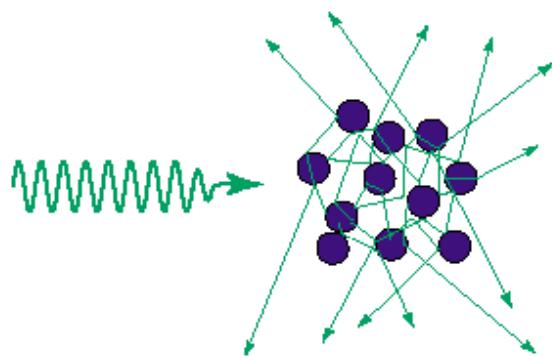


Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός
βιοδραστικών πολυμερών της
Πολυβινυλοπυρρολίδόντος με
σκέδαση ακτίνων Laser



Τιάννας Ανιφραγκής

Υπεύθυνος Καθηγητής : Ά. Ρήγος

«ΕΦΗΡΜΟΣΜΕΝΗ ΜΟΡΓΑΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ»
Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης



ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2002

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- Απόστολος Ρίζος (Αναπλ. Καθηγητής Τμήματος Χημείας, επιβλέπων)
- Σταύρος Φαράντος (Καθηγητής Τμήματος Χημείας)
- Αριστείδης Τσατσάκης (Αναπλ. Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής)

Abstract

The relationships between the macroscopic properties of polymers and their molecular structure, dynamics as well as supramolecular organization are complex. They involve enormous length- and timescales from the molecular, via mesoscopic to macroscopic dimensions and from picoseconds to years. These properties do not only depend on the chemical nature of the repeat units (monomers), but also on the way these monomers are linked together. In order to provide a comprehensive characterization of the dynamics of low molecular weight or polymeric materials one has to study not only local motional processes but the global ones, too. With Photon Correlation Spectroscopy (PCS), a broad time window from 10^{-7} to 10^5 sec can be probed.

The polymer Polyvinyl pyrrolidone (PVP) has a long history of several applications and demonstrates a high degree of biocompatibility. In this study, three different polymeric derivatives of PVP were investigated.

PVP derivatives of Sorbic Acid : The problem of food contamination by fungi and their toxic metabolites is quite common. One way to deal with this problem is to use organic acids with a small carbon chain like sorbic acid (SA) or propionic acid as food preservatives. It was observed that PVP polymeric derivatives of SA showed controlled release action, on the mycelial growth of *Fusarium oxysporum f.sp. cucumerinum* (*Fusarium oxysporum* is a common mould that contaminates tomato and potato plants, wheat and corn). The light scattering data suggest that the polymer structure and/or solution conformation may be important determinants of the inhibitory effect (bioactivity).

Amphiphilic derivatives of PVP: Certain amphiphilic water-soluble polymers including Stearyl amphiphilic derivatives of polyvinyl pyrrolidone (Stearyl-PVP) were found to be efficient steric protectors for liposomes *in vivo*. In order to uncover how the polymer structure and/or solution conformation differed from that of PVP, we performed

static and dynamic light scattering measurements on these PVP derivatives under physiological conditions.

Aminoacid derivatives of PVP : Two polymers families, one with aminoacid residues on the base of co-polymer of N-vinyl pyrrolidone and allylglycidyl ether (NVP-AGE) and another with aminoacid residues on the base of deoxidized polyvinyl pyrrolidone (Epoxy-NVP), were proved to involve in biological procedures of the human immune system. We have performed static and dynamic light scattering measurements in the same Epoxy-NVP and NVP-AGE polymers of PVP derivatives with different amino acid-dependent groups under physiological conditions in order to uncover how the polymer structure and/or solution conformation affects immunoreactivity.

Keywords : Photon Correlation Spectroscopy (PCS), Polyvinyl pyrrolidone (PVP), PVP derivatives, static/dynamic light scattering.

Λέξεις Κλειδιά: Φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων, συνάρτηση αυτοσυσχέτισης, πολυβινυλοπυρρολιδόνη, πολυμερικά παράγωγα της πολυβινυλοπυρρολιδόνης, στατική/δυναμική σκέδαση φωτός.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

Εισαγωγή

4-6

I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I.1	Εισαγωγή	7
I.2	Ο μηχανισμός της σκέδασης	8-9
I.3	Κλασσική ηλεκτρομαγνητική θεωρία	10-14

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

II.1	Πειραματική διάταξη	15-17
II.2	Δυναμική Σκέδαση Φωτός	
II.2α	Συνάρτηση αυτοσυσχέτισης	18-24
II.2β	Ανάλυση της συνάρτησης συσχέτισης	25-26
II.3	Στατική Σκέδαση Φωτός	27-28

III. ΧΡΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΠΟΛΥΒΙΝΥΛΟΠΥΡΡΟΛΙΔΟΝΗΣ

III.1		
III.1α	Μύκητες - Μυκοτοξίνες	29-31
III.1β	Μυκοστατικά- Πρόσθετα σε τρόφιμα	32-33
III.1γ	Τρόπος δράσης των πρόσθετων ουσιών	33-34
III.2	Λιποσωμάτια	35-37
III.3	Ανοσοδραστικά σκευάσματα	38-39

IV. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΕΝΕΡΓΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ

IV.1	Σύνθεση πολυμερικών συμπλόκων του σορβικού οξέος	40
IV.2	Σύνθεση αμφιφιλικών πολυμερών της Πολυβινυλοπυρρολιδόνης	41
IV.3	Σύνθεση πολυμερών της Πολυβινυλοπυρρολιδόνης που περιέχουν αμινοξέα	42-44

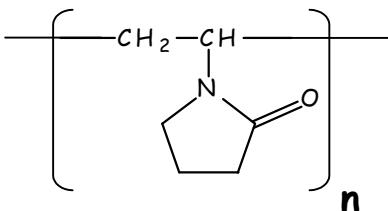
V. ΜΕΛΕΤΗ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ

V.	Διερεύνηση της δομής με φασματοσκοπία σκέδασης ακτίνων laser	45-46
V.1	Πολυμερικά σύμπλοκα του σορβικού οξέος	47
V.1α	Μελέτη της δομής των πολυμερικών συμπλόκων του σορβικού οξέος με Υπολογιστική Χημεία.	48-52
V.1β	Μελέτη της Βιολογικής Δράσης των πολυμερικών συμπλόκων του σορβικού οξέος.	53-54
V.1γ	Χαρακτηρισμός των πολυμερικών συμπλόκων του σορβικού οξέος με Σκέδαση Φωτός.	55-66

V.2	Αμφιφιλικά παράγωγα της PVP	67
V.2α	Χαρακτηρισμός των αμφιφιλικών παραγώγων της PVP με Σκέδαση Φωτός.	68-71
V.2β	Μελέτη μέσω της Φασματοσκοπίας Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (ESR).	72
V.3	Πολυμερικά παράγωγα με αμινοξέα.	73-84
Γενικά Συμπεράσματα		85-87
Βιβλιογραφία		88-91

Εισαγωγή

Η πολύβινυλοπυρροιδόνη - PVP, (χημικός τύπος $[C_6H_9NO]_n$) και συντακτικός τύπος



είναι ευρύτατα διαδεδομένο πολυμερές.

Συναντάται συνήθως είτε ως λευκή πούδρα είτε ως υδατικό διάλυμα. Χρησιμοποιείται σε πάρα πολλούς τομείς όπως στη **φαρμακευτική βιομηχανία**, ως διαλυτικό μέσο στις ενέσεις, μέσο ροής στις κάψουλες, διαλύτης στα υγρά φάρμακα και στις χρωστικές ουσίες, σταθεροποιητής για ένζυμα και για θερμοευαίσθητα φάρμακα, λιπαντικό και αντιοξικό μέσο σε κολλύρια. Η PVP έχει χρησιμοποιηθεί ως έκδοχο σε περισσότερα από 100 φάρμακα. Επίσης στο πρώτο μισό του 20^{ου} αιώνα ανακαλύφθηκε ότι κάποιος ασθενής που έχει χάσει ποσότητα αίματος, μπορεί να κρατηθεί στη ζωή αν του χορηγηθεί πλάσμα αίματος. Σε πολλές περιπτώσεις όπως στο 2° παγκόσμιο πόλεμο ή στο πόλεμο της Κορέας, τα μικρά αποθέματα πλάσματος πολλαπλασιάζονταν με αραίωση τους με PVP και έτσι γινόταν δυνατή η διατήρηση των τραυματιών στη ζωή. Επίσης σημαντικές είναι οι εφαρμογές σε **καλλυντικά** (σπρέι, λοσιόν, gel και mouse μαλλιών, προϊόντα περιποίησης δέρματος, σαμπουάν, κραγιόν, αποσμητικά, οδοντόπαστες), **αφεψήματα** (μπύρες, κρασί, ξύδι, αναψυκτικά ως παράγοντας διαύγειας, καθαρότητας), **αρτοσκευάσματα** (ως συντηρητικό και βελτιωτής γεύσης, και σε πλαστικά (κόλλες, συνθετικές ρητίνες, απορρυπαντικά, χρωστικές ουσίες, ηλεκτρονικές συσκευές).

Η PVP απορροφάται πολύ γρήγορα, μέσω της αναπνευστικής οδού και του δέρματος και διασκορπίζεται απ' άκρο σ' άκρο στο σώμα. Στη συνέχεια μεταβολίζεται σε πολικό παράγωγο και αποβάλλεται στα ούρα. Δεν προκαλεί ερεθισμούς στο δέρμα, αλλά σε υγρή μορφή προκαλεί σοβαρό ερεθισμό στα μάτια. Η PVP ελέγχθηκε για καρκινογενέσεις και διαπιστώθηκε ότι σχετίζεται με καρκινώματα, αδενώματα και αδενοκαρκινώματα της ρινικής κοιλότητας και του λάρυγγα και στα δύο φύλα. Επίσης παρατηρήθηκαν επιδράσεις στο ήπαρ. Όλες οι παραπάνω διαπιστώσεις έγιναν σε πειραματόζωα (ποντίκια), τα οποία επαναλαμβανόμενα εκτίθεντο σε PVP. Τέλος στα πειραματόζωα δεν παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις ή αλλαγές στη γονιμότητα.

Η περιεκτικότητα των διαφόρων προϊόντων σε PVP είναι τόσο μικρή (1-100 ppm), ώστε να μην υπάρχουν σοβαρές ανησυχίες για την ανθρώπινη υγεία. Η χειρότερη περίπτωση υπολογίζεται για ημερήσια έκθεση, σε φάρμακα ή καταναλωτικά προϊόντα (και εφόσον απορροφάται το 100% PVP που περιέχεται), σε 0,8 μg/kg βάρους σώματος. Η τιμή αυτή είναι 2000 φορές μικρότερη από εκείνη που απορροφούν τα πειραματόζωα, κατά την έκθεσή τους σε 5 ppm PVP για 6ώρες την ημέρα. Η χρήση PVP σε σπρέι μαλλιών ίσως αυξάνει την έκθεση. Η εκτιμώμενη συγκέντρωση στην οποία πρέπει να εκτίθεται ο καταναλωτής είναι $1,5 \times 10^{-6}$ ppm για κάθε γεγονός. Σε πρόσφατες εκθέσεις της Scientific Committee for Food τονίζεται ότι η απορροφούμενη ποσότητα PVP, μέσω προσθέτων τροφίμων δεν προκαλεί λόγους ανησυχίας.¹

Η παρούσα μελέτη περιλαμβάνει διερεύνηση τριών διαφορετικών πολυμερικών παραγώγων της PVP:

A) Πολυμερικά σύμπλοκα σορβικού οξέος με PVP.

Οι πρόσθετες ουσίες βρίσκουν εφαρμογή ως μέσα συντήρησης των τροφίμων και της προστασίας αυτών από βακτήρια. Το σορβικό οξύ (Ε200) (ή 2,4-hexadienoic acid ή 2-propenylacrylic acid) είναι οργανικό οξύ με μικρή ανθρακική αλυσίδα. Η χρήση του στη βιομηχανία των τροφίμων είναι αρκετά διαδεδομένη ως πρόσθετο και λειτουργεί ως συντηρητικό. Χρησιμοποιείται κατά πρώτο λόγο για να βελτιώσει κάποιες οργανοληπτικές ιδιότητες (ειδική γεύση) των τροφίμων, την τροποποίηση του pH τους και μερικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων όπως ιξώδες, ρεολογικές συνθήκες κ.α. Επιπλέον χρησιμοποιούνται για την αντιβακτηριακή και τη μυκοστατική δράση (έναντι παθογόνων ή δυνητικά παθογόνων μυκήτων), ενώ πιθανολογείται ότι επιδρά στην τοξικόγεννη ση και κατά συνέπεια στη μείωση της παραγωγής των μυκοτοξινών από τους μύκητες. Έχει ισχυρή μυκοστατική δράση, αλλά περιορισμένη αντιμικροβιακή δράση. Διερευνήσαμε με δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) την πολυμερική δομή των συμπλόκων του σορβικού οξέος με PVP, ενώ με χρήση της υπολογιστικής φυσικής εξαγάγαμε χρήσιμες πληροφορίες για το σχηματιζόμενο δεσμό υδρογόνου ανάμεσα στη PVP και το σορβικό οξύ.

Β) Αμφιφιλικά παράγωγα της PVP.

Ορισμένες κατηγορίες αμφιφιλικών υδατοδιαλυτών πολυμερών, συμπεριλαμβανομένων και αμφιφιλικών παραγώγων της PVP, βρέθηκε ότι ασκούν αποτελεσματική στερεοχημική προστασία σε λιποσωμάτια *in vivo*. Τόσο η PVP, όσο και τα αμφιφιλικά παράγωγα της με στεατικό οξύ (Stearyl-PVP), έχουν την ικανότητα να ενσωματώνονται στη μεμβράνη των λιποσωμάτων. Διερευνήσαμε με δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) την διαφορετικότητα της πολυμερικής δομής ανάμεσα στην PVP και στα αμφιφιλικά παράγωγα της, καθώς και την επίδραση των υδρόφιβων και υδρόφιλων τμημάτων τους στη σταθερότητα των σχηματιζόμενων μικκυλίων.

Γ) Πολυμερικά παράγωγα της PVP με αμινοξέα.

Δύο πολυμερικές οικογένειες, οι οποίες αποτελούν μήτρες χημικής ακινητοποίησης ουσιών, όπως πεπτίδια και μικρές πρωτεΐνες, εξετάστηκαν *in vitro* για την βιοδραστικότητα τους. Στη μια πολυμερική οικογένεια το αμινοξύ (glycine, β-alanine, γ-aminobutyric και ε-aminocaproic acid) είναι συνδεδεμένο με τη N-βυνιλοπυρροιδόνη και allylglycidyl αιθέρα (NVP-AGE), ενώ στην άλλη τα ίδια αμινοξέα είναι συνδεδεμένα με εποξείδιο τη πολυβινυλοπυρροιδόνης (EPVP). Εξετάσθηκε αν τα παραπάνω πολυμερικά παράγωγα συμβάλλουν α) στην ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και β) στην αύξηση ή στην καταστολή του πολλαπλασιασμού των T-λεμφοκυττάρων, εξαιτίας άλλων πολυκλωνικών διεγέρσεων των T-λεμφοκυττάρων ή κατά την παρουσία αντιγόνων. Διερευνήσαμε με δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) τη διαφορετικότητα της πολυμερικής δομής και της διαμόρφωσης στο διάλυμα ανάμεσα στη PVP και στα σύμπλοκα της με τα παραπάνω αμινοξέα.

I. ΘΕΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I.1 Εισαγωγή

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία για τη διερεύνηση της δομής, αλλά και της δυναμικής της ύλης. Κατά την αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη μπορούν να αλλάξουν τρεις από τις φυσικές ποσότητες που χαρακτηρίζουν το προσπίπτων κύμα: η έντασή του (I), η ενέργειά του (E) και /ή το κυματοδιάνυσμά του (k). Τα αντίστοιχα φαινόμενα που συμβαίνουν στο δείγμα περιλαμβάνουν απορρόφηση, απώλεια ενέργειας και σκέδαση της ακτινοβολίας.

Κατά τη σκέδαση το ηλεκτρομαγνητικό κύμα αλλάζει τη διεύθυνση του κυματοδιανύσματός του, δηλαδή $k \neq k_0$. Η σκέδαση χαρακτηρίζεται ελαστική, όταν δεν αλλάζει το μήκος του κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας $\lambda = \lambda_0$ και ανελαστική όταν $\lambda \neq \lambda_0$.²

Όταν τα φωτόνια προσπέσουν πάνω σε ένα μόριο, αυτό μπορεί να απορροφήσει ή να αποδώσει ενέργεια από τους μεταφορικούς, τους ηλεκτρονικούς, τους δονητικούς και τους περιστροφικούς βαθμούς ελευθερίας του. Στην περίπτωση που η σκέδαση του φωτός θεωρηθεί από τους μεταφορικούς και περιστροφικούς βαθμούς ελευθερίας, εμφανίζεται μια μικρή μετατόπιση των συχνοτήτων του προσπίπτοντος φωτός (Doppler shift), η σκέδαση θεωρείται ελαστική και ονομάζεται *Rayleigh* σκέδαση. Αντίθετα η σκέδαση από τους δονητικούς βαθμούς ελευθερίας ονομάζεται *Raman* σκέδαση ουσιαστικά δίνει πληροφορίες για το ενεργειακό φάσμα των μορίων, παρουσιάζοντας τις δονήσεις οι οποίες αντιστοιχούν στις αλλαγές των συχνοτήτων της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, που συμβαίνουν από την αλληλεπίδραση του προσπίπτοντος ηλεκτρομαγνητικού κύματος με το μόριο.

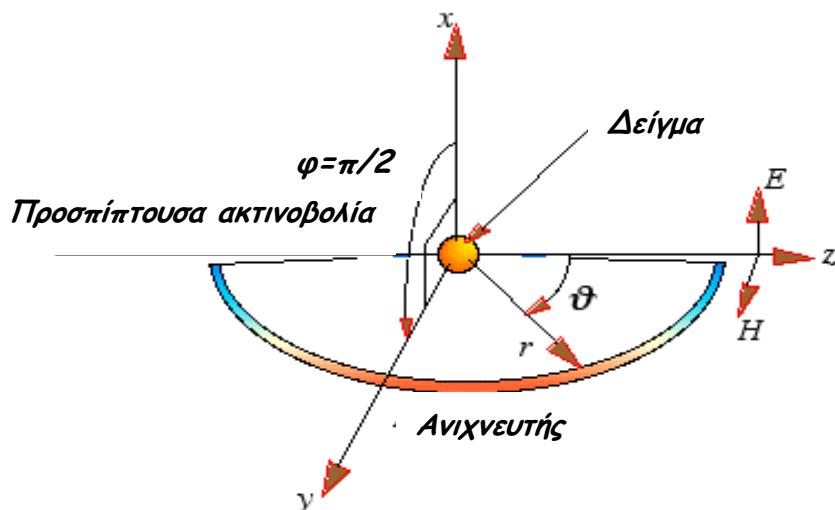
Παρόλο που για την περιγραφή της αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας με την ύλη πρέπει να χρησιμοποιηθεί η κβαντική ηλεκτροδυναμική θεωρία, για την περιγραφή της σκέδασης του φωτός τα περισσότερα φαινόμενα μπορούν να περιγραφούν με την κλασσική θεωρία του ηλεκτρομαγνητισμού.

I.2 Ο μηχανισμός της σκέδασης

Η εξήγηση του φαινομένου της σκέδασης βασίζεται σε μια συνδυασμένη θεωρία οπτικής, ηλεκτρομαγνητισμού και θερμοδυναμικής που αναπτύχθηκε αρχικά από τους Faraday και Tyndall και θεμελιώθηκε στη συνέχεια από τους Rayleigh, Einstein και Debye.

Όταν το φως προσπέσει πάνω στην ύλη, το ηλεκτρικό του πεδίο προκαλεί τη δημιουργία παλλόμενων διπόλων τα οποία σύμφωνα με την κλασσική ηλεκτρομαγνητική θεωρία συμπεριφέρονται ως δευτερογενείς πηγές φωτός, επανεκπέμποντας την ενέργεια προς όλες τις κατευθύνσεις (σκέδαση). Οι μεταπτώσεις των συχνοτήτων, η γωνιακή κατανομή, η πολωσιμότητα και η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός μπορούν να καθοριστούν από το μέγεθος, το σχήμα και τις αλληλεπιδράσεις του υλικού που προκαλεί τη σκέδαση.^{3,4}

Όταν, λοιπόν, δέσμη φωτός πέσει επάνω σε διάλυμα, ένα μέρος της φωτεινής ακτινοβολίας διέρχεται του διαλύματος και το υπόλοιπο σκεδάζεται.



Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός είναι συνάρτηση του μεγέθους των σκεδαστών, του μοριακού τους βάρους, του σχήματός τους, της συγκέντρωσής τους και άλλων πιθανώς παραμέτρων. Ειδικά το μέγεθος είναι καθοριστικής σημασίας.

Σ' ένα πείραμα σκέδασης (Rayleigh σκέδαση) μια δέσμη φωτός προσπίπτει πάνω σ' ένα όγκο υγρού δείγματος και στη συνέχεια σκεδάζεται προς τον ανιχνευτή. Πολωτές και αναλυτές χρησιμοποιούνται για να καθοριστεί η πόλωση της προσπίπτουσας και σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Συνήθως η σκεδαζόμενη ένταση καταγράφεται σε δύο γεωμετρίες, την πολωμένη (VV), όπου προσπίπτουσα και σκεδαζόμενη δέσμη πολώνονται κάθετα σε σχέση με το επίπεδο σκέδασης, (το οποίο καθορίζεται από τους κυματαριθμούς της προσπίπτουσας και της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας), και την αποπολωμένη (VH), όπου η προσπίπτουσα πολώνεται κάθετα, ενώ η σκεδαζόμενη πολώνεται παράλληλα προς το επίπεδο σκέδασης.

Τα βασικότερα πλεονεκτήματα της δυναμικής σκέδασης του φωτός είναι : α) η αμελητέα παρενόχληση της θερμοδυναμικής κατάστασης του δείγματος από τις ακτίνες Laser, β) η ευρεία κάλυψη δυναμικής περιοχής. Όσον αφορά τα μειονεκτήματα η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί μόνο σε δείγματα με αμελητέα απορρόφηση στην ορατή περιοχή, ενώ απαιτεί η διαλυμένη ουσία να έχει διαφορετικό δείκτη διάθλασης από το διαλύτη ώστε να μπορεί να μελετηθεί.

I.3 Κλασσική Ηλεκτρομαγνητική Θεωρία

Το προσπίπτων ηλεκτρικό πεδίο είναι ένα επίπεδο κύμα της μορφής :

$$\vec{E}_i(\vec{r}, t) = \vec{n}_i E_o \exp[j(\vec{k}_i \cdot \vec{r} - \omega_i t)] \quad (1)$$

όπου n_i είναι το μοναδιαίο διάνυσμα το οποίο έχει την κατεύθυνση του προσπίπτοντος ηλεκτρικού πεδίου, E_o το πλάτος του πεδίου, k_i το κυματάνυσμα (διάνυσμα διάδοσης) $k_i = 2\pi n/\lambda_i$, λ_i το μήκος κύματος και ω_i η κυκλική συχνότητα.

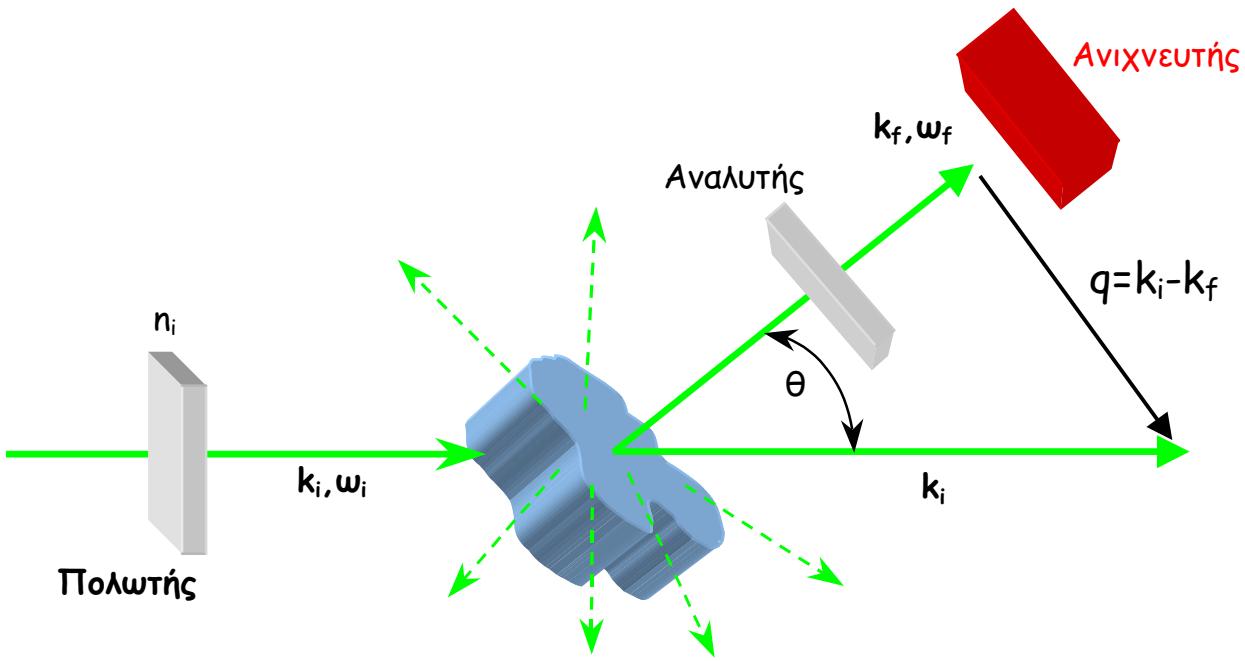
Το πεδίο προσπίπτει πάνω στο δείγμα το οποίο έχει τοπική διηλεκτρική σταθερά της μορφής:

$$\vec{\epsilon}(\vec{r}, t) = \epsilon_o \vec{I} + \vec{\delta\epsilon}(\vec{r}, t) \quad (2)$$

όπου ϵ_o είναι η μέση διηλεκτρική σταθερά (δείκτης διάθλασης $n = \sqrt{\epsilon_o}$), $\vec{\delta\epsilon}(r, t)$ είναι ο τανυστής των διακυμάνσεων της διηλεκτρικής σταθεράς στη θέση r τη χρονική στιγμή t και \vec{I} ο μοναδιαίος τανυστής. Χρησιμοποιώντας τις βασικές εξισώσεις του Maxwell μπορεί να υπολογιστεί το σκεδαζόμενο ηλεκτρικό πεδίο σε μεγάλη απόσταση R από το σκεδαζόμενο όγκο, το οποίο είναι ίσο:

$$E_s(R, t) = \frac{-k_f^2 E_o}{4\pi R \epsilon_o} \exp\{j(k_f R - \omega_i t)\} \vec{n}_f \cdot [\vec{k}_f \otimes \vec{k}_f \otimes (\vec{\delta\epsilon}(\vec{q}, t) \cdot \vec{n}_i)] \quad (3)$$

όπου $\vec{\delta\epsilon}(\vec{q}, t) = \int_V d^3 r \vec{\delta\epsilon}(\vec{r}, t) \exp[j(\vec{q} \cdot \vec{r}, t)]$ είναι χωρικό μετασχηματισμού Fourier των διακυμάνσεων της διηλεκτρικής σταθεράς κατά την αρχική n_i και τελική n_f διεύθυνση πόλωσης.



Το προσπίπτων φως με πόλωση n_i και κυματοδιάνυσμα k_i σκεδάζεται από το δείγμα προς όλες τις κατευθύνσεις. Μόνο το σκεδαζόμενο φως με n_f και k_f , μετριέται από τον ανιχνευτή σε γωνία θ . Το σκεδαζόμενο κυματοδιάνυσμα καθορίζεται από τη γεωμετρία, όπως φαίνεται από το σχήμα.

Το κυματάνυσμα q , ορίζεται από τη γεωμετρία που φαίνεται στο σχήμα όπου για την ελαστική σκέδαση (δηλαδή $|k_i| \sim |k_f| = 2\pi n/\lambda$), εφόσον $\vec{q} = \vec{k}_i - \vec{k}_f$, είναι ίσο με :

$$q = 2k_i \sin(\theta/2) = \frac{4\pi n}{\lambda_i} \sin(\theta/2) \quad \begin{matrix} \text{Συνθήκη του Bragg για} \\ \text{τη σκέδαση} \end{matrix} \quad (4)$$

Θ γωνία σκέδασης

Το φάσμα του σκεδαζόμενου φωτός υπολογίζεται από την εξίσωση της χρονικής συσχέτισης του σκεδαζόμενου ηλεκτρικού πεδίου:

$$I_{if}(\vec{q}, \omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} dt \langle E_s^*(0) E_s(t) \rangle \exp(-i\omega t) \quad (5)$$

$$\text{όπου } \langle E_s^*(0) E_s(t) \rangle = \frac{k_f^4 |E_o|^2}{16\pi^2 R^2 \varepsilon_o} \langle \delta \varepsilon_{if}(\vec{q}, 0) \delta \varepsilon_{if}(\vec{q}, t) \rangle \exp(-i\omega_f t) \quad (6)$$

Τελικά η εξίσωση (5) λόγω της (6) γράφεται:

$$I_{if}(\vec{q}, \omega) = A \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} dt \langle \delta \varepsilon_{if}^*(\vec{q}, 0) \delta \varepsilon_{if}(\vec{q}, t) \rangle \exp(-i\omega t) \quad (7)$$

όπου A η σταθερά αναλογίας που δίνεται από τη σχέση:

$$A = \frac{k_f^4 I_o}{16\pi^2 R^2 \varepsilon_o^2} \quad (8)$$

Η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης των διακυμάνσεων της διηλεκτρικής σταθεράς συχνά συμβολίζεται :

$$I_{if}^e(\vec{q}, t) = \langle \delta \varepsilon_{if}^*(\vec{q}, 0) \delta \varepsilon_{if}(\vec{q}, t) \rangle \quad (9)$$

Από την A μπορούν να βγουν μερικά ενδιαφέροντα συμπεράσματα - χαρακτηριστικά της σκέδασης φωτός. Η χαρακτηριστική εξάρτηση λ^{-4} της Rayleigh σκέδασης και η εξάρτηση R^{-2} δίνει την εξασθένηση που αναμένεται για κάθε σφαιρικό κύμα. Επίσης όπως φαίνεται η ένταση δεν εξαρτάται από την αρχική και τελική τιμή της κυκλικής συχνότητας, αλλά από τη διαφορά τους, $\omega_i - \omega_f$, η οποία είναι η αλλαγή στη συχνότητα λόγω της σκέδασης. Η παραπάνω αλλαγή συμβαίνει μόνο εφόσον υπάρχει μεταβολή του $\delta \varepsilon_{if}(q, t)$ με το χρόνο. Σκέδαση θα μπορούσε να δημιουργηθεί και από "παγωμένες" διακυμάνσεις, όμως σε αυτή την περίπτωση η συχνότητα του σκεδαζόμενου κύματος θα ήταν ταυτόσημη με τη συχνότητα του προσπίπτοντος κύματος.

