDS στην αντίδραση πολυμερισμού, σε αντίθεση με το συνθετικό πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας διατριβής.

Στο πρώτο σκέλος των βιολογικών πειραμάτων μελετήθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με laser σε πραγματικό χρόνο, η κυτταρική πρόσληψη των δειγμάτων PNS@F25 και PNS@F25#I10 (εφεξής PF και PFI αντίστοιχα) σε καρκινικά κύτταρα της σειράς HeLa. Εν συνεχεία, τα υλικά αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την ενθυλάκωση και την ποιοτική μελέτη της αποδέσμευσης DOX. Με γνώμονα την εξακρίβωση του μηχανισμού ενθυλάκωσης και αποδέσμευσης, συντέθηκε δείγμα θερμοαποκρίσιμων/μαγνητικών νανοϋβριδικών με ονομαστικό ποσοστό ανόργανης φάσης 6%, PNS#I6 (εφεξής PI) και μελετήθηκε συνδυαστικά με τα PF και PFI. Τα ενθυλακωμένα με φάρμακο υλικά χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα κυτταρικής πρόσληψης και η κατανομή τους στα κύτταρα εξετάστηκε εκ νέου με συνεστιακή μικροσκοπία. Η κυτταροτοξικότητα του συνόλου των δειγμάτων μελετήθηκε με δοκιμή MTT, ενώ η αποδέσμευση του φαρμάκου στους 37 °C και για pH = 5 και σε pH = 7, μελετήθηκε ποιοτικά με εφαρμογή φασματοσκοπίας UV-Vis.

6.2 Πειραματικό Μέρος

6.2.1 Κυτταρική Καλλιέργεια και Επώαση Κυττάρων HeLa με Νανοπηκτές για την Παρατήρηση με Συνεστιακή Μικροσκοπία

Καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας της σειράς HeLa επώαστηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες (37 °C, 5% CO₂) και θρεπτικό ορό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low Glucose with 10% heat-inactivated calf serum). Τα κύτταρα σχηματίζουν μονοστοιβάδα και αφέθηκαν να αναπτυχθούν μέχρι ~70 % επικάλυψης. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και τοποθετήθηκαν σε ειδικά τριβλία των 35 mm (ibidi μ -dishes) σε συγκέντρωση 12x10⁴ κύτταρα/τριβλίο. Έπειτα από 24 h, το θρεπτικό μέσο αφαιρέθηκε και αντ' αυτού προστέθηκε 1 ml ορού PBS (phosphate buffer saline, φυσιολογικός φωσφορικός

ορός) στον οποίο βρίσκονταν διάσπαρτες οι νανοπηκτές σε προκαθορισμένες συγκεντρώσεις. Μετά την επώαση στους 37 °C για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, ακολούθησαν 5 διαδοχικές εκπλύσεις με PBS για την αφαίρεση μη ενθυλακωμένου υλικού στα κύτταρα και προστέθηκε 1 ml ορού PBS πριν από την απ'ευθείας τοποθέτηση για παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser TCS SP5 της εταιρίας Leica. Η επεξεργασία των εικόνων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό LAS AF Lite.

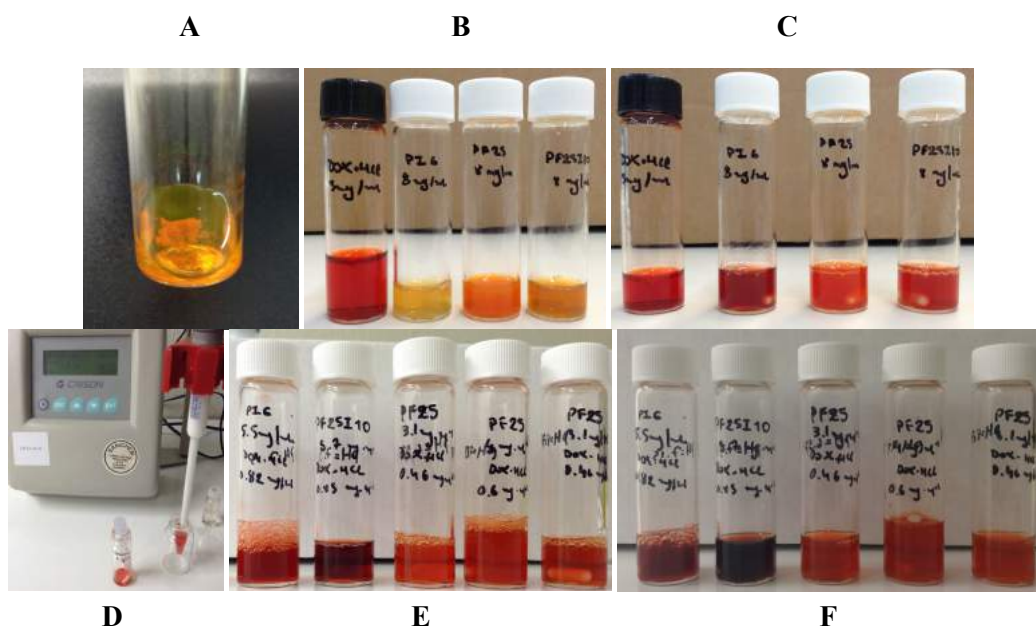
6.2.2 Μελέτη Κυτταροτοξικότητας

Η δοκιμή MTT εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων HeLa έπειτα από την επώαση με τις νανοπηκτές σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Λεπτομερέστερη περιγραφή των πειραματικών συνθηκών σχετικά με την επιλογή και τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων ακολουθεί στην Παράγραφο 6.3.2. Κύτταρα HeLa συλλέχθηκαν και τοποθετήθηκαν σε φρεάτια πλάκας 96 θέσεων (8000 κύτταρα/φρεάτιο). Έπειτα από 24 h, 100 μl του θρεπτικού ορού DMEM αντικαταστάθηκαν με τον ίδιο όγκο κατάλληλα αραιωμένων αιωρημάτων νανοπηκτών για την επίτευξη προκαθορισμένων συγκεντρώσεων και ακολούθησε επώαση των κυττάρων σε αυτές τις συνθήκες για 24 h στους 37 °C. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης το θρεπτικό μέσο αφαιρέθηκε και στα φρεάτια προστέθηκαν 100 μl από διάλυμα MTT συγκέντρωσης 5 mg.ml⁻¹ (Sigma), οπότε και αφέθηκαν για επιπλέον 4 h στους 37 °C. Μετά το πέρας των 4 h, το διάλυμα MTT αφαιρέθηκε, προστέθηκαν 100 μl “στατικού” διαλύματος (20% SDS σε 50% DMF/H₂O) και τα κύτταρα αφέθηκαν για ~ 12 h μακριά από το φως. Η απορρόφηση από κάθε φρεάτιο στα 493 nm μετρήθηκε αυτόματα σε φασματοφωτόμετρο τύπου plate-reader. Η απορρόφηση αναφοράς προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας απεσταγμένο H₂O.

6.2.3 Ενθυλάκωση DOX σε Νανοπηκτές: Παρασκευή PF@DOX, PFI@DOX, και PI@DOX

Η ενθυλάκωση της DOX πραγματοποιήθηκε τροποποιώντας όπου κρίθηκε απαραίτητο το πρωτόκολο των Hu et al. [385]. Ποσότητες στοκ αιωρημάτων γνωστής συγκέντρωσης PF, PFI και PI (βλ. Παράγραφο 6.4 για σύνθεση/επεξεργασία του PI) συμπυκνώθηκαν στον περιστροφικό εξατμιστή (Εικόνα 6.1.A) και εκ νέου αραιώθηκαν με δις απεσταγμένο H₂O σε συγκέντρωση 8 mg.ml⁻¹ (Εικόνα 6.1.B). Σε 1 ml από τις διασπορές προστέθηκαν 400 μl ενός διαλύματος DOX 3 mg.ml⁻¹ (Εικόνα 6.1.C). Η αναλογία μάζας DOX:Νανοπηκτές ισούται με 1,2 mg / 8 mg = 15 %. Έπειτα από την προσθήκη της DOX το pH των διασπορών μεταβλήθηκε με αποτέλεσμα την επαναρρύθμιση του σε pH=7 χρησιμοποιώντας αραιά διαλύματα NaOH/HCl 10⁻² M. Το pH καταγράφηκε με επιτραπέζιο

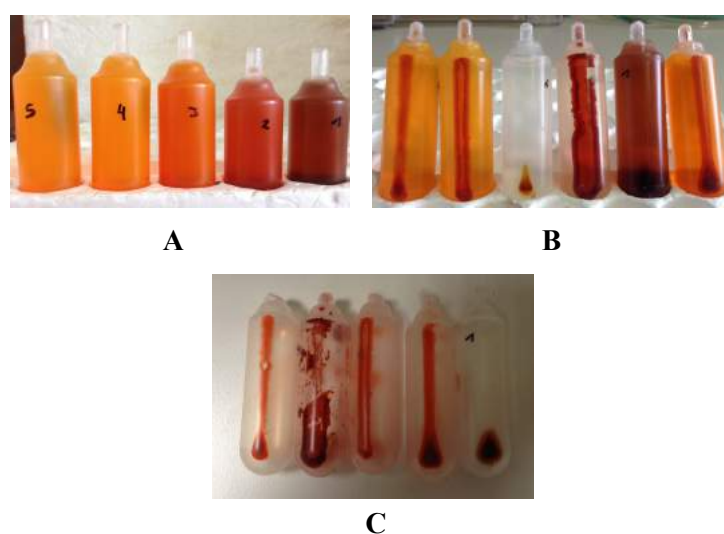
όργανο της εταιρίας Crison (Εικόνα 6.1.D). Σημαντική παράμετρος στην διαδικασία υπήρξε η ελαχιστοποίηση της απόκλισης από την αρχική συγκέντρωση των αιωρημάτων ούτως ώστε να διατηρηθούν το δυνατόν ομοιογενείς συνθήκες ενθυλάκωσης. Η νέες πειραματικές συγκεντρώσεις καταγράφηκαν και τα αιωρήματα αφέθηκαν μακριά από το φως για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση. Μετά το πέρας των 24 h παρατηρήθηκε αλλαγή στο χρώμα των διασπορών, γεγονός το οποίο υποδήλωσε την αλληλεπίδραση της DOX με τα υποστρώματα (Εικόνες 6.1.E και 6.1.F).



Εικόνα 6.1 Πειραματική πορεία ενθυλάκωσης DOX στις νανοπηκτές.

Το επόμενο στάδιο περιλάμβανε την απομόνωση των συμπλεγμένων με DOX νανοπηκτών. Προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι μέσω θέρμανσης σε $T > VPTT$, θρόμβωσης με σταγόνες πυκνού AcCOOH και συμβατικής φυγοκέντρησης σε δειγματοφορείς Eppendorf στις 15000 RPM, καθίσταται δυνατή η απομόνωση των συμπλεγμένων υλικών. Τα πειράματα κατέδειξαν την ποσοτική ενθυλάκωση της DOX στα δείγματα τα οποία περιείχαν την ανόργανη μαγνητική φάση (PI και PFI) καθώς το υπερκείμενο βρέθηκε άχρωμο και διαυγές. Παρ' όλα αυτά, η επιβολή όξινων συνθηκών ακόμα και για 1-2 min έως την κατακρήμνιση είναι δυνατόν να προκαλέσει την αποδέσμευση της DOX και συνεπώς δεν συνιστά δόκιμη πειραματική πρακτική απομόνωσης. Τα δείγματα απομονώθηκαν με υπερφυγοκέντρηση στις 25000 RPM χρησιμοποιώντας την συσκευή L8-80M και τον ρότορα NVT 100 της εταιρίας Beckman-Coulter. Μία κρίσιμη πειραματική περιπλοκή στάθηκε η απαραίτητη αραιώση των διασπορών για την τοποθέτηση στους ειδικά σφραγισμένους δειγματοφορείς σε

συγκεντρώσεις της τάξης των $\sim 0.28 - 0.53 \text{ mg.ml}^{-1}$ (Εικόνα 6.2.A). Η αυξημένη κολλοειδής σταθερότητα των δειγμάτων των PF και PFI για το δεδομένο εύρος συγκεντρώσεων υπήρξε απαγορευτικός παράγοντας στην απομόνωση με υπερφυγοκέντριση (Εικόνα 6.2.B). Αντίθετα, αξιοσημείωτη υπήρξε η πλήρης κατακρήμνιση και απομόνωση του PI@DOX, όπως αποδεικνύεται από το διαυγές υπερκείμενο διάλυμα (τέταρτος περιέκτης από αριστερά στην Εικόνα 6.2B). Οι συγκεντρώσεις των κατακρημνισμάτων (Εικόνα 6.2.C) ως προς την DOX εξήχθησαν έπειτα από επαναδιασπορά σε 2 ml δις απεσταγμένο H₂O και μέτρηση της απορρόφησης στα 550 nm με χρήση φασματο-φωτόμετρου UV-Vis. Είχε προηγηθεί η κατασκευή καμπύλη βαθμονόμησης από διαλύματα μεταβλητής συγκέντρωσης DOX σε H₂O (βλ. Σχήμα Π6.1 Παράρτημα Κεφαλαίου).

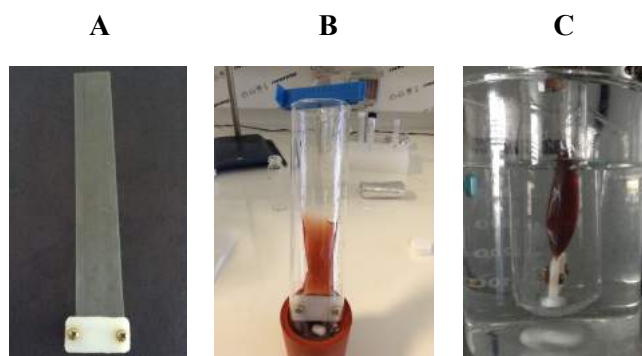


Εικόνα 6.2 Αιωρήματα PF@DOX (#3), PFI@DOX (#1) και PI@DOX(#2) πριν (A) και μετά (B) την υπερφυγοκέντριση. (C) Στερεό υπόλειμμα.

6.2.4 Ποιοτική Μελέτη Αποδέσμευσης Δοξορουβικίνης από PF@DOX, PFI@DOX, και PI@DOX

Η ποσοτική μελέτη στα δείγματα PF και PFI κατέστη ανέφικτη λόγω της αδυναμίας πλήρους κατακρήμνισης των νανοπηκτών, σε αντίθεση με το δείγμα PI το οποίο ανακτήθηκε πλήρως. Πραγματοποιήθηκε ποιοτική μελέτη της αποδέσμευσης για όλα τα δείγματα όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 6.3.3. Χρησιμοποιήθηκε αυτοσχέδια πειραματική διάταξη (Εικόνα 6.3) η οποία αποτελούνταν από θερμοστατούμενο υάλινο κυλινδρικό περιεκτή, στο εσωτερικό του οποίου τοποθετείτο μεμβράνη διαπίδισης (Spretapore, 3 kDa cutoff) που περιείχε τα αιωρήματα. Η θερμοκρασία σε όλα τα πειράματα ρυθμίστηκε στους 37 °C. Το pH των αιωρημάτων και του διαλύματος αποδέσμευσης στο

εσωτερικό του κυλινδρικό περιέκτη ρυθμίστηκε με προσθήκη αραιών διαλυμάτων NaOH και AcCOOH. Ποσότητες από το αιώρημα διαπίδησης, πριν και μετά την πάροδο 24 h ελήφθησαν και αραιώθηκαν πριν την μελέτη με φασματοσκοπία UV-Vis χρησιμοποιώντας το όργανο BioSpec mini-1240 της εταιρίας Shimadzu. Το διάλυμα αποδέσμευσης μελετήθηκε χωρίς αραιώση λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης DOX σε κάθε περίπτωση.

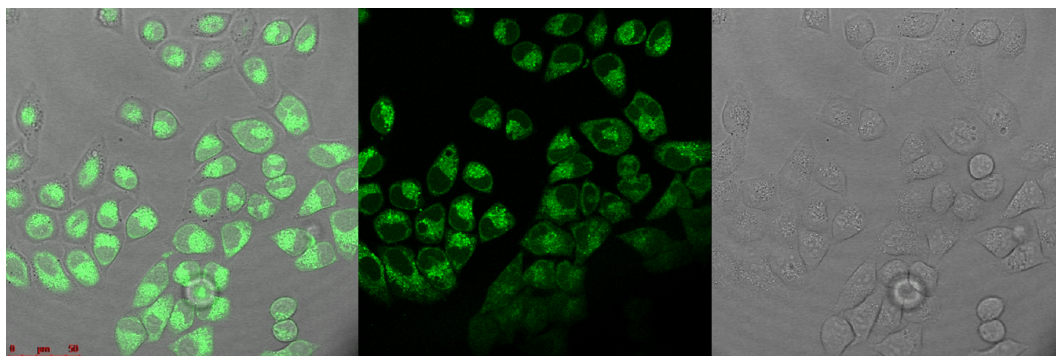


Εικόνα 6.3 Μembrάνη διαπίδησης με βιδωτό κλιπ στο άκρο, (A) πριν και (B) μετά την προσθήκη PFI@DOX και την τοποθέτηση στον κυλινδρικό περιέκτη. (C) Πλάγια όψη της διάταξης μετά την τοποθέτηση σε θερμοστατούμενο υδατόλουτρο.

6.3 Αποτελέσματα

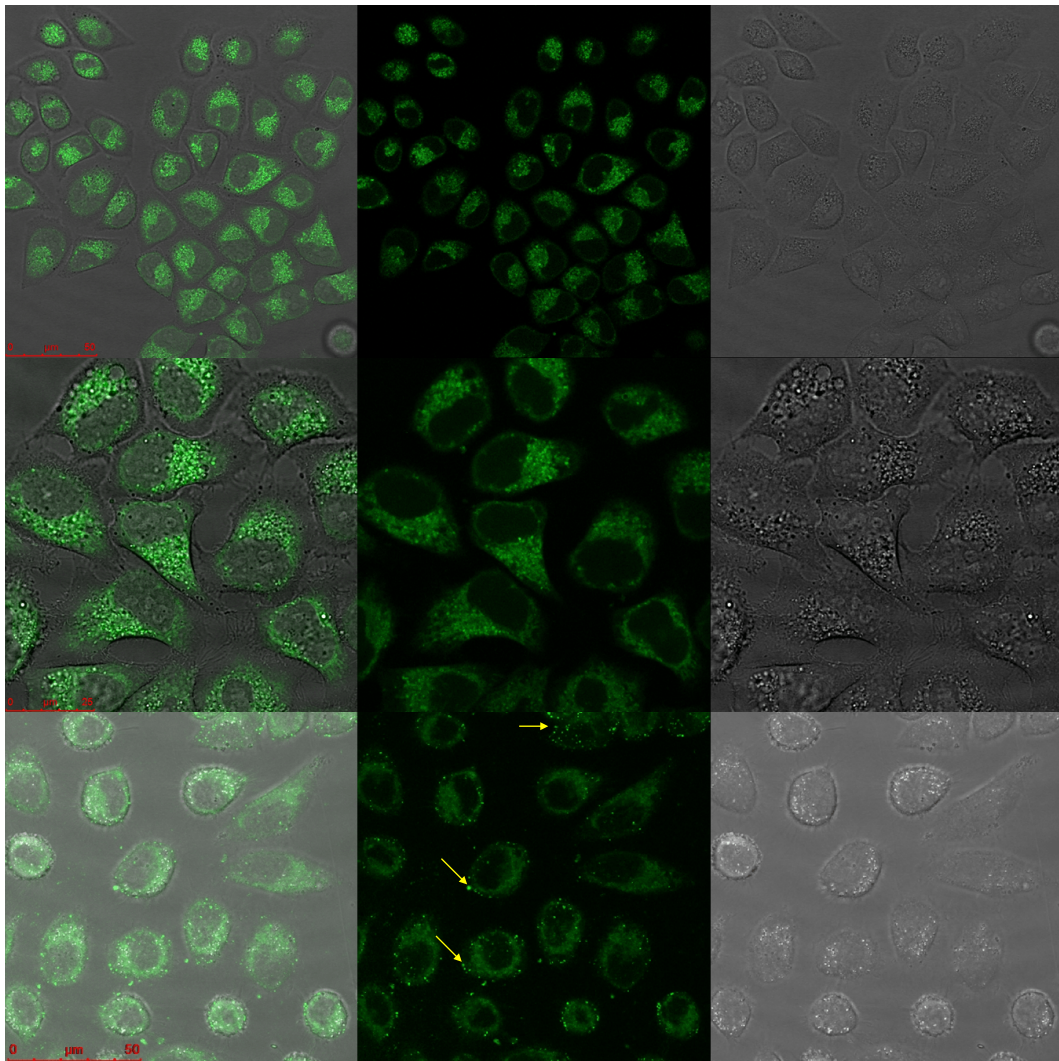
6.3.1 Κυτταρική Απεικόνιση

Η αρχική συγκέντρωση της μελέτης κυτταρικής πρόσληψης των νανοπηκτών ορίστηκε στα 40 μM υποκατεστημένων καρβοξυλικών θέσεων. Υπενθυμίζεται ότι υφίστανται 0.14 μmol -FL ανά mg PNS@F25, δηλαδή το αιώρημα τροφοδοσίας είχε συγκέντρωση, εκτεφρασμένη ως προς τη μάζα του πολυμερούς, 0.285 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ο χρόνος επώασης για την πρώτη σειρά ήταν 2 h. Όπως είναι εμφανές στην Εικόνα 6.4, οι



Εικόνα 6.4 Από αριστερά προς τα δεξιά: Σύνθετο σήμα, σήμα φθορισμού και σήμα φωτεινού πεδίου συνεστιακής μικροσκοπίας PF_40 μM _2h.

μικροπηκτές εντοπίζονται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα, σχηματίζοντας κυστίδια. Το έντονο σήμα φθορισμού υποδεικνύει την πρόσληψη μεγάλου αριθμού νανοπηκτών. Η απουσία σήματος φθορισμού από τον πυρήνα επιβεβαιώνει την σταθερή πρόσδεση των χρωμοφόρων στις νανοπηκτές καθώς σε αντίθετη περίπτωση θα αναμενόταν η διάχυση της μοριακής χρωμοφόρας σε όλο το κύτταρο. Για την αποφυγή πρόκλησης κυτταρικού στρες, το οποίο θα οφειλόταν σε μηχανικές βλάβες λόγω της παρουσίας σημαντικού πληθυσμού ξένων σωματιδίων, σε επόμενο πείραμα (Εικόνα 6.5, πρώτη σειρά) τα κύτταρα τροφοδοτήθηκαν με την ίδια συγκέντρωση (40 μM) υποδιπλασιάζοντας τον χρόνο επώασης.



Εικόνα 6.5 Από αριστερά προς τα δεξιά: Σύνθετο σήμα, σήμα φθορισμού και σήμα φωτεινού πεδίου συνεστιακής μικροσκοπίας PF_40 μM _1h (πρώτη σειρά), PF_20 μM _30min (δεύτερη σειρά) και PFI_20 μM _30min (τρίτη σειρά).

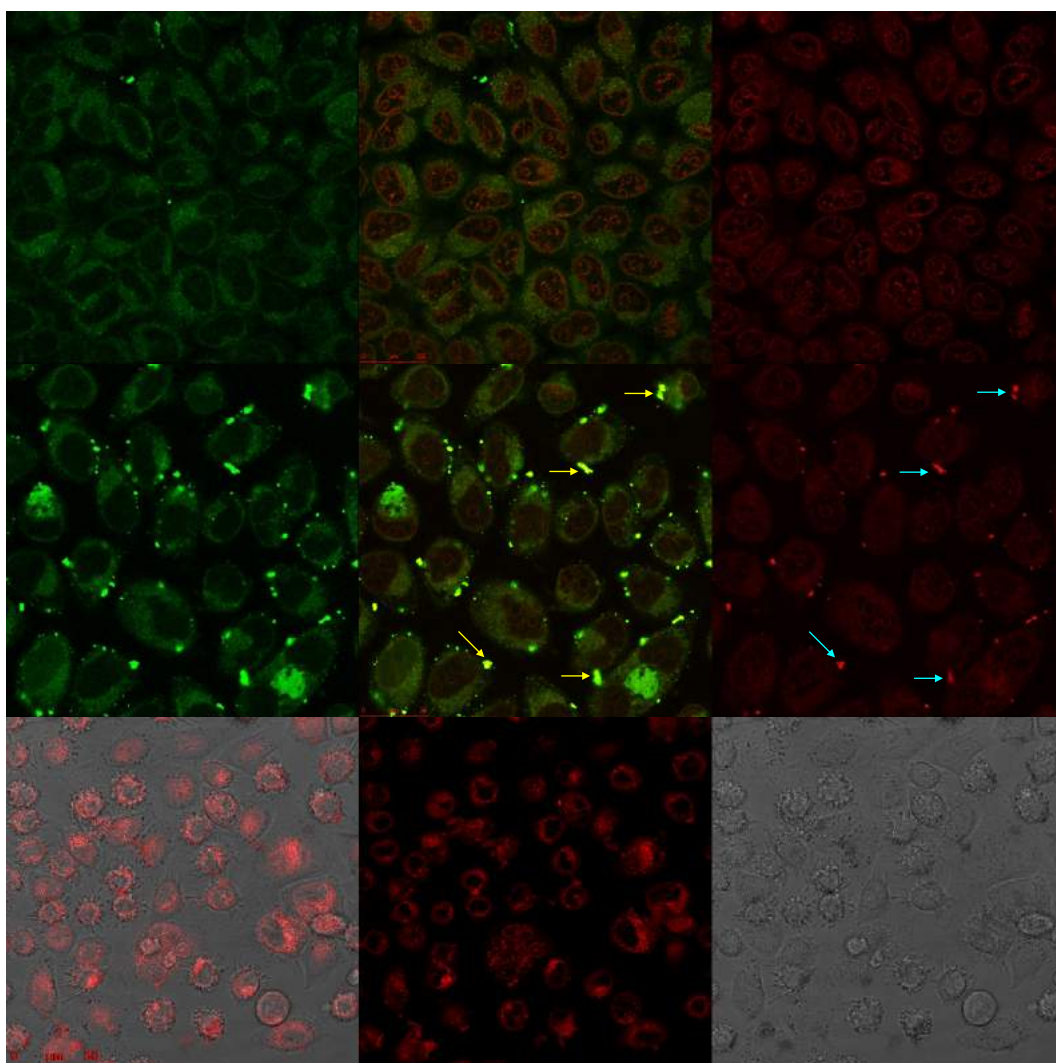
Σε ποιοτικό επίπεδο, από την σύγκριση της έντασης του σήματος στις εικόνες φθορισμού για χρόνους επώασης 2h και 1h μπορεί να συναχθεί ότι η διαδικασία πρόσληψης συνεχίζεται

πέραν της 1h. Με σκοπό την ελαχιστοποίηση του χρόνου επώασης και της συγκέντρωσης τροφοδοσίας, διατηρώντας παράλληλα ισχυρό σήμα φθορισμού, και οι δύο παράμετροι υποδιπλασιάστηκαν περαιτέρω. Οι κυστιδικές δομές απεικονίζονται ευκρινώς στο πείραμα PF_20μM_30min (Εικόνα 6.5, δεύτερη σειρά). Οι δεδομένες συνθήκες επιβλήθηκαν και για την περίπτωση του νανοϋβριδικού PFI (Εικόνα 6.5, τρίτη σειρά). Παρατηρήθηκε αφενός μικρή εξασθένηση του σήματος φθορισμού η οποία όπως έχει συζητηθεί οφείλεται στην επίδραση της μαγνητικής φάσης και αφετέρου αναγνωρίστηκε ο σχηματισμός συσσωματωμάτων, τα οποία εμφανίζονται ως φωτεινά στίγματα στην περιφέρεια των κυττάρων (κίτρινα βέλη).