Η ολική σκεδαζόμενη ένταση μπορεί να υπολογιστεί από την ολοκλήρωση του φάσματος του σκεδαζόμενου φωτός πάνω από όλες τις συχνότητες, δηλαδή από την επιφάνεια κάτω από το φάσμα:

$$I_{if}(\vec{q}) = \int_{-\infty}^{+\infty} d\omega I_{if}(\vec{q}, \omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} dt \delta(t) \langle \delta \varepsilon_{if}^*(\vec{q}, 0) \delta \varepsilon_{if}(\vec{q}, t) \rangle \quad (10)$$

όπου $\delta(t) = (1/(2\pi)) \int d\omega e^{i\omega t}$, οπότε τελικά αυτό που μετριέται απευθείας από οποιοδήποτε ανιχνευτή (ένα φωτοπολλαπλασιαστή για παράδειγμα) είναι:

$$I_{if}(\vec{q}) = \langle |\delta \varepsilon_{if}(\vec{q})|^2 \rangle \quad (11)$$

Στην προσέγγιση αυτή που ακολουθήθηκε, η εξίσωση (7) δίνει το φάσμα της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας με όρους τις διακυμάνσεις στην τοπική διηλεκτρική σταθερά. Επειδή δε λήφθηκαν υπόψη μοριακές ιδιότητες, η προσέγγιση είναι καθαρά φαινομενολογική· επιπρόσθετα οποιαδήποτε

προσπάθεια να συμπεριληφθούν μοριακές ιδιότητες, θα προκαλούσε την ανάγκη εισαγωγής προσεγγίσεων. Μια εναλλακτική προσέγγιση είναι αυτή της μοριακής Θεωρίας σκέδασης (Molecular theory of Scattering), η οποία θεωρεί ότι η σκέδαση είναι αποτέλεσμα των διακυμάνσεων του τανυστή πολωσιμότητας $\bar{\alpha}$ των σκεδαστών. Θεωρεί ότι η διπολική ροπή που επάγεται σ' ένα μόριο με πολωσιμότητα a , λόγω της πρόσπτωσης μονοχρωματικής ακτινοβολίας, δίνεται από τη σχέση:

$$\vec{m}(t) = \bar{\alpha} \vec{E}(t) \quad (12)$$

και μεταβάλλεται με το χρόνο οπότε το μόριο σκεδάζει. Ακολουθώντας αντίστοιχη προσέγγιση με την πρώτη πορεία υπολογίζεται ότι το σκεδαζόμενο πεδίο στον ανιχνευτή με πόλωση \vec{n}_f , είναι ανάλογο του $\alpha_{if}(t)e^{i\vec{q}\vec{r}(t)}$, όπου $\alpha_{if}(t) = \vec{n}_f \bar{\alpha}(t) \vec{n}_i$ είναι ο μοριακός τελεστής πολωσιμότητας κατά τη διεύθυνση των \vec{n}_i και \vec{n}_f , $\vec{r}(t)$ είναι η θέση των κέντρων μάζας των μορίων τη χρονική στιγμή t . Το $\alpha_{if}(t)$ μεταβάλλεται με το χρόνο λόγω της περιστροφής και των δονήσεων του μορίου, ενώ ο παράγοντας φάσης, $e^{i\vec{q}\vec{r}(t)}$, μεταβάλλεται με το χρόνο λόγω της μεταφορικής κίνησής του. Σ' ένα υγρό, εάν οι ηλεκτρονικές καταστάσεις των μορίων δε διαταράσσονται από τα γειτονικά μόρια, μπορεί να θεωρηθεί ότι το σκεδαζόμενο φως είναι αποτέλεσμα του αθροίσματος των πλατών των σκεδαζόμενων κυμάτων από τα μόρια που βρίσκονται στον όγκο σκέδασης. Έτσι το σκεδαζόμενο πεδίο είναι ανάλογο προς το άθροισμα:

$$\delta\alpha(\vec{r}, t) = \sum_j \alpha_{if}^j(t) \exp[i\vec{q} \cdot \vec{r}_j(t)] \quad (13)$$

όπου j αναφέρεται στην συνεισφορά του j -μορίου στο άθροισμα. Έτσι το φάσμα του σκεδαζόμενου πεδίου δίνεται :

$$I_{if}(\vec{q}, \omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} dt \exp(-i\omega t) I_{if}^\alpha(\vec{q}, t) \quad (14)$$

όπου κατά αντιστοιχία με τη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης των $\delta\alpha_{if}$:

$$I_{if}^\alpha(\vec{q}, t) = \langle \delta\alpha_{if}^*(\vec{q}, 0) \delta\alpha_{if}(\vec{q}, t) \rangle \quad (15)$$

είναι η συνάρτηση συσχέτισης των διακυμάνσεων της πολωσιμότητας, και

$$\delta\alpha_{if}(\vec{q}, t) = \sum_{j=1}^N \alpha_{if}^j(t) \exp[i\vec{q} \cdot \vec{r}(t)] \quad (16)$$

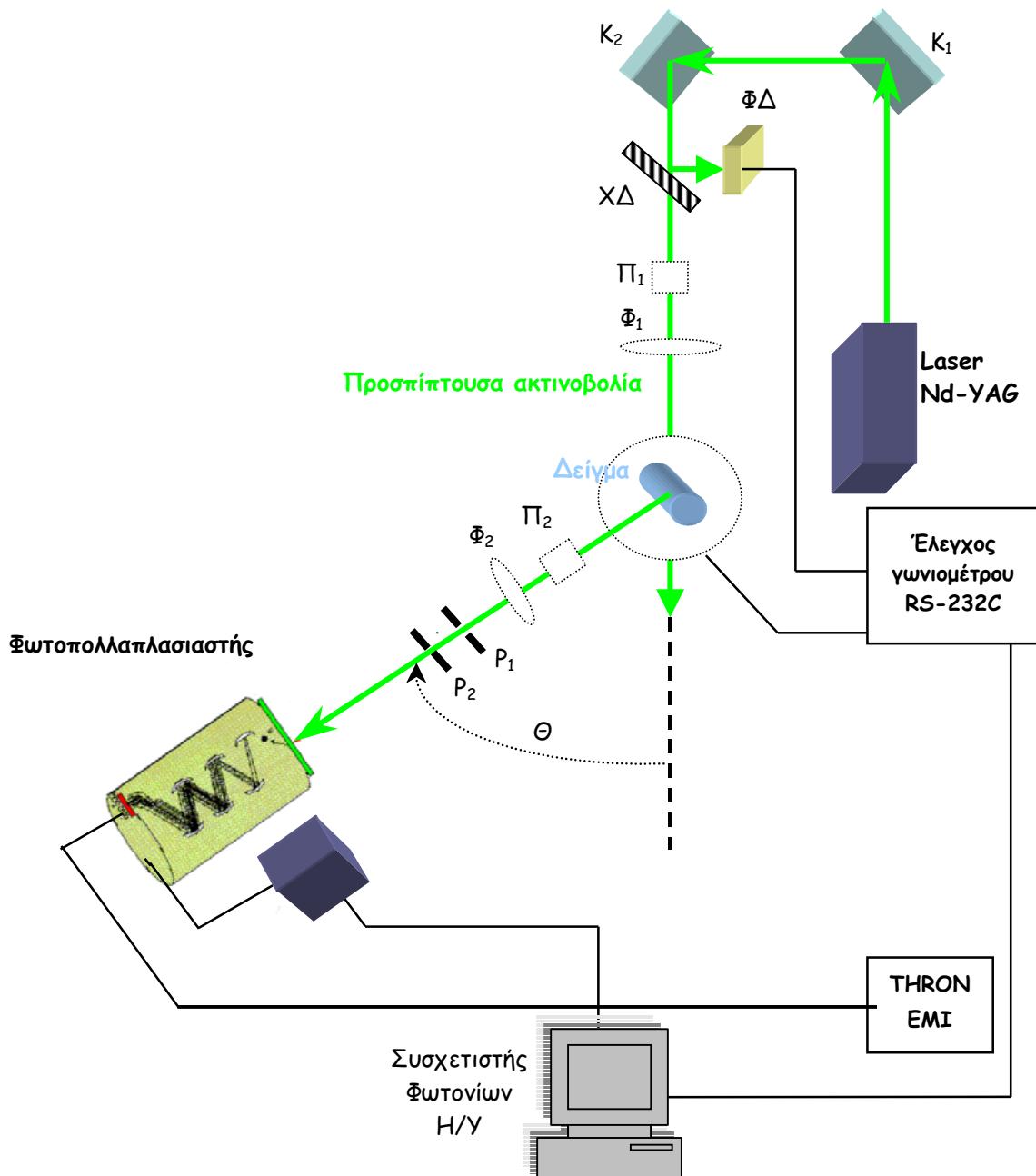
είναι ο Fourier μετασχηματισμός της πυκνότητας πολωσιμότητας, $\delta\alpha(\vec{r}, t)$.

Η περιγραφή της σκέδασης του φωτός με τη μοριακή θεωρία είναι προσεγγιστική μέθοδος, εφόσον δε λαμβάνονται υπόψη οι διαταραχές που προκύπτουν στο ηλεκτρικό φορτίο λόγω των μοριακών συγκρούσεων.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

II.1 Πειραματική διάταξη

Οι μετρήσεις της δυναμικής σκέδασης φωτός (και φυσικά και της στατικής) έγιναν χρησιμοποιώντας την πειραματική διάταξη της οποίας η σχηματική αναπαράσταση φαίνεται παρακάτω.



Με τη χρήση γωνιομέτρου είναι εφικτή η μέτρηση σε γωνίες σκέδασης από 11° έως 150° . Η πόλωση της προσπίπτουσας δέσμης επιτυγχάνεται με τη χρήση δύο Glan - Thomson (Halle, Berlin) πολωτών (Π_1 και Π_2). Σε όλα τα πειράματα που έγιναν, η πόλωση ήταν κάθετη στο επίπεδο σκέδασης και στην προσπίπτουσα, αλλά και στη σκεδαζόμενη δέσμη, δηλαδή πάντα VV μετρήσεις και αντίστοιχα υπολογισμός της $I_{VV}(q)$ σκεδαζόμενης έντασης. Η πηγή φωτός που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα Nd:YAG αερόψυκτο laser (Adlas DPY 315II) με μήκος κύματος $\lambda=532nm$ και μέγιστη ένταση περίπου ίση με $100mW$. Η διάμετρος της δέσμης ήταν $0,32mm$, ενώ η ισχύς που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, για λόγους σταθερότητας ήταν περίπου $80mW$.

Η προσπίπτουσα δέσμη εστιάζεται στο δείγμα με τη χρήση αχρωματικού φακού (Φ_1) με μήκος εστίασης $F=200mm$. Η ένταση και η θέση της προσπίπτουσας δέσμης ελέγχεται με τη χρήση τεσσάρων φωτοδιόδων ($\Phi\Delta$). Το δείγμα τοποθετείται σε γυάλινη κυψελίδα, κατασκευασμένη από οπτικό γυαλί, με διάμετρο στο σημείο πρόσπτωσης της δέσμης, ίση με $10nm$. Με τη σειρά της η κυψελίδα τοποθετείται σε λουτρό το οποίο περιέχει τολουόλιο (γενικά υγρό ίδιου, κατά προτίμηση, δείκτη διάθλασης με το γυαλί) ώστε να αποφεύγονται φαινόμενα ανάκλασης, σε όλο το φάσμα των μετρούμενων γωνιών.

Η θερμοκρασία του λουτρού, άρα και του δείγματος, καθορίζεται και σταθεροποιείται με τη χρήση θερμοστάτη. Όλες οι λειτουργίες του γωνιομέτρου ελέγχονται από υπολογιστή μέσω bus controller RS-232C. Η σκεδαζόμενη ένταση συλλέγεται από οπτικό ανιχνευτή ο οποίος χρησιμοποιεί ένα $2F/2F$ σύστημα, δηλαδή φακό (Φ_2), ο οποίος τοποθετείται σε απόσταση $2F$ από τον όγκο σκέδασης και από την τελευταία οπή (pinhole, P_2) πριν από τον φωτοπολλαπλασιαστή. Για τον καθορισμό του όγκου σκέδασης χρησιμοποιούνται δύο οπές (P_1 και P_2) με διάμετρο συνήθως είτε $0,2$ είτε $0,4nm$ πριν τον φωτοπολλαπλασιαστή (Thorn EM1).

Η συσχέτιση των φωτονίων γίνεται με τη χρήση ενός ALV-5000/E πολλαπλών χρόνων χαλάρωσης ψηφιακό συσχετιστή φωτονίων, ο οποίος κανονικά διαθέτει 288 κανάλια, και μπορεί να καταγράφει τη συνάρτηση

συσχέτισης στο χρονικό εύρος 10^{-6} έως 1000 δευτερόλεπτα. Με τη προσθήκη μιας κάρτας γρήγορης συσχέτισης, αυξάνεται ο αριθμός των καναλιών στα 320, επεκτείνοντας έτσι το χρονικό εύρος της συσχέτισης από 10^{-7} έως τα 1000 δευτερόλεπτα.

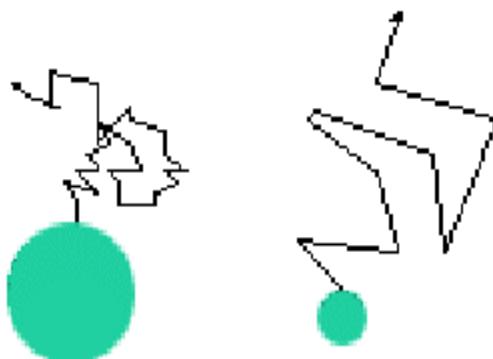
II.2 Δυναμική Σκέδαση Φωτός

II.2a. Συνάρτηση Αυτοσυσχέτισης - Συσχετιστής

Πληροφορίες για τα μακρομόρια στο διάλυμα είναι δυνατό να ληφθούν καταγράφοντας, σε πραγματικό χρόνο τις διακυμάνσεις της σκεδαζόμενης έντασης και μέσω αυτών, την τιμή του μεταφορικού συντελεστή διάχυσης των σκεδαστών που υπόκεινται σε διαρκή τυχαία κίνηση (Brown). Οι διαστάσεις τους μπορούν να κυμαίνονται από μερικά nm μέχρι και περίπου 1 μμ.

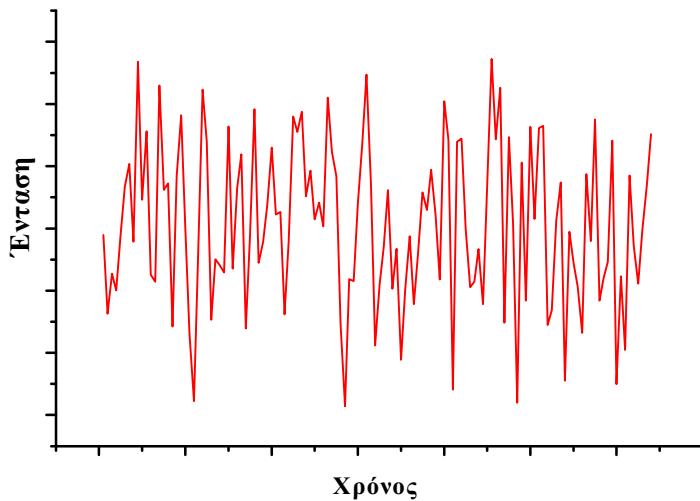
Μία δέσμη laser (στο ορατό) διαπερνά αραιό διάλυμα π.χ. πολυμερούς και το σκεδαζόμενο φως ανιχνεύεται σε μια γωνία θ. Το σήμα που συλλέγει ο φωτομετρητής, παρατηρούμενο σε ένα παλμογράφο εμφανίζει έντονες και τυχαίες αυξομειώσεις (της τάξης από ms μέχρι ms), καθώς τα διαλυμένα σωματίδια διαχέονται στο φωτιζόμενο από τη δέσμη, όγκο και τα κυματικά μέτωπα του σκεδαζόμενου από αυτά φωτός, συμβάλλουν μεταξύ τους.

Αν τα σωματίδια είναι μικρά, κινούνται, μέσω διάχυσης, πολύ γρήγορα με αποτέλεσμα και οι διακυμάνσεις της έντασης να είναι γρήγορες. Αντίθετα, μεγάλα σωματίδια διαχέονται αργά, κι έτσι η ένταση του φωτός που σκεδάζεται από αυτά μεταβάλλεται σε μικρότερη χρονική κλίμακα.



Kίνηση Brown για μεγάλο και μικρό σωματίδιο αντίστοιχα.

Επειδή, επιπλέον, τα σωματίδια κινούνται εντελώς τυχαία (κίνηση Brown), αντίστοιχα έντονα τυχαίο χαρακτήρα θα έχουν και οι διακυμάνσεις της έντασης.



Διακυμάνσεις της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σε σχέση με το χρόνο.

Για να εξαχθούν, λοιπόν, οι οποιεσδήποτε πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος των σωματιδίων θα πρέπει να γίνει στατιστική ανάλυση των διακυμάνσεων της έντασης. Εξαιρετικά χρήσιμη σε τέτοιες περιπτώσεις είναι η λεγόμενη «συνάρτηση συσχέτισης» (*correlation function*) της έντασης, η οποία περιγράφει συνοπτικά το πόσο γρήγορα μεταβάλλεται το σήμα και πόσος χρόνος απαιτείται ώστε το σήμα αυτό να χάσει τη «μνήμη» της προηγούμενης τιμής του. Η συνάρτηση συσχέτισης λαμβάνεται μέσω ηλεκτρονικής διάταξης (correlator) που επεξεργάζεται το σήμα του φωτοπολλαπλασιαστή.

Η συνάρτηση συσχέτισης της έντασης του φωτός που προέρχεται από διάλυμα με σκεδάζοντα σωματίδια ενός και μόνο μοριακού βάρους είναι μια εκθετική συνάρτηση, ο χρόνος απόσβεσης της οποίας έχει μια απλή εξάρτηση από το μέγεθος των σωματιδίων. Αυτό σημαίνει ότι α) τα σωματίδια διαχέονται τριγύρω τυχαία, και «ξεχνάνε» την προηγούμενή τους θέση με εκθετικό τρόπο και β) το μέγεθος των σωματιδίων μπορεί να προσεγγιστεί μετρώντας το ρυθμό απόσβεσης (decay rate) της συνάρτησης συσχέτισης. Στην πράξη, αυτό γίνεται στο συχετιστή (correlator), τα

δεδομένα του οποίου διοχετεύονται σε υπολογιστή, όπου και γίνεται, αυτόματα, ο προσδιορισμός των χαρακτηριστικών των σκεδαστών. Προβλήματα αρχίζουν να εμφανίζονται όταν τα σωματίδια-σκεδαστές δεν έχουν το ίδιο μέγεθος. Σε αυτή την περίπτωση, το κάθε ένα από αυτά θα συνεισφέρει ένα εκθετικό μέρος στη συνάρτηση συσχέτισης.

Βέβαια, για να μπορεί να γίνει ο διαχωρισμός από τον υπολογιστή θα πρέπει τα εισερχόμενα δεδομένα να είναι τα καλύτερα δυνατά, απαλλαγμένα από «θόρυβο», μια βασική πηγή του οποίου είναι σωματίδια σκόνης που μπορεί να δίνουν επιπλέον σκέδαση αλλοιώνοντας τα αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό πλένουμε με νερό και σαπούνι την κυψελίδα και το κάλυμμα της. Κατόπιν την ξεπλένουμε με απιονισμένο νερό.

Όπως προαναφέρθηκε, ο ανιχνευτής του σκεδαζόμενου φωτός, ο φωτοπολλαπλασιαστής είναι συνδεδεμένος με ταχύ συσχετιστή (correlator), ως αναπόσπαστο κομμάτι του υπολογιστή στον οποίο εισάγονται τα δεδομένα. Αυτό γίνεται χιλιάδες φορές και ανά μικρά χρονικά διαστήματα (της τάξης των μs). Ο συσχετιστής λοιπόν, συσχετίζει τα ενισχυμένα σήματα που στέλνει ο φωτοπολλαπλασιαστής, καθώς δέχεται τα φωτόνια της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας - εξ' ου και το όνομα της τεχνικής «φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων»

Αν βρεθούν στιγμιαία πολλά σωματίδια στο στοιχειώδη όγκο σκέδασης, θα προκληθεί ισχυρή σκέδαση της ακτινοβολίας. Το αντίθετο θα συμβεί αν τα σωματίδια απομακρυνθούν από το στοιχειώδη όγκο. Επειδή ο χρόνος δειγματοληψίας, Δt , είναι πολύ μικρός, οι θέσεις των σωματιδίων δε διαφοροποιούνται σημαντικά για τα μικρά χρονικά διαστήματα. Υπάρχει δηλαδή ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των σωματιδίων. Για μεγαλύτερα, βέβαια χρονικά διαστήματα η συσχέτιση αυτή παύει να υφίσταται. Τα δεδομένα της έντασης, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, συσχετίζονται με τον ταχύ συσχετιστή, δίνοντας τη συνάρτηση χρονικής συσχέτισης, tcf (*time correlation function*).

Η συσχέτιση, όπως ορίζεται στη δυναμική σκέδαση του φωτός, είναι ένα μέτρο της ομοιότητας μεταξύ δύο μεγεθών. Αν $A(t)$ και $B(t)$ είναι οι

εντάσεις δύο χρονικά μεταβαλλόμενων τυχαίων σημάτων, η μεταξύ τους συσχέτιση ορίζεται με τη συνάρτηση συσχέτισης:

$$G(\tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_t^{t_0+T} A(t)B(t-\tau)dt \quad (17)$$

όπου T είναι ο χρόνος ολοκλήρωσης, t_0 η αρχική χρονική στιγμή και τ είναι η χρονική μετατόπιση ή καθυστέρηση. Αν οι συναρτήσεις $A(t)$ και $B(t)$ είναι η ίδια συνάρτηση, δηλ., η $B(t-\tau)$ είναι μια μετατοπισμένη χρονικά έκδοση της συνάρτησης $A(t)$, τότε η $G(\tau)$ ονομάζεται *συνάρτηση αυτοσυσχέτισης (auto-correlation function)*.

Οι μέσες τιμές μιας ιδιότητας σε ένα σύστημα λαμβάνονται είτε παίρνοντας τη μέση τιμή όλου του πληθυσμού του συστήματος μια χρονική στιγμή, ή παίρνοντας τη μέση τιμή στο χρόνο της ιδιότητας ενός ή περισσοτέρων μελών του συστήματος. Προϋπόθεση όμως γι' αυτό είναι όλα τα μόρια του συστήματος να μπορούν να βρεθούν σε όλες τις δυνατές καταστάσεις. Συστήματα στα οποία πληρείται η προϋπόθεση αυτή λέγονται εργοδικά συστήματα. Τα συνήθη διαλύματα κολλοειδών και πολυμερών είναι εργοδικά συστήματα, όχι όμως και τα πηκτώματα (*gels*). Για σήματα ανεξάρτητα από τον αρχικό χρόνο και για εργοδικά συστήματα, η συνάρτηση συσχέτισης μπορεί να γραφεί ως εξής:

$$G(\tau) = \langle A(0)B(\tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T A(t)B(t-\tau)dt \quad (18)$$

Αν Δt είναι ο χρόνος δειγματοληψίας σε ένα πείραμα δυναμικής σκέδασης του φωτός, οι χρόνοι t , τ και T είναι πολλαπλάσια του Δt .

Έστω N_i και N_{i+1} ο αριθμός των φωτονίων (ανάλογος με την ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας) που φτάνουν στο φωτοπολλαπλασιαστή σε δύο διαδοχικά χρονικά διαστήματα. Το γινόμενό τους αποθηκεύεται στο πρώτο κανάλι του συσχετιστή (ο οποίος έχει ένα μεγάλο αριθμό καναλιών για την αποθήκευση δεδομένων). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται εκατοντάδες χιλιάδες φορές και τα γινόμενα των αριθμών φωτονίων σε διαδοχικούς χρόνους αποθηκεύονται στο κανάλι 1. Με την ίδια διαδικασία τα γινόμενα των αριθμών φωτονίων N_j και N_{j+2} (τη στιγμή $j\Delta t$ και $(j+2)\Delta t$ αντίστοιχα) αποθηκεύονται στο κανάλι 2, κ.ο.κ. Με τα δεδομένα αυτά ο συσχετιστής

δημιουργεί τη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης, η οποία περιγράφει την απόσβεση μιας ισχυρά συσχετιζόμενης αρχικής κίνησης των μακρομορίων σε μια ασυσχέτιστη τελικά κίνηση λόγω της διάχυσής τους.

Η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας για τη δυναμική σκέδαση φωτός δίνεται από τη σχέση:

$$G^{(2)}(q, t) = \langle I_s(q, 0) I_s(q, t) \rangle \quad (19)$$

η οποία σχετίζεται με τη συνάρτηση συσχέτισης του σκεδαζόμενου πεδίου ως:

$$G_{if}^{(1)}(q, t) = \langle E_s^*(q, 0) E_s(q, t) \rangle = I_{if}^e(q, t) = A(4\pi)^2 I_{if}^\alpha(q, t) \quad (20)$$

που συνδέεται με τη σειρά της με τη δυναμική συμπεριφορά του συστήματος που μας ενδιαφέρει. Εάν ο όγκος σκέδασης V χωριστεί σε πολλούς μικρούς όγκους, σε σχέση με το μήκος κύματος του φωτός, όγκους τότε το σκεδαζόμενο πεδίο E_s μπορεί να θεωρηθεί ως μια υπέρθεση των πεδίων όπου κάθε επιμέρους όγκος σκεδάζει, οπότε:

$$E_s = \sum_n E_s^{(n)} \quad (21)$$

όπου $E_s^{(n)}$ το πεδίο το οποίο κάθε υποδιαίρεση του όγκου σκέδασης, σκεδάζει. Επιπλέον εάν θεωρηθεί ότι κάθε υποδιαίρεση του όγκου είναι αρκετά μεγάλη ώστε να επιτρέπει ανεξάρτητη κίνηση των μορίων που εμπεριέχει, τότε τα σκεδαζόμενα πεδία $E_s^{(n)}$, μπορούν να θεωρηθούν ανεξάρτητες μεταβλητές, οπότε το ολικό σκεδαζόμενο πεδίο E_s θεωρείται ότι είναι τυχαία μεταβλητή που ακολουθεί Gaussian κατανομή³. Τότε η $G^{(1)}(q, t)$ με τη σχέση του Siegert:

$$G^{(2)}(t) = |G^{(1)}(0)|^2 \left(1 + \frac{|G^{(1)}(t)|^2}{|G^{(1)}(0)|^2} \right) \quad (22)$$

Πρακτικά αυτό που μετριέται σ' ένα πείραμα φασματοσκοπίας συσχέτισης φωτονίων είναι η κανονικοποιημένη συνάρτηση συσχέτισης της έντασης:

$$g^{(2)}(q, t) = \frac{G^{(2)}(q, t)}{|G^{(1)}(q, 0)|^2} = 1 + f^* |\alpha g^{(1)}(q, t)|^2 \quad (23)$$

όπου:

$$g^{(1)}(q,t) = \frac{G^{(1)}(q,t)}{G^{(1)}(q,0)} \quad (24)$$

είναι η κανονικοποιημένη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης του πεδίου, f^* ένας πειραματικός παράγοντας της συσκευής ο οποίος υπολογίζεται με τη χρησιμοποίηση πρότυπου δείγματος.

Η σταθερά αυτή εξαρτάται από το μέγεθος του όγκου σκέδασης ο οποίος καθορίζεται από το μέγεθος των οπών και την περιοχή συμφωνίας της δέσμης. Η περιοχή συμφωνίας ορίζεται ως η περιοχή όπου όλα τα σκεδάζοντα φωτόνια, τα οποία φτάνουν στην επιφάνεια του ανιχνευτή, έχουν την ίδια φάση. Εάν ο όγκος σκέδασης (ακτίνας a) ή η απόσταση R από τον ανιχνευτή (ακτίνας b) είναι μεγάλα, τότε τα φωτόνια τα οποία φτάνουν από διαφορετικές περιοχές του όγκου σκέδασης, θα ακολουθήσουν διαφορετικού μήκους διαδρομές και έτσι θα φτάσουν εκτός φάσης στον ανιχνευτή. Οι διακυμάνσεις της έντασης σε μια συσκευή θα είναι σημειακές, εφόσον η επιφάνεια του ανιχνευτή είναι ίση (ή μικρότερη) με μια επιφάνεια συμφωνίας, A_{coh} ,

$$A_{coh} = \pi b^2 = \frac{\lambda^2 R^2}{\pi \alpha^2} \quad (25)$$

όπου λ το μήκος κύματος του φωτός. Εάν ο όγκος σκέδασης έχει ακτίνα a ώστε η επιφάνεια σκέδασης πa^2 να είναι μεγαλύτερη από την περιοχή συμφωνίας, τότε ο φωτοπολλαπλασιαστής ανιχνεύει μικρότερες διακυμάνσεις στη σκεδαζόμενη ένταση, εφόσον παρατηρείται μεγαλύτερη επιφάνεια. Όσο οι διακυμάνσεις στην ένταση μειώνονται (ενώ η ολική ένταση αυξάνει) ανιχνεύεται μικρότερη δυναμική πληροφορία από το δείγμα, εφόσον τα φωτόνια που μετρούνται από τον ανιχνευτή βρίσκονται εκτός φάσης και λόγω των διακυμάνσεων στο μέσο (από τις κινήσεις της πολυμερικής αλυσίδας), αλλά και λόγω της διαφορετικής απόστασης που έχουν να καλύψουν. Ως αποτέλεσμα η συνάρτηση συσχέτισης ελαττώνεται σε $G(q,0)-1$, από την μέγιστη τιμή 1 προς μια τιμή ίση με f^* , όταν a=1. Με βάση το προηγούμενο, η τιμή του f^* μπορεί να υπολογιστεί με τη χρήση ενός πολυμερικού διαλύματος, το οποίο παρουσιάζει μια διαδικασία χαλάρωσης λόγω των πολυμερικών μορίων, στο παράθυρο του συσχετιστή.