Αφού επιβεβαιώθηκε η επιτυχής κυτταρική πρόσληψη, το επόμενο πειραματικό στάδιο αφορούσε την μελέτη της συμπεριφοράς των συμπλεγμένων με DOX νανοφορέων. Η στοιχειομετρία των πειραμάτων εξήχθη με βάση την συγκέντρωση της DOX και ορίστηκε στα 20 μM. Ενδεικτικά, αν υποθεθεί ότι σε αντιστοιχία με το PI η DOX ενθυλακώνεται ποσοτικά στο PFI, η αναλογία μεταξύ φέροντων μορίων DOX και υποκατεστημένων θέσεων -COOH είναι ίση με $[DOX]:[-COOH] = 1.84$. Αντίθετως δεν υπάρχουν ενδείξεις για την υιοθέτηση ανάλογης συλλογιστικής στην περίπτωση του PF. Στην Εικόνα 6.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης με συνεστιακή μικροσκοπία. Οι χρόνοι επώασης διατηρήθηκαν στα 30 min για τα δείγματα PF και PFI, ενώ η ευκρινής απεικόνιση των κυττάρων για το PI κατέστη εφικτή επιβάλλοντας πολύ σύντομους χρόνους επώασης (5 min). Παρατηρήθηκε ότι:

1. Το σήμα φθορισμού από το πράσινο κανάλι (το οποίο οφείλεται αποκλειστικά στον νανοφορέα PF) παραμένει εντοπισμένο από το κυτταρόπλασμα, ενώ την ίδια στιγμή το σήμα φθορισμού από το κόκκινο κανάλι (το οποίο οφείλεται αποκλειστικά στην DOX) έχει διαχυθεί προς τον πυρήνα. Το κίτρινο χρώμα στο σύνθετο σήμα οφείλεται στην ταυτόχρονη εκπομπή πράσινου και κόκκινου σήματος. Σημειώνεται ότι το αφού το αιώρημα τροφοδοσίας παρασκευάστηκε έπειτα από κατακρήμνιση του PF@DOX η περίπτωση σχηματισμού φυσικού μίγματος PF και ελεύθερης DOX έχει αποκλειστεί.
2. Το ίδιο μοτίβο ακολουθείται και στην περίπτωση του PFI@DOX, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού των συσσωματωμάτων τα οποία τώρα έχουν την μορφή έντονα φωτεινών κηλίδων (κίτρινα βέλη). Η έντονη εκπομπή σήματος από τα συσσωματώματα στο κόκκινο κανάλι (γαλάζια βέλη) συνάδει με τις εως τώρα ποιοτικές παρατηρήσεις περί της ενθυλάκωσης της DOX σε μεγάλο ποσοστό. Επιπλέον, υποδηλώνει ισχυρή πρόσδεση των μορίων DOX επάνω στα PFI@DOX για τις συνθήκες που επικρατούν στον εξωκυττάριο χώρο (37 °C, ορός PBS, pH = 7.4) καθώς σε αντίθετη περίπτωση θα είχε απομακυνθεί μέσω των διαδοχικών εκπλύσεων του τριβλίου παρατήρησης με PBS.
3. Η παρατήρηση των κυττάρων που επώαστηκαν με PI@DOX_20μM για 30min δεν κατέστη δυνατή διότι τα κύτταρα είχαν καταστραφεί και αποκολληθεί από το τριβλίο

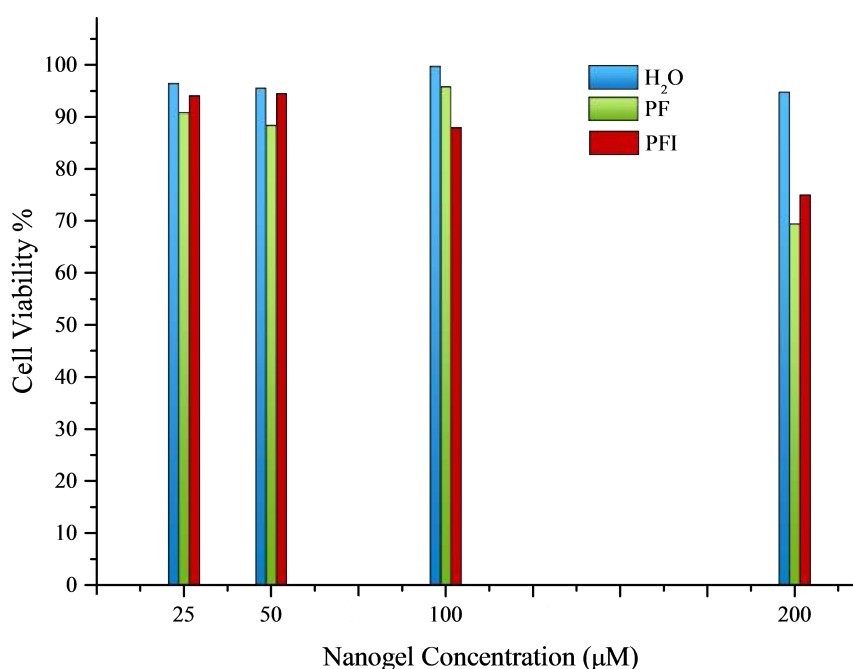
παρατήρησης (Εικόνα Π6.1 στο Παράρτημα του Κεφαλαίου). Όμοια συμπεριφορά έχει αναφερθεί επίσης για συναφές σύστημα με ενθυλακωμένη DOX [388]. Η επώαση για 5 min επέφερε την κυτταρική πρόσληψη μεγάλου αριθμού νανοϋβριδικών PI@DOX. Στα εν λόγω υλικά δεν έχει πραγματοποιηθεί φθορίζουσα επισήμανση, οπότε μπορεί ασφαλώς να συναχθεί αφενός ότι και σε αυτή την περίπτωση οι νανοφορείς εντοπίζονται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα και αφετέρου ότι η DOX δεν διαχέεται στον πυρήνα έπειτα από παρέλευση 5 min. Λόγω της πλήρους ανάκτησης της DOX στα PI@DOX, η πειραματική συγκέντρωση των PI@DOX_20 μM εκπεφρασμένη ως προς τη μάζα του πολυμερούς αντιστοιχεί σε 0.077 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.



Εικόνα 6.6 Από αριστερά προς τα δεξιά: Σήμα φθορισμού του πράσινου καναλιού, σύνθετο σήμα και σήμα φθορισμού του κόκκινου καναλιού συνεστιακής μικροσκοπίας PF@DOX_20 μM _30min (πρώτη σειρά), PFI@DOX_20 μM _30min (δεύτερη σειρά) και PI@DOX_20 μM _5min (τρίτη σειρά).

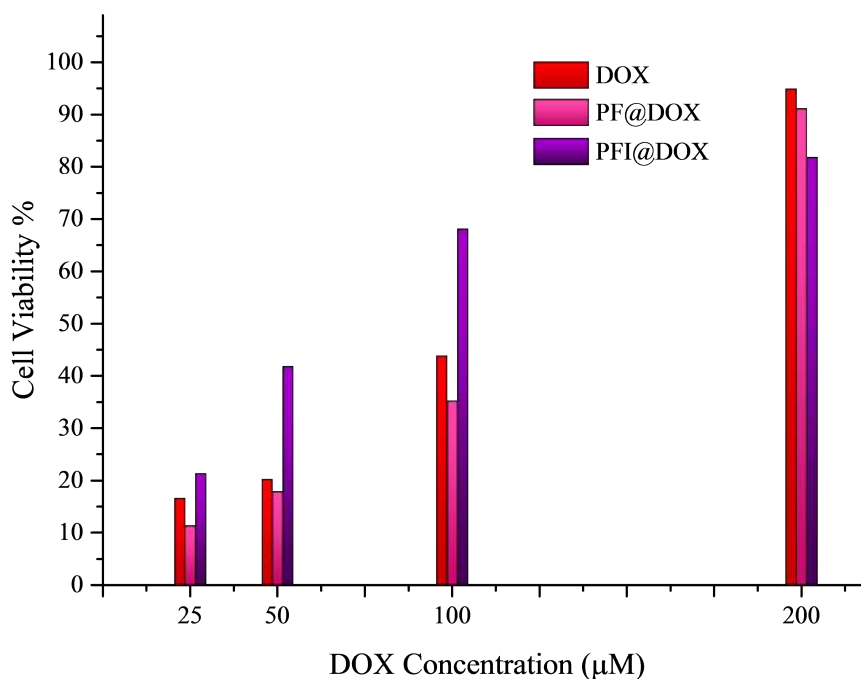
6.3.2 Βιωσιμότητα Κυττάρων

Η δοκιμή MTT εφαρμόστηκε για τον χρωματομετρικό προσδιορισμό της κυτταρικής βιωσιμότητας. Συνοπτικά, η MTT αποτελεί οργανική ένωση η οποία υιοθετεί την δομή τετραζόλης και χαρακτηρίζεται από κίτρινο χρώμα σε διάλυμα. Υπό την επίδραση της μιτοχονδριακής ρεδοκτάσης (mitochondrial reductase), ενός ενζύμου με αναγωγική δράση το οποίο είναι παραπροϊόν του κυτταρικού μεταβολισμού, ανάγεται και μετασχηματίζεται σε φορμαζίνη με χαρακτηριστικό μωβ χρώμα. Η τιμή της απορρόφησης στα 470 nm συσχετίζεται με τον ζωντανό κυτταρικό πληθυσμό. Με H₂O συμβολίζονται τα πειράματα ελέγχου όπου προστέθηκαν ίσοι όγκοι δις απεσταγμένου νερού με αυτούς οι οποίοι προστέθηκαν στα πειράματα με τις νανοπηκτές. Σε αντιστοιχία με τα πειράματα κυτταρικής απεικόνισης οι συγκεντρώσεις εκφράστηκαν ως προς τις υποκατεστημένες με -FL θέσεις για τα δείγματα PF και PFI και ως προς την DOX για τα δείγματα PF@DOX και PFI@DOX. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στα Σχήματα 6.2 και 6.3.



Σχήμα 6.2 Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων HeLa για επώαση 48h με διαφορετικές συγκεντρώσεις PF και PFI. Απεσταγμένο H₂O χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα ελέγχου.

Τα πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα PF και PFI αποκάλυψαν εξαιρετική κυτταρική βιωσιμότητα, πάνω από 85% σε όλες τις περιπτώσεις, για συγκέντρωση μέχρι και 100 μM (0.713 mg.ml⁻¹ πολυμερούς). Τα αποτελέσματα



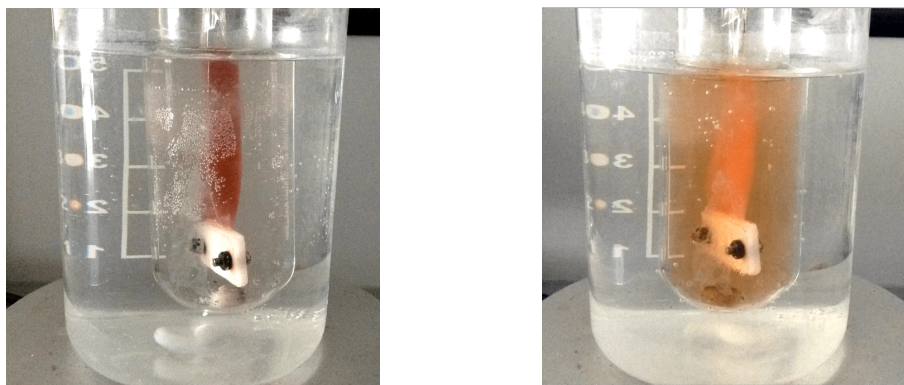
Σχήμα 6.3 Ποσοστό βιωσιμότητας κυττάρων HeLa για επώαση 48h με διαφορετικές συγκεντρώσεις DOX, PF@DOX και PFI@DOX.

καταδεικνύουν την καταλληλότητα των νανοφορέων για βιολογική χρήση. Στην υψηλότερη πειραματική συγκέντρωση των 200 uM παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας πιθανότατα, λόγω της υπερβολικής συσσώρευσης νανοπηκτών στο εσωτερικό των κυττάρων. Η επιβολή τόσο υψηλών συγκεντρώσεις δεν αποτελεί ρεαλιστικό σενάριο για εφαρμογές *in vivo*, παρά ταύτα μέσω της δοκιμής αποδεικνύεται η εύκολη πρόσληψη των νανοφορέων από τα κύτταρα HeLa. Στα πειράματα όπου οι νανοφορείς ήταν συμπλεγμένοι με DOX, επεδείχθη συμπεριφορά αντίστροφη της αναμενόμενης: ενώ η κυτταρική βιωσιμότητα βρέθηκε πολύ χαμηλή για συγκέντρωση DOX 25 μM παρουσίασε συνολικά αύξηση για τις επόμενες πειραματικές τιμές. Όπως θα καταστεί σαφές στην συζήτηση που ακολουθεί, η μείωση της κυτταροτοξικότητας δεν σχετίζεται με την αποτελεσματικότητα του συστήματος αυτού καθ'αυτού, αλλά με την κolloειδή σταθερότητα στις συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος.

6.3.3 Αποδέσμευση DOX

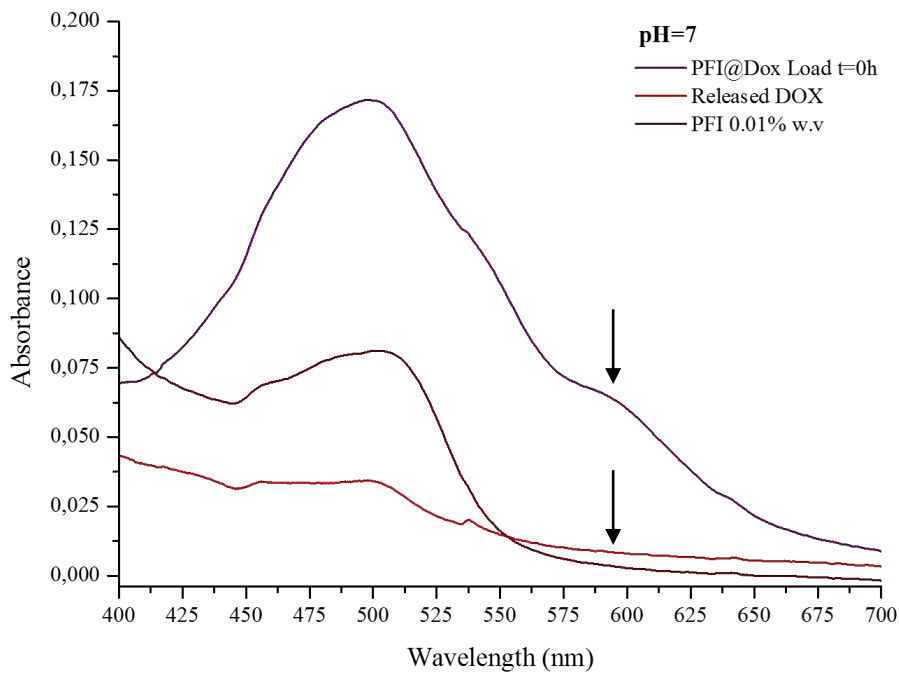
Σκοπός της ποιοτικής μελέτης της αποδέσμευσης υπήρξε η διακρίβωση των συνθηκών κάτω από τις οποίες η DOX αποβάλλεται από τους νανοφορείς. Τα πειράματα διεξήχθησαν σε τιμές pH = 7 και pH = 5, ενώ η θερμοκρασία κρατήθηκε σταθερή στους 37 °C για την προσομοίωση φυσιολογικών συνθηκών. Οι συγκεντρώσεις των αιωρημάτων αποδέσμευσης ως προς την DOX προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά μέσω της

μέτρησης της απορρόφησης στα 550 nm. Με αυτό τον τρόπο παρακάμφθηκε το πρόβλημα της κοινής απορρόφησης των φθορίζοντων νανοπηκτών και της DOX [389] σε χαμηλότερα μήκη κύματος. Ο ποιοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε μέσω της σύγκρισης των φασμάτων απορρόφησης του αιωρήματος στο εσωτερικό της μεμβράνης αμέσως πριν από την τοποθέτηση και έπειτα από 24 h, καθώς και του διαλύματος αποδέσμευσης. Σε όλα τα δείγματα η αποδέσμευση της DOX σε pH=7 βρέθηκε αμελητέα. Από την άλλη πλευρά, οι νανοφορείς PF@DOX και PI@DOX σχημάτισαν συσσωματώματα και κατακρημνίστηκαν μέσα στην μεμβράνη διαπίδησης στα πειράματα σε pH=5, καθιστώντας αδύνατη την εξαγωγή συμπεράσματος σχετικά με την δυνατότητα αποδέσμευσης σε ελαφρά όξινες συνθήκες. Εντούτοις, η επιτυχημένη αποδέσμευση της DOX σε pH=5 πραγματοποιήθηκε για το δείγμα PFI@DOX (Εικόνα 6.8).

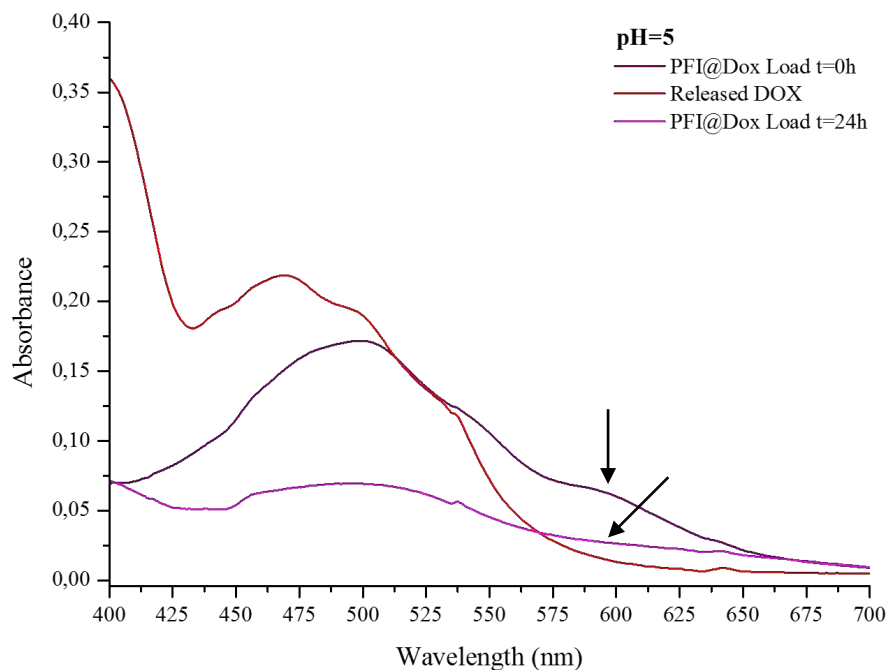


Εικόνα 6.8 Αποδέσμευση DOX από τον νανοφορέα PFI@DOX σε pH=5. Όψη του αντιδραστήρα κατά την έναρξη του πειράματος (αριστερά) και έπειτα από 24 h (δεξιά). Είναι εμφανής ο αποχρωματισμός του αιωρήματος και ο χρωματισμός του διαλύματος αποδέσμευσης.

Η αντίθεση μεταξύ των φασμάτων UV-Vis για τα πειράματα σε pH=7 και pH=5 είναι καταφανής (Σχήματα 6.4 και 6.5). Για λόγους ευκρίνειας, στο γράφημα για pH=7 δεν παρατίθεται το φάσμα του αιωρήματος έπειτα από την παρέλευση 24 h, καθώς πρακτικά ταυτίστηκε με το αρχικό (βλ. Εικόνα Π6.2 στο Παράρτημα Κεφαλαίου). Τα φάσματα λήφθηκαν έπειτα από 1:10 αραίωση των αντίστοιχων αιωρημάτων μέσα στην μεμβράνη διαπίδησης. Η παρατηρούμενη κορυφή στα ~595 nm στο φάσμα του PFI@DOX (βλ. βέλη στο Σχήμα 6.9) είναι χαρακτηριστική του σχηματισμού συμπλόκου μεταξύ της DOX και του νανουβριδικού υποστρώματος. Η κορυφή απουσιάζει τόσο από το φάσμα της DOX (βλ. Σχήμα Π6.1 στο Παράρτημα του Κεφαλαίου) όσο και από το φάσμα του PFI (βλ. Σχήμα 5.18 στο Κεφάλαιο 5). Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις της χρωμοφόρας DOX με φορτισμένες ομάδες των PFI, η επίδραση της ανόργανης μαγνητικής φάσης ή αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα της FL συγκαταλέγονται στις πιθανές αιτίες ανάδυσης της κορυφής. Η κατάσταση διαφοροποιείται δραστικά για pH=5 όπου αφενός παρατηρείται η



Σχήμα 6.4 Φάσματα UV-Vis αιωρήματος PFI@DOX πριν την έναρξη του πειράματος, διάλυματος αποδέσμευσης DOX έπειτα από 24h και πρόδρομου αιωρήματος PFI σε pH = 7.



Σχήμα 6.5 Φάσματα UV-Vis αιωρήματος PFI@DOX πριν την έναρξη του πειράματος και αιωρήματος PFI@DOX - διάλυματος αποδέσμευσης μετά από 24h.

εξάλειψη της κορυφής στο PFI@DOX έπειτα από 24 h σε pH=5 και αφετέρου το διάλυμα αποδέσμευσης εμφανίζει το χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης της DOX (βλ. βέλη στο Σχήμα 6.5). Η εικόνα του αντιδραστήρα, όπου η αποδέσμευση της DOX είναι εμφανής δια γυμνού οφθαλμού, παρουσιάζεται στην Εικόνα 6.8.

6.4 Συζήτηση

Στις αρχικές κατευθυντήριες για την ανάπτυξη ενός νανοφορέα περιλαμβάνονται η δυνατότητα ενεργητικής πρόσδωσης της ενεργής ουσίας και η αποφυγή της πρόωξης αποδέσμευσης, ενώ σε επόμενο επίπεδο ζητούμενο είναι η στοχευμένη κυτταρική πρόσληψη. Αναφορικά, η *in vivo* βιοκατανομή των νανοφορέων εξαρτάται από παράγοντες όπως το μέγεθος, το σχήμα (σφαιρικό, κυβικό ή επιμήκες) και το επιφανειακό φορτίο [372]. Αν τελικά ο νανοφορέας φτάσει στον κυτταρικό στόχο, το είδος του μηχανισμού ενδοκυττάρωσης καθορίζει επίσης και την μετέπειτα συσσώρευση στα κυτταρικά διαμερίσματα [256]. Οι διαθέσιμοι μηχανισμοί ενδοκυττάρωσης περιγράφονται με σαφήνεια σε επισκοπήσεις ειδικότερου ενδιαφέροντος [256, 392]. Ο πιθανότερος μηχανισμός ενδοκυττάρωσης για τα εξεταζόμενα δείγματα της παρούσης διατριβής ακολουθεί την ατραπό της κλαθρίνης (clathrin mediated endocytosis). Αυτή η υπόθεση βασίζεται στα χαρακτηριστικά των φορέων ($100 \text{ nm} < D_H < 200 \text{ nm}$, αρνητικό επιφανειακό φορτίο και σφαιρικό σχήμα) και σε διαθέσιμα βιβλιογραφικά δεδομένα [393]. Η ομάδα της Landfester [394] μελέτησε την πρόσληψη φθορίζοντων ανιοντικών κolloειδών PS από κύτταρα HeLa. Οι παρατιθέμενες εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας στην εργασία εμφανίζουν σημαντικές ομοιότητες με τις Εικόνες 6.3 και 6.4. Οι ερευνητές απέδωσαν την παρουσία των φωτεινών κηλίδων σε πλειάδες κolloειδών PS στα ενδοσώματα ενώ το διάχυτο φωτεινό υπόβαθρο περιμετρικά του πυρήνα στην μερική διαφυγή σωματιδίων από τα εν λόγω κυτταρικά διαμερίσματα. Στην ίδια εργασία, εφαρμόστηκε κρυογενική ηλεκτρονιακή μικροσκοπία διαπερατότητας (cryo TEM) σε λεπτές τομές των κυττάρων HeLa (πάχος ~80 nm). Η χρώση με όσμιο βοήθησε στην οπτικοποίηση της συγκέντρωσης των κolloειδών PS στα ενδοσώματα. Ο εντοπισμός φθορίζοντων ανιοντικών πολυμερικών νανοσωματιδίων πολυ(λακτικού-*co*-γαλακτικού οξέος) (PLGA) στα ενδοσώματα κυττάρων HeLa έχει αποδειχθεί μέσω της χωρικής σύμπτωσης του σήματος με την χρωστική LysoTracker, η οποία χαρακτηρίζεται από επιλεκτική ενδοσωμική συγκέντρωση [395]. Επίσης, ταύτιση με τα παραπάνω ευρήματα έχει αναφερθεί και στην περίπτωση ενδοκυττάρωσης γραμμικών φθορίζοντων πολυμερών με βάση το PNIPAm, όπου ο σχηματισμός των νανοδομών πραγματοποιήθηκε μέσω της μεταβολής του pH στον άμεσο εξωκυττάριο χώρο [396].

Η αλληλουχία των διεργασιών μέσα στο κύτταρο μετά την πρόσληψη μέσω της ατραπού της κλαθρίνης συνίσταται στον σχηματισμό κυστιδίων μέσα στα οποία

εγκολλώνονται οι νανοφορείς, στην σύντηξη των κυστιδίων και στον σχηματισμό των πρώιμων ενδοσωμάτων, την μετατροπή τους σε όψιμα ενδοσώματα και τελικά την συγχώνευση με τα λυσοσώματα [397]. Κάθε μία από τις προαναφερθείσες μεταβολές συνοδεύεται από την μείωση του pH στο άμεσο μικροπεριβάλλον των νανοφορέων, ενώ τελικώς στα λυσοσώματα το pH λαμβάνει τιμές μεταξύ 4.5 - 5. Σε αυτές τις συνθήκες επιτελείται η ενδοκυττάρια αποδέσμευση της DOX και στους τρεις εξεταζόμενους τύπους νανοφορέων. Στην περίπτωση των PF@DOX, ο μηχανισμός αποδέσμευσης της DOX βασίζεται στην ταυτόχρονη ηλεκτροστατική αποσύμπλεξη των ενθυλακωμένων μορίων DOX από τις καρβοξυλικές θέσεις ενώ δεν μπορεί να αποκλειστεί η συνεργιστική απομάκρυνση εξαιτίας της συρρίκνωσης των νανοφορέων στην θερμοκρασία του πειράματος. Από την άλλη πλευρά, η ανόργανη μαγνητική φάση των ΝΣΟΣ επιτελεί σημαντικό ρόλο στην ενθυλάκωση της DOX όπως αποδείχθηκε για τα δείγματα PI@DOX. Κρίνεται αναγκαίο να υπογραμμιστεί ότι αν και ακολουθήθηκε η ίδια σύνθετική πορεία *in situ* εναπόθεσης ΝΣΟΣ στις νανοπηκτές PNS σε ονομαστικό ποσοστό 6% κ.β., τα νανοϋβριδικά PI δεν υπέστησαν την ίδια επεξεργασία με τα ομόλογα PFI. Συγκεκριμένα, έπειτα από την ελάττωση της ιοντικής ισχύος με διαπίδωση και την επαναδιασπορά με σύντομη τοποθέτηση σε λουτρό υπερήχων (βλ. Πειραματικό Μέρος Κεφαλαίου 5) δεν ακολούθησε επικάλυψη με τασιενεργό PSS. Τόσο τα PI όσο και τα PI@DOX εμφάνισαν άριστη κολλοειδή σταθερότητα σε pH = 7 και στο θερμοκρασιακό εύρος ενδιαφέροντος (25 - 45 °C), όπως επιβεβαιώθηκε με μετρήσεις DLS. Το πρωτόκολλο επεξεργασίας παραλάχθηκε ούτως ώστε να εξαλειφθεί η ηλεκτροστατική συνεισφορά του αρνητικά φορτισμένου επιφανειακού στρώματος στην ενθυλάκωση της DOX και να μελετηθεί αμιγώς ο ρόλος των ΝΣΟΣ στον μηχανισμό ενθυλάκωσης. Μία πιθανή ερμηνεία για την ποσοτική ενθυλάκωση της DOX στα PI αποτελεί η συναρμογή (complexation) του μορίου στην επιφάνεια των ΝΣΟΣ. Πράγματι, η μελέτη προσρόφησης του δομικά παρεμφερούς με την DOX μορίου της οξυτετρακυκλίνης, ενός αντιβιοτικού ευρέος φάσματος, στην επιφάνεια α -Fe₂O₃ αιματίτη απέδειξε ότι η διεργασία ελέγχεται από τον σχηματισμό συμπλόκου συναρμογής [398]. Επιπλέον, η ποσοτική ενθυλάκωση της μιτοξανδρόνης, αντικαρκινικής ουσίας της οικογένειας των ανθρακυκλινών, έχει αναφερθεί για νανοϋβριδικές μικροπηκτές P(NiPAm-co-SA)@Fe₃O₄, έναντι ποσοστού 65% απουσία της κεραμικής νανοφάσης [218]. Συνεπώς, για τα συστήματα PF@DOX και PI@DOX μπορεί να συναχθεί ότι:

1. Εμφανίζουν κολλοειδή σταθερότητα σε pH=7, γεγονός το οποίο πιστοποιείται από μετρήσεις DLS και από τον υψηλό βαθμό κυτταρικής πρόσληψης.
2. Η DOX δεν αποδεσμεύεται πριν από την κυτταρική πρόσληψη και την έκθεση στις όξινες συνθήκες των λυσοσωμάτων.
3. Η συμπεριφορά που επεδείχθη στα πειράματα κυτταρικής πρόσληψης δεν κατέστη δυνατό να αναπαραχθούν στα πειράματα αποδέσμευσης.

Η τελευταία παρατήρηση σχετίζεται με περιορισμούς της πειραματικής διάταξης που χρησιμοποιήθηκε: μέσα στην μεμβράνη διαπίδσης και τα δύο υλικά εκτέθηκαν σε ελαφρά όξινη συνθήκη (pH=5) σε θερμοκρασία περί της VPTT. Στους νανοφορείς PF@DOX, η ηλεκτροστατική σύμπλεξη της DOX προκαλεί την εξάλειψη της ηλεκτροστατικής σταθεροποίησης, σε ένα υλικό (PF) όπου ήδη το 25% των επιφανειακών θέσεων έχει υποκατασταθεί από τα υδρόφοβα κατάλοιπα της χρωμοφόρας FL. Ομοίως, στο δείγμα PI@DOX, η μείωση του pH επιφέρει την ελάττωση του μέτρου των ηλεκτροστατικών απώσεων. Μέσω μετρήσεων ηλεκτροφορητικής σκέδασης φωτός το δυναμικό-ζ βρέθηκε περί τα -12 mV σε pH~7, ενώ αντιστοίχως σε pH~5 βρέθηκε ότι η επιφάνεια προσεγγίζει το ισοηλεκτρικό σημείο. Ως εκ τούτου, οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις κυριάρχησαν στην θερμοκρασία διεξαγωγής των πειραμάτων αποδέσμευσης (pH=5, T=37 °C) επιφέροντας την θρόμβωση των PI@DOX. Στον σχηματισμό θρόμβων συμβάλλει επιπρόσθετα η μόνιμη μαγνητική διπολική ροπή που αποκτούν τα πρωτογενή συσσωματώματα με αποτέλεσμα την προαγωγή των ελκτικών μαγνητικών αλληλεπιδράσεων. Κρίσιμος παράγοντας για την δημιουργία θρόμβων στην φασματοσκοπική μελέτη αποτελούν επίσης και οι πολύ μεγαλύτερες πειραματικές συγκεντρώσεις σε σχέση με την μελέτη κυτταρικής πρόσληψης νανοφορέων. Τα παραπάνω εμπόδια θα μπορούσαν να αντιμετωπιστούν με την προσθήκη PSS *ύστερα* από την διαδικασία ενθυλάκωσης της DOX και ανάκτησης με υπερφυγοκέντριση.

Απεναντίας, η εκτεταμένη κolloειδής σταθερότητα του PFI@DOX σε T=37 °C και pH=5 επέτρεψε την προσομοίωση των συνθηκών στα λυσοσώματα και την φασματοσκοπική αποτύπωση της αποδέσμευσης. Η ελεγχόμενη από το pH απελευθέρωση της DOX έχει παρατηρηθεί σε πλειάδα συστημάτων, ενώ ο μηχανισμός της ενδοκυτταρικής αποδέσμευσης έχει επίσης περιγραφεί για pH αποκρίσιμα πολυμερή [399] και συναφή νανοϋβριδικά υλικά με βάση το PNiPAm [400]. Είναι επίσης αξιοπρόσεκτο ότι η ενθυλάκωση DOX σε νανοϋβριδικό σύστημα με μαγνητικό πυρήνα ΝΣΟΣ και πολυμερικό κέλυφος PEG έχει αναφερθεί ότι επιφέρει την σμίκρυνση καρκινικών όγκων σε πειράματα *in vivo* χωρίς την περαιτέρω τροποποίηση της επιφάνειας με παράγοντες στόχευσης όπως μονοκλωνικά αντισώματα ή πεπτίδια [401].

6.5 Συμπεράσματα

Τα φθορίζοντα (PF) και φθορίζοντα νανοϋβριδικά (PFI) υλικά επέδειξαν άριστη βιοσυμβατότητα και δυνατότητα υψηλού βαθμού κυτταρικής πρόσληψης. Το αντικαρκινικό φάρμακο δοξουβικίνη ενθυλακώθηκε επιτυχώς στα παραπάνω υλικά. Ο προσδιορισμός του ποσοστού ενθυλάκωσης δεν κατέστη δυνατόν να εξακριβωθεί εξαιτίας πειραματικών περιορισμών και αποτελεί αντικείμενο μελλοντικής εργασίας. Αντιθέτως, η ποσοτική

ενθυλάκωσης της DOX επιβεβαιώθηκε για το νανοϋβριδικό υλικό PI. Η μελέτη της κυτταρικής πρόσληψης των συμπλόκων PF@DOX, PFI@DOX και PI@DOX με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού με laser καταδεικνύει ότι η απελευθέρωση του φαρμάκου πραγματοποιείται εντός του κυττάρου, ενώ δεν παρατηρείται απελευθέρωση στον εξωκυττάριο χώρο. Τα ευρήματα των πειραμάτων κυτταρικής πρόσληψης επιβεβαιώθηκαν από την φασματοσκοπική μελέτη της αποδέσμευσης για το υλικό PFI@DOX, το οποίο επέδειξε παρατεταμένη κολλοειδή σταθερότητα. Η αποδέσμευση ήταν αμελητέα σε φυσιολογικές συνθήκες, ενώ αντίθετα σημαντική διάχυση φαρμάκου παρατηρήθηκε σε ελαφρά όξινες συνθήκες (37 °C, pH=7.4), προσομοιώνοντας με αυτό τον τρόπο το μικροπεριβάλλον των ενδοσωμάτων. Το *in-vivo* θεραπευτικό αποτέλεσμα των νανοφορέων αποτελεί αντικείμενο μελέτης μελλοντικά.

Κεφάλαιο 7

Γενικά Συμπεράσματα - Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα

Στην παρούσα διατριβή ακολουθήθηκε μία διαδικασία ανάπτυξης για την παρασκευή ενός νανοϋβριδικού υλικού για βιοϊατρικές εφαρμογές ενθυλάκωσης και ελεγχόμενης αποδέσμευσης. Η προετοιμασία του υλικού πραγματοποιήθηκε σε τρία επιμέρους στάδια. Στο πρώτο στάδιο, υλοποιήθηκε ένα καινοτόμο συνθετικό πρωτόκολο παρασκευής μικροπηκτών με βάση το πολυ(*N*-ισοπροπυλακρυλαμίδιο). Η προσθήκη του ακρυλικού νατρίου ως ιοντικό συμμονομερές σε χρόνους μετά την έναρξη της αντίδρασης πολυμερισμού, διαδραμάτισε καθοριστικό ρόλο στις τελικές φυσικοχημικές ιδιότητες των μικροπηκτών. Η αναπαραγωγή αποτελεσμάτων τα οποία έως τώρα ήταν βιβλιογραφικά διαθέσιμα μόνο μέσω της προσθήκης τασιενεργής ένωσης στο μίγμα της αντίδρασης, οδήγησε στην υιοθέτηση ενός μηχανισμού συνθετικού ελέγχου. Σύμφωνα με τον μηχανισμό, ο αμφιφιλικός χαρακτήρας των αναπτυσσόμενων αλυσίδων στην επιφάνεια των μικροπηκτών προκαλεί την σταθεροποίηση του μεγέθους και τον ομοιογενή σχηματισμό των δευτερογενών πυρήνων κατά την διεξαγωγή του πολυμερισμού. Το αποτέλεσμα είναι η επιτυχής ρύθμιση παραμέτρων όπως το μέγεθος, η μορφολογία, η θερμοκρασία μετάπτωσης και η πολυδιασπορά των μικροπηκτών ελέγχοντας τον χρόνο εισαγωγής του ακρυλικού νατρίου στην αντίδραση πολυμερισμού. Τα χρονικά όρια για δύο πειραματικές σειρές με διαφορετικές συγκεντρώσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η μείωση των διαστάσεων επιτυγχάνεται σε μικρότερους χρόνους εισαγωγής, όσο η συγκέντρωση αυξάνεται. Η οικουμενικότητα του μηχανισμού συνθετικού ελέγχου μπορεί μελλοντικά να εκτιμηθεί μέσω του συμπολυμερισμού της εξουδετερωμένης μορφής διαθέσιμων όξινων μονομερών (π.χ. μεθακρυλικό νάτριο, φουμαρικό νάτριο) ή μονομερών με φέρουσες ομάδες τεταρτοταγούς αμίνης (π.χ. χλωρίδιο του μεθακρυλικού διμεθυλάμινο εστέρα).

Στο δεύτερο στάδιο της ανάπτυξης, το δείγμα με αριστοποιημένες ιδιότητες (D_H , VPTT και επιφανειακή δραστηριότητα) εξυπηρέτησε περαιτέρω ως η βάση για την ανάπτυξη ενός τριπλά λειτουργικού θερμοαποκρίσιμου/φθορίζοντος/μαγνητικού νανοϋβριδικού υλικού. Οι υδροδυναμικές διαστάσεις διατηρήθηκαν κοντά στην τιμή-στόχο, ενώ παράλληλα επιτεύχθηκε η σημαντική αύξηση της VPTT, η πρόσδωση υπερμαγνητικών ιδιοτήτων και ικανοποιητικής έντασης φθορισμού. Παρά την επιτυχή σύνθεση του φθορίζοντος λειτουργικού συμμονομερούς του *O*-μεθακρυλικού εστέρα της φθορεσίνης, δεν κατέστη εφικτός ο συμπολυμερισμός για την παρασκευή μικροπηκτών με βάση το PNiPAM, αποδίδοντας την αστοχία σε πιθανή υδρόλυση του μορίου. Το ζήτημα χρήζει περαιτέρω πειραματικής διερεύνησης διότι βρίσκεται σε ανακολουθία με αποτελέσματα της βιβλιογραφίας. Για την παράκαμψη του προβλήματος, συντέθηκε παράγωγο της φθορεσίνης

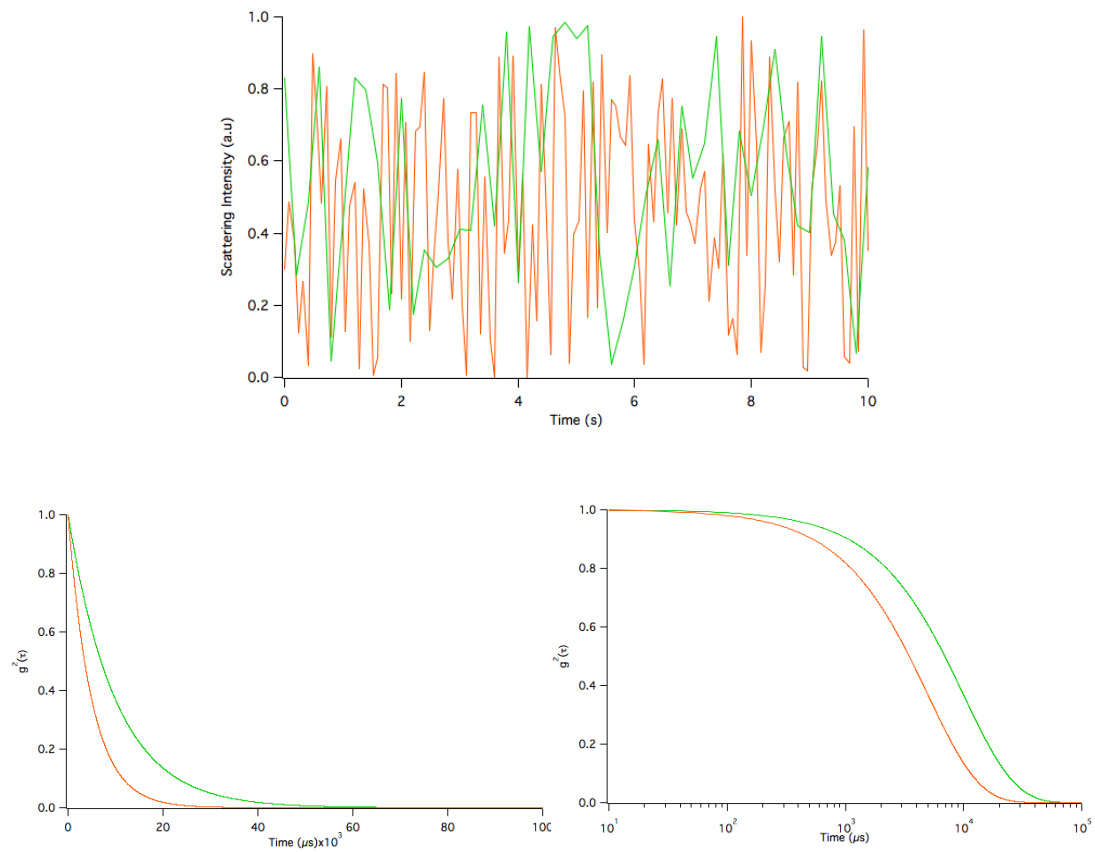
με άμινο δραστικές θέσεις το οποίο προσδέθηκε ομοιοπολικά στην επιφάνεια των αριστοποιημένων μικροπηκτών με εφαρμογή χημείας καρβοδιμιδίων. Οι θερμοαποκρίσιμες/φθορίζουσες μικροπηκτές επέδειξαν διττά θερμική/οπτική αντιστρεπτή αποκρισιμότητα όταν βρίσκονταν διάσπαρτες σε ισχυρά όξινο περιβάλλον. Η συμπεριφορά αυτού του τύπου είναι ιδιαίτερα ελκυστική για πιθανές εφαρμογές νανοαισθητήρων. Η πραγματοποίηση της *in situ* εναπόθεσης μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου απέφερε το τελικό πολυλειτουργικό νανοϋβριδικό. Αντίστοιχες μετρήσεις μεταβολής της έντασης φθορισμού συναρτήσει της θερμοκρασίας έδειξαν ότι το υλικό αποκρίνεται οπτικά σε ουδέτερο pH: ενώ στην πρώτη περίπτωση το οπτικό ερέθισμα αποδόθηκε σε αλλαγές της μικροπολικότητας, στην δεύτερη περίπτωση συσχετίστηκε με την εγγύτητα των χρωμοφώρων-υποκαταστατών με την ανόργανη νανοφάση. Η εκμετάλευση αυτής της ιδιότητας για την κατασκευή νανοσκοπικών οπτικών αισθητήρων θερμοκρασίας αποτελεί πρόκληση για μελλοντική έρευνα.

Στο τρίτο στάδιο τα πολυλειτουργικά κolloειδή μελετήθηκαν ως προς την δυνατότητα ενσωμάτωσης σε βιολογικές εφαρμογές και σε συμφωνία με δεδομένα από την βιβλιογραφία επέδειξαν άριστη βιολογική ανοχή. Η παρουσία της ανόργανης μαγνητικής νανοφάσης συνεπικουρεί στην επίτευξη υψηλού ποσοστού φόρτωσης δοξορουβικίνης. Αν και ο ακριβής μηχανισμός συναρμογής παραμένει αντικείμενο μελλοντικής διερεύνησης αποδείχθηκε ότι πρόκειται για ανεξάρτητη διεργασία από την ηλεκτροστατική σύμπλεξη με τους νανοφορείς, επιτελώντας πειράματα ελέγχου με θερμοαποκρίσιμα/μαγνητικά κolloειδή τα οποία δεν επικαλύφθηκαν με ανιοντικό τασιενεργό. Στις άμεσες προτάσεις για μελλοντική έρευνα συμπεριλαμβάνονται η ακριβής προσδιορισμός του ποσοστού ενθυλάκωσης και η μελέτη της κινητικής της αποδέσμευσης. Μεταγενέστερα, τα δείγματα αναμένεται να αξιοποιηθούν σε πειράματα *in vivo*.

Μία ενδιαφέρουσα πτυχή της εργασίας η οποία θα εξεταστεί μελλοντικά, αφορά την μελέτη των υλικών με ηλεκτρονιακή μικροσκοπία για την προσδιορισμό του μεγέθους και της κατανομής μεγεθών των ανόργανων μαγνητικών νανοσωματιδίων. Επίσης, η αντίστροφη πορεία σύνθεσης του συστήματος (μαγνητικός πυρήνας και θερμοαποκρίσιμο κέλυφος με δραστικές ομάδες) θα μπορούσε να εξεταστεί για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την επίδραση της μορφολογίας επάνω στην αλληλεπίδραση φαρμάκου-νανοφορέα. Στα πλαίσια της ενδεχόμενης *in vivo* εφαρμογής, η ομοιοπολική σύζευξη ομάδων στόχευσης (π.χ. πεπτίδιο RGD) θα μπορούσε να συμβάλλει στην καλύτερη θεραπευτική προοπτική, όπως επίσης και η επιφανειακή τροποποίηση με παράγωγα της πολυαιθυλοαινογλυκόλης για την παράταση της συστημικής κυκλοφορίας. Τέλος, τόσο σε θεμελιακό επίπεδο όσο και για βιοϊατρικές εφαρμογές, η εξέταση συστημάτων βιοπολυμερικής βάσης (π.χ. πολυσακχαρίτες) τα οποία θα προσιδιάζουν τις ιδιότητες των συνθετικών μικροπηκτών αποτελεί μία ελπιδοφόρα ερευνητική προοπτική

Παράρτημα

Παράρτημα Κεφαλαίου 3



Σχήμα Π3.1 Προσομοίωση πειραματικών δεδομένων DLS: Μεταβολή της σκεδαζόμενη ακτινοβολίας $I(t)$ vs t (επάνω). Κανονικοποιημένης συνάρτησης αυτοσυσχέτισης $g^2(\tau)$ vs τ σε γραμμική (κάτω αριστερά) και ημιλογαριθμική κλίμακα (κάτω δεξιά).

Μαθηματική Ανάλυση για την Εξαγωγή της Τελικής Μορφής της Συνάρτησης Αυτοσυσχέτισης

Το πρόβλημα μετατίθεται στην εύρεση μίας αναλυτικής έκφρασης για την κατανομή των ρυθμών εκθετικής απόσβεσης $G(\Gamma)$. Παρατηρείται ότι η μορφή της $g^l(\tau)$ είναι ταυτοτικά ίση με την ροπογεννήτρια συνάρτηση της κατανομής $G(\Gamma)$, $M(-\tau, \Gamma)$. Η m -οστή ροπή της κατανομής, $m_m(\Gamma)$ δίνεται από την m -οστή παράγωγο της $M(-\tau, \Gamma)$ για $\tau = 0$.

$$m_m(\Gamma) = \left. \frac{d^m M(-\tau, \Gamma)}{d(-\tau)^m} \right|_{-\tau=0}$$

Η γεννήτρια συνάρτηση της αθροιστικής κατανομής $K(-\tau, \Gamma)$ αποτελεί τον φυσικό λογάριθμο της ροπογεννήτριας συνάρτησης $M(-\tau, \Gamma)$, δηλαδή ισχύει ότι:

$$K(-\tau, \Gamma) = \ln[M(-\tau, \Gamma)] = \ln[g^1(\tau)]$$

Ο m -οστός συντελεστής της αθροιστικής κατανομής δίνεται από την m -οστή παράγωγο της $K(-\tau, \Gamma)$ για $\tau = 0$.

$$\kappa_m(\Gamma) = \left. \frac{d^m K(-\tau, \Gamma)}{d(-\tau)^m} \right|_{-\tau=0}$$

Η αναπαράσταση ως προς την $K(-\tau, \Gamma)$ είναι προτιμότερη αξιοποιώντας το γεγονός ότι, εκτός από την πρώτη τιμή $\kappa_1(\Gamma)$, κάθε m -οστή τιμή του συντελεστή της αθροιστικής κατανομής, κ_m , παραμένει αμετάβλητη σε αλλαγή των συντεταγμένων. Επομένως οι συντελεστές κ_m μπορούν να εκφραστούν ως ροπές γύρω από την μέση τιμή $\bar{\Gamma}$ ως εξής:

$$\kappa_1(\Gamma) = \int_0^\infty G(\Gamma) \Gamma d\Gamma \equiv \bar{\Gamma}$$

$$\kappa_2(\Gamma) = \mu_2, \quad \kappa_3(\Gamma) = \mu_3 \quad \dots \quad \text{όπου} \quad \mu_m = \int_0^\infty G(\Gamma) (\bar{\Gamma} - \Gamma)^m d\Gamma$$

Η κεντρική ιδέα για την ανάλυση των δεδομένων δυναμικής σκέδασης βασίζεται στο γεγονός ότι η τιμή του κ_m αντιστοιχεί στην τιμή του m -οστού συντελεστή της ποσότητας $(-\tau)^m / m!$ στο ανάπτυγμα Taylor της $K(-\tau, \Gamma)$ γύρω από το $\tau = 0$, ισχύει δηλαδή ότι:

$$\ln[g^1(t)] \equiv K(-\tau, \Gamma) = -\bar{\Gamma}\tau + \frac{\kappa_2}{2!}\tau^2 - \frac{\kappa_3}{3!}\tau^3 + \frac{\kappa_4}{4!}\tau^4 \dots$$

ενώ μέσω της σχέσης Siegert η προηγούμενη έκφραση μετατρέπεται στην

$$\ln[g^2(t) - 1] = \ln \beta - 2\bar{\Gamma}\tau + \kappa_2\tau^2 - \frac{\kappa_3}{3}\tau^3 + \dots$$

Συμπληρωματικά Στοιχεία Θεωρίας για την Τεχνική της Ανάλυσης Φάσης Σκεδαζόμενης Ακτινοβολίας (Phase Analysis Light Scattering, PALS)

Το μέτρο της ολίσθησης φάσης εξαιτίας του φαινομένου Doppler είναι ευθέως ανάλογο της συνιστώσας της ταχύτητας των σωματιδίων στην κατεύθυνση του διανύσματος σκεδασης και δίνεται από την σχέση:

$$\delta v = [(2nu_p)/\lambda] \sin(\theta/2) \cos\varphi = (nu_p q)/2\pi \cos\varphi \quad (1)$$

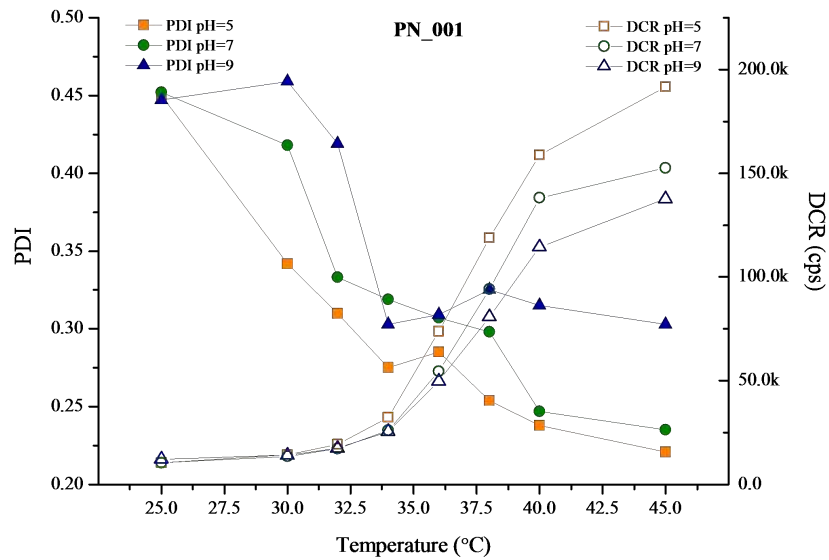
όπου n , ο δείκτης διάθλασης του μέσου διασποράς, u_p , η ταχύτητα των σωματιδίων, λ , το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, θ , η γωνία σκέδασης και φ , η γωνία μεταξύ της κατεύθυνσης του πεδίου και του διανύσματος σκέδασης q [238]. Για τον υπολογισμό του δv , το οποίο ακόμα και για ένα ισχυρά φορτισμένο σωματίδιο κινούμενο μέσα σε υψηλό ηλεκτρικό πεδίο είναι μόλις της τάξης μεγέθους των 10 Hz, η σκεδαζόμενη δέσμη υπερτίθεται μαζί με μία δέσμη αναφοράς. Εξαιτίας της οπτικής μίξης των δύο δεσμών, το φωτόρευμα που καταγράφεται στον ανιχνευτή έχει μία AC (alternative current) συνιστώσα με συχνότητα ίση με την συχνότητα διακροτήματος. Υπενθυμίζεται ότι όταν δύο αρμονικές κυματομορφές παραπλήσιας συχνότητας "αναμειγνύονται" παράγεται σήμα αυξομειούμενης έντασης με συχνότητα ίση με την διαφορά των δύο αρχικών συχνοτήτων (συχνότητα διακροτήματος). Άρα το καταγραφόμενο σήμα πέραν της DC συνιστώσας ανάλογης της σκεδαζόμενης έντασης περιέχει και εναλλασσόμενη συνιστώσα ίση με το δv και μέσω της σχέσης (1) υπολογίζεται η ταχύτητα των σωματιδίων.

Τα σωματίδια συνεχίζουν να εκτελούν διαχυτική κίνηση ταυτόχρονα με την προσανατολισμένη μεταφορική παρουσία ηλεκτρικού πεδίου και σε σύνδεση με την κλασική θεωρία της δυναμικής σκέδασης φωτός, αυτή η συμβολή προκαλεί επίσης ολίσθηση συχνότητας ανάλογη με το FWHM της λορεντζιανής κατανομής συχνοτήτων. Καθώς το δv λόγω μεταφορικής κίνησης είναι ευθέως ανάλογο του q ενώ η αντίστοιχη ολίσθηση συχνότητας λόγω της διαχυτικής κίνησης ευθέως ανάλογο του q^2 , επιλέγονται μικρές γωνίες ανίχνευσης ούτως ώστε να μειωθεί η συνεισφορά της κίνησης Brown στο σήμα του ηλεκτροφορικού πειράματος.