Έτσι χρησιμοποιείται αραιό διάλυμα πολυστυρενίου (PS) σε τολουόλιο, για το υπολογισμό του f^* , σύμφωνα με τη σχέση:

$$f^* = \frac{A}{(1 - (1 - \phi)(I_{tol}/I_{PS/tol}))^2} \quad (26)$$

όπου $A=G(q,0)$ είναι το πλάτος (η διαφορά) της $G(q,t)$ από το πρότυπο διάλυμα PS, I_{tol} η ένταση η οποία σκεδάζεται από το καθαρό τολουόλιο, $I_{PS/tol}$ η ένταση που σκεδάζεται από το πρότυπο διάλυμα, φ το κλάσμα όγκου του PS/tol. Το οποίο ισχύει γιατί όλη η ένταση από το πρότυπο διάλυμα βρίσκεται μέσα στο παράθυρο του συσχετιστή, άρα $\alpha=(I_{PS/tol}-I_{tol})/I_{PS/tol}$.^{5,6,7,8}

II.2β. Ανάλυση της Συνάρτησης Συσχέτισης

II.2β.1 KWW

Η ανάλυση της μετρούμενης κανονικοποιημένης συνάρτησης αυτοσυσχέτισης του πεδίου, $g^{(1)}(q,t)$, γίνεται συνήθως με τη χρήση του αλγόριθμού Kohlrausch-Williams-Watts (KWW) ^{9,10}:

$$g^{(1)}(q,t) = \alpha(q) \exp\left\{-\left[\frac{t}{\tau(q)}\right]^{\beta_{\text{KWW}}}\right\} \quad (27)$$

όπου $\alpha(q)$ είναι το πλάτος, $\tau(q)$ ο χρόνος χαλάρωσης και β_{KWW} ο παράγοντας της μορφής της διαδικασίας χαλάρωσης. Τυπικά $0 \leq \beta_{\text{KWW}} \leq 1$, όπου η τιμή $\beta_{\text{KWW}}=1$ αντιστοιχεί σε διαδικασία απλής εκθετικής, η οποία συνήθως παρατηρείται σε διαδικασίες διάχυσης, ενώ όταν $\beta_{\text{KWW}} > 1$ τότε η χαλάρωση ελαττώνεται πιο απότομα από απλή εκθετική. Παρόλο που η ύπαρξη πολυδιασποράς στο δείγμα παραποιεί την εκθετική διαδικασία, το β_{KWW} βρίσκεται να είναι πάντα μεγαλύτερο από 0.8 για ανιονικά πολυμερικά δείγματα. Η KWW χρησιμοποιείται συνήθως σε περιπτώσεις όπου η διαδικασία χαλάρωσης ελαττώνεται με ρυθμό πιο αργό από ένα απλό εκθετικό.

II.2β.2 CONTIN

Ένας διαφορετικός τρόπος ανάλυσης των δεδομένων, ο οποίος χρησιμοποιείται όταν έχουμε πολλές διαδικασίες χαλάρωσης είναι ο αλγόριθμος CONTIN^{11,12}, κατά τον οποίο η μετρούμενη συνάρτηση συσχέτισης του πεδίου, $C(q,t)$ μετασχηματίζεται με τον αντίστροφο μετασχηματισμό Laplace (ILT). Ο αλγόριθμος θεωρεί την $C(q,t)$ σαν μία υπέρθεση εκθετικών της μορφής:

$$C(q,t) = a g^{(1)}(q,t) = \int_{-\infty}^{+\infty} L(\ln \tau) \exp(-\frac{t}{\tau}) d(\ln \tau) \quad (28)$$

η οποία περιγράφει ένα συνεχές φάσμα χαρακτηριστικών χρόνων $L(\ln \tau)$ το οποίο στην πραγματικότητα είναι η συνάρτηση κατανομής των χαρακτηριστικών χρόνων χαλάρωσης. Από το $L(\ln \tau)$ προσδιορίζεται ο μέσος

χαρακτηριστικός χρόνος χαλάρωσης, τ , από την τιμή του χρόνου στην κορυφή της κατανομής, ενώ από την επιφάνεια κάτω από την κορυφή προσδιορίζεται η ένταση της αντίστοιχης διαδικασίας. Η διαδικασία αντιστροφής από τον αλγόριθμο των $C(t)$ είναι μια διαδικασία η οποία δεν είναι εύκολη και ως αποτέλεσμα δίνει μεγάλο αριθμό λύσεων.

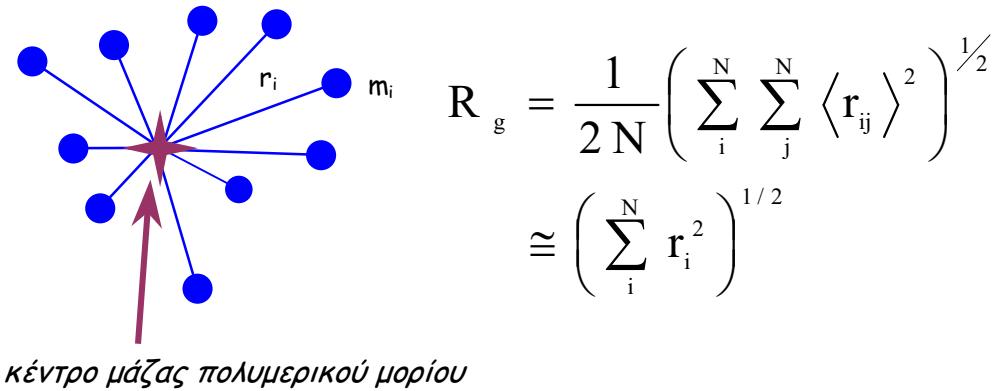
Το **CONTIN** χρησιμοποιεί μια μέθοδο περιορισμού των λύσεων, η οποία βασίζεται στην ελαχιστοποίηση της ποσότητας $\chi^2(\alpha)$ σύμφωνα με την σχέση:

$$\chi^2(\alpha) = \sum_i \left(\frac{1}{\sigma_i} \right) \left[C(t_i) - \int \omega(\tau) \exp(-\frac{1}{\tau}) d\tau \right]^2 + \alpha \left\| \frac{d^2 \omega(\tau)}{d\tau^2} \right\| \quad (29)$$

όπου ο παράγοντας α είναι ρυθμιστής των λύσεων. Πρακτικά όσο πιο μεγάλη τιμή του α τόσο πιο πολλές λεπτομέρειες προκύπτουν στην κατανομή των χρόνων, $L(I_{\text{HT}})$. Η επιλογή της κατάλληλης λύσης γίνεται με βάση την επιλογή εκείνης με τις λιγότερες κορυφές η οποία να προσομοιώνει καλύτερα τα πειραματικά δεδομένα (συνήθως οι τιμές του α που επιλέγονται είναι 10^{-3} - 10^{-4}).

II.3. Στατική Σκέδαση Φωτός

Η στατική σκέδαση φωτός^{5,13} αποτελεί μια τεχνική με την οποία μπορούμε να υπολογίσουμε την γυροσκοπική ακτίνα R_g και τη μοριακή μάζα των πολυμερών, μικκυλίων και κολλοειδών. Η γυροσκοπική ακτίνα ενός πολυμερούς που αποτελείται από N μονομερή, είναι ένας τρόπος μέτρησης του μεγέθους του πολυμερικού μορίου· ορίζεται από την απόσταση μεταξύ των μονομερών i και j . Συνήθως η απόσταση r_{ij} αντικαθίσταται από την απόσταση, r_{i0} , του κάθε μονομερούς από το κέντρο μάζας του πολυμερούς.¹⁴



$$R_g = \frac{1}{2N} \left(\sum_i^N \sum_j^N \langle r_{ij}^2 \rangle \right)^{1/2}$$

$$\cong \left(\sum_i^N r_i^2 \right)^{1/2}$$

Το μέγεθος το οποίο μετράται σ' αυτή την τεχνική είναι η συνολική ένταση I_s της σκεδαζόμενης, σ' όλες τις γωνίες, ακτινοβολίας, καθώς και η ένταση I_o της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Στη συνέχεια υπολογίζεται ο λόγος Rayleigh:

$$R_\theta = \frac{I_s}{I_o} \left(\frac{r^2}{1 + \cos^2 \theta} \right) \quad (30)$$

όπου
 r^2 είναι η απόσταση ανάμεσα στο σκεδαζόμενο δείγμα και το φωτοπολλαπλασιαστή και
 θ είναι η γωνία σκέδασης.

Η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας εξαρτάται από το μέγεθος των σκεδαστών, την πολωσιμότητά τους α καθώς και τη μέση διηλεκτρική σταθερά ϵ_o του διαλύματος:

$$\frac{I_s}{I_o} = \left(\frac{\rho N_A \pi^2 \alpha^2}{2M_w \epsilon_o \lambda_o^4} \right) \left(\frac{1 + \cos^2 \theta}{r^2} \right) = R_\theta \left(\frac{1 + \cos^2 \theta}{r^2} \right) \quad (31)$$

συνεπώς ο λόγος Rayleigh γράφεται:

$$R_\theta = \frac{1}{2} \left(\frac{\rho N_A}{M_w} \right) \frac{\pi^2 \alpha^2}{\epsilon_o^2 \lambda_o^4} \quad (32)$$

όπου

ρ η πυκνότητα του δείγματος,

M_w το μέσο μοριακό βάρος κατά βάρος.

Χρησιμοποιώντας την εξίσωση Clausius-Mosetti για το καθορισμό της πολωσιμότητας του δείγματος μέσω της μέσης διηλεκτρικής σταθεράς ϵ_o ο λόγος Rayleigh παίρνει τη συνήθη μορφή του:

$$R_\theta = KC \left(\frac{1}{M_w} + 2A_2 C \right)^{-1} \Rightarrow \frac{KC}{R_\theta} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{R_g^2}{3} q^2 \right) + 2A_2 C \quad (33)$$

όπου

$$K = \frac{4\pi^2}{\lambda_o^4 N_A} \left(n_o \frac{dn}{dc} \right)^2$$

dn/dc δίνει πληροφορίες για τη μεταβολή του δείκτη διάθλασης του διαλύματος σε σχέση με τη συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας,

C η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας (g/ml),

A_2 ο 2^{nd} συντελεστής virial ενδεικτικός των αλληλεπιδράσεων της διαλυμένης ουσίας και του διαλύτη.⁸

III. ΧΡΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΠΟΛΥΒΙΝΥΛΟΤΥΡΡΟΛΙΔΟΝΗΣ

III. 1a. Μύκητες - Μυκοτοξίνες¹⁸

Οι μύκητες είναι ετερότροφοι οργανισμοί· για να επιβιώσουν απαιτούν θρεπτικό υπόστρωμα, το οποίο να περιέχει τις απαραίτητες ουσίες που χρειάζονται για να συνθέσουν τα συστατικά των κυττάρων τους και να αποθηκεύσουν την ενέργεια που είναι απαραίτητη για τις ζωτικές λειτουργίες τους. Οι απαραίτητες ουσίες δεν είναι οι ίδιες για όλους τους μύκητες και εξαρτώνται από τη γενετική σύνθεση του μύκητα και από τις συνθήκες του περιβάλλοντος που επικρατούν σε κάθε περίπτωση.

Για την ανάπτυξη των μυκήτων απαραίτητα στοιχεία είναι ο άνθρακας, το άζωτο, το οξυγόνο, το υδρογόνο, ο φωσφόρος, το θείο, το κάλιο και το μαγνήσιο τα οποία απαρτίζουν το θαλλό των μυκήτων. Το υδρογόνο το λαμβάνουν από το νερό και τις διάφορες οργανικές ενώσεις, ενώ το οξυγόνο από τον αέρα. Η αύξηση και αναπαραγωγή των μυκήτων εξαρτάται επίσης και από παράγοντες του περιβάλλοντος όπως θερμοκρασία, φως, pH, αερισμός κ.α. Για καθένα από τους παραπάνω παράγοντες υπάρχει μια ορισμένη κλίμακα μέσα στην οποία πραγματοποιείται η καλύτερη ανάπτυξη του μύκητα.

Για κάθε μύκητα υπάρχει μια ελάχιστη, μια μέγιστη και μια άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης. Η άριστη θερμοκρασία συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 20 έως 30°C. Θερμοκρασίες πέρα από το μέγιστο ή το ελάχιστο όριο θα επιφέρουν το θάνατο του μύκητα.¹⁵

Οι μυκοτοξίνες είναι χημικά σταθερές ενώσεις, δευτερογενείς μεταβολίτες των μυκήτων και έχουν τοξικές ιδιότητες. Το ενδιαφέρον για τις συγκεκριμένες τοξίνες άρχισε στα μέσα περίπου αυτού του αιώνα, παρόλο που οι μυκοτοξικώσεις είναι ασθένειες που επιβαρύνουν τον άνθρωπο από τη στιγμή της ύπαρξης του. Επιπροσθέτως διαφάνηκε όλο και μεγαλύτερη η σχέση μεταξύ των μυκοτοξινών και κάποιων ασθενειών. Οι μυκοτοξίνες απαντώνται στις ζωτροφές, στα δημητριακά, στα λαχανικά, στα εγκυτιωμένα τρόφιμα και σε πολλά άλλα είδη κυρίως ξηρών τροφών,

βάζοντας σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία και την κτηνοτροφική παραγωγή σε όλο τον κόσμο.

Οι μύκητες που μπορούν να παράγουν μυκοτοξίνες είναι διάφορα είδη του *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Claviceps*, *Stachybotrys*, *Pithomyces*, *Phoma*, *Diphodia*, *Trichothecium*, *Phomopsis*, *Cladosporium*, *Byssochlamys*, *Chaetomium*, *Rhizopus* και *Scerotinia*¹⁶. Οι παραπάνω οργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν σε μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων κάτω από κατάλληλες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και υγρασίας¹⁷. Η παρουσία όμως μυκήτων δεν είναι πάντα στοιχείο ύπαρξης και μυκοτοξινών. Με άλλα λόγια ο μύκητας μπορεί να υπάρχει άλλα να μην παράγει μυκοτοξίνες. Επιπλέον, η μη παρουσία μύκητα δεν αποκλείει την ύπαρξη μυκοτοξίνης αφού ο μύκητας μπορεί να προϋπήρχε και να έχει παράγει την τοξίνη σε προηγούμενο στάδιο παραγωγής ή επεξεργασίας της τροφής. Η μυκοτοξίνη μπορεί να παραμείνει στην τροφή πολύ μετά το θάνατο του μύκητα χωρίς να καταστραφεί ή να υποστεί οποιαδήποτε αλλοίωση υπό κανονικές συνθήκες.

Οι βιολογικές επιδράσεις των μυκοτοξινών εντοπίζονται κυρίως στα παρακάτω συστήματα: α) το σύστημα μεταβολισμού, όπως ο μεταβολισμός των υδατανθράκων, ο μεταβολισμός των λιπιδίων, η αφομοίωση των βιταμινών, η σύνθεση των πρωτεΐνων και η μιτοχονδριακή αναπνοή, β) το ενδοκρινικό σύστημα και γ) το εριστικό σύστημα¹⁶. Ήδη γνωστές ασθένειες που επιβαρύνονται από την επίδραση των μυκήτων και των μυκοτοξινών είναι η καντιντίαση, η κοκκιδιομύκωση, η λοιμώδης βρογχίτις, η σαλμονέλωση, η παστεριδίωση, η ερυθρά, η διστομίαση.

Πολλά είδη εσπεριδοειδών, δημητριακών, καφέ και άλλων προϊόντων μπορούν να μολυνθούν με μυκοτοξίνες πριν τη συγκομιδή, κατά τη διάρκεια της συγκομιδής και κατά την διάρκεια της ξήρανσης ή αποθήκευσή τους.

Οι κίνδυνοι για την υγεία των ανθρώπων προέρχονται κυρίως από προϊόντα (κρέας, αυγά, γάλα) που παράγονται από μολυσμένα με μυκοτοξίνες ζώα. Στο κρέας οι μυκοτοξίνες μπορεί να βρεθούν είτε λόγω της μολυσμένης τροφής με την οποία εκτρέφονται τα ζώα είτε ως αποτέλεσμα ανάπτυξης μύκητα και παραγωγής μυκοτοξινών σε ήδη επεξεργασμένα προϊόντα όπως

τα αλλαντικά. Όσο αφορά τα φρούτα και τα λαχανικά έχει κυρίως παρατηρηθεί μόλυνση από μυκοτοξίνες στα μήλα, στις τομάτες και στα παράγωγα επεξεργασμένα προϊόντα αυτών (π.χ. χυμοί).

Η μόλυνση στα ακατέργαστα τρόφιμα μπορεί να προέλθει κατά την παραγωγή και την ωρίμανση των προϊόντων στους αγρούς, πριν ή μετά την συγκομιδή τους, κατά τη συλλογή και κατά την αποθήκευση των προϊόντων. Μεγάλη παραγωγή τοξινών έχει παρατηρηθεί όταν η αποθήκευση των τροφίμων γίνεται σε ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη του μύκητα χωρίς αναγκαστικά να υπάρχει μόλυνση πριν από αυτή την περίοδο. Οι ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη του μύκητα είναι υψηλή θερμοκρασία, υψηλό ποσοστό υγρασίας και ελλιπής αερισμός των χώρων αποθήκευσης. Για το λόγο αυτό η αποθήκευση των τροφών πρέπει να γίνεται σε χώρους ξηρούς, με καλό αερισμό και σχετικά χαμηλή θερμοκρασία.

Φυσικά η εμφάνιση μυκοτοξινών στις επεξεργασμένες τροφές εξαρτάται και από τη διαδικασία επεξεργασίας που ακολουθείται. Οι συνθήκες επεξεργασίας μπορούν να επιδράσουν στην παραγωγή μυκοτοξινών αλλά και στη σταθερότητα αυτών.¹⁸

III. 1β. Μυκοστατικά - Πρόσθετα σε τρόφιμα¹⁸

Οι βασικοί τρόποι αντιμετώπισης του προβλήματος της μόλυνσης των τροφίμων από μύκητες και μυκοτοξίνες, που ακολουθούνται διεθνώς είναι: α) η χρήση μυκοστατικών, όπως το σορβικό οξύ, το προπιονικό οξύ, το οξικό οξύ και τα άλατά τους, ως πρόσθετα σε τρόφιμα για αναστολή των μυκήτων που παράγουν μυκοτοξίνες, β) η χρήση φυτοφαρμάκων και εντομοκτόνων για τη μείωση της παραγωγής μυκοτοξίνων, γ) η διάσπαση των μυκοτοξίνων με φυσικοχημικές μεθόδους π.χ. θερμοκρασία, χρήση οξέων και βάσεων, ακτινοβολία κ.α., δ) η αδρανοποίηση των μυκοτοξίνων στα τρόφιμα με προσκόλληση τους σε υλικά όπως ο βεντονίτης και η πολυβινυλοπυρρολιδόνη και η αποβολή τους μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα και ε) η χρήση αντιμυκητιασικών π.χ. νυσταμίνη, αμφοτερικίνη Β, μικοναζόλη κ.α. σε περίπτωση μυκητίασης.

Ως πρόσθετες ουσίες χαρακτηρίζεται ένας πολύ μεγάλος αριθμός ουσιών. Οι ουσίες αυτές προστίθενται στα τρόφιμα σε πολύ μικρές ποσότητες και αποσκοπούν στη βελτίωση της παραγωγής, της επεξεργασίας, της συντήρησης και της εμφάνισης των τροφίμων. Σε ορισμένες περιπτώσεις εμποδίζουν την εμφάνιση και την ανάπτυξη βακτηριδίων και μυκήτων, ενώ θεωρητικά τουλάχιστον είναι ακίνδυνες για την ανθρώπινη υγεία σε μικρές συγκεντρώσεις.

Οι πρόσθετες ουσίες χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων από πολύ παλιά. Σήμερα πολλές από τις παραδοσιακές αυτές ουσίες έχουν εκτοπιστεί από άλλες μεθόδους συντήρησης των τροφίμων, όπως η ψύξη και η αφυδάτωση που θεωρούνται σχετικά ακίνδυνες και ενίοτε πλέον αποτελεσματικές. Παρόλα αυτά στον κατάλογο των πρόσθετων ουσιών καθημερινά παρουσιάζονται καινούριες αποτελεσματικές αλλά όχι πάντα ακίνδυνες για την ανθρώπινη υγεία.

Η ποσότητα και το είδος της πρόσθετης ουσίας που χρησιμοποιείται κάθε φορά εξαρτάται από το είδος του τροφίμου, τις κλιματολογικές συνθήκες και τις ειδικές τοπικές συνήθειες των καταναλωτών. Γενικά όμως

η χρήση των πρόσθετων ουσιών θα πρέπει να ακολουθεί συγκεκριμένους κανόνες και περιορισμούς, όπως:

- Η ποσότητα της προστιθέμενης ουσίας να μην υπερβαίνει την μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση η οποία έχει οριστεί με βάση τη βιολογική δράση της ουσίας και την αλληλεπίδρασή της με τα συστατικά του τροφίμου.
- Η χρήση των πρόσθετων ουσιών πρέπει να γίνεται σε τρόφιμα που δεν έχουν υποστεί καμία αλλοίωση και είναι άψογα από κάθε άποψη. Σ' αυτή τη περίπτωση η χρήση τους αποσκοπεί στη βελτίωση ή διατήρηση των επιθυμητών ιδιοτήτων του τροφίμου.

III. 1γ. Τρόπος Δράσης των πρόσθετων ουσιών¹⁸

Ο τρόπος δράσης πολλών πρόσθετων ουσιών δεν είναι πλήρως γνωστός και φυσικά δεν είναι όμοιος για όλες τις ουσίες. Οι πρόσθετες ουσίες που βρίσκουν εφαρμογή ως μέσα συντήρησης των τροφίμων και της προστασίας αυτών από βακτήρια πιστεύεται πως επιδρούν στη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης την οποία μεταβάλλουν ή καταστρέφουν. Επιπλέον συμβάλλουν στην απενεργοποίηση συγκεκριμένων ενζυμικών συστημάτων που είναι απαραίτητα για την πραγματοποίηση διαφόρων δραστηριοτήτων. Η κυτταρική μεμβράνη είναι ημιπερατή και αυτορυθμιζόμενη και η εκλεκτική διαπερατότητά της εξαρτάται από τη σύσταση και την πολικότητα των διαφόρων συστατικών. Η πολικότητα της κυτταρικής μεμβράνης αλλάζει με την προσθήκη διαφόρων ουσιών και κατά συνέπεια καταστρέφεται η επιλεκτικότητα με αποτέλεσμα το θάνατο του κυττάρου.

Άλλες πρόσθετες ουσίες θεωρείται ότι ανταγωνίζονται τα ένζυμα στη χρησιμοποίηση των αμινοξέων, άλλες ότι δεσμεύουν την προσθετική ομάδα των ενζύμων και κυρίως το ασβέστιο και τέλος ότι συναγωνίζονται τα ένζυμα για την απόκτηση του πρωτεΐνικού τμήματος.

Μια από τις πρόσθετες ουσίες που χρησιμοποιείται είναι και το σορβικό οξύ (Ε200) ή 2,4-hexadienoic acid ή 2-propenylacrylic acid. είναι οργανικό

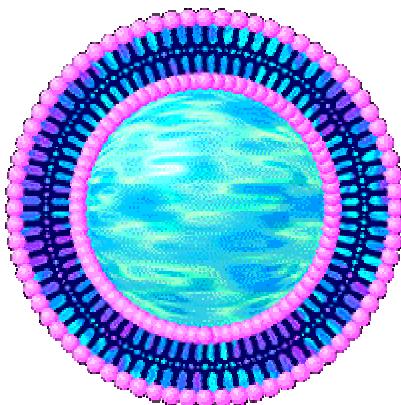
οξύ με μικρή ανθρακική αλυσίδα, έχει συντακτικό τύπο $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ και μοριακό βάρος 112,2. Η χρήση του στη βιομηχανία των τροφίμων είναι αρκετά διαδεδομένη ως πρόσθετο και λειτουργεί ως συντηρητικό. Χρησιμοποιείται κατά πρώτο λόγο για να βελτιώσει κάποιες οργανοληπτικές ιδιότητες (ειδική γεύση) των τροφίμων, την τροποποίηση του pH τους και μερικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων όπως ιξώδες, ρεολογικές συνθήκες κ.α. Επιπλέον χρησιμοποιείται για την αντιβακτηριακή και τη μυκοστατική δράση (έναντι παθογόνων ή δυνητικά παθογόνων μυκήτων), ενώ πιθανολογείται ότι επιδρά στην τοξικογέννεση και κατά συνέπεια στη μείωση της παραγωγής των μυκοτοξινών από τους μύκητες.

Η τοξικότητά του είναι πολύ μικρή ($\text{LD}_{50}=7,36\text{g/kg}$ στους αρουραίους(orally)). Η διαλυτότητά του στο νερό, αλλά και στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες είναι πολύ μικρή και αυτό είναι ένα μεγάλο πρόβλημα στις εφαρμογές του. Ενδεικτικά στο νερό διαλύεται μόλις κατά 0,25% στους 30°C , ενώ στην αιθανόλη και τη μεθανόλη κατά 5,5% στην ίδια θερμοκρασία. Γενικά η δοσολογία του σορβικού οξέος σε τροφές κυμαίνεται περίπου στο $1,5\text{g/kg}$ τροφής.

Έχει ισχυρή μυκοστατική δράση, αλλά περιορισμένη αντιμικροβιακή δράση. Μερικοί μύκητες του είδους *Penicillium* έχουν τη δυνατότητα να μεταβολίζουν το σορβικό οξύ και να το μετατρέπουν σε 1,3-πενταδιένιο, με αποτέλεσμα οι συγκεκριμένοι μύκητες να μπορούν να επιβιώσουν παρουσία μεγάλων ποσοτήτων του.^{18,19,20,21,22,23,24}

III.2 Λιποσωμάτια

Τα λιποσωμάτια περιγράφτηκαν για πρώτη φορά το 1965 από τον Bangham σε πειράματα μελέτης της φύσης των κυτταρικών μεμβρανών.²⁵ Ως λιποσωμάτια σήμερα ορίζονται τα σφαιρικά κυστίδια τα οποία συντίθενται από μια ή και περισσότερες φωσφολιπιδικές διπλοστοιβάδες οι οποίες περιβάλλουν μια κοιλότητα υδατικού περιβάλλοντος.



Λιποσωμάτιο

Η ικανότητά τους να φέρουν στην κοιλότητα διάφορα υδατοδιαλυτά μόρια όπως φλουοροχρώματα, ένζυμα, φάρμακα και πρωτεΐνες τα κατέστησε ιδανικούς υποψήφιους σε μεγάλο εύρος εφαρμογών.

Ο τύπος και το μέγεθος των λιποσωματίων κυμαίνεται από τα μικρά κυστίδια μονής στοιβάδας (SUV) με διάμετρο κάτω από τα 100nm, στα κυστίδια πολλαπλών στοιβάδων (MLV, OLV) με διάμετρο κάτω από τα 1000nm, και στα μεγάλα κυστίδια μονής στοιβάδας (LUV) με μεγέθη από 100nm έως μερικά μμ. Τα MLVς συνήθως φέρουν 5 έως 20 ομόκεντρες διπλοστοιβάδες λιπιδίων, τα OLV περίπου 5 και τα LUV μόνο μία.

Σήμερα οι περισσότερες εφαρμογές λιποσωματίων επικεντρώνονται σε μεθόδους εστιασμένης χορήγησης ουσιών.²⁶ Σε τέτοιες εφαρμογές το εσωτερικό υδατικό περιβάλλον των λιποσωματίων χρησιμοποιείται για την ενσωμάτωση μεγάλου αριθμού των επιθυμητών μορίων. Η συγκέντρωση του επιθυμητού μορίου, στα λιποσωμάτια πρέπει να είναι όσο το δυνατό υψηλότερη, η εκροή από το λιπόσωμα όσο το δυνατό μικρότερη και η απελευθέρωση του να γίνεται μόνο στο σημείο στόχου. Η τελευταία απαίτηση

επιτυγχάνεται με σύνδεση στην επιφάνεια των λιποσωματίων ειδικών μορίων που τα οδηγούν στο σημείο στόχο.

Τα λιποσωμάτια συνδυάζουν εξαιρετική ανοσολογική ικανότητα και ταυτόχρονα ασφάλεια προς το χρήστη. Θεωρούνται ως ένας από τους πιο υποσχόμενους τρόπους κατανομής, διάθεσης και μεταφοράς των φαρμακευτικών σκευασμάτων παρεντερικής (ενέσιμης) χορήγησης. Τα λιποσωμάτια δημιουργούνται από διαθέσιμα αρχικά προϊόντα, μετατρέπουν σε διαλυτή μορφή τα μη διαλυτά σκευασμάτα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς σκευασμάτων ευρείας δράσης συμπεριλαμβανομένων των ανοσοενεργών σκευασμάτων. Όμως έχουν ουσιαστικά μειονεκτήματα που περιορίζουν την δυνατότητα της χρήσης τους. Έτσι τα λιποσωμάτια δεν είναι σταθερά στην αιματική κυκλοφορία και επίσης εγκωλπίζονται έντονα από τα κύτταρα του ενδοθηλιακού συστήματος π.χ. τα κύτταρα του ήπατος. Ως αποτέλεσμα αυτού οι φαρμακευτικές ουσίες που εισάγονται στα λιποσωμάτια πολύ γρήγορα χάνουν τη ζητούμενη δράση τους. Για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας των λιποσωματίων απαιτείται η τροποποίηση της επιφανειακής στοιβάδας με την εισαγωγή σε αυτή συγγενών ομάδων που προσδιορίζουν τη μεταφορά της φαρμακευτικής ουσίας στο όργανο στόχο.