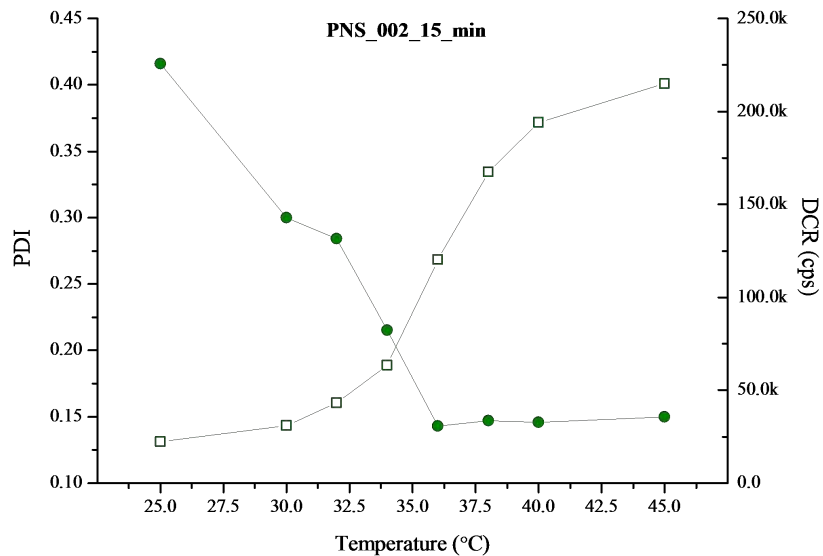
Μείωση όμως του q συνεπάγεται ελάττωση του δv και επακόλουθα απαιτούνται μεγάλοι χρόνοι μέτρησης για την επίτευξη μικρού στατιστικού σφάλματος. Αν το πείραμα διαρκεί μερικά δευτερόλεπτα, υπάρχει σημαντική πιθανότητα ηλεκτρόλυσης του δείγματος, συγκέντρωσης δηλαδή του πλήθους των σωματιδίων στους πόλους των ηλεκτροδίων. Για την παράκαμψη της παραπάνω δυσκολίας, όπως επίσης και για την αποφυγή της ωμικής θέρμανσης του αγωγίμου δείγματος, τα επιβαλλόμενα ηλεκτρικά πεδία είναι της τάξης των 10 V.cm⁻¹ και διαμορφωμένα ως τετραγωνικοί παλμοί με τυπικές συχνότητες 5–60 Hz. Αφού το πεδίο εφαρμόζεται για μικρούς χρόνους, το δv μπορεί να καταστεί μη μετρήσιμο και ο προσδιορισμός της ταχύτητας σωματιδίων με μικρό δυναμικό-ζ ανακριβής, όταν η ιοντική ισχύς του μέσου διασποράς είναι υψηλή ή η μέτρηση λαμβάνεται κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο. Για την μέτρηση της ταχύτητας βραδέως κινούμενων σωματιδίων αναπτύχθηκε η τεχνική PALS (Σχήμα 3.12), κατά την οποία η δέσμη αναφοράς και η σκεδαζόμενη δέσμη "αναμειγνύονται" με έναν πιο περίπλοκο τρόπο. Στην PALS παρακολουθείται η ολίσθηση φάσης μεταξύ των δύο δεσμών και όχι η ολίσθηση συχνότητας όπως στην παραδοσιακή

ταχυμετρία laser-Doppler, με την φάση να ορίζεται κλασσικά ως το γινόμενο της συχνότητας με τον χρόνο. Το γεγονός αυτό επιτρέπει την μέτρηση ηλεκτροφορετικών κινητικότητων έως και 1000 φορές μικρότερων συγκριτικά με το κατώτατο όριο της LDV. Συγκεκριμένα, το πρόβλημα έγκειται και εδώ στην ελάττωση του δn για χαμηλές ταχύτητες κολλοειδών. Όταν η μετατόπιση του σωματιδίου είναι μικρότερη του q^{-1} στην διάρκεια μίας μέτρησης, το καταγραφόμενο σήμα δεν ολοκληρώνει έναν κύκλο οπότε δεν καθίσταται δυνατός ο προσδιορισμός της συχνότητας του διακροτήματος. Ο περιορισμός αυτός αίρεται διαμορφώνοντας την δέσμη αναφοράς στην συχνότητα της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας απουσία ηλεκτρικού πεδίου μέσω παλλόμενων οπτικών διατάξεων [402].

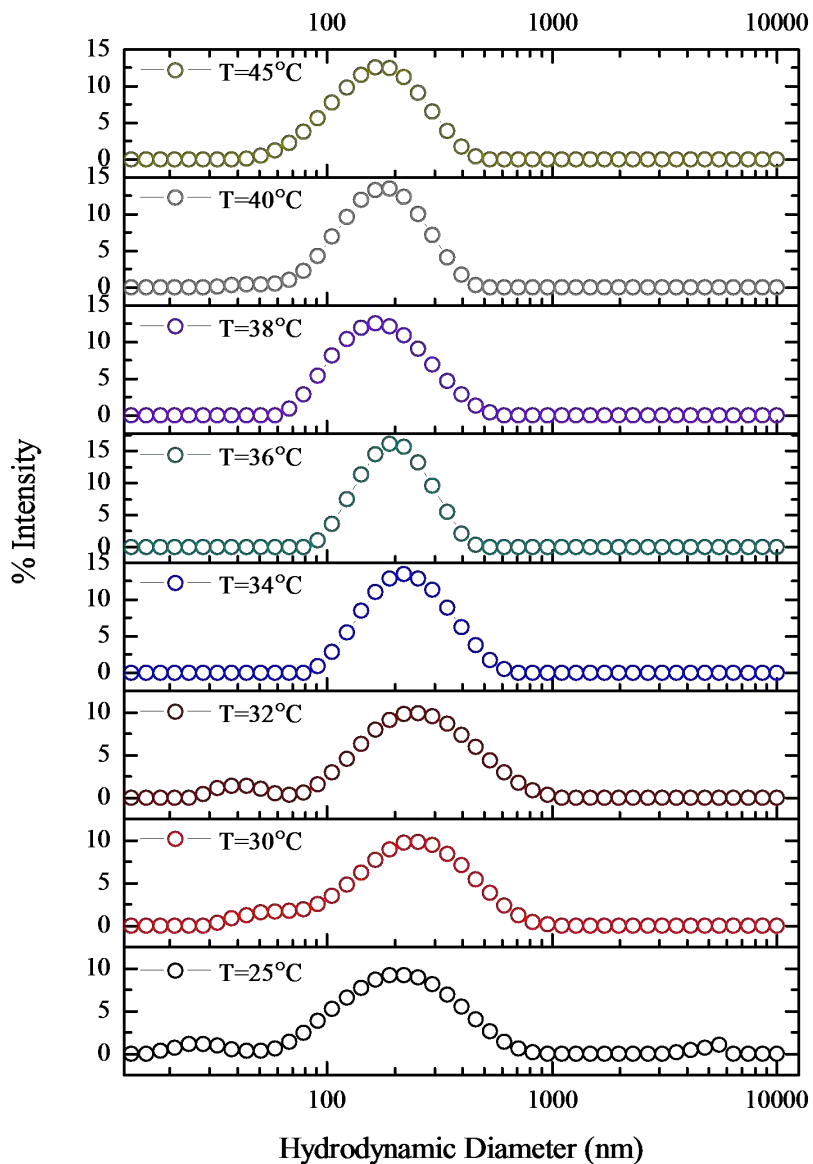
Παράρτημα Κεφαλαίου 4



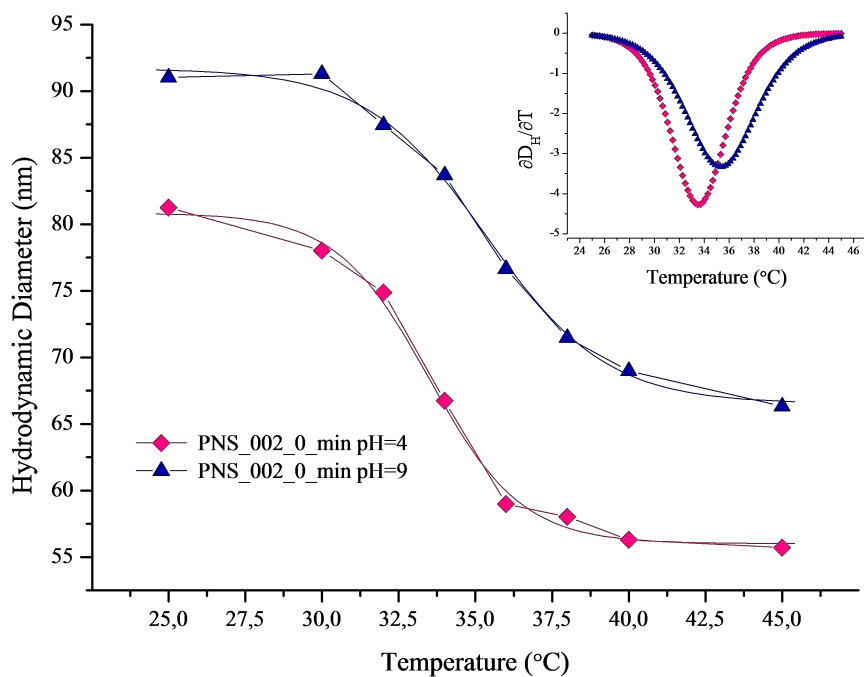
Σχήμα Π4.1 Μεταβολή έντασης σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (DCR) και δείκτη πολυδιασποράς (PDI) συναρτήσει της θερμοκρασίας για διαφορετικές τιμές του pH (Δείγμα PN_001).



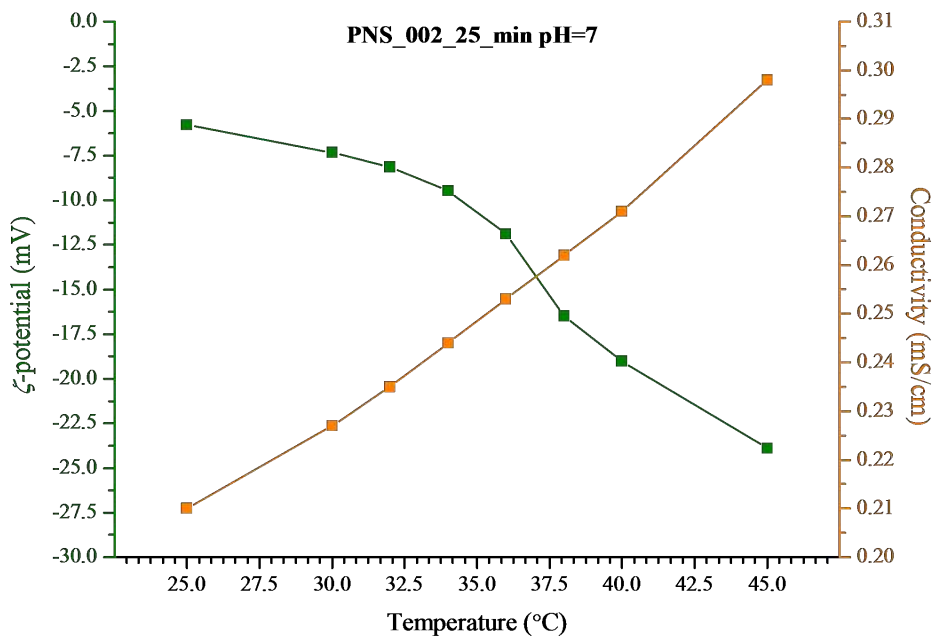
Σχήμα Π4.2 Μεταβολή έντασης σκεδαζόμενης ακτινοβολίας (DCR) και δείκτη πολυδιασποράς (PDI) συναρτήσει της θερμοκρασίας σε pH=7 για το δείγμα PN_001.



Σχήμα Π4.3 Κατανομή σκεδαζόμενης έντασης (I_{scat}) συναρτήσει του σκεδαζόντος πληθυσμού (D_h) για το δείγμα *PNS_002_15_min* για το εύρος των εξεταζόμενων θερμοκρασιών σε $pH=7$.



Σχήμα Π4.4 Συνδυαστική αποκρισιμότητα σε θερμοκρασία-pH του δείγματος PNS_002_0_min. Ένθεση: Μετατόπιση της VPTT με αύξηση του pH από 4 σε 9.



Σχήμα Π4.5 Μεταβολή του δυναμικού-ζ συναρτήσει της θερμοκρασίας στο δείγμα PNS_002_25_min σε pH=7 (πράσινο χρώμα). Η αντίστοιχη μεταβολή της αγωγιμότητας στο κελί μέτρησης αναπαρίσταται με πορτοκαλί χρώμα

$$\text{Σχέση Π4.1} \quad N_p = \frac{6m_p}{\pi \rho_p (D_{h,col})^3}$$

$$\text{Σχέση Π4.2} \quad A_p = N_p \pi (D_{h,swol})^2$$

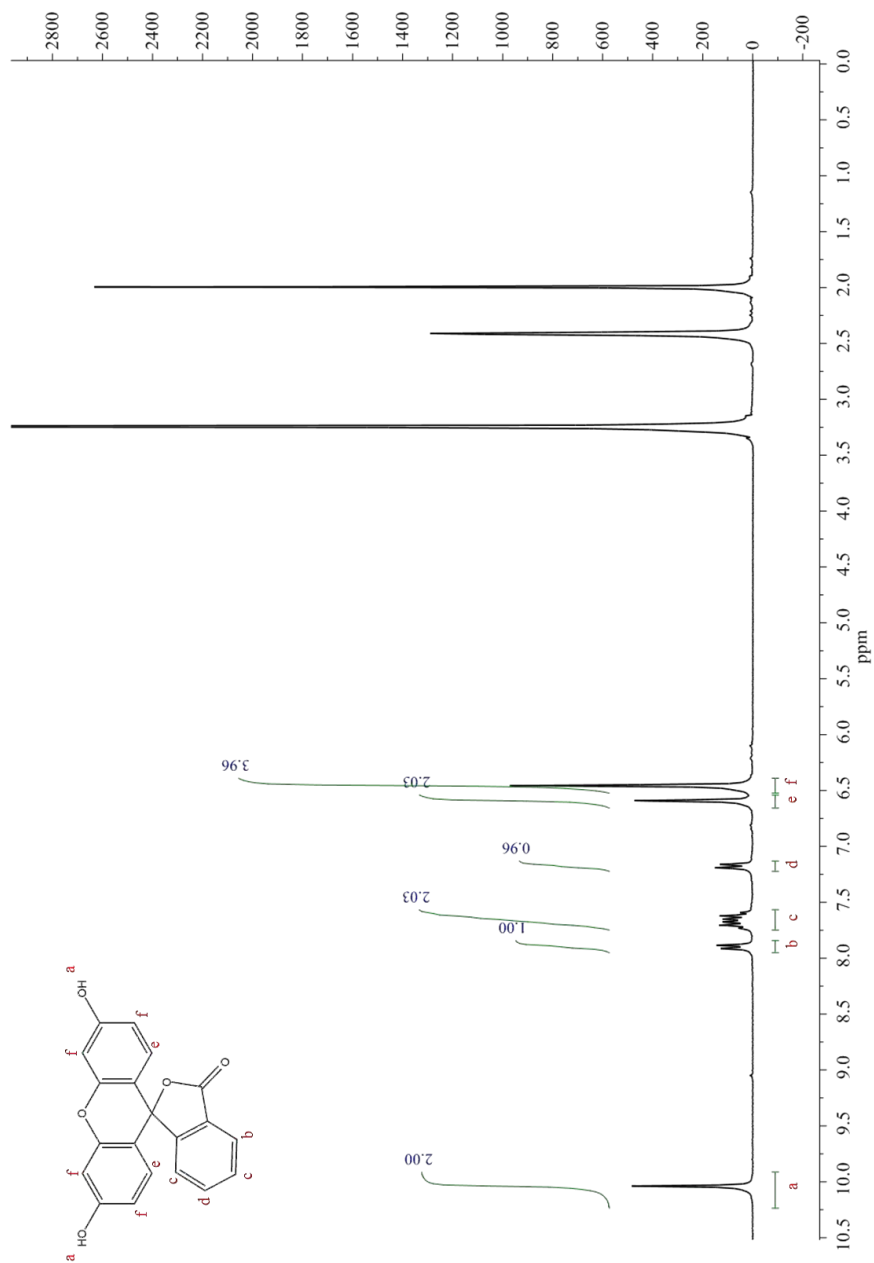
Παράρτημα Κεφαλαίου 5

Αποτελέσματα Φασματοσκοπίας NMR

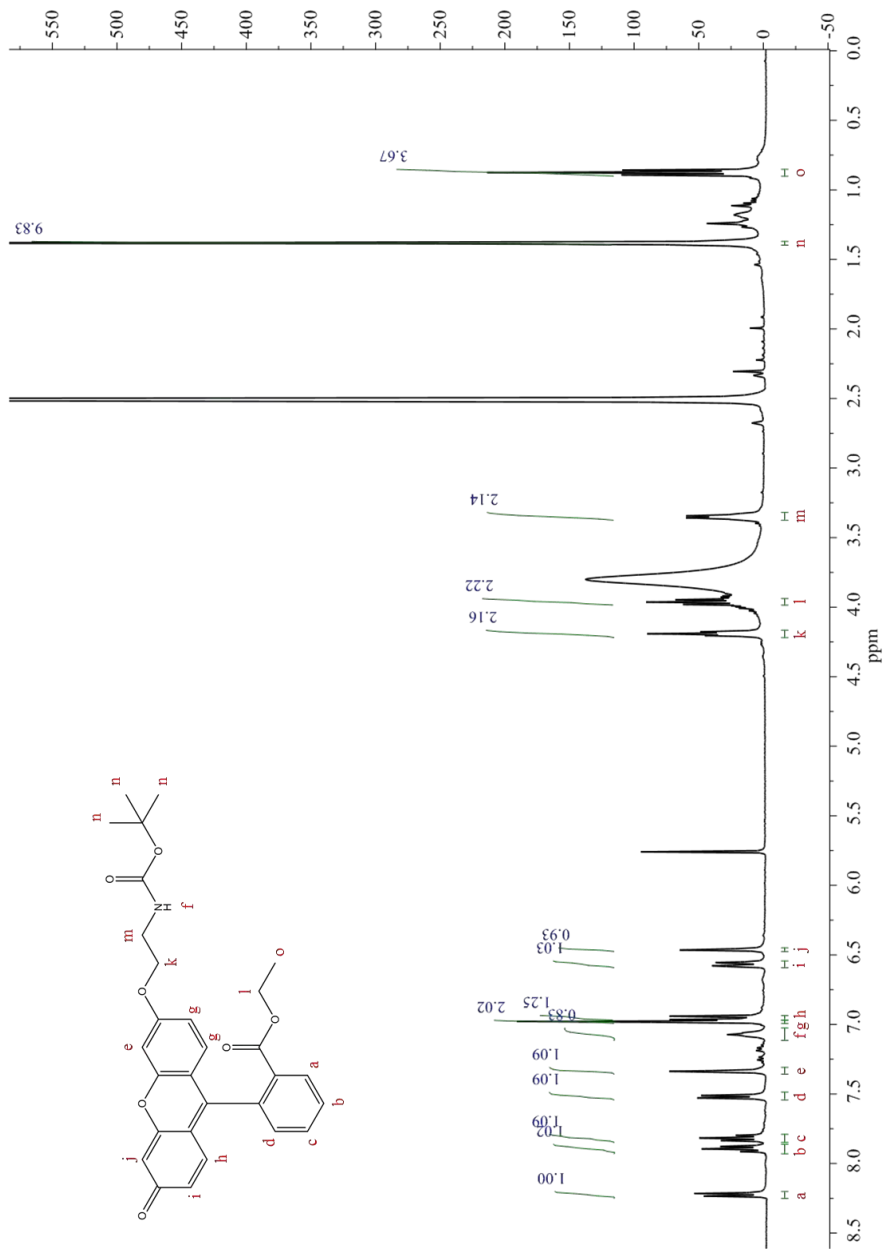
Η επιτυχής σύνθεση και απομόνωση των μοριακών ενώσεων πιστοποιήθηκε αρχικά με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$. Για τις ενώσεις FL-NH-Boc και FL-NH $_3^+$ παρατίθενται συμπληρωματικά τα φάσματα $^{13}\text{C-NMR}$ και πραγματοποιείται η ακριβής ταυτοποίηση των κορυφών. Χρησιμοποιήθηκαν οι φασματογράφοι NMR Brücker AV-250 (συχνότητα συντονισμού 250 MHz) και Brücker AV-400 (συχνότητα συντονισμού 400 MHz). Για όλα την λήψη των φασμάτων οι ενώσεις διαλύθηκαν σε δευτεριωμένο διμεθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO- d_6 , 99.9% atom D, Sigma) και συγκέντρωση ~ 5 mg/ml. Για την πρόδρομη ένωση FL (Σχήμα 5.6), μπορεί να συναχθεί, από την τιμή του ολοκλήρωματος της κορυφής στα 10.04 ppm, ότι υιοθετεί την λακτοειδή μορφή συντονισμού. Το ολοκλήρωμα στα 10.02 ppm του εστεροποιημένου παραγώγου FL Ester λαμβάνει το 1/4 της αναμενόμενης τιμής λόγω της ανταλλαξιμότητας του φαινολικού πρωτονίου με τον διαλύτη. Συγκριτικά με την πρόδρομη ένωση FL, τα αρωματικά πρωτόνια στο FL Ester βρέθηκαν περισσότερο αποπροστατευμένα και εντοπίζονται σε υψηλότερες τιμές χημικής μετατόπισης.

Αιθυλ-2-(6-(2-((tert-βουτοξυκαρβονυλο)αμινο)αιθοξυ)-3-οξο-3H-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκός εστέρας (FL-NH-Boc) $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ 8.23 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.92 (t, J = 7.6Hz, 1H), 7.81 (t, J = 7.6Hz, 1H), 7.53 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.07 (t, J = 5.3, Hz, 1H), 6.98 (s, 2H), 6.95 (d, J = 9.7, Hz, 1H), 6.57 (dd, J = 9.6 Hz, J = 1.54 Hz, 1H) 6.47(s, 1H), 4.19 (t, J = 5.42 Hz, 2H), 3.96 (m, 2H), 3.35 (dd, J=10.7, J=5.3 Hz, 2H), 1.37 (s, 9H), 0.86 ppm (t, J=7.1 Hz, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ 179.1, 164.72, 163.1, 157.77, 155.65, 133.17, 133.04, 131.65, 130.83, 130.54, 130.25, 130.19 129.69, 125.92, 116.58, 116.2, 115.48, 103.55, 100.89, 78.00, 68.27, 61.08, 28.21, 13.37 ppm.

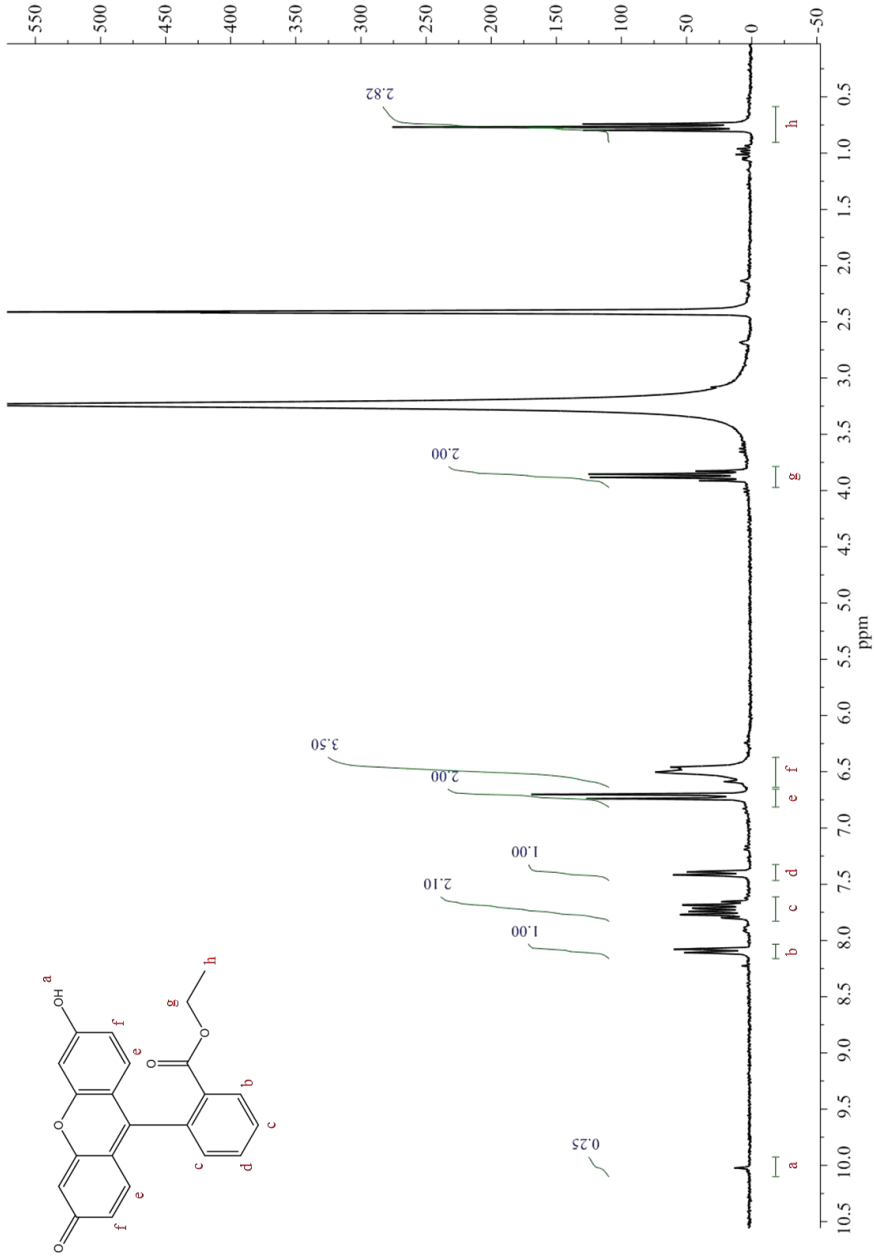
Τριφθοροξικό 2-(9-(2-(αιθόξυ)φαινυλο)-3-οξο-3H-ξανθεν-6-υλ)οξυ)αιθαν-1-αμμωνιακό άλας (FL-NH $_3^+$ TFA $^-$) $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ 8.22 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.04 (br, 3H), 7.92 (t, J = 7.6Hz, 1H), 7.81 (t, J = 7.54Hz, 1H), 7.51 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 6.99 (s, 2H), 6.92 (d, J = 9.7, Hz, 1H), 6.53 (dd, J = 9.6 Hz, J = 1.54 Hz, 1H) 6.42(s, 1H), 4.36 (t, J = 4.8 Hz, 2H), 3.96 (m, 2H), 3.29 (dd, J=10.16, J=4.97 Hz, 2H), 0.88 ppm (t, J=7.1 Hz, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ 182.57, 164.98, 163.02, 158.49, 154.02, 152.18 133.34, 133.18, 130.86, 130.81, 130.54, 130.25, 129.87, 128.57, 125.92, 117.07, 115.11, 114.77, 104.36, 101.13, 68.27, 65.59, 60.98, 38.14, 13.37 ppm.



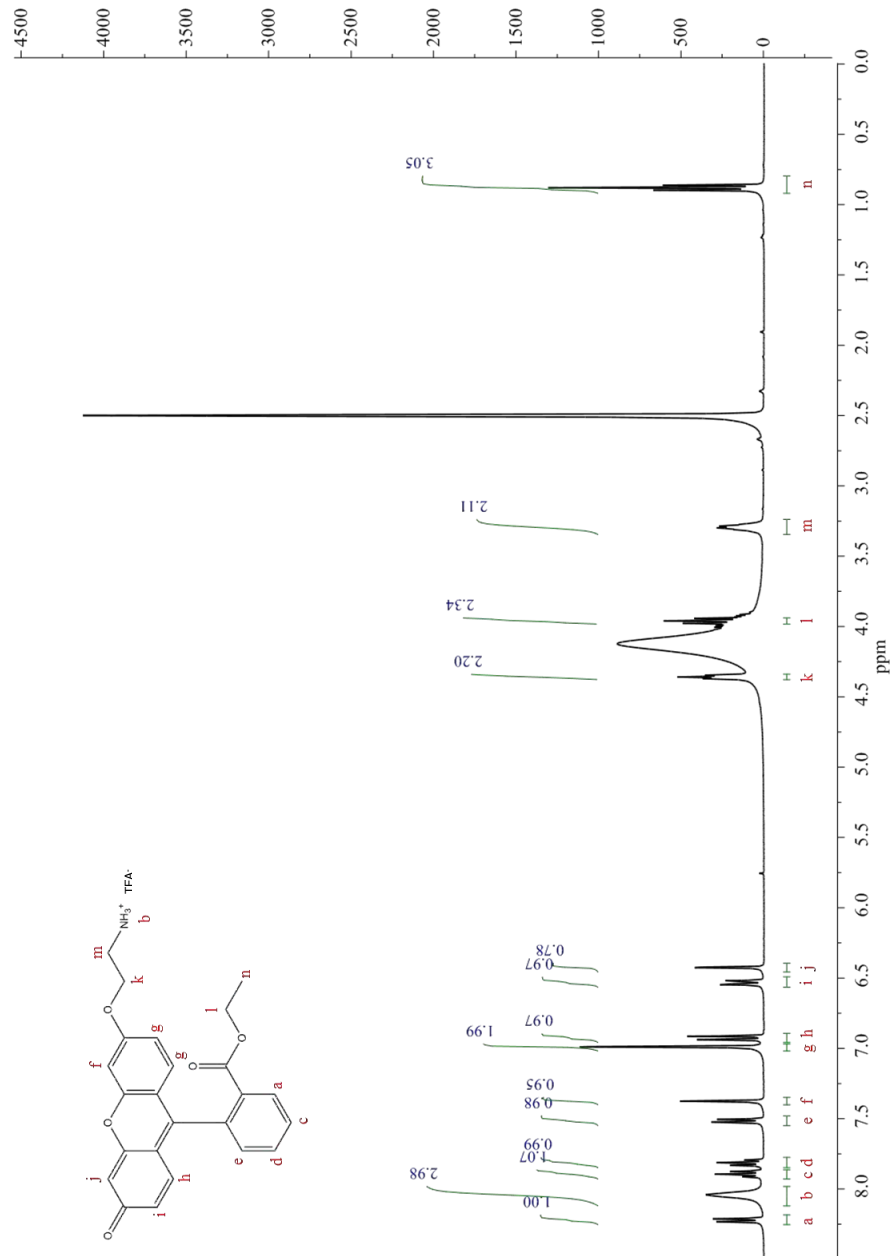
Σχήμα Π5.1 Φάσμα 250 MHz ¹H-NMR φθορεσίνης (FL).



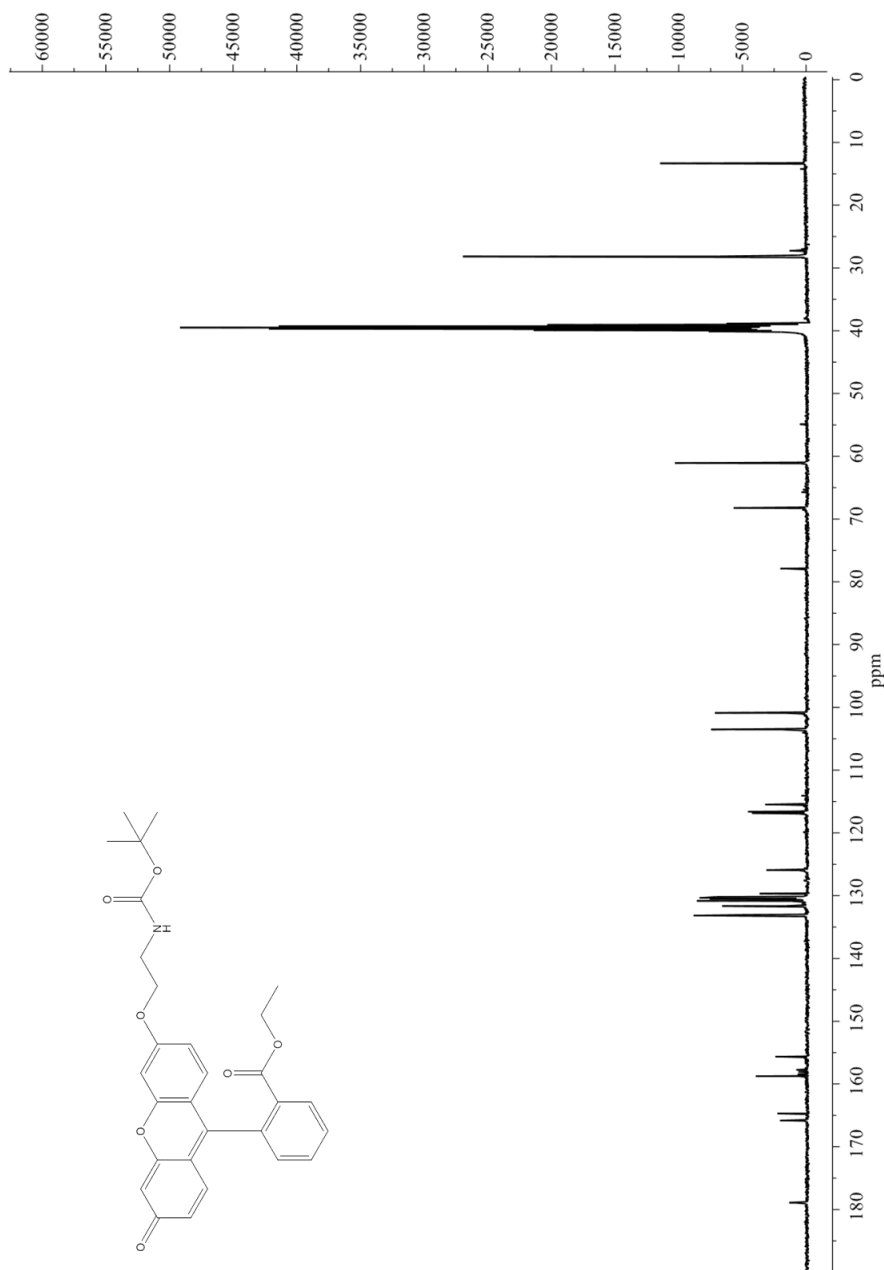
Σχήμα Π5.3 Φάσμα 400 MHz $^1\text{H-NMR}$ αιθυλ-2-(6-(2-((tert-βουταξυκαρβονυλο)αμινο)αιθοξυ)-3-οξό-3H-ζανθεν-9-yl) βενζοϊκού εστέρα (FL-NH-Boc).



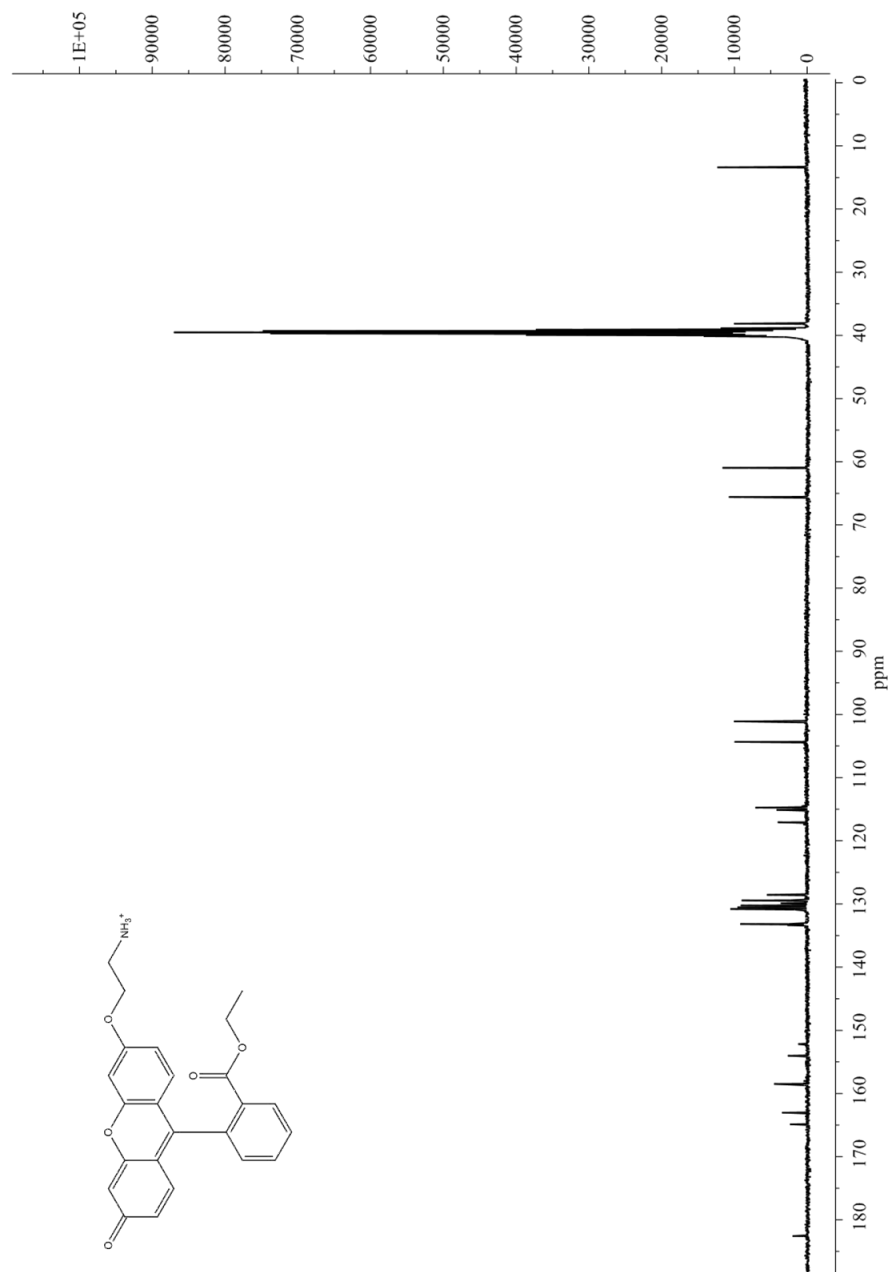
Σχήμα Π5.2 Φάσμα 250 MHz ¹H-NMR αιθυλ-2-(6-υδροξύ-3-οξο-3H-ξανθεν-9-υλ) βενζοϊκού εστέρα (FL Ester).



Σχήμα Π5.4 Φάσμα 400 MHz ¹H-NMR τριφθοροξικού 2-((9-(2-(αιθόξυ)φαινυλο)-3-οξο-3H-ζανθεν-6-νι)οξυ)αιθαν-1-αμμωνιακού άλατος (FL-NH₃⁺).



Σχήμα Π5.5 Φάσμα 100 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ αιθυλ-2-(6-(2-((tert-βουτοξυκαρβονυλ)αμινο)αιθοξυ)-3-οξο-3H-ζάνθεν-9-υλ) βενζοϊκού εστέρα (FL-NH-Boc).

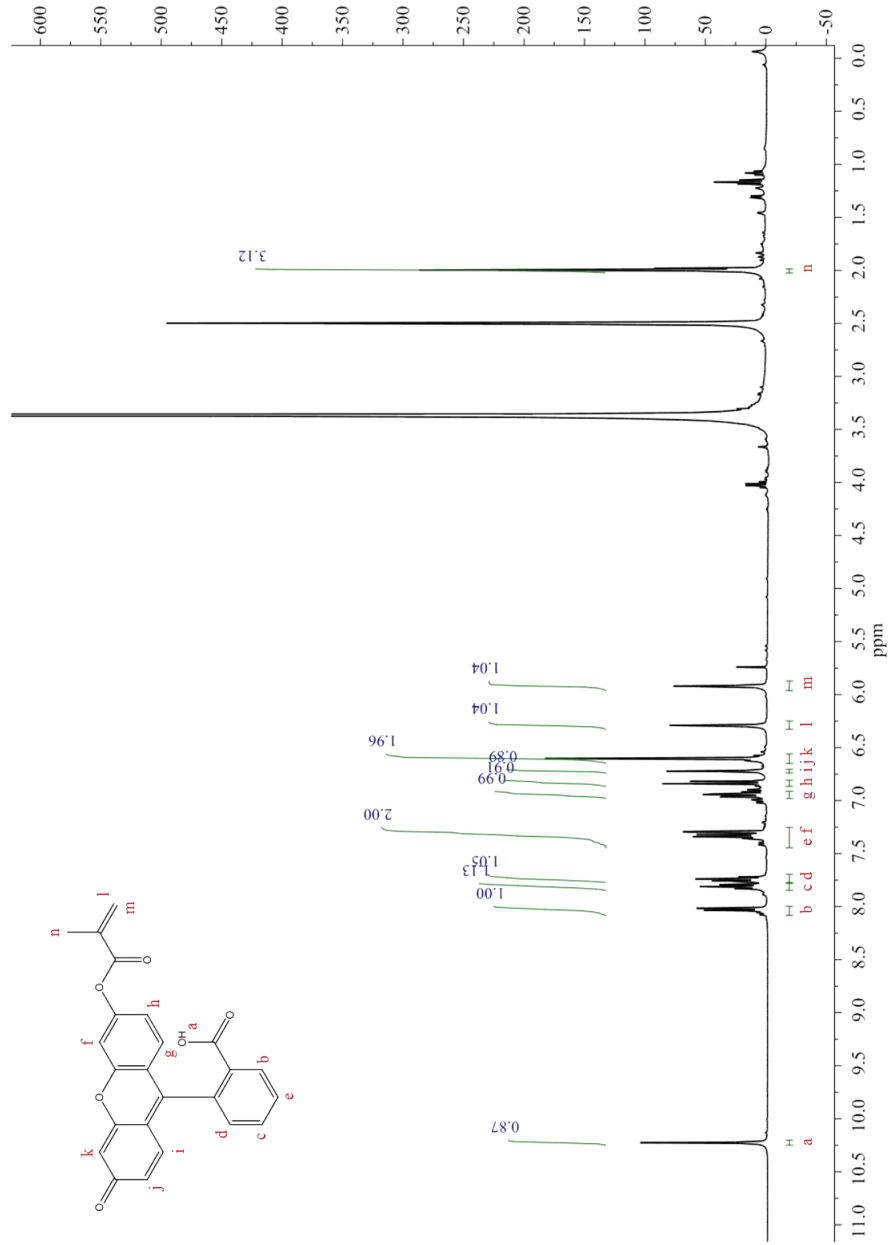


Σχήμα Π5.6 Φάσμα 100 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ τριφθοροξικού 2-(9-(2-(αιθόξυ)φαινυλο)-3-οξο-3Η-ξανθεν-6-υλο)οξάν-1-αμμωνιακού άλατος (FL-NH₃⁺).

Η χαρακτηριστικότερες ενδείξεις επιτυχημένης αποπροστασίας και απομόνωσης του τελικού FL-NH₃⁺TFA⁻ υπήρξαν *i*) η εξάλειψη της χαρακτηριστικής χημικής μετατόπισης των πρωτονίων της *tert*-βουτυλομάδας, που εμπεριέχεται στην Boc προστατευτική ομάδα, στα 1.37 ppm στο φάσμα ¹H-NMR συγκριτικά με το FL-NH-Boc και *ii*) η εμφάνιση της ευρείας χημικής μετατόπισης των πρωτονίων στα 8.04 ppm, χαρακτηριστική της πρωτονιομένης αμινομάδας. Επίσης, παρατηρήθηκε συνολική μετατόπιση των αρωματικών κορυφών εξαιτίας της αλλαγής του χημικού περιβάλλοντος στο τελικό μόριο.

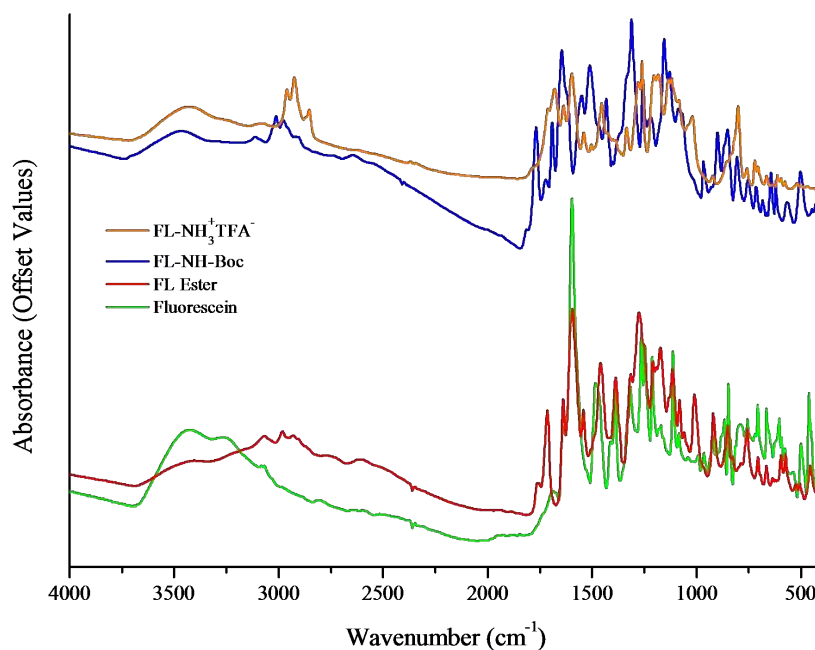
Στο Σχήμα Π5.1 παρατίθεται το φάσμα ¹H-NMR του λειτουργικού μονομερούς FL-MAAc. Η επιτυχημένη σύνθεση του μορίου πιστοποιείται από την παρουσία των πολύ καθαρών χημικών μετατοπίσεων των βινυλικών πρωτονίων (*l* και *m*) και των πρωτονίων της μεθυλομάδας (*n*). Συγκριτικά με το φάσμα της πρόδρομης ένωσης FL, η τιμή του ολοκληρώματος της κορυφής της χημικής μετατόπισης του πρωτονίου (*a*) αποτελεί ξεκάθαρη επιβεβαίωση της σχηματισμού δεσμού σε μία εκ των δύο φαινολικών θέσεων στον ξανθενικό δακτύλιο. Περαιτέρω, η αλλαγή της υφής και του χρώματος του FL-MAAc (κρυσταλλικό ροζ/ιώδες), καθώς και το διαφορετικό μέτωπο στην χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας συνηγούν ποιοτικά στην επιτυχημένη τροποποίηση. Το μονομερές είναι εμπορικά διαθέσιμο από την Sigma-Aldrich (Κωδικός 568864 ALDRICH).

Οι προσπάθειες πολυμερισμού του FL-MAAc στάθηκαν ανεπιτυχείς εξαιτίας της ατελούς διαλυτότητας του FL-MAAc σε απεσταγμένο H₂O (pH ~ 6), γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται από την έλειψη της θολερότητας στο στάδιο σχηματισμού των πρωτογενών σωματιδίων. Εάν αντί της αρχικής διαλυτοποίησης σε ACN, είχε αυξηθεί το pH της μίγματος των αντιδρώντων, θα συντελείτο επιτάχυνση της υδρόλυσης του εστερικού δεσμού και αποικοδόμηση του FL-MAAc, με δεδομένη την υψηλή θερμοκρασία πολυμερισμού. Παρ' όλα αυτά, το φθορίζων μονομερές παρουσιάζει καλή προοπτική ενσωμάτωσης σε πολυλειτουργικά νανοσκοπικά συστήματα μελλοντικά, καθώς έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την πρόσδωση φθορισμού σε πολυμερικές δομές [403-405].



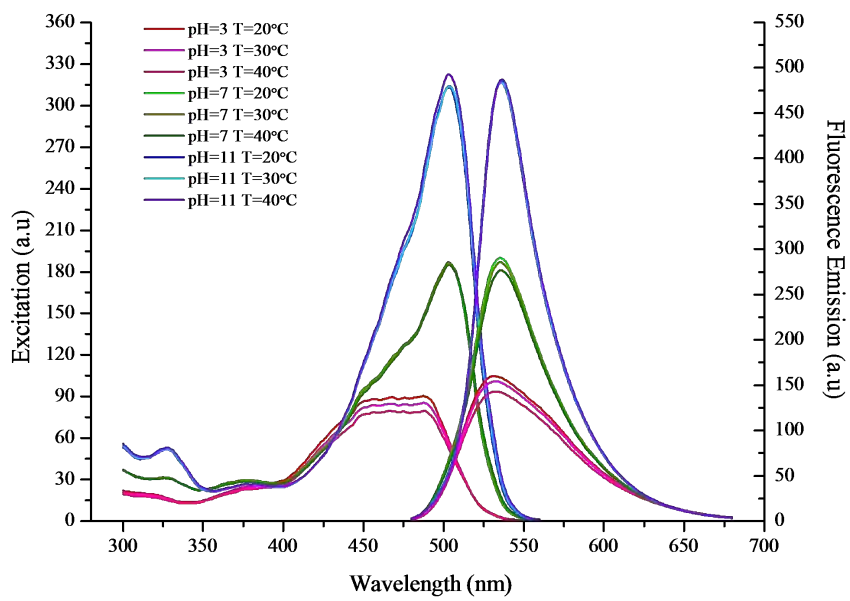
Σχήμα Π5.7 Φάσμα 400 MHz ¹H-NMR 2-(6-(μεθακρυλοϋλ)-3-οξο-3H-ζαnθεν-9-υλ) βενζοϊκού οξέος (FL-MIAAc)

Αποτελέσματα Φασματοσκοπίας FT-IR



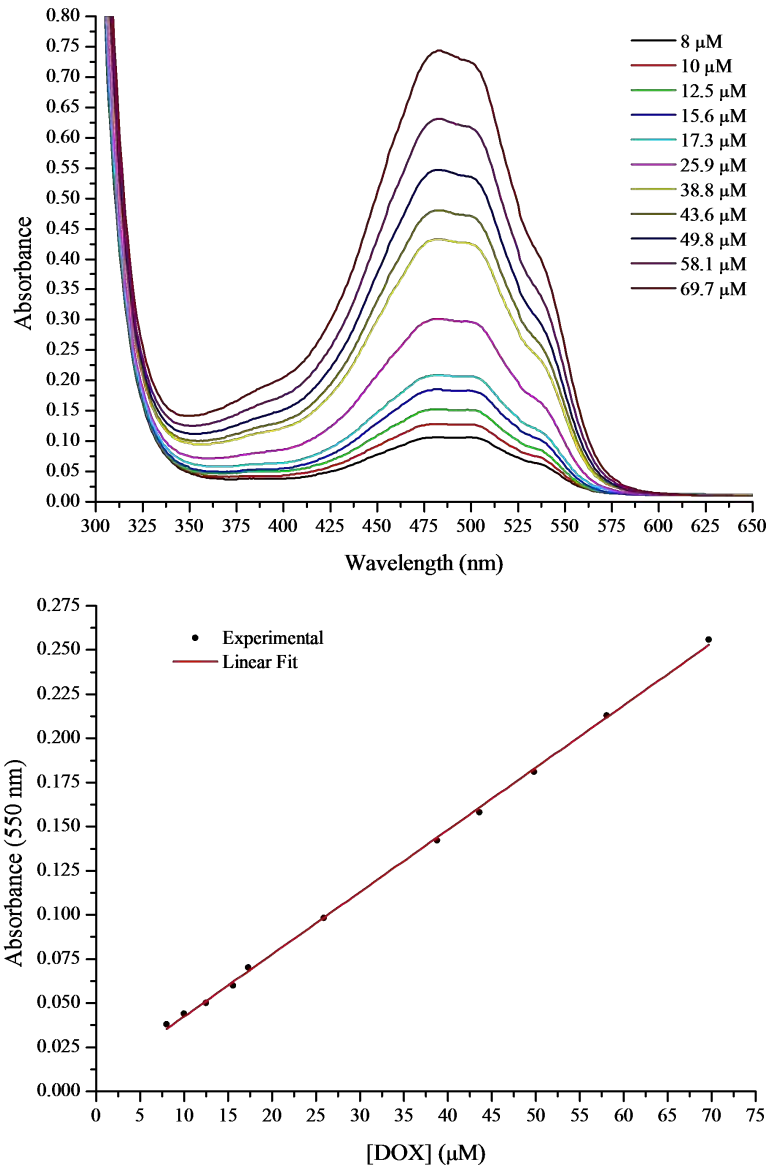
Σχήμα Π5.8 Συγκεντρωτικά φάσματα FT-IR των μοριακών ενώσεων FL, FL Ester, FL-NH-Boc και FL-NH₃⁺TFA⁻.

Όλα τα φάσματα FT-IR ελήφθησαν στο φασματοφωτόμετρο υπερύθρου Jasco 6200 χρησιμοποιώντας λειοτριβιμένο KBr ως το “οπτικά διαφανές” μέσο. Η κορυφή με την υψηλότερη απορρόφηση στο φάσμα της FL (1600 cm⁻¹) οφείλεται στις δονήσεις τάσης των δεσμών C-C των αρωματικών δακτυλίων. Η μικρότερης έντασης κορυφή στους 1686 cm⁻¹ αποδίδεται στις δονήσεις τάσης της καρβonyλομάδας. Η ευρεία μπάντα πάνω από τους 3000 cm⁻¹ είναι χαρακτηριστική των φαινολικών υδροξυλομάδων ή του H₂O. Στο φάσμα του FL Ester παρατηρείται μετατόπιση της απορρόφησης από τους 1686 cm⁻¹ στους 1715 και 1760 cm⁻¹. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την διάνοιξη του λακτοειδούς δακτυλίου, καθώς οι κορυφές είναι αντιπροσωπευτικές της καρβonyλικής δόνησης τάσης σε βενζοϊκούς και αλειφατικούς εστέρες αντίστοιχα. Την ίδια στιγμή παρατηρείται μετατόπιση της απορρόφησης στις μεγάλες τιμές κυματαριθμών λόγω του “κλειδώματος” της ένωσης FL Ester στην κινουειδή μορφή. Το φάσμα της ένωσης FL-NH-Boc χαρακτηρίζεται από την απορρόφηση στους 1769 cm⁻¹ (δόνηση τάσης C=O της Boc ομάδας). Η ανάδυση των οξειών κορυφών στους 2974 και 3014 cm⁻¹ είναι χαρακτηριστική της δόνησης τάσης του δεσμού N-H. Για το τελικό προϊόν FL-NH₃⁺TFA⁻, οι κορυφές απορρόφησης στους 2854, 2923 και 2962 cm⁻¹ οφείλονται στην ομάδα NH₃⁺. Η επικαλυπτόμενη κορυφή στους 1713 cm⁻¹ οφείλεται στην απορρόφηση της ομάδας C=O του βενζοϊκού εστέρα

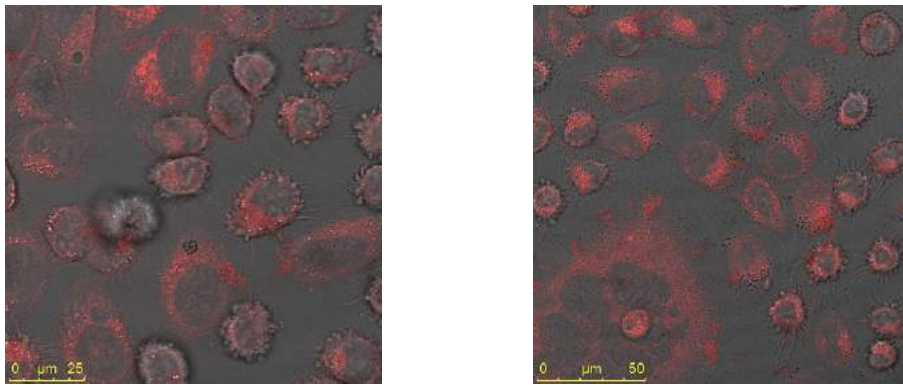


Σχήμα Π5.9 Φάσμα διέγερσης/εκπομπής FL-NH₂.