Για το σκοπό αυτό, κατά τη χημική σύνθεση των λιποσωματίων χρησιμοποιούνται πολυμερή, τα οποία έχουν δείξει ότι προστατεύουν μεμονωμένα μόρια από την αλληλεπίδρασή τους με διάφορες ουσίες. Συγκεκριμένα το υδρόφιλο τμήμα του λιποσωματίου, εκτίθενται στο διάλυμα αλλά το συνδεδεμένο πολυμερές τα προστατεύει από την αλληλεπίδρασή τους με τις πρωτεΐνες πλάσματος του αίματος.

Η πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP) χρησιμοποιείται από πολύ παλιά σε φαρμακευτικές εφαρμογές και έχει επιδείξει μεγάλο βαθμό βιοσυμβατότητας. Τα αμφιφιλικά παράγωγα της, S-PVP, όπου το ένα άκρο της PVP έχει καταληφθεί από το υδροφοβικό stearyl, περιέχουν υπολείμματα φωσφολιπιδίων, ενώ η μακριά αλυσίδα του αλκυλίου του έχει υδροφοβικό χαρακτήρα. Η συγχώνευση αμφιφιλικών πολυμερών της πολυβινυλοπυρρολιδόνης στις μεμβράνες των λιποσωματίων είχε ως

αποτέλεσμα την αύξηση της σταθερότητάς τους στο αίμα και τη μείωση της συγκέντρωσής τους στο ήπαρ των πειραματόζωων.

Τα λιποσωμάτια παράγονται ήδη εμπορικά στη βιομηχανία καλλυντικών ως συστατικά διαφόρων σκευασμάτων. Επιπλέον τα πρώτα ιατρικά προϊόντα που βασίζονται σε λιποσωμάτια βρίσκονται σε διαδικασία παραγωγής ενώ κλινικές μελέτες για πολλά άλλα είναι καθ' οδό.^{27,28,29} Μεγάλο κομμάτι της έρευνας για ανάπτυξη ανθρώπινων εμβολίων βασισμένων στα λιποσωμάτια έχει εστιαστεί στη χρήση συνθετικών αντιγόνων και ειδικότερα πεπτιδίων και ανασυνδυασμένων πρωτεΐνων. Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί λιποσωμικά εμβόλια που στοχεύουν στη μαλάρια³⁰, το AIDS³¹, την ηπατίτιδα A και τη γρίπη.³² Πρόσφατα εγκρίθηκε το πρώτο ανθρώπινο λιποσωμικό εμβόλιο, εναντίον της ηπατίτιδας A, το οποίο και κυκλοφόρησε στην Ευρωπαϊκή αγορά.

III.3 Ανοσοδραστικά Σκευάσματα

Η κατανόηση του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος, είναι σήμερα στόχος πολλών ερευνητικών προσπαθειών, γιατί αποτελεί μέσο καταπολέμησης κυρίως ενδογενών ασθενειών, αφού επιτρέπει την «εκπαίδευση» ειδικών κυτταρικών πληθυσμών τα οποία αποκτούν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να καταστρέφουν τον επιθυμητό στόχο.

Τα ανοσοδραστικά σκευάσματα προσελκύουν τελευταία όλο και περισσότερο ενδιαφέρον με σκοπό α) την αύξηση της αντίστασης του οργανισμού σε διάφορες και μερικές φορές πολύ βαριές ασθένειες (*immunostimulators*, εμβόλια), β) την προσπάθεια για κατευθυνόμενη μείωση της ανοσοαντίστασης (*immunodepresant*), γ) τη χρήση τους ως σκευάσματα σε ανοσοδιαγνωστικούς σκοπούς.

Η ανοσολογική δράση αυτών των σκευασμάτων εμφανίζεται ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασής τους με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτά περιέχουν κάποιο ανοσοενεργό παράγοντα συνδεδεμένο με ένα μακρομοριακό φορέα. Η παρουσία αυτού του φορέα εξασφαλίζει την πολυδιάστατη ή πολυμορφική αλληλεπίδραση με τα ανοσούπεύθυνα κύτταρα (*immunocompetent cells*). Συνήθως, στο ρόλο τέτοιων φορέων χρησιμοποιούνται υδατοδιαλυτά φυσικά ή συνθετικά μακρομοριακά προϊόντα ή μικροσωματίδια (π.χ. λιποσώματα).

Η πολύβινυλοπυρρολιδόνη (PVP) έχει μακρά ιστορία σε φαρμακευτικές εφαρμογές, καθώς παρουσιάζει βιοσυμβατότητα σε πολύ μεγάλο βαθμό. Πρόκειται για μια βιολογικά ανενεργή ουσία, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως ως «όχημα» μεταφοράς βιολογικά ενεργών ουσιών, κυρίως στα φάρμακα.^{33,34,35,36,37,38,39}

Δύο πολυμερικές οικογένειες, οι οποίες αποτελούν μήτρες χημικής ακινητοποίησης ουσιών, όπως πεπτίδια και μικρές πρωτεΐνες, εξετάστηκαν *in vitro* για την βιοδραστικότητα τους.⁴⁰ Στη μια πολυμερική οικογένεια το αμινοξύ(glycine, β-alanine, γ-aminobutyric και ε-aminocaproic acid) είναι συνδεδεμένο με τη πολυβινυλοπυρρολιδόνη και allylglycidyl αιθέρα (NVP-

AGE), ενώ στην άλλη τα ίδια αμινοξέα είναι συνδεδεμένα με εποξείδιο της πολύβινυλοπυρρολιδόνης (ENVP).⁴¹

Εξετάσθηκε αν τα παραπάνω πολυμερικά παράγωγα συμβάλλουν α) στην ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων και β) στην αύξηση ή στη καταστολή του πολλαπλασιασμού των Τ-λεμφοκυττάρων, εξαιτίας άλλων πολυκλωνικών διεγέρσεων των Τ-λεμφοκυττάρων ή κατά την παρουσία αντιγόνων.

Τα λεμφοκύτταρα είναι είδος λευκού αιμοσφαιρίου και παίζουν ζωτικό ρόλο στην άμυνα του σώματος. Τα περισσότερα είδη λεμφοκυττάρων παράγουν πρωτεΐνες που λέγονται αντισώματα. Αυτά χρησιμοποιούνται από το ανοσοποιητικό σύστημα για την καταστροφή βακτηρίων και άλλων ξένων κυττάρων. Τα λεμφοκύτταρα αναπτύσσονται μέσα στο λεμφικό σύστημα αν και αρχικά σχηματίζονται στο μυελό των οστών. Δεν κυκλοφορούν μόνο στο αίμα, αλλά και σε άλλα μέρη του σώματος.

Τα Τ-λεμφοκύτταρα είναι είδος λεμφοκυττάρων που επιτίθενται στους εισβολείς. Υπάρχουν τρία κύρια είδη Τ-λεμφοκυττάρων, καθένα από τα οποία δρα με ελαφρά διαφορετικό τρόπο. Τα φονικά Τ-λεμφοκύτταρα ανακαλύπτουν τα προσβεβλημένα κύτταρα του σώματος και προσκολλούνται πάνω τους. Κατόπιν, απελευθερώνουν χημικές ουσίες, τις λεμφοκίνες, που καταστρέφουν τα προσβεβλημένα κύτταρα μαζί με τα παθογόνα που περιέχουν. Τα βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα βοηθούν τα φονικά Τ-λεμφοκύτταρα και επίσης βοηθούν τα Β-λεμφοκύτταρα στην παραγωγή αντισωμάτων. Τα Τ-λεμφοκύτταρα μνήμης δε συμμετέχουν ενεργά στην ανοσοαντίδραση. Αντί γι' αυτό, απομνημονεύουν τα αντιγόνα έτσι ώστε να αντιμετωπίσουν γρήγορα τον εισβολέα, αν ξαναεμφανιστεί.

Τα αντιγόνα είναι κάθε ξένη ουσία που μπορεί να ενεργοποιήσει τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος. Τις περισσότερες φορές είναι μακρομόρια όπως οι πρωτεΐνες, οι οποίες, ενώ στην επιφάνεια του κυττάρου είναι βιολογικά και δομικά σταθερές, συνήθως χαρακτηρίζονται από αστάθεια όταν βρίσκονται σε διάλυμα.

IV. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΕΝΕΡΓΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ

IV.1 Σύνθεση πολυμερικών συμπλόκων του σορβικού οξέος^{18,52}

Παρασκευάστηκαν πολυμερικά σύμπλοκα του σορβικού οξέος, όπου το σορβικό οξύ συνδέεται με τον πολυμερικό φορέα (PVP) με δεσμό υδρογόνου.

Συγκεκριμένα 1g σορβικού οξέος προστίθεται σε 80 ml νερού, ενώ 40g PVP μοριακού βάρους $10*10^3$, $25*10^3$, $30*10^3$, $40*10^3$ προστίθενται σε 150 ml νερού. Αντίστοιχα 0.5g σορβικού οξέος προστίθενται σε 80 ml νερού και 9g PVP μοριακού βάρους $90*10^3$ ή $360*10^3$ προστίθενται σε 150 ml νερού. Τα παραπάνω διαλύματα θερμαίνονται σε υψηλή θερμοκρασία (θερμοκρασία βρασμού) μέχρι πλήρης διάλυσης του σορβικού οξέος και της PVP. Στην συνέχεια τα διαλύματα αναμιγνύονται, η θερμοκρασία ρυθμίζεται στους 100°C και τα διαλύματα συμπυκνώνονται σε τελικό όγκο 100 ml. Μετά το πέρας της αντίδρασης και την πτώση της θερμοκρασίας σε κανονικά επίπεδα το διάλυμα που προκύπτει πρέπει να είναι διαυγές, απαλλαγμένο από μικροκρυστάλλους, κάτι που σημαίνει ότι όλο το σορβικό οξύ έχει αντιδράσει με την PVP.

Με τον τρόπο αυτό παρασκευάζονται σύμπλοκα του σορβικού οξέος με την PVP μοριακού βάρους $10*10^3$, $25*10^3$, $30*10^3$, $40*10^3$, $90 *10^3$ και $360*10^3$.

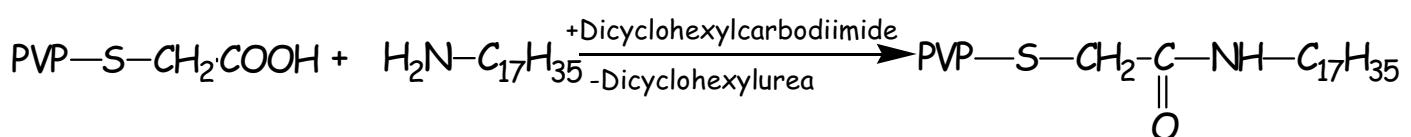
**IV.2 Σύνθεση Αμφιφιλικών Παραγώγων της
ΠολύΒινυλοπυρρολιδόνης**

Πρώτα παρασκευάσθηκε η PVP με το καρβοξυλικό άκρο και στη συνέχεια η υδροφοβική ομάδα ενώθηκε στο χημικά ενεργό άκρο του μορίου της PVP.

Ο πολυμερισμός της VP πραγματοποιήθηκε σε ατμόσφαιρα ξηρού αργού σε διάλυμα διοξανίου (2.5 mol/l), παρουσία του αντιδραστηρίου εικίνησης αζωδιισοβιουτυρο νιτρίλιο (0.06 mol/VP mol) για 1 ώρα στους 70°C .

Για την παρασκευή του καρβόξυ τελικού PVP με διάφορα μοριακά βάρη, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές ποσότητες μερκαπτοαιθανικού οξέος ($0.4 - 1.2 \text{ mol/VP mol}$).

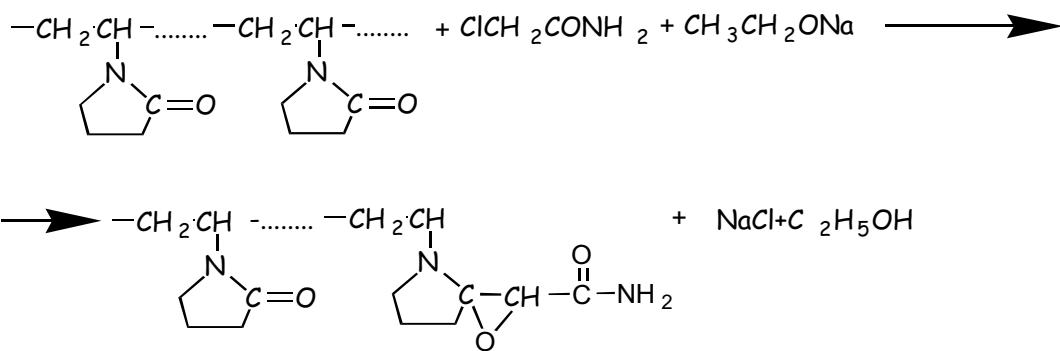
To stearyl - PVP (S-PVP) μπορεί να παρασκευαστεί με επίδραση της στεαρυλαμίνης στο καρβόξυ - PVP. Για την ενεργοποίηση του καρβοξυλικού άκρου της PVP, προστέθηκε σε διάλυμα καρβόξυ - PVP σε ξηρό διοξάνιο (1 mol/l) περίσσεια N, N' - δικυκλοέξυλο καρβοδιιμίδιο. Το μίγμα αναδεύτηκε για 1 ώρα στους 0°C και προστέθηκε περίσσεια διαλύματος στεαρυλαμίνης σε ισοπροπανόλη. Το νέο μίγμα επωάστηκε για 2 ώρες στους 60°C . Στη συνέχεια το ίζημα της N, N' - δικυκλοεξυλουρία απομακρύνθηκε με διήθηση και το πολυμερές καταβυθίστηκε σε διαιθυλαιθέρα, ξεπλύθηκε με αιθέρα και ξηράνθηκε σε κενό.⁴²



IV.3 Σύνθεση πολυμερών της Πολυβινυλοπυρρολιδόνης που περιέχουν αμινοξέα.

Το εποξείδιο της PVP, παρασκευάζεται με αντίδραση της PVP με χλωροακεταμίδιο παρουσία αιθοξειδίου του νατρίου σε αιθανόλη ακολουθώντας γνωστή από την βιβλιογραφία μέθοδο Darzani⁴³.

Συγκεκριμένα για τη δημιουργία του εποξειδίου της PVP αντιδρούν: 25gr (0.225moles) PVP μοριακού βάρους 10×10^3 , 40×10^3 και 360×10^3 , καθώς και 7gr (0.076moles) χλωροακεταμίδου σε 200ml απόλυτης αιθανόλης. Στο διάλυμα αυτό προστίθεται σταδιακά για χρονικό διάστημα 2 ωρών ποσότητα αιθανολικού διαλύματος αιθοξειδίου του νατρίου συνολικής μάζας 5gr (0.217moles) σε νάτριο. Το μίγμα αφήνεται να αντιδράσει για άλλες 2 ώρες στους $10-12^\circ C$. Το παραγόμενο ίζημα φιλτράρεται, πλένεται με αιθανόλη, επαναδιαλύεται σε ξηρή ακετόνη (για απομάκρυνση του χλωριούχου νατρίου το οποίο δεν είναι διαλυτό σε αυτή) και κατακρημνίζεται με ξηρό διμεθυλοσουλφοξάνιο(DMSO). Με τον τρόπο αυτό παρασκευάζεται το εποξείδιο της PVP με περιεκτικότητα σε επόξυ ομάδες 7.2-11.2% (σχήμα IV.2-1).