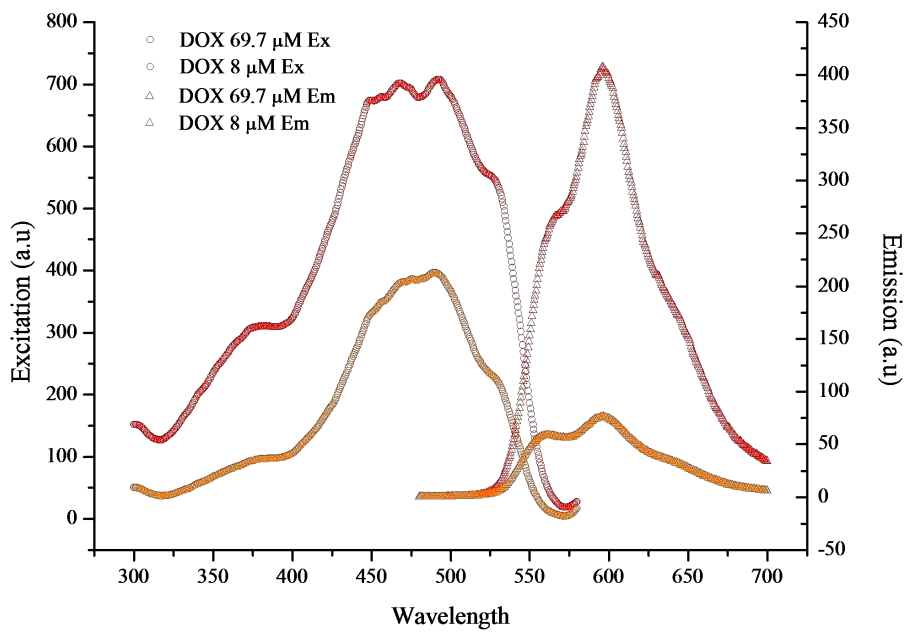
Παράρτημα Κεφαλαίου 6



Σχήμα Π6.1 Σμίγος φασμάτων απορρόφησης DOX σε μεταβλητή συγκέντρωση και κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης.



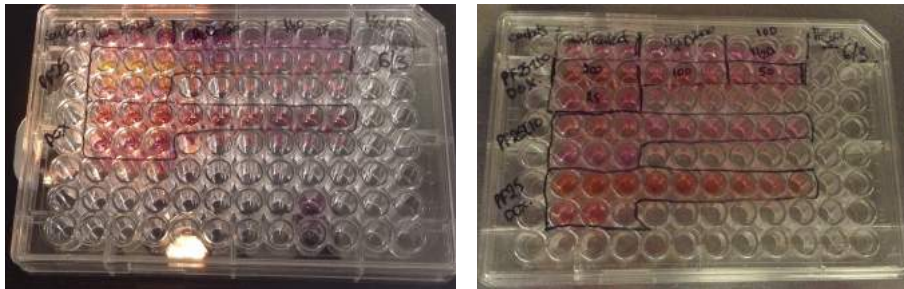
Εικόνα Π6.1 Κύτταρα HeLa έπειτα από τροφοδοσία με PI@DOX₂₀ μΜ για 30 min.



Σχήμα Π6.2 Φάσματα διέγερσης εκπομπής υδατικών διαλυμάτων DOX συγκέντρωσης 69.7 μΜ και 8 μΜ.



Εικόνα Π6.2 Φωτογραφία αντιδραστήρα αποδέσμευσης PFI@DOX σε pH=7 για t=24 h.



Εικόνα Π6.3 Πλάκες δοκιμής κυτταρικής βιωσιμότητας MTT.

Βιβλιογραφία

1. IUPAC, <http://goldbook.iupac.org/G02600.html>.
2. Elias, H.G., *An Introduction to Polymer Science*. 1997: Wiley VCH.
3. Hoffman, A.S., *Hydrogels for biomedical applications*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002. 54(1): p. 3-12.
4. Fernández-Barbero, A., et al., Gels and microgels for nanotechnological applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2009. 147–148: p. 88-108.
5. Tanaka, T., *Phase Transitions of Gels*, in *Polyelectrolyte Gels*. 1992, American Chemical Society. p. 1-21.
6. Pelton, R.H. and P. Chibante, Preparation of aqueous latices with N-isopropylacrylamide. *Colloids and Surfaces*, 1986. 20(3): p. 247-256.
7. Zheng, X., et al., Microgel-Based Thermosensitive MRI Contrast Agent. *ACS Macro Letters*, 2015. 4(4): p. 431-435.
8. Naha, P.C., et al., Intracellular localisation, geno- and cytotoxic response of polyN-isopropylacrylamide (PNIPAM) nanoparticles to human keratinocyte (HaCaT) and colon cells (SW 480). *Toxicology Letters*, 2010. 198(2): p. 134-143.
9. Guan, Y. and Y. Zhang, PNIPAM microgels for biomedical applications: from dispersed particles to 3D assemblies. *Soft Matter*, 2011. 7(14): p. 6375-6384.
10. Dai, Z. and T. Ngai, Microgel particles: The structure-property relationships and their biomedical applications. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2013. 51(14): p. 2995-3003.
11. Smeets, N.M.B. and T. Hoare, Designing responsive microgels for drug delivery applications. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2013. 51(14): p. 3027-3043.
12. Pelton, R. and T. Hoare, *Microgels and Their Synthesis: An Introduction*, in *Microgel Suspensions*. 2011, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 1-32.
13. Hoare, T. and R. Pelton, Characterizing charge and crosslinker distributions in polyelectrolyte microgels. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2008. 13(6): p. 413-428.
14. Xia, L.-W., et al., Nano-structured smart hydrogels with rapid response and high elasticity. *Nat Commun*, 2013. 4.
15. Pich, A. and W. Richtering, *Microgels by Precipitation Polymerization: Synthesis, Characterization, and Functionalization*, in *Chemical Design of Responsive Microgels*, A. Pich and W. Richtering, Editors. 2011, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1-37.

16. McPhee, W., K.C. Tam, and R. Pelton, Poly(N-isopropylacrylamide) Latices Prepared with Sodium Dodecyl Sulfate. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1993. 156(1): p. 24-30.
17. Tam, K.C., S. Ragaram, and R.H. Pelton, Interaction of Surfactants with Poly(N-isopropylacrylamide) Microgel Latexes. *Langmuir*, 1994. 10(2): p. 418-422.
18. Wang, G., R. Pelton, and J. Zhang, Sodium dodecyl sulfate binding to poly(N-isopropylacrylamide) microgel latex studied by isothermal titration calorimetry. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1999. 153(1-3): p. 335-340.
19. Wilkinson, M.C., J. Hearn, and P.A. Steward, *The cleaning of polymer colloids*. *Advances in Colloid and Interface Science*, 1999. 81(2): p. 77-165.
20. Pelton, R., Unresolved issues in the preparation and characterization of thermoresponsive microgels. *Macromolecular Symposia*, 2004. 207(1): p. 57-66.
21. Cserhádi, T., E. Forgács, and G. Oros, Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment International*, 2002. 28(5): p. 337-348.
22. Lockman, P.R., et al., Nanoparticle Surface Charges Alter Blood-Brain Barrier Integrity and Permeability. *Journal of Drug Targeting*, 2004. 12(9-10): p. 635-641.
23. Gao, J. and B.J. Frisken, Cross-Linker-Free N-Isopropylacrylamide Gel Nanospheres. *Langmuir*, 2003. 19(13): p. 5212-5216.
24. Ma, X., et al., Different deswelling behavior of temperature-sensitive microgels of poly(N-isopropylacrylamide) crosslinked by polyethyleneglycol dimethacrylates. *Journal of colloid and interface science*, 2004. 276(1): p. 53-59.
25. Deen, G.R. and J.S. Pedersen, Investigation on the structure of temperature-responsive N-isopropylacrylamide microgels containing a new hydrophobic crosslinker. *Cogent Chemistry*, 2015. 1(1): p. 1012658.
26. Zhao, C., et al., Facile synthesis of thermo- and pH-responsive biodegradable microgels. *Colloid and Polymer Science*, 2011. 289(4): p. 447-451.
27. Cuggino, J.C., et al., Thermosensitive nanogels based on dendritic polyglycerol and N-isopropylacrylamide for biomedical applications. *Soft Matter*, 2011. 7(23): p. 11259-11266.
28. Smith, M.H., et al., Monitoring the Erosion of Hydrolytically-Degradable Nanogels via Multiangle Light Scattering Coupled to Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation. *Analytical Chemistry*, 2010. 82(2): p. 523-530.
29. Woodward, N.C., et al., Calorimetric Investigation of the Influence of Cross-Linker Concentration on the Volume Phase Transition of Poly(N-isopropylacrylamide) Colloidal Microgels. *Langmuir*, 2003. 19(8): p. 3202-3211.
30. Liu, R., M. Fraylich, and B.R. Saunders, Thermoresponsive copolymers: from fundamental studies to applications. *Colloid and Polymer Science*, 2009. 287(6): p. 627-643.

31. Κωνσταντίνος, Π., *Επιστήμη και Τεχνολογία Πολυμερών*. 2001, Θεσσαλονίκη: Πήγασος.
32. Nayak, S. and L.A. Lyon, *Soft Nanotechnology with Soft Nanoparticles*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2005. 44(47): p. 7686-7708.
33. Schild, H.G., Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. *Progress in Polymer Science*, 1992. 17(2): p. 163-249.
34. Quesada-Perez, M., et al., Gel swelling theories: the classical formalism and recent approaches. *Soft Matter*, 2011. 7(22): p. 10536-10547.
35. Pelton, R., Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) is never hydrophobic. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010. 348(2): p. 673-674.
36. Gauthier, M.A., M.I. Gibson, and H.-A. Klok, Synthesis of Functional Polymers by Post-Polymerization Modification. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009. 48(1): p. 48-58.
37. Snowden, M.J., et al., Colloidal copolymer microgels of N-isopropylacrylamide and acrylic acid: pH, ionic strength and temperature effects. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 1996. 92(24): p. 5013-5016.
38. Hartanto, Y., et al., Thermoresponsive Acidic Microgels as Functional Draw Agents for Forward Osmosis Desalination. *Environmental Science & Technology*, 2016. 50(8): p. 4221-4228.
39. Ma, X., et al., Deswelling comparison of temperature-sensitive poly(N-isopropylacrylamide) microgels containing functional OH groups with different hydrophilic long side chains. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 2005. 43(24): p. 3575-3583.
40. Ma, X. and X. Tang, Flocculation behavior of temperature-sensitive poly(N-isopropylacrylamide) microgels containing polar side chains with OH groups. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006. 299(1): p. 217-224.
41. Suzuki, D., T. Yamagata, and M. Murai, Multilayered Composite Microgels Synthesized by Surfactant-Free Seeded Polymerization. *Langmuir*, 2013. 29(33): p. 10579-10585.
42. Chen, Q., et al., Preparation and characterization of poly (N-isopropylacrylamide)/polyvinylamine core-shell microgels. *Colloid and Polymer Science*, 2009. 287(11): p. 1339-1346.
43. Xu, J. and R. Pelton, A new route to poly(N-isopropylacrylamide) microgels supporting a polyvinylamine corona. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2004. 276(1): p. 113-117.
44. Huang, G. and Z. Hu, Phase Behavior and Stabilization of Microgel Arrays. *Macromolecules*, 2007. 40(10): p. 3749-3756.

45. Kodlekere, P., A.L. Cartelle, and L.A. Lyon, Design of functional cationic microgels as conjugation scaffolds. *RSC Advances*, 2016. 6(38): p. 31619-31631.
46. Chen, Y., et al., Dynamic control of volume phase transitions of poly(N-isopropylacrylamide) based microgels in water using hydrazide-aldehyde chemistry. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2014. 52(12): p. 1745-1754.
47. Horecha, M., et al., Ordered surface structures from PNIPAM-based loosely packed microgel particles. *Soft Matter*, 2010. 6(23): p. 5980-5992.
48. Singh, N. and L.A. Lyon, Synthesis of multifunctional nanogels using a protected macromonomer approach. *Colloid and Polymer Science*, 2008. 286(8): p. 1061-1069.
49. Ito, S., et al., Preparation of Thermosensitive Submicrometer Gel Particles with Anionic and Cationic Charges. *Langmuir*, 1999. 15(12): p. 4289-4294.
50. Schmid, A.J., et al., Synthesis and solution behaviour of stimuli-sensitive zwitterionic microgels. *Colloid and Polymer Science*, 2015. 293(11): p. 3305-3318.
51. Zha, L., et al., Preparation and characterization of poly (N-isopropylacrylamide-co-dimethylaminoethyl methacrylate) microgel latexes. *Colloid and Polymer Science*, 2002. 280(1): p. 1-6.
52. Pinkrah, V.T., et al., Physicochemical Properties of Poly(N-isopropylacrylamide-co-4-vinylpyridine) Cationic Polyelectrolyte Colloidal Microgels. *Langmuir*, 2003. 19(3): p. 585-590.
53. Li, X., et al., Preparation and Characterization of Narrowly Distributed Nanogels with Temperature-Responsive Core and pH-Responsive Shell. *Macromolecules*, 2004. 37(26): p. 10042-10046.
54. Kim, K.S. and B. Vincent, pH and Temperature-sensitive Behaviors of Poly(4-vinylpyridine-co-N-isopropyl acrylamide) Microgels. *Polym J*, 2005. 37(8): p. 565-570.
55. Nur, H., et al., Synthesis and properties of polyelectrolyte microgel particles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2010. 158(1-2): p. 15-20.
56. Li, X., et al., Volume phase transition temperature tuning and investigation of the swelling-deswelling oscillation of responsive microgels. *Polymer International*, 2007. 56(8): p. 968-975.
57. Kataoka, K., et al., Totally Synthetic Polymer Gels Responding to External Glucose Concentration: Their Preparation and Application to On-Off Regulation of Insulin Release. *Journal of the American Chemical Society*, 1998. 120(48): p. 12694-12695.
58. Hoare, T. and R. Pelton, Engineering Glucose Swelling Responses in Poly(N-isopropylacrylamide)-Based Microgels. *Macromolecules*, 2007. 40(3): p. 670-678.
59. Zhang, Y., Y. Guan, and S. Zhou, Synthesis and Volume Phase Transitions of Glucose-Sensitive Microgels. *Biomacromolecules*, 2006. 7(11): p. 3196-3201.

60. Ge, H., et al., Temperature-Controlled Release of Diols from N-Isopropylacrylamide-co-Acrylamidophenylboronic Acid Microgels. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006. 110(41): p. 20635-20639.
61. Zhu, X., et al., Preparation and characterization of nanosized P(NIPAM-MBA) hydrogel particles and adsorption of bovine serum albumin on their surface. *Nanoscale Research Letters*, 2012. 7(1): p. 1-8.
62. Trongsatitkul, T. and B.M. Budhlall, Temperature dependence of serum protein adsorption in PEGylated PNIPAm microgels. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013. 103: p. 244-252.
63. Gan, D. and L.A. Lyon, Synthesis and Protein Adsorption Resistance of PEG-Modified Poly(N-isopropylacrylamide) Core/Shell Microgels. *Macromolecules*, 2002. 35(26): p. 9634-9639.
64. Wong, Y.-M., et al., Optimization of Poly(N-isopropylacrylamide) as an Artificial Amidase. *Biomacromolecules*, 2015. 16(1): p. 411-421.
65. Welsch, N., et al., Core-shell microgels as "smart" carriers for enzymes. *Soft Matter*, 2012. 8(5): p. 1428-1436.
66. Smith, M.H. and L.A. Lyon, Tunable Encapsulation of Proteins within Charged Microgels. *Macromolecules*, 2011. 44(20): p. 8154-8160.
67. Dubey, N.C., et al., Smart Core-Shell Microgel Support for Acetyl Coenzyme A Synthetase: A Step Toward Efficient Synthesis of Polyketide-Based Drugs. *Biomacromolecules*, 2014. 15(7): p. 2776-2783.
68. Simberg, D., et al., *Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. 104(3): p. 932-936.
69. Lee, J.-H., et al., All-in-One Target-Cell-Specific Magnetic Nanoparticles for Simultaneous Molecular Imaging and siRNA Delivery. *Angewandte Chemie*, 2009. 121(23): p. 4238-4243.
70. Gui, R., Y. Wang, and J. Sun, Encapsulating magnetic and fluorescent mesoporous silica into thermosensitive chitosan microspheres for cell imaging and controlled drug release in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014. 113: p. 1-9.
71. Bruce, I.J. and T. Sen, Surface Modification of Magnetic Nanoparticles with Alkoxysilanes and Their Application in Magnetic Bioseparations. *Langmuir*, 2005. 21(15): p. 7029-7035.
72. Xu, W., et al., Fluorescein-polyethyleneimine coated gadolinium oxide nanoparticles as T1 magnetic resonance imaging (MRI)-cell labeling (CL) dual agents. *RSC Advances*, 2012. 2(29): p. 10907-10915.

73. Wu, W., et al., Specific glucose-to-SPR signal transduction at physiological pH by molecularly imprinted responsive hybrid microgels. *Biomaterials*, 2012. 33(29): p. 7115-7125.
74. Vaz, A.M., et al., Synthesis and characterization of biocatalytic γ -Fe₂O₃@SiO₂ particles as recoverable bioreactors. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014. 114: p. 11-19.
75. Karg, M. and T. Hellweg, Smart inorganic/organic hybrid microgels: Synthesis and characterisation. *Journal of Materials Chemistry*, 2009. 19(46): p. 8714-8727.
76. Daniel, M.-C. and D. Astruc, Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chemical Reviews*, 2004. 104(1): p. 293-346.
77. Suzuki, D. and H. Kawaguchi, Modification of Gold Nanoparticle Composite Nanostructures Using Thermosensitive Core–Shell Particles as a Template. *Langmuir*, 2005. 21(18): p. 8175-8179.
78. Suzuki, D. and H. Kawaguchi, Gold Nanoparticle Localization at the Core Surface by Using Thermosensitive Core–Shell Particles as a Template. *Langmuir*, 2005. 21(25): p. 12016-12024.
79. Suzuki, D. and H. Kawaguchi, Hybrid Microgels with Reversibly Changeable Multiple Brilliant Color. *Langmuir*, 2006. 22(8): p. 3818-3822.
80. Contreras-Cáceres, R., et al., Encapsulation and Growth of Gold Nanoparticles in Thermoresponsive Microgels. *Advanced Materials*, 2008. 20(9): p. 1666-1670.
81. Karg, M., et al., Temperature, pH, and ionic strength induced changes of the swelling behavior of PNIPAM-poly(allylacetic acid) copolymer microgels. *Langmuir*, 2008. 24.
82. Zhang, Y., et al., Assembling of gold nanorods on P(NIPAM-AAPBA) microgels: a large shift in the plasmon band and colorimetric glucose sensing. *RSC Advances*, 2012. 2(11): p. 4768-4776.
83. Shi, S., et al., Poly(N-isopropylacrylamide)-Au hybrid microgels: synthesis, characterization, thermally tunable optical and catalytic properties. *Soft Matter*, 2013. 9(46): p. 10966-10970.
84. Shi, S., et al., Thermo-, pH-, and Light-Responsive Poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid)–Au Hybrid Microgels Prepared by the in Situ Reduction Method Based on Au-Thiol Chemistry. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2014. 118(25): p. 7177-7186.
85. Tang, F., et al., Control of Metal-Enhanced Fluorescence with pH- and Thermoresponsive Hybrid Microgels. *Langmuir*, 2012. 28(1): p. 883-888.
86. Tang, Y., et al., Synthesis of thermo- and pH-responsive Ag nanoparticle-embedded hybrid microgels and their catalytic activity in methylene blue reduction. *Materials Chemistry and Physics*, 2015. 149–150: p. 460-466.

87. Zha, L.S., et al., Monodisperse Temperature-Sensitive Microcontainers. *Advanced Materials*, 2002. 14(15): p. 1090-1092.
88. Zhang, F. and C.-C. Wang, Preparation of thermoresponsive core-shell polymeric microspheres and hollow PNIPAM microgels. *Colloid and Polymer Science*, 2008. 286(8): p. 889-895.
89. Agrawal, M., et al., Switchable Photoluminescence of CdTe Nanocrystals by Temperature-Responsive Microgels. *Langmuir*, 2008. 24(17): p. 9820-9824.
90. Wang, C., et al., A chitosan-modified graphene nanogel for noninvasive controlled drug release. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2013. 9(7): p. 903-911.
91. Girard, H.A., et al., Encapsulated nanodiamonds in smart microgels toward self-assembled diamond nanoarrays. *Diamond and Related Materials*, 2013. 33: p. 32-37.
92. Wang, H., et al., Immobilization of Carbon Dots in Molecularly Imprinted Microgels for Optical Sensing of Glucose at Physiological pH. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015. 7(29): p. 15735-15745.
93. Schmidt, A.M., *Thermoresponsive magnetic colloids*. *Colloid and Polymer Science*, 2007. 285(9): p. 953-966.
94. Arami, H., et al., In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 2015. 44(23): p. 8576-8607.
95. Venditto, V.J. and F.C. Szoka Jr, Cancer nanomedicines: So many papers and so few drugs! *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013. 65(1): p. 80-88.
96. Mahmoudi, M., et al., Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2011. 63(1-2): p. 24-46.
97. Ricardo, G.-C., et al., Vacancy ordering and electronic structure of γ - Fe₂O₃ (maghemite): a theoretical investigation. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 2010. 22(25): p. 255401.
98. Valérie, C., *Magnetic Nanoparticles: Preparation and Properties*, in *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. 2007, Taylor & Francis. p. 1715-1730.
99. Wei, W., et al., Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Science and Technology of Advanced Materials*, 2015. 16(2): p. 023501.
100. Laurent, S., et al., *Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications*. *Chemical Reviews*, 2008. 108(6): p. 2064-2110.

101. Rubio-Retama, J., et al., Synthesis and Characterization of Thermosensitive PNIPAM Microgels Covered with Superparamagnetic γ -Fe₂O₃ Nanoparticles. *Langmuir*, 2007. 23(20): p. 10280-10285.
102. Deng, Y.H., et al., A Novel Approach for Preparation of Thermoresponsive Polymer Magnetic Microspheres with Core–Shell Structure. *Advanced Materials*, 2003. 15(20): p. 1729-1732.
103. Laurenti, M., et al., Synthesis of Thermosensitive Microgels with a Tunable Magnetic Core. *Langmuir*, 2011. 27(17): p. 10484-10491.
104. Khan, A., Preparation and characterization of magnetic nanoparticles embedded in microgels. *Materials Letters*, 2008. 62(6–7): p. 898-902.
105. Chen, T., et al., Preparation and characterization of thermosensitive organic–inorganic hybrid microgels with functional Fe₃O₄ nanoparticles as crosslinker. *Polymer*, 2011. 52(1): p. 172-179.
106. Turcu, R., et al., Magnetic microgels, a promising candidate for enhanced magnetic adsorbent particles in bioseparation: synthesis, physicochemical characterization, and separation performance. *Soft Matter*, 2015. 11(5): p. 1008-1018.
107. Liu, G., et al., Magnetite-Loaded Thermosensitive Nanogels for Bioinspired Lubrication and Multimodal Friction Control. *ACS Macro Letters*, 2016. 5(1): p. 144-148.
108. Nassau, K., *The Physics and Chemistry of Color: The Fifteen Causes of Color*. 2nd ed. 2001: John Wiley and Sons.
109. Huisgen, R., *Adolf von Baeyer's Scientific Achievements — a Legacy*. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1986. 25(4): p. 297-311.
110. Martin, M.M. and L. Lindqvist, The pH dependence of fluorescein fluorescence. *Journal of Luminescence*, 1975. 10(6): p. 381-390.
111. *MolView*. Available from: <http://molview.org/?cid=16850>.
112. Urano, Y., et al., Evolution of Fluorescein as a Platform for Finely Tunable Fluorescence Probes. *Journal of the American Chemical Society*, 2005. 127(13): p. 4888-4894.
113. Duan, Y., et al., Recent Progress on Synthesis of Fluorescein Probes. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 2009. 6(1): p. 35-43.
114. Alford, R., et al., Toxicity of Organic Fluorophores Used in Molecular Imaging: Literature Review. *Molecular Imaging*, 2009. 8(6).
115. Kwiterovich, K.A., et al., Frequency of Adverse Systemic Reactions after Fluorescein Angiography. *Ophthalmology*, 1991. 98(7): p. 1139-1142.
116. Thielbeer, F., S.V. Chankeshwara, and M. Bradley, Polymerizable Fluorescein Derivatives: Synthesis of Fluorescent Particles and Their Cellular Uptake. *Biomacromolecules*, 2011. 12(12): p. 4386-4391.

117. Adamczyk, M., J. Grote, and J.A. Moore, Chemoenzymatic Synthesis of 3'-O-(Carboxyalkyl)fluorescein Labels. *Bioconjugate Chemistry*, 1999. 10(3): p. 544-547.
118. Wrzesien, J. and D. Graham, Synthesis of SERS active nanoparticles for detection of biomolecules. *Tetrahedron*, 2012. 68(4): p. 1230-1240.
119. Kruger, R.G., P. Dostal, and D.G. McCafferty, An economical and preparative orthogonal solid phase synthesis of fluorescein and rhodamine derivatized peptides: FRET substrates for the *Staphylococcus aureus* sortase SrtA transpeptidase reaction. *Chemical Communications*, 2002(18): p. 2092-2093.
120. Falck, J.R., et al., Preparation and spectral properties of lipophilic fluorescein derivatives: application to plasma low-density lipoprotein. *Journal of the American Chemical Society*, 1981. 103(24): p. 7396-7398.
121. Burchak, O.N., et al., Fluorescein-based amino acids for solid phase synthesis of fluorogenic protease substrates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2006. 14(8): p. 2559-2568.
122. Lohse, J., et al., Fluorescein-Conjugated Lysine Monomers for Solid Phase Synthesis of Fluorescent Peptides and PNA Oligomers. *Bioconjugate Chemistry*, 1997. 8(4): p. 503-509.
123. Zhao, Z.-G., T. Shen, and H.-J. Xu, The absorption and structure of fluorescein and its ethyl derivatives in various solutions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 1989. 45(11): p. 1113-1116.
124. Song, A., et al., Spectral properties and structure of fluorescein and its alkyl derivatives in micelles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2000. 167(3): p. 253-262.
125. Liu, B., et al., A Photostable, pH-Invariant Fluorescein Derivative for Single-Molecule Microscopy. *Journal of Fluorescence*, 2009. 19(5): p. 915-920.
126. Baum, J., P. Stastny, and M. Ziff, Effects of the Rheumatoid Factor and Antigen-Antibody Complexes on the Vessels of the Rat Mesentery. *The Journal of Immunology*, 1964. 93(6): p. 985-992.
127. de Belder, A.N. and K.O. Wik, Preparation and properties of fluorescein-labelled hyaluronate. *Carbohydrate Research*, 1975. 44(2): p. 251-257.
128. Ricka, J., et al., Mobility of fluorescent polyacrylamide derivatives in water-acetone mixtures. *Macromolecules*, 1987. 20(6): p. 1407-1411.
129. Buxbaum, E., Amine-Reactive Reagents, in *Biophysical Chemistry of Proteins: An Introduction to Laboratory Methods*. 2011, Springer US: Boston, MA. p. 199-203.
130. Zheng, F., et al., A water-soluble, low-cytotoxic and sensitive fluorescent probe based on poly(ethylene glycol) for detecting sulfide anion in aqueous media and imaging inside live cells. *Polymer*, 2013. 54(21): p. 5691-5697.

131. Wu, X., G.J. Price, and R.H. Guy, Disposition of Nanoparticles and an Associated Lipophilic Permeant following Topical Application to the Skin. *Molecular Pharmaceutics*, 2009. 6(5): p. 1441-1448.
132. Basiruddin, S.K., A. Ranjan Maity, and N.R. Jana, Glucose/galactose/dextran-functionalized quantum dots, iron oxide and doped semiconductor nanoparticles with <100 nm hydrodynamic diameter. *RSC Advances*, 2012. 2(31): p. 11915-11921.
133. Basiruddin, S.K., et al., Functionalized Gold Nanorod Solution via Reverse Micelle Based Polyacrylate Coating. *Langmuir*, 2010. 26(10): p. 7475-7481.
134. He, H., et al., Clickable poly(ionic liquid)s for modification of glass and silicon surfaces. *Polymer*, 2014. 55(16): p. 3330-3338.
135. Vihola, H., et al., Cell-polymer interactions of fluorescent polystyrene latex particles coated with thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) and poly(N-vinylcaprolactam) or grafted with poly(ethylene oxide)-macromonomer. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007. 343(1-2): p. 238-246.
136. Flint, N.J., S. Gardebrecht, and L. Swanson, Fluorescence Investigations of "Smart" Microgel Systems. *Journal of Fluorescence*, 1998. 8(4): p. 343-353.
137. Khan, A., Preparation and characterization of N-isopropylacrylamide/acrylic acid copolymer core-shell microgel particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007. 313(2): p. 697-704.
138. Koc, K. and E. Alveroglu, Tuning the gel size and LCST of N-isopropylacrylamide nanogels by anionic fluoroprobe. *Colloid and Polymer Science*, 2016. 294(2): p. 285-290.
139. Matsumura, Y. and K. Iwai, Synthesis and thermo-responsive behavior of fluorescent labeled microgel particles based on poly(N-isopropylacrylamide) and its related polymers. *Polymer*, 2005. 46(23): p. 10027-10034.
140. Matsumura, Y. and K. Iwai, Thermo-responsive behavior and microenvironments of poly(N-isopropylacrylamide) microgel particles as studied by fluorescent label method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006. 296(1): p. 102-109.
141. Li, G., et al., Synthesis of Poly(methyl methacrylate) Labeled with Fluorescein Moieties via Atom Transfer Radical Polymerization. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 2008. 45(6): p. 495-501.
142. Lu, X., et al., Synthesis of poly(N-isopropylacrylamide) by ATRP using a fluorescein-based initiator. *Polymer Bulletin*, 2007. 59(2): p. 195-206.
143. Hiruta, Y., et al., Temperature-Responsive Fluorescence Polymer Probes with Accurate Thermally Controlled Cellular Uptakes. *ACS Macro Letters*, 2014. 3(3): p. 281-285.

144. Choi, S.H., J.J. Yoon, and T.G. Park, Galactosylated Poly(N-isopropylacrylamide) Hydrogel Submicrometer Particles for Specific Cellular Uptake within Hepatocytes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2002. 251(1): p. 57-63.
145. Gao, H., et al., Thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) nanocapsules with controlled permeability. *Polymer*, 2005. 46(4): p. 1087-1093.
146. Garcia, A., et al., Photo-, Thermally, and pH-Responsive Microgels. *Langmuir*, 2007. 23(1): p. 224-229.
147. Meng, Z., G.R. Hendrickson, and L.A. Lyon, Simultaneous Orthogonal Chemoligations on Multiresponsive Microgels. *Macromolecules*, 2009. 42(20): p. 7664-7669.
148. Wong, C.-H. and S.C. Zimmerman, Orthogonality in organic, polymer, and supramolecular chemistry: from Merrifield to click chemistry. *Chemical Communications*, 2013. 49(17): p. 1679-1695.
149. Mansson, L.K., et al., A new route towards colloidal molecules with externally tunable interaction sites. *Faraday Discussions*, 2015. 181(0): p. 49-69.
150. Kim, Y., et al., Fluorescent, stimuli-responsive, crosslinked PNIPAM-based microgel. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015. 207, Part A: p. 623-630.
151. Schwarzenbach, R.P., P.M. Gschwend, and D.M. Imboden, Chemical Transformations I: Hydrolysis and Reactions Involving Other Nucleophilic Species, in *Environmental Organic Chemistry*. 2005, John Wiley & Sons, Inc. p. 489-554.
152. Kim, Y., et al., Fluorescence sensing of glucose using glucose oxidase incorporated into a fluorophore-containing PNIPAM hydrogel. *Polymer Chemistry*, 2016. 7(10): p. 1907-1912.
153. McCurley, M.F., An optical biosensor using a fluorescent, swelling sensing element. *Biosensors and Bioelectronics*, 1994. 9(7): p. 527-533.
154. Gan, D. and L.A. Lyon, Interfacial Nonradiative Energy Transfer in Responsive Core-Shell Hydrogel Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 2001. 123(34): p. 8203-8209.
155. Wang, D., et al., Stimuli-Responsive Fluorescent Poly(N-isopropylacrylamide) Microgels Labeled with Phenylboronic Acid Moieties as Multifunctional Ratiometric Probes for Glucose and Temperatures. *Macromolecules*, 2011. 44(7): p. 2282-2290.
156. Laurenti, M., et al., Interpenetrated PNIPAM-Polythiophene Microgels for Nitro Aromatic Compound Detection. *Langmuir*, 2009. 25(16): p. 9579-9584.
157. Liu, T., et al., Enhancing Detection Sensitivity of Responsive Microgel-Based Cu(II) Chemosensors via Thermo-Induced Volume Phase Transitions. *Chemistry of Materials*, 2009. 21(14): p. 3439-3446.

158. Uchiyama, S., et al., Fluorescent Molecular Thermometers Based on Polymers Showing Temperature-Induced Phase Transitions and Labeled with Polarity-Responsive Benzofurazans. *Analytical Chemistry*, 2003. 75(21): p. 5926-5935.
159. Gota, C., S. Uchiyama, and T. Ohwada, Accurate fluorescent polymeric thermometers containing an ionic component. *Analyst*, 2007. 132(2): p. 121-126.
160. Gota, C., et al., Temperature-Dependent Fluorescence Lifetime of a Fluorescent Polymeric Thermometer, Poly(N-isopropylacrylamide), Labeled by Polarity and Hydrogen Bonding Sensitive 4-Sulfamoyl-7-aminobenzofurazan. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008. 112(10): p. 2829-2836.
161. Iwai, K., et al., Development of fluorescent microgel thermometers based on thermo-responsive polymers and their modulation of sensitivity range. *Journal of Materials Chemistry*, 2005. 15(27-28): p. 2796-2800.
162. Shiraishi, Y., et al., Rhodamine-Based Fluorescent Thermometer Exhibiting Selective Emission Enhancement at a Specific Temperature Range. *Organic Letters*, 2007. 9(20): p. 3921-3924.
163. Tang, L., et al., A fluorescent thermometer operating in aggregation-induced emission mechanism: probing thermal transitions of PNIPAM in water. *Chemical Communications*, 2009(33): p. 4974-4976.
164. Hu, J., et al., Ultrasensitive ratiometric fluorescent pH and temperature probes constructed from dye-labeled thermo-responsive double hydrophilic block copolymers. *Journal of Materials Chemistry*, 2011. 21(47): p. 19030-19038.
165. Chen, C.-Y. and C.-T. Chen, A PNIPAM-based fluorescent nanothermometer with ratiometric readout. *Chemical Communications*, 2011. 47(3): p. 994-996.
166. Okabe, K., et al., Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nat Commun*, 2012. 3: p. 705.
167. Qiao, J., et al., Intracellular temperature sensing by a ratiometric fluorescent polymer thermometer. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014. 2(43): p. 7544-7550.
168. Qiao, J., et al., Ratiometric Fluorescent Polymeric Thermometer for Thermogenesis Investigation in Living Cells. *Analytical Chemistry*, 2015.
169. Liu, J., et al., Intracellular Fluorescent Temperature Probe Based on Triarylboron Substituted Poly N-Isopropylacrylamide and Energy Transfer. *Analytical Chemistry*, 2015. 87(7): p. 3694-3698.
170. Guo, Z., et al., Multiple Logic Fluorescent Thermometer System Based on N-Isopropylmethacrylamide Copolymer Bearing Dicyanomethylene-4H-pyran Moiety. *Macromolecules*, 2009. 42(5): p. 1448-1453.
171. Sambe, L., et al., Programmable Polymer-Based Supramolecular Temperature Sensor with a Memory Function. *Angewandte Chemie*, 2014. 126(20): p. 5144-5148.

172. Corr, S.A., Y.P. Rakovich, and Y.K. Gun'ko, Multifunctional Magnetic-fluorescent Nanocomposites for Biomedical Applications. *Nanoscale Research Letters*, 2008. 3(3): p. 87-104.
173. Kaewsaneha, C., et al., Multifunctional Fluorescent-Magnetic Polymeric Colloidal Particles: Preparations and Bioanalytical Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015. 7(42): p. 23373-23386.
174. Howes, P., et al., Magnetic Conjugated Polymer Nanoparticles as Bimodal Imaging Agents. *Journal of the American Chemical Society*, 2010. 132(28): p. 9833-9842.
175. Chekina, N., et al., Fluorescent magnetic nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry*, 2011. 21(21): p. 7630-7639.
176. Gallagher, J.J., et al., Bimodal magnetic-fluorescent nanostructures for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry*, 2009. 19(24): p. 4081-4084.
177. Li, Y., et al., Surface molecular imprinting onto fluorescein-coated magnetic nanoparticles via reversible addition fragmentation chain transfer polymerization: A facile three-in-one system for recognition and separation of endocrine disrupting chemicals. *Nanoscale*, 2011. 3(1): p. 280-287.
178. Di Corato, R., et al., Magnetic-Fluorescent Colloidal Nanobeads: Preparation and Exploitation in Cell Separation Experiments. *Macromolecular Bioscience*, 2009. 9(10): p. 952-958.
179. Martin, A.L., et al., Enhanced Cell Uptake of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Functionalized with Dendritic Guanidines. *Bioconjugate Chemistry*, 2008. 19(12): p. 2375-2384.
180. Li, M., et al., Clickable poly(ester amine) dendrimer-grafted Fe₃O₄ nanoparticles prepared via successive Michael addition and alkyne-azide click chemistry. *Polymer Chemistry*, 2011. 2(6): p. 1312-1321.
181. Ge, Y., et al., Fluorescence Modified Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles for High-Efficient Cellular Imaging. *Nanoscale Research Letters*, 2009. 4(4): p. 287-295.
182. Kaewsaneha, C., et al., Immobilization of fluorescein isothiocyanate on magnetic polymeric nanoparticle using chitosan as spacer. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2012. 377(1): p. 145-152.
183. Becker, C., et al., Uptake of magnetic nanoparticles into cells for cell tracking. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2007. 311(1): p. 234-237.
184. Wang, L., et al., Biodegradable magnetic-fluorescent magnetite/poly(dl-lactic acid-co- α,β -malic acid) composite nanoparticles for stem cell labeling. *Biomaterials*, 2010. 31(13): p. 3502-3511.

185. Zhang, Y., N. Kohler, and M. Zhang, Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials*, 2002. 23(7): p. 1553-1561.
186. Zhang, X.F., et al., Multifunctional Fe₃O₄-Au/Porous Silica@Fluorescein Core/Shell Nanoparticles with Enhanced Fluorescence Quantum Yield. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2010. 114(43): p. 18313-18317.
187. Govindaiah, P., et al., Monodisperse and fluorescent poly(styrene-co-methacrylic acid-co-2-naphthyl methacrylate)/Fe₃O₄ composite particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2010. 343(2): p. 484-490.
188. Govindaiah, P., et al., Synthesis and characterization of multifunctional Fe₃O₄/poly(fluorescein O-methacrylate) core/shell nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2012. 379(1): p. 27-32.
189. Nagao, D., et al., Synthesis of Highly Monodisperse Particles Composed of a Magnetic Core and Fluorescent Shell. *Langmuir*, 2008. 24(17): p. 9804-9808.
190. Liu, J., et al., Bifunctional Nanoparticles with Fluorescence and Magnetism via Surface-Initiated AGET ATRP Mediated by an Iron Catalyst. *Langmuir*, 2011. 27(20): p. 12684-12692.
191. Lee, H., et al., Thermally Cross-Linked Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Application as a Dual Imaging Probe for Cancer in Vivo. *Journal of the American Chemical Society*, 2007. 129(42): p. 12739-12745.
192. Liu, Y., et al., Construction of antibody-like nanoparticles for selective protein sequestration in living cells. *Nanoscale*, 2015. 7(16): p. 7162-7167.
193. Yang, H., et al., Multifunctional Core/Shell Nanoparticles Cross-linked Polyetherimide-folic Acid as Efficient Notch-1 siRNA Carrier for Targeted Killing of Breast Cancer. *Scientific Reports*, 2014. 4: p. 7072.
194. Chang, I.P., K.C. Hwang, and C.-S. Chiang, Preparation of Fluorescent Magnetic Nanodiamonds and Cellular Imaging. *Journal of the American Chemical Society*, 2008. 130(46): p. 15476-15481.
195. Gollavelli, G. and Y.-C. Ling, Multi-functional graphene as an in vitro and in vivo imaging probe. *Biomaterials*, 2012. 33(8): p. 2532-2545.
196. Busquets, A.M., et al., Magnetic Nanoparticles Cross the Blood-Brain Barrier: When Physics Rises to a Challenge. *Nanomaterials*, 2015. 5(4).
197. Huang, Y., et al., Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Modified with Tween 80 Pass through the Intact Blood-Brain Barrier in Rats under Magnetic Field. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016. 8(18): p. 11336-11341.
198. Luther, E.M., et al., Endocytotic uptake of iron oxide nanoparticles by cultured brain microglial cells. *Acta Biomaterialia*, 2013. 9(9): p. 8454-8465.

199. Dulkeith, E., et al., Fluorescence Quenching of Dye Molecules near Gold Nanoparticles: Radiative and Nonradiative Effects. *Physical Review Letters*, 2002. 89(20): p. 203002.
200. He, J., et al., Adsorption model of ethyl ester of fluorescein on colloidal TiO₂ and the mechanism of the interfacial electron transfer. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1998. 142(1): p. 49-57.
201. Qu, H., et al., Water-Dispersible Iron Oxide Magnetic Nanoparticles with Versatile Surface Functionalities. *Langmuir*, 2011. 27(6): p. 2271-2278.
202. Bertorelle, F., et al., Fluorescence-Modified Superparamagnetic Nanoparticles: Intracellular Uptake and Use in Cellular Imaging. *Langmuir*, 2006. 22(12): p. 5385-5391.
203. Salgueiriño-Maceira, V. and M.A. Correa-Duarte, Increasing the Complexity of Magnetic Core/Shell Structured Nanocomposites for Biological Applications. *Advanced Materials*, 2007. 19(23): p. 4131-4144.
204. Ao, L., et al., Fluoroimmunoassay for Antigen Based on Fluorescence Quenching Signal of Gold Nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 2006. 78(4): p. 1104-1106.
205. Hoare, T. and R. Pelton, Impact of Microgel Morphology on Functionalized Microgel-Drug Interactions. *Langmuir*, 2008. 24(3): p. 1005-1012.
206. Hoare, T., et al., Thermoresponsive nanogels for prolonged duration local anesthesia. *Acta Biomaterialia*, 2012. 8(10): p. 3596-3605.
207. Ahmad, N., et al., PNIPAM nanoparticles for targeted and enhanced nose-to-brain delivery of curcuminoids: UPLC/ESI-Q-ToF-MS/MS-based pharmacokinetics and pharmacodynamic evaluation in cerebral ischemia model. *Drug Delivery*, 2014: p. 1-20.
208. Bucatariu, S., et al., Synthesis and characterization of thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide-co-hydroxyethylacrylamide) microgels as potential carriers for drug delivery. *Journal of Polymer Research*, 2014. 21(11): p. 1-12.
209. Hathaway, H., et al., Poly(N-isopropylacrylamide-co-allylamine) (PNIPAM-co-ALA) nanospheres for the thermally triggered release of Bacteriophage K. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2015. 96: p. 437-441.
210. Lopez, V.C., J. Hadgraft, and M.J. Snowden, The use of colloidal microgels as a (trans)dermal drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 2005. 292(1-2): p. 137-147.
211. Poh, S., J.B. Lin, and A. Panitch, Release of Anti-inflammatory Peptides from Thermosensitive Nanoparticles with Degradable Cross-Links Suppresses Pro-inflammatory Cytokine Production. *Biomacromolecules*, 2015. 16(4): p. 1191-1200.
212. Lou, S.-F., et al., Galactose functionalized injectable thermoresponsive microgels for sustained protein release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014. 113: p. 368-374.

213. Quan, C.-Y., et al., Polyethyleneimine Modified Biocompatible Poly(N-isopropylacrylamide)-Based Nanogels for Drug Delivery. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2008. 8(5): p. 2377-2384.
214. Blanco, M.D., et al., Synthesis and in vitro biological evaluation as antitumour drug carriers of folate-targeted N-isopropylacrylamide-based nanohydrogels. *Polymer International*, 2012. 61(7): p. 1202-1212.
215. Li, P., et al., Thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide-co-glycidyl methacrylate) microgels for controlled drug release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013. 101: p. 251-255.
216. Jian, Z., Q. Zhiyu, and G. Yueqing, In vivo anti-tumor efficacy of docetaxel-loaded thermally responsive nanohydrogel. *Nanotechnology*, 2009. 20(32): p. 325102.
217. Wu, W., et al., Smart Core-Shell Hybrid Nanogels with Ag Nanoparticle Core for Cancer Cell Imaging and Gel Shell for pH-Regulated Drug Delivery. *Chemistry of Materials*, 2010. 22(6): p. 1966-1976.
218. Regmi, R., et al., Hyperthermia controlled rapid drug release from thermosensitive magnetic microgels. *Journal of Materials Chemistry*, 2010. 20(29): p. 6158-6163.
219. Campbell, S., D. Maitland, and T. Hoare, Enhanced Pulsatile Drug Release from Injectable Magnetic Hydrogels with Embedded Thermosensitive Microgels. *ACS Macro Letters*, 2015. 4(3): p. 312-316.
220. Perkampus, H.-H., *Principles*, in *UV-VIS Spectroscopy and Its Applications*. 1992, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 3-9.
221. Yadav, L.D.S., *Ultraviolet (UV) and Visible Spectroscopy*, in *Organic Spectroscopy*. 2005, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 7-51.
222. *Introduction to Fluorescence*, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, J.R. Lakowicz, Editor. 2006, Springer US: Boston, MA. p. 1-26.
223. Valeur, B. and M.N. Berberan-Santos, *Characteristics of Fluorescence Emission*, in *Molecular Fluorescence*. 2012, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 53-74.
224. Donald L. Pavia, G.M.L., George S. Kriz, James A. Vyvyan, *Introduction to Spectroscopy*. 2009: Brooks/Cole, Cengage Learning.
225. James W. Robinson, E.S.F., George M. Frame II, *Undergraduate Instrumental Analysis*. Seventh ed. 2014.
226. Schärtl, W., *Fundamental Concepts*, in *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*. 2007, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1-24.
227. Ottewill, R.H., *Scattering Techniques-Fundamentals*, in *Polymeric Dispersions: Principles and Applications*, J.M. Asua, Editor. 1997, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 217-228.
228. Hulst, H.C.v.d., *Light Scattering by Small Particles*. 1981: Dover.

229. Richard, B.M., R.L. Walter, and N.F. Joseph, *Laser Rayleigh scattering*. Measurement Science and Technology, 2001. 12(5): p. R33.
230. *Zetasizer Nano User Manual*. Vol. MAN0317. 2009: Malvern Instruments.
231. Schätzel, K., Correlation techniques in dynamic light scattering. Applied Physics B, 1987. 42(4): p. 193-213.
232. Tscharnuter, W., Photon Correlation Spectroscopy in Particle Sizing, in Encyclopedia of Analytical Chemistry. 2006, John Wiley & Sons, Ltd.
233. Alexander-Katz, R., Light Scattering and its Applications in Polymer Characterization, in Handbook of Polymer Synthesis, Characterization, and Processing. 2013, John Wiley & Sons, Inc. p. 367-389.
234. What Is The Hydrodynamic Radius? Malvern Technical Note.
235. Frisken, B.J., Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data. Applied Optics, 2001. 40(24): p. 4087-4091.
236. Patty, P.J. and B.J. Frisken, Direct determination of the number-weighted mean radius and polydispersity from dynamic light-scattering data. Applied Optics, 2006. 45(10): p. 2209-2216.
237. Ohshima, H., Potential and Charge of a Hard Particle and a Soft Particle, in Electrical Phenomena at Interfaces and Biointerfaces. 2012, John Wiley & Sons, Inc. p. 1-15.
238. Riley, J., *Charge in Colloidal Systems*, in *Colloid Science*. 2009, Blackwell Publishing Ltd. p. 14-35.
239. Miller, J.F., K. Schätzel, and B. Vincent, The determination of very small electrophoretic mobilities in polar and nonpolar colloidal dispersions using phase analysis light scattering. Journal of Colloid and Interface Science, 1991. 143(2): p. 532-554.
240. Lattuada, M. and T.A. Hatton, Functionalization of Monodisperse Magnetic Nanoparticles. Langmuir, 2007. 23(4): p. 2158-2168.
241. Dodrill, B.C., Magnetic Media Measurements with a VSM.
242. Stuart, B.H., Introduction, in Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. 2005, John Wiley & Sons, Ltd. p. 1-13.
243. Paddock, S.W., Principles and practices of laser scanning confocal microscopy. Molecular Biotechnology, 2000. 16(2): p. 127-149.
244. Denis, S. and R.W. Eric, Confocal Microscopy, in Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering, Second Edition. 2008, CRC Press. p. 705-714.
245. Debord, J.D. and L.A. Lyon, Synthesis and Characterization of pH-Responsive Copolymer Microgels with Tunable Volume Phase Transition Temperatures. Langmuir, 2003. 19(18): p. 7662-7664.
246. Jones, C.D. and L.A. Lyon, Synthesis and Characterization of Multiresponsive Core-Shell Microgels. Macromolecules, 2000. 33(22): p. 8301-8306.

247. Karg, M., et al., Temperature, pH, and Ionic Strength Induced Changes of the Swelling Behavior of PNIPAM–Poly(allylactic acid) Copolymer Microgels. *Langmuir*, 2008. 24(12): p. 6300-6306.
248. Hoare, T. and D. McLean, Kinetic Prediction of Functional Group Distributions in Thermosensitive Microgels. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006. 110(41): p. 20327-20336.
249. Kratz, K., T. Hellweg, and W. Eimer, Influence of charge density on the swelling of colloidal poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) microgels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2000. 170(2–3): p. 137-149.
250. Acciaro, R., T. Gilányi, and I. Varga, Preparation of Monodisperse Poly(N-isopropylacrylamide) Microgel Particles with Homogenous Cross-Link Density Distribution. *Langmuir*, 2011. 27(12): p. 7917-7925.
251. Still, T., et al., Synthesis of micrometer-size poly(N-isopropylacrylamide) microgel particles with homogeneous crosslinker density and diameter control. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2013. 405: p. 96-102.
252. Zhang, Q., et al., A novel route to prepare pH- and temperature-sensitive nanogels via a semibatch process. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2009. 330(2): p. 330-336.
253. Sheikholeslami, P., et al., Semi-batch control over functional group distributions in thermoresponsive microgels. *Colloid and Polymer Science*, 2012. 290(12): p. 1181-1192.
254. Wei, J., Y. Li, and T. Ngai, *Tailor-made microgel particles: Synthesis and characterization*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2016. 489: p. 122-127.
255. Hartanto, Y., et al., Functionalized thermo-responsive microgels for high performance forward osmosis desalination. *Water Research*, 2015. 70: p. 385-393.
256. Petros, R.A. and J.M. DeSimone, Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov*, 2010. 9(8): p. 615-627.
257. Das, M., et al., Biofunctionalized pH-Responsive Microgels for Cancer Cell Targeting: Rational Design. *Advanced Materials*, 2006. 18(1): p. 80-83.
258. Peer, D., et al., Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nano*, 2007. 2(12): p. 751-760.
259. Mitragotri, S. and J. Lahann, Materials for Drug Delivery: Innovative Solutions to Address Complex Biological Hurdles. *Advanced Materials*, 2012. 24(28): p. 3717-3723.
260. Zha, L., B. Banik, and F. Alexis, Stimulus responsive nanogels for drug delivery. *Soft Matter*, 2011. 7(13): p. 5908-5916.
261. Hoare, T. and R. Pelton, Highly pH and Temperature Responsive Microgels Functionalized with Vinylacetic Acid. *Macromolecules*, 2004. 37(7): p. 2544-2550.

262. Elaissari, A. and A.R. Mahdavian, *Polymerization Kinetics of Microgel Particles*, in *Microgel Suspensions*. 2011, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 33-51.
263. Virtanen, O.L.J. and W. Richtering, Kinetics and particle size control in non-stirred precipitation polymerization of N-isopropylacrylamide. *Colloid and Polymer Science*, 2014. 292(8): p. 1743-1756.
264. Meng, Z., M.H. Smith, and L.A. Lyon, Temperature-programmed synthesis of micron-sized multi-responsive microgels. *Colloid and Polymer Science*, 2009. 287(3): p. 277-285.
265. Irfan, H., et al., Synthesis and characterization of multi-responsive poly (NIPAm-co-AAc) microgels. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 2014. 60(1): p. 012046.
266. Odian, G., *Principles of Polymerization*, Fourth Edition. 2004: John Wiley & Sons.
267. Xiao, X.-C., et al., Preparation of Submicrometer-Sized Monodispersed Thermoresponsive Core-Shell Hydrogel Microspheres. *Langmuir*, 2004. 20(13): p. 5247-5253.
268. Wu, X., et al., The kinetics of poly(N-isopropylacrylamide) microgel latex formation. *Colloid and Polymer Science*. 272(4): p. 467-477.
269. Crowther, M.H. and B. Vincent, Swelling behavior of poly- N-isopropylacrylamide microgel particles in alcoholic solutions. *Colloid and Polymer Science*, 1998. 276(1): p. 46-51.
270. Karg, M., et al., *Poly-NIPAM Microgels with Different Cross-Linker Densities*, in *Intelligent Hydrogels*, G. Sadowski and W. Richtering, Editors. 2013, Springer International Publishing: Cham. p. 63-76.
271. Senff, H. and W. Richtering, Influence of cross-link density on rheological properties of temperature-sensitive microgel suspensions. *Colloid and Polymer Science*, 2000. 278(9): p. 830-840.
272. Tauer, K., et al., Thermal property changes of poly(N-isopropylacrylamide) microgel particles and block copolymers. *Colloid and Polymer Science*, 2009. 287(3): p. 299-312.
273. Berndt, I. and W. Richtering, Doubly Temperature Sensitive Core-Shell Microgels. *Macromolecules*, 2003. 36(23): p. 8780-8785.
274. Jones, C.D. and L.A. Lyon, Shell-Restricted Swelling and Core Compression in Poly(N-isopropylacrylamide) Core-Shell Microgels. *Macromolecules*, 2003. 36(6): p. 1988-1993.
275. Parasuraman, D. and M.J. Serpe, Poly (N-Isopropylacrylamide) Microgel-Based Assemblies for Organic Dye Removal from Water. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2011. 3(12): p. 4714-4721.
276. Serpe, M.J., C.D. Jones, and L.A. Lyon, Layer-by-Layer Deposition of Thermoresponsive Microgel Thin Films. *Langmuir*, 2003. 19(21): p. 8759-8764.

277. Nerapusri, V., et al., Swelling and Deswelling of Adsorbed Microgel Monolayers Triggered by Changes in Temperature, pH, and Electrolyte Concentration. *Langmuir*, 2006. 22(11): p. 5036-5041.
278. Blackburn, W.H. and L.A. Lyon, Size-controlled synthesis of monodisperse core/shell nanogels. *Colloid and Polymer Science*, 2008. 286(5): p. 563-569.
279. Burmistrova, A., et al., The Effect of Co-Monomer Content on the Swelling/Shrinking and Mechanical Behaviour of Individually Adsorbed PNIPAM Microgel Particles. *Polymers*, 2011. 3(4).
280. Parasuraman, D., E. Leung, and M.J. Serpe, Poly (N-isopropylacrylamide) microgel based assemblies for organic dye removal from water: microgel diameter effects. *Colloid and Polymer Science*, 2012. 290(11): p. 1053-1064.
281. Xiong, W., et al., The dual temperature/pH-sensitive multiphase behavior of poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) microgels for potential application in in situ gelling system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011. 84(1): p. 103-110.
282. Kang, A., et al., Concave microwell array-mediated three-dimensional tumor model for screening anticancer drug-loaded nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2015. 11(5): p. 1153-1161.
283. Zhu, L., et al., Photocontrollable volume phase transition of an azobenzene functionalized microgel and its supramolecular complex. *RSC Advances*, 2015. 5(102): p. 84263-84268.
284. Debord, S.B. and L.A. Lyon, Influence of Particle Volume Fraction on Packing in Responsive Hydrogel Colloidal Crystals. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2003. 107(13): p. 2927-2932.
285. Horecha, M., et al., Swelling behaviour of PNIPAM-polyisoprene core-shell microgels at surface. *Colloid and Polymer Science*, 2010. 289(5): p. 603-612.
286. Sanson, N. and J. Rieger, Synthesis of nanogels/microgels by conventional and controlled radical crosslinking copolymerization. *Polymer Chemistry*, 2010. 1(7): p. 965-977.
287. Elias, H.-G., *Macromolecules Volume 2 - Synthesis and Materials*. 1977, New York: Springer Science+Business Media.
288. Lokitz, B.S., et al., Responsive Nanoassemblies via Interpolyelectrolyte Complexation of Amphiphilic Block Copolymer Micelles. *Macromolecules*, 2006. 39(25): p. 8594-8602.
289. Bütün, V., et al., Novel Multiresponsive Microgels: Synthesis and Characterization Studies. *Langmuir*, 2011. 27(20): p. 12657-12665.
290. Liechty, W.B., et al., Advanced molecular design of biopolymers for transmucosal and intracellular delivery of chemotherapeutic agents and biological therapeutics. *Journal of Controlled Release*, 2011. 155(2): p. 119-127.

291. Uğur, Ş., et al., Reversible film formation from nano-sized PNIPAM particles below glass transition. *Colloid and Polymer Science*, 2007. 285(4): p. 423-430.
292. Lai, E.-P., et al., Preparation of Uniform-Sized and Dual Stimuli-Responsive Microspheres of Poly(N-Isopropylacrylamide)/Poly(Acrylic acid) with Semi-IPN Structure by One-Step Method. *Polymers*, 2016. 8(3).
293. Fan, K., et al., Effect of Chain Length on the Interaction between Modified Organic Salts Containing Hydrocarbon Chains and Poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) Microgel Particles. *Langmuir*, 2011. 27(8): p. 4362-4370.
294. Kawaguchi, S., A. Yekta, and M.A. Winnik, Surface Characterization and Dissociation Properties of Carboxylic Acid Core–Shell Latex Particle by Potentiometric and Conductometric Titration. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1995. 176(2): p. 362-369.
295. Saunders, J.M., et al., A study of pH-responsive microgel dispersions: from fluid-to-gel transitions to mechanical property restoration for load-bearing tissue. *Soft Matter*, 2007. 3(4): p. 486-494.
296. Hoare, T. and R. Pelton, Titrametric Characterization of pH-Induced Phase Transitions in Functionalized Microgels. *Langmuir*, 2006. 22(17): p. 7342-7350.
297. Phillips, D.J. and M.I. Gibson, Degradable thermoresponsive polymers which display redox-responsive LCST Behaviour. *Chemical Communications*, 2012. 48(7): p. 1054-1056.
298. Yin, J., et al., Schizophrenic Core–Shell Microgels: Thermoregulated Core and Shell Swelling/Collapse by Combining UCST and LCST Phase Transitions. *Langmuir*, 2014. 30(9): p. 2551-2558.
299. Echeverria, C., N.A. Peppas, and C. Mijangos, Novel strategy for the determination of UCST-like microgels network structure: effect on swelling behavior and rheology. *Soft Matter*, 2012. 8(2): p. 337-346.
300. Suzuki, H., et al., Potentiometric Titration Behaviors of a Polymer and Gel Consisting of N-Isopropylacrylamide and Acrylic Acid. *Langmuir*, 1999. 15(12): p. 4283-4288.
301. Kawaguchi, S., et al., Dissociation behavior of poly(itaconic acid) by potentiometric titration and intrinsic viscosity. *Macromolecules*, 1990. 23(10): p. 2710-2714.
302. Bokias, G., G. Staikos, and I. Iliopoulos, Solution properties and phase behaviour of copolymers of acrylic acid with N-isopropylacrylamide: the importance of the intrachain hydrogen bonding. *Polymer*, 2000. 41(20): p. 7399-7405.
303. Quinn, J.F. and F. Caruso, Facile Tailoring of Film Morphology and Release Properties Using Layer-by-Layer Assembly of Thermoresponsive Materials. *Langmuir*, 2004. 20(1): p. 20-22.

304. Yin, X., A.S. Hoffman, and P.S. Stayton, Poly(N-isopropylacrylamide-co-propylacrylic acid) Copolymers That Respond Sharply to Temperature and pH. *Biomacromolecules*, 2006. 7(5): p. 1381-1385.
305. Kleinen, J., A. Klee, and W. Richtering, Influence of Architecture on the Interaction of Negatively Charged Multisensitive Poly(N-isopropylacrylamide)-co-Methacrylic Acid Microgels with Oppositely Charged Polyelectrolyte: Absorption vs Adsorption. *Langmuir*, 2010. 26(13): p. 11258-11265.
306. Daly, E. and B.R. Saunders, Temperature-dependent electrophoretic mobility and hydrodynamic radius measurements of poly(N-isopropylacrylamide) microgel particles: structural insights. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2000. 2(14): p. 3187-3193.
307. Fullbrandt, M., R. von Klitzing, and A. Schonhals, The dielectric signature of poly(N-isopropylacrylamide) microgels at the volume phase transition: dependence on the crosslinking density. *Soft Matter*, 2013. 9(17): p. 4464-4471.
308. Wong, J.E., et al., Layer-by-layer assembly of a magnetic nanoparticle shell on a thermoresponsive microgel core. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2007. 311(1): p. 219-223.
309. Zhang, M., et al., Multipetal-Structured and Dumbbell-Structured Gold-Polymer Composite Particles with Self-Modulated Catalytic Activity. *Langmuir*, 2015. 31(48): p. 13191-13200.
310. Wu, C. and S. Zhou, Volume Phase Transition of Swollen Gels: Discontinuous or Continuous? *Macromolecules*, 1997. 30(3): p. 574-576.
311. Keerl, M., J.S. Pedersen, and W. Richtering, Temperature Sensitive Copolymer Microgels with Nanophase Separated Structure. *Journal of the American Chemical Society*, 2009. 131(8): p. 3093-3097.
312. Sedláček, M., What Can Be Seen by Static and Dynamic Light Scattering in Polyelectrolyte Solutions and Mixtures? *Langmuir*, 1999. 15(12): p. 4045-4051.
313. Jones, F., H. Cölfen, and M. Antonietti, Iron oxyhydroxide colloids stabilized with polysaccharides. *Colloid and Polymer Science*, 2000. 278(6): p. 491-501.
314. Wang, J., The Origin of the Slow Mode in Dilute Aqueous Solutions of PEO. *Macromolecules*, 2015. 48(5): p. 1614-1620.
315. Käfer, F., et al., LCST and UCST in One: Double Thermoresponsive Behavior of Block Copolymers of Poly(ethylene glycol) and Poly(acrylamide-co-acrylonitrile). *Langmuir*, 2015. 31(32): p. 8940-8946.
316. Shin, B.C., et al., pH/Temperature dependent phase transition of an interpenetrating polymer network: Anomalous swelling behavior above lower critical solution temperature. *European Polymer Journal*, 1998. 34(11): p. 1675-1681.

317. Serrano-Ruiz, D., et al., Influence of the inter-chain hydrogen bonds on the thermoresponsive swelling behavior of UCST-like microgels. *Polymer*, 2013. 54(18): p. 4963-4971.
318. Xia, X. and Z. Hu, Synthesis and Light Scattering Study of Microgels with Interpenetrating Polymer Networks. *Langmuir*, 2004. 20(6): p. 2094-2098.
319. Thorne, J.B., G.J. Vine, and M.J. Snowden, Microgel applications and commercial considerations. *Colloid and Polymer Science*, 2011. 289(5): p. 625-646.
320. Brugger, B. and W. Richtering, Emulsions Stabilized by Stimuli-Sensitive Poly(N-isopropylacrylamide)-co-Methacrylic Acid Polymers: Microgels versus Low Molecular Weight Polymers. *Langmuir*, 2008. 24(15): p. 7769-7777.
321. Kleinen, J. and W. Richtering, Polyelectrolyte microgels based on poly-N-isopropylacrylamide: influence of charge density on microgel properties, binding of polydiallyldimethylammonium chloride, and properties of polyelectrolyte complexes. *Colloid and Polymer Science*, 2011. 289(5): p. 739-749.
322. Zhou, S. and B. Chu, Synthesis and Volume Phase Transition of Poly(methacrylic acid-co-N-isopropylacrylamide) Microgel Particles in Water. *The Journal of Physical Chemistry B*, 1998. 102(8): p. 1364-1371.
323. Kleinen, J. and W. Richtering, Defined Complexes of Negatively Charged Multisensitive Poly(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid) Microgels and Poly(diallyldimethylammonium chloride). *Macromolecules*, 2008. 41(5): p. 1785-1790.
324. Weng, H., et al., Tissue responses to thermally-responsive hydrogel nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2004. 15(9): p. 1167-1180.
325. Kawasaki, H., S. Sasaki, and H. Maeda, Effect of pH on the Volume Phase Transition of Copolymer Gels of N-Isopropylacrylamide and Sodium Acrylate. *The Journal of Physical Chemistry B*, 1997. 101(26): p. 5089-5093.
326. Zhou, S., et al., SAXS study on complexes formed by anionic poly(sodium methacrylate-co-N-isopropylacrylamide) gels with cationic surfactants. *Polymers for Advanced Technologies*, 2000. 11(5): p. 235-241.
327. Mohan, Y.M., et al., Stimuli-responsive poly(N-isopropylacrylamide-co-sodium acrylate) hydrogels: A swelling study in surfactant and polymer solutions. *Reactive and Functional Polymers*, 2007. 67(9): p. 844-858.
328. Hahn, M., E. Görnitz, and H. Dautzenberg, Synthesis and Properties of Ionically Modified Polymers with LCST Behavior. *Macromolecules*, 1998. 31(17): p. 5616-5623.
329. Duracher, D., et al., Preparation of thermosensitive latexes by copolymerization of N-isopropylmethacrylamide with a chelating monomer. *Macromolecular Symposia*, 2000. 150(1): p. 297-303.

330. Barth, J. and M. Buback, Termination and Transfer Kinetics of Sodium Acrylate Polymerization in Aqueous Solution. *Macromolecules*, 2012. 45(10): p. 4152-4157.
331. Gilanyi, T., et al., Characterisation of monodisperse poly(N-isopropylacrylamide) microgel particles. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2000. 2(9): p. 1973-1977.
332. Holzapfel, V., et al., Preparation of Fluorescent Carboxyl and Amino Functionalized Polystyrene Particles by Miniemulsion Polymerization as Markers for Cells. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2005. 206(24): p. 2440-2449.
333. Wong, J.E., et al., Dual-stimuli responsive PNIPAM microgel achieved via layer-by-layer assembly: Magnetic and thermoresponsive. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2008. 324(1-2): p. 47-54.
334. Contreras-Cáceres, R., et al., Multifunctional Microgel Magnetic/Optical Traps for SERS Ultradetection. *Langmuir*, 2011. 27(8): p. 4520-4525.
335. Jaiswal, M.K., et al., Thermoresponsive Magnetic Hydrogels as Theranostic Nanoconstructs. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2014. 6(9): p. 6237-6247.
336. Deng, Y., et al., Preparation, Characterization, and Application of Multistimuli-Responsive Microspheres with Fluorescence-Labeled Magnetic Cores and Thermoresponsive Shells. *Chemistry – A European Journal*, 2005. 11(20): p. 6006-6013.
337. Guo, J., et al., Poly(N-isopropylacrylamide)-Coated Luminescent/Magnetic Silica Microspheres: Preparation, Characterization, and Biomedical Applications. *Chemistry of Materials*, 2006. 18(23): p. 5554-5562.
338. Govindaiah, P., et al., Synthesis and characterization of poly(styrene-co-fluorescein O-methacrylate)/poly(N-isopropylacrylamide)-Fe₃O₄ core/shell composite particles. *Polymer*, 2011. 52(22): p. 5058-5064.
339. Li, Q., et al., Multistimuli-responsive hybrid nanoparticles with magnetic core and thermoresponsive fluorescence-labeled shell via surface-initiated RAFT polymerization. *Soft Matter*, 2011. 7(15): p. 6958-6966.
340. Zhu, H., et al., Magnetic, fluorescent, and thermo-responsive Fe₃O₄/rare earth incorporated poly(St-NIPAM) core-shell colloidal nanoparticles in multimodal optical/magnetic resonance imaging probes. *Biomaterials*, 2013. 34(9): p. 2296-2306.
341. Chai, W.L.F.a.a.C.L.L., *Purification of Laboratory Chemicals (Sixth Edition)*. 2009: Butterworth-Heinemann.
342. Cortese, F., *On the Synthesis of Taurine*. *Journal of the American Chemical Society*, 1936. 58(2): p. 191-192.
343. Beylin, V.G. and O.P. Goel, A CONVENIENT SYNTHESIS OF t-BUTYL N-(2-BROMOETHYL)CARBAMATE. *Organic Preparations and Procedures International*, 1987. 19(1): p. 78-80.

344. Ahmad, H., et al., Synthesis of Biocompatible Sterically-Stabilized Poly(2-(methacryloyloxy)ethyl phosphorylcholine) Latexes via Dispersion Polymerization in Alcohol/Water Mixtures. *Langmuir*, 2009. 25(19): p. 11442-11449.
345. Guang Choo, E.S., et al., Controlled loading of superparamagnetic nanoparticles in fluorescent nanogels as effective T2-weighted MRI contrast agents. *Journal of Materials Chemistry*, 2011. 21(7): p. 2310-2319.
346. Kahani, S.A. and M. Jafari, A new method for preparation of magnetite from iron oxyhydroxide or iron oxide and ferrous salt in aqueous solution. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2009. 321(13): p. 1951-1954.
347. Soares, P.I.P., et al., Effects of surfactants on the magnetic properties of iron oxide colloids. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2014. 419: p. 46-51.
348. Pich, A., et al., Temperature-Sensitive Hybrid Microgels with Magnetic Properties. *Langmuir*, 2004. 20(24): p. 10706-10711.
349. Rubio-Retama, J., et al., Investigation of the Relationship between Hydrogen Bonds and Macroscopic Properties in Hybrid Core-Shell γ -Fe₂O₃-P(NIPAM-AAS) Microgels. *Langmuir*, 2010. 26(10): p. 7101-7106.
350. Brealey, G.J. and M. Kasha, The Rôle of Hydrogen Bonding in the $n \rightarrow \pi^*$ Blue-shift Phenomenon. *Journal of the American Chemical Society*, 1955. 77(17): p. 4462-4468.
351. Yu, S. and G.M. Chow, Carboxyl group (-CO₂H) functionalized ferrimagnetic iron oxide nanoparticles for potential bio-applications. *Journal of Materials Chemistry*, 2004. 14(18): p. 2781-2786.
352. Millan, A., et al., *Surface effects in maghemite nanoparticles*. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2007. 312(1): p. L5-L9.
353. Tang, J., et al., Magnetite Fe₃O₄ Nanocrystals: Spectroscopic Observation of Aqueous Oxidation Kinetics. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2003. 107(30): p. 7501-7506.
354. Vandenberghe, R.E., et al., Surface oxidation control of nanosized magnetite and Mössbauer measurements. *Hyperfine Interactions*, 2005. 165(1): p. 267-271.
355. Rabias, I., et al., No Aging Phenomena in Ferrofluids: The Influence of Coating on Interparticle Interactions of Maghemite Nanoparticles. *ACS Nano*, 2008. 2(5): p. 977-983.
356. Ahmed, S.R.a.O., S. B. and Papaefthymiou, Georgia C. and Ramesh, Ramamoorthy and Kofinas, Peter, *Magnetic properties of CoFe₂O₄ nanoparticles synthesized through a block copolymer nanoreactor route*. *Applied Physics Letters*, 2002. 80: p. 1616-1618.
357. García-Cerda, L.A., R. Chapa-Rodríguez, and J. Bonilla-Ríos, In situ synthesis of iron oxide nanoparticles in a styrene-divinylbenzene copolymer. *Polymer Bulletin*, 2007. 58(5): p. 989-994.

358. Chen, W., et al., Magnetic and conducting particles: preparation of polypyrrole layer on Fe₃O₄ nanospheres. *Applied Surface Science*, 2003. 218(1–4): p. 216-222.
359. Narita, A., K. Naka, and Y. Chujo, Facile control of silica shell layer thickness on hydrophilic iron oxide nanoparticles via reverse micelle method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2009. 336(1–3): p. 46-56.
360. Păcurariu, C., et al., Synthesis and characterization of γ -Fe₂O₃/SiO₂ composites as possible candidates for magnetic paper manufacture. *Ceramics International*, 2015. 41(1, Part B): p. 1079-1085.
361. Wei, S., et al., Ex Situ Solvent-Assisted Preparation of Magnetic Poly(propylene) Nanocomposites Filled with Fe@FeO Nanoparticles. *Macromolecular Materials and Engineering*, 2011. 296(9): p. 850-857.
362. He, F., et al., The attachment of Fe₃O₄ nanoparticles to graphene oxide by covalent bonding. *Carbon*, 2010. 48(11): p. 3139-3144.
363. Dresco, P.A., et al., Preparation and Properties of Magnetite and Polymer Magnetite Nanoparticles. *Langmuir*, 1999. 15(6): p. 1945-1951.
364. Harris, L.A., et al., Magnetite Nanoparticle Dispersions Stabilized with Triblock Copolymers. *Chemistry of Materials*, 2003. 15(6): p. 1367-1377.
365. Jiang, F., et al., Combination of Magnetic and Enhanced Mechanical Properties for Copolymer-Grafted Magnetite Composite Thermoplastic Elastomers. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015. 7(19): p. 10563-10575.
366. Goya, G.F., et al., Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles. *Journal of Applied Physics*, 2003. 94(5): p. 3520.
367. Qiu, P., et al., Oil Phase Evaporation-Induced Self-Assembly of Hydrophobic Nanoparticles into Spherical Clusters with Controlled Surface Chemistry in an Oil-in-Water Dispersion and Comparison of Behaviors of Individual and Clustered Iron Oxide Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 2010. 132(50): p. 17724-17732.
368. Gupta, A.K. and M. Gupta, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 2005. 26(18): p. 3995-4021.
369. Langer, R.S. and N.A. Peppas, Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. *Biomaterials*, 1981. 2(4): p. 201-214.
370. Langer, R., INVITED REVIEW POLYMERIC DELIVERY SYSTEMS FOR CONTROLLED DRUG RELEASE. *Chemical Engineering Communications*, 1980. 6(1-3): p. 1-48.
371. Couvreur, P., et al., Toxicity of Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles II: Doxorubicin-Loaded Nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1982. 71(7): p. 790-792.

372. Bertrand, N., et al., Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2014. 66: p. 2-25.
373. Parveen, S., R. Misra, and S.K. Sahoo, Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2012. 8(2): p. 147-166.
374. Gormley, A.J., et al., Guided delivery of polymer therapeutics using plasmonic photothermal therapy. *Nano Today*, 2012. 7(3): p. 158-167.
375. Liu, X.L., et al., Magnetic nanoparticle-loaded polymer nanospheres as magnetic hyperthermia agents. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014. 2(1): p. 120-128.
376. Σημειώσεις του Μαθήματος "Οργανική Φαρμακευτική Χημεία". 2010-11; Available from: http://www.pharm.auth.gr/old_pharm/gr/anakoinoseis_mathimatwn/2010-11_organiki_farmakeytiki_himia.pdf.
377. Ma, P. and R.J. Mumper, Anthracycline nano-delivery systems to overcome multiple drug resistance: A comprehensive review. *Nano Today*, 2013. 8(3): p. 313-331.
378. Barenholz, Y., Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release*, 2012. 160(2): p. 117-134.
379. Kabanov, A.V. and S.V. Vinogradov, Nanogels as Pharmaceutical Carriers: Finite Networks of Infinite Capabilities. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009. 48(30): p. 5418-5429.
380. Wei, H., et al., Thermo-sensitive polymeric micelles based on poly(N-isopropylacrylamide) as drug carriers. *Progress in Polymer Science*, 2009. 34(9): p. 893-910.
381. Zhang, H., et al., New progress and prospects: The application of nanogel in drug delivery. *Materials Science and Engineering: C*, 2016. 60: p. 560-568.
382. Zhan, Y., et al., Thermo/redox/pH-triple sensitive poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) nanogels for anticancer drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015. 3(20): p. 4221-4230.
383. Rahimi, M., et al., Synthesis and Characterization of Thermo-Sensitive Nanoparticles for Drug Delivery Applications. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2008. 4(4): p. 482-490.
384. Dhanya, S., et al., Maleic acid incorporated poly-(N-isopropylacrylamide) polymer nanogels for dual-responsive delivery of doxorubicin hydrochloride. *European Polymer Journal*, 2013. 49(1): p. 22-32.
385. Hu, X., et al., Multifunctional hybrid silica nanoparticles for controlled doxorubicin loading and release with thermal and pH dual response. *Journal of Materials Chemistry B*, 2013. 1(8): p. 1109-1118.

386. Zhang, Z., et al., Near Infrared Laser-Induced Targeted Cancer Therapy Using Thermoresponsive Polymer Encapsulated Gold Nanorods. *Journal of the American Chemical Society*, 2014. 136(20): p. 7317-7326.
387. Zeng, J., et al., Superparamagnetic Reduction/pH/Temperature Multistimuli-Responsive Nanoparticles for Targeted and Controlled Antitumor Drug Delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 2015. 12(12): p. 4188-4199.
388. Deka, S.R., et al., Magnetic nanobeads decorated by thermo-responsive PNIPAM shell as medical platforms for the efficient delivery of doxorubicin to tumour cells. *Nanoscale*, 2011. 3(2): p. 619-629.
389. Pernia Leal, M., et al., Controlled Release of Doxorubicin Loaded within Magnetic Thermo-responsive Nanocarriers under Magnetic and Thermal Actuation in a Microfluidic Channel. *ACS Nano*, 2012. 6(12): p. 10535-10545.
390. Kakwere, H., et al., Functionalization of Strongly Interacting Magnetic Nanocubes with (Thermo)Responsive Coating and Their Application in Hyperthermia and Heat-Triggered Drug Delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015. 7(19): p. 10132-10145.
391. Xiong, W., et al., Dual temperature/pH-sensitive drug delivery of poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) nanogels conjugated with doxorubicin for potential application in tumor hyperthermia therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011. 84(2): p. 447-453.
392. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ, Ζ., ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ ΠΟΥ ΕΝΣΩΜΑΤΩΝΟΥΝ ΑΡΣΕΝΟΛΙΠΙΔΙΑ. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ Η/ΚΑΙ ΕΠΙΚΑΛΥΨΗΣ ΤΗΣ ΛΙΠΟΣΩΜΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΜΕ ΠΟΛΥΑΙΘΥΛΕΝΟΓΛΥΚΟΛΗ ΣΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥΣ, ΣΤΗΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΚΥΤΤΑΡΑ (in vitro) ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΒΙΟΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥΣ., in ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ. 2012, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ: ΠΑΤΡΑ.
393. Kou, L., et al., The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013. 8(1): p. 1-10.
394. Musyanovych, A., et al., Criteria impacting the cellular uptake of nanoparticles: A study emphasizing polymer type and surfactant effects. *Acta Biomaterialia*, 2011. 7(12): p. 4160-4168.
395. Reisch, A., et al., Collective fluorescence switching of counterion-assembled dyes in polymer nanoparticles. *Nat Commun*, 2014. 5.
396. Hiruta, Y., et al., pH/temperature-responsive fluorescence polymer probe with pH-controlled cellular uptake. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015. 207, Part A: p. 724-731.
397. Martens, T.F., et al., Intracellular delivery of nanomaterials: How to catch endosomal escape in the act. *Nano Today*, 2014. 9(3): p. 344-364.

398. Figueroa, R.A. and A.A. MacKay, Sorption of Oxytetracycline to Iron Oxides and Iron Oxide-Rich Soils. *Environmental Science & Technology*, 2005. 39(17): p. 6664-6671.
399. Du, J.-Z., et al., Tailor-Made Dual pH-Sensitive Polymer–Doxorubicin Nanoparticles for Efficient Anticancer Drug Delivery. *Journal of the American Chemical Society*, 2011. 133(44): p. 17560-17563.
400. Dai, Y., et al., Up-Conversion Cell Imaging and pH-Induced Thermally Controlled Drug Release from NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺@Hydrogel Core–Shell Hybrid Microspheres. *ACS Nano*, 2012. 6(4): p. 3327-3338.
401. Yu, M.K., et al., Drug-Loaded Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Combined Cancer Imaging and Therapy In Vivo. *Angewandte Chemie International Edition*, 2008. 47(29): p. 5362-5365.
402. McNeil-Watson, F., W. Tscharnuter, and J. Miller, A new instrument for the measurement of very small electrophoretic mobilities using phase analysis light scattering (PALS). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1998. 140(1–3): p. 53-57.
403. Wu, X., et al., Preparation and in Vitro Evaluation of Topical Formulations Based on Polystyrene-poly-2-hydroxyl Methacrylate Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 2009. 6(5): p. 1449-1456.
404. Nese, A., et al., pH-Responsive Fluorescent Molecular Bottlebrushes Prepared by Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules*, 2011. 44(15): p. 5905-5910.
405. Yang, Q., et al., Poly(N-vinylpyrrolidinone) Microgels: Preparation, Biocompatibility, and Potential Application as Drug Carriers. *Biomacromolecules*, 2014. 15(6): p. 2285-2293.