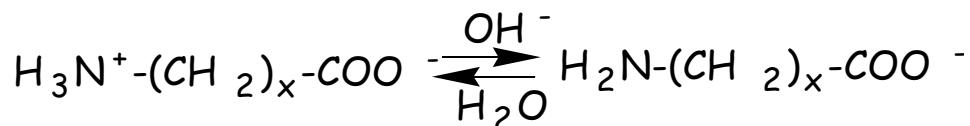
Σχήμα IV.2-1 Η αντίδραση παρασκευής του εποξειδίου της PVP

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε επόξυ ομάδες γίνεται με αντίδραση του σχηματισμένου εποξειδίου με υδροχλωρικό οξύ. Με την επίδραση του συγκεκριμένου οξέος ο εποξειδικός δεσμός σπάει. Η ποσότητα

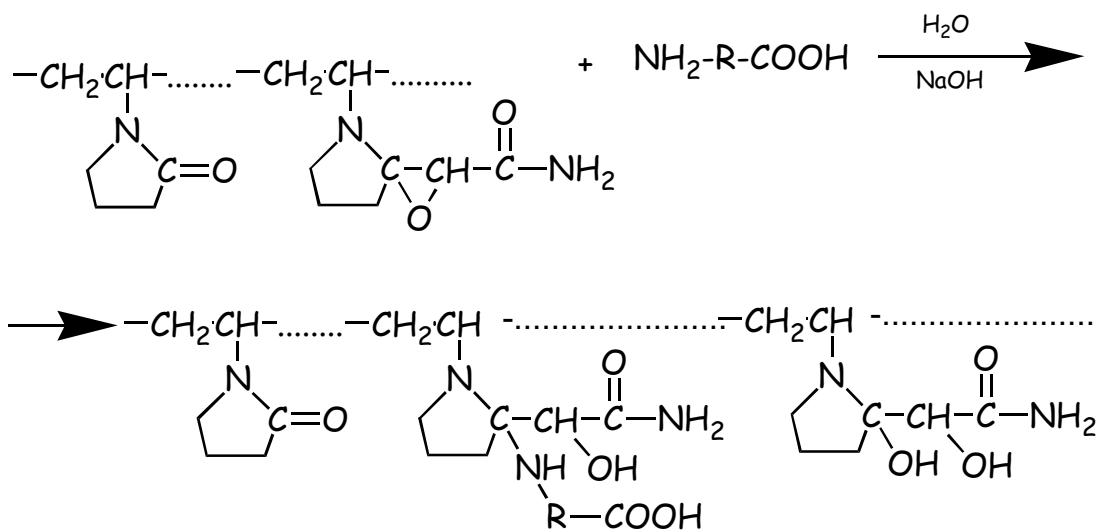
του υδροχλωρικού οξέος που δεν αντιδρά εξουδετερώνεται με καυστικό κάλιο. Από την ποσότητα του καυστικού καλίου που χρησιμοποιήθηκε για την εξουδετέρωση μπορούμε να βρούμε την ποσότητα υδροχλωρικού οξέος που έχει παραμείνει στο διάλυμα και κατά συνέπεια την περιεκτικότητα των επόξυ ομάδων της PVP.

Οι ενώσεις που περιέχουν εποξειδικές ομάδες είναι σταθερές σε ουδέτερο περιβάλλον. Οι ενώσεις αυτές εύκολα αντιδρούν σε όξινο και βασικό περιβάλλον με άνοιγμα του εποξειδικού δακτυλίου. Τα αμινοξέα είναι αμφοτερικές ενώσεις και έτσι βασικά άλατα χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των προϊόντων που είναι συνδεδεμένα με τις αμινο-ομάδες.

Μια άλλη δυνατότητα είναι η αντίδραση να γίνεται σε βασικό περιβάλλον. Το γεγονός αυτό εξηγείται από τις zwitter ion ιδιότητες των αμινοξέων που παρουσία ομάδων υδροξυλίου προσλαμβάνουν βασικές ιδιότητες.



Η αντίδραση του εποξειδίου της PVP με τα αμινοξέα γλυκίνη, β-αλανίνη, γ-αμινοβουτυρικό και ε-αμινοκαπροικό γίνεται σύμφωνα με το σχήμα που ακολουθεί. Η αμινο-ομάδα προσβάλλει το άτομο άνθρακα στον οξιρανικό δακτύλιο σύμφωνα με τον κανόνα του Krausky.



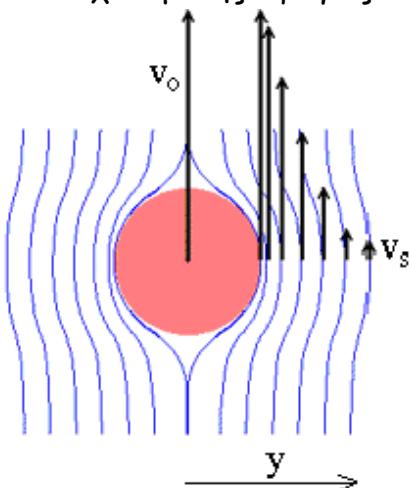
Η δυνατότητα της προσθήκης της αμινο-ομάδας στο άτομο άνθρακα του οξιρανικού δακτυλίου κοντά στον πενταμελή δακτύλιο υποστηρίζεται από την διερεύνηση της αντίδρασης μεταξύ της γλυκίνης και της μικρομοριακής εποξειδικής μέθυλο-πυρρολιδόνης (προσθήκη A). Εποξειπολύβινυλοπυρρολιδόνη με περιεκτικότητα σε επόξυ ομάδες 10% και κατάλληλη ποσότητα αμινοξέος διαλύονται σε απεσταγμένο νερό και προστίθεται διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου, για τέσσερις ώρες σε Θερμοκρασία δωματίου. Λόγω της καταλυτικής δράσης της σχηματιζόμενης δευτεροταγούς αλκοολικής ομάδας (αυτή η ομάδα έχει υψηλή νουκλεοφιλικότητα), η αντίδραση μεταξύ των πολυμερών που περιέχουν εποξειδικές ομάδες και των αμινών επιταχύνεται και αυξάνει η απόδοση σε προϊόντα. Η αντίδραση γίνεται σε περίσσεια αμινοξέος (περίπου 20 φορές) σε σύγκριση με τη συγκέντρωση των εποξειδικών ομάδων, επειδή η απόδοση αυξάνει με την αύξηση της ποσότητας του αμινοξέος. Τα προϊόντα καθαρίζονται με διύλιση και ξηραίνονται λυοφιλικά.⁴⁴

V. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΣΚΕΔΑΣΗΣ ΑΚΤΙΝΩΝ LASER

Σήμερα τα όργανα μέτρησης διαστάσεων σωματιδίων έχουν ξεπεράσει κατά πολύ το όριο των οπτικών μικροσκοπίων. Οι σημερινές τεχνικές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε:

- Άμεσης απεικόνισης όπως το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και η κρυσταλλογραφία ακτίνων X, όπου το διαλυτικό μέσο εξαφανίζεται και δημιουργείται μια ψευτο-φωτογραφία του σωματιδίου.
- Έμμεσης απεικόνισης όπως η στατική σκέδαση φωτός που παρουσιάζει μια συνολική μέση ακτίνα από το εξεταζόμενο δείγμα. Το αποτέλεσμα όμως αυτό δεν μας δίνει πληροφορίες για την κατανομή των μεγεθών των διαφόρων σωματιδίων.
- Διάχυσης όπως η δυναμική σκέδαση φωτός, που στηρίζεται στην επίδραση του συντελεστή τριβής στη διάχυση του υπό εξέταση σωματιδίου. Ο συντελεστής τριβής δηλώνει την αντίσταση που συναντά η επιφάνεια του σωματιδίου κατά τη μετακίνησή του σ' ένα υγρό. Η ακτίνα που προκύπτει από αυτές τις τεχνικές ονομάζεται υδροδυναμική και υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τη σχέση Stokes- Einstein.

Το μοντέλο Stokes αναφέρεται στην κίνηση σκληρών σφαιρών μέσα σε υγρό. Η αντίσταση στην κίνησή τους σχετίζεται με τη δύναμη ανάμεσα στο υγρό και την επιφάνεια της επιταχυνόμενης σφαίρας.⁸



Κίνηση σκληρής σφαίρας μέσα σε υγρό.

Η συνολική δύναμη που ασκείται από το υγρό δίνεται από τη σχέση :

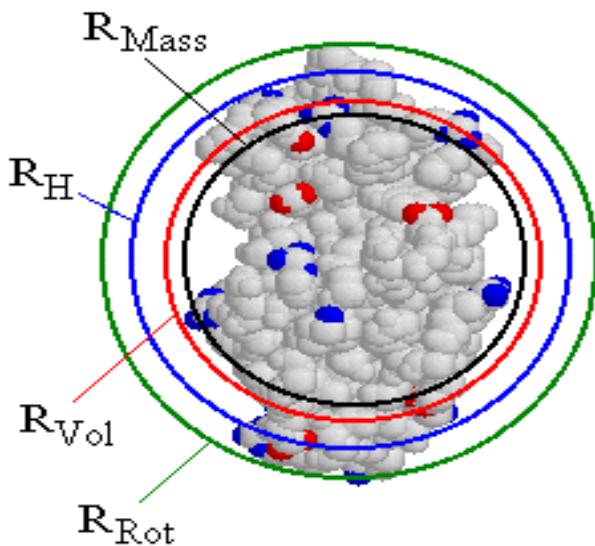
$$F=6\pi\eta R(v_s)$$

Ο παράγοντας $f=6\pi\eta R$, ονομάζεται συντελεστής τριβής και χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί η ακτίνα του σωματιδίου μέσω του συντελεστή διάχυσης D.

Σύμφωνα με την εξίσωση του Stokes-Einstein

$$D = \frac{kT}{f} = \frac{kT}{6\pi\eta R} \Rightarrow R = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (34)$$

Η ακτίνα που προκύπτει από τη μέθοδο διάχυσης σκληρών σφαιρών, μπορεί να υποτεθεί ότι είναι η ακτίνα του εξεταζόμενου σωματιδίου που κινείται με την ίδια ταχύτητα.



Η υπόθεση όμως αυτή δεν είναι απόλυτα σωστή, γιατί στην πραγματικότητα τα μακρομόρια που μας ενδιαφέρουν δεν είναι σφαιρικά. Συνεπώς η ακτίνα που υπολογίζουμε είναι ενδεικτική του πραγματικού μεγέθους του σωματιδίου και ονομάζεται «υδροδυναμική ακτίνα».⁴⁵



V.1 Πολυμερικά Σύμπλοκα του Σορβικού Οξέος

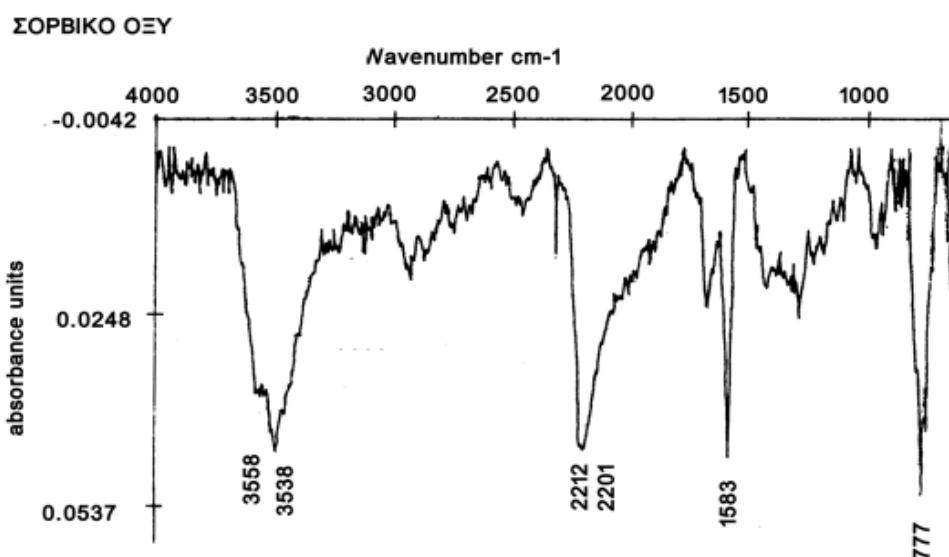
Οι πρόσθετες ουσίες βρίσκουν εφαρμογή ως μέσα συντήρησης των τροφίμων και της προστασίας αυτών από βακτήρια. Το σορβικό οξύ (E200) (ή 2,4-hexadienoic acid ή 2-propenylacrylic acid) είναι οργανικό οξύ με μικρή ανθρακική αλυσίδα. Η χρήση του στη βιομηχανία των τροφίμων είναι αρκετά διαδεδομένη ως πρόσθετο και λειτουργεί ως συντηρητικό. Χρησιμοποιείται κατά πρώτο λόγο για να βελτιώσει κάποιες οργανοληπτικές ιδιότητες (ειδική γεύση) των τροφίμων, την τροποποίηση του pH τους και μερικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων όπως ιξώδες, ρεολογικές συνθήκες κ.α. Επιπλέον χρησιμοποιούνται για την αντιβακτηριακή και τη μυκοστατική δράση (έναντι παθογόνων ή δυνητικά παθογόνων μυκήτων), ενώ πιθανολογείται ότι επιδρά στην τοξικόγεννη σημέπεια στη μείωση της παραγωγής των μυκοτοξινών από τους μύκητες. Έχει ισχυρή μυκοστατική δράση, αλλά περιορισμένη αντιμικροβιακή δράση.

Διερευνήσαμε με δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) την πολυμερική δομή των συμπλόκων του σορβικού οξέος, ενώ με χρήση της υπολογιστικής φυσικής εξαγάγαμε χρήσιμες πληροφορίες για το σχηματιζόμενο δεσμό υδρογόνου ανάμεσα στη PVP και το σορβικό οξύ.

V.1α. Μελέτη της δομής των πολυμερικών συμπλόκων του σορβικού οξέος με Υπολογιστική Χημεία.

Ο προσδιορισμός και η εξακρίβωση του είδους του δεσμού μεταξύ σορβικού οξέος και PVP στα πολυμερικά σύμπλοκα καθώς και της επίδρασης του μοριακού βάρους της PVP στη δημιουργία του δεσμού έγινε με φασματοσκοπία IR.¹⁸

Χρησιμοποιήθηκαν σύμπλοκα με περιεκτικότητα σορβικού οξέος 5%. Παρόλο που η περιεκτικότητα του σορβικού οξέος είναι η ίδια σε όλα τα σύμπλοκα σε μερικά από αυτά παρατηρείται ελεύθερο οξύ. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από την εμφάνιση κορυφής στα 2200 cm^{-1} στο φάσμα των συμπλοκών του σορβικού οξέος η οποία αποδίδεται στο ελεύθερο οξύ. Η μεγαλύτερη ποσότητα ελεύθερου οξέος παρατηρείται στο σύμπλοκο με μοριακό βάρος 10×10^3 (Σχήμα V.2), ενώ αντίθετα δεν παρατηρείται ελεύθερο οξύ στο σύμπλοκο με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος 360×10^3 (Σχήμα V.3). Συνεπώς όσο μεγαλύτερο είναι το μοριακό βάρος του συμπλόκου τόσο καλύτερη η συμπλοκοποίηση του σορβικού οξέος.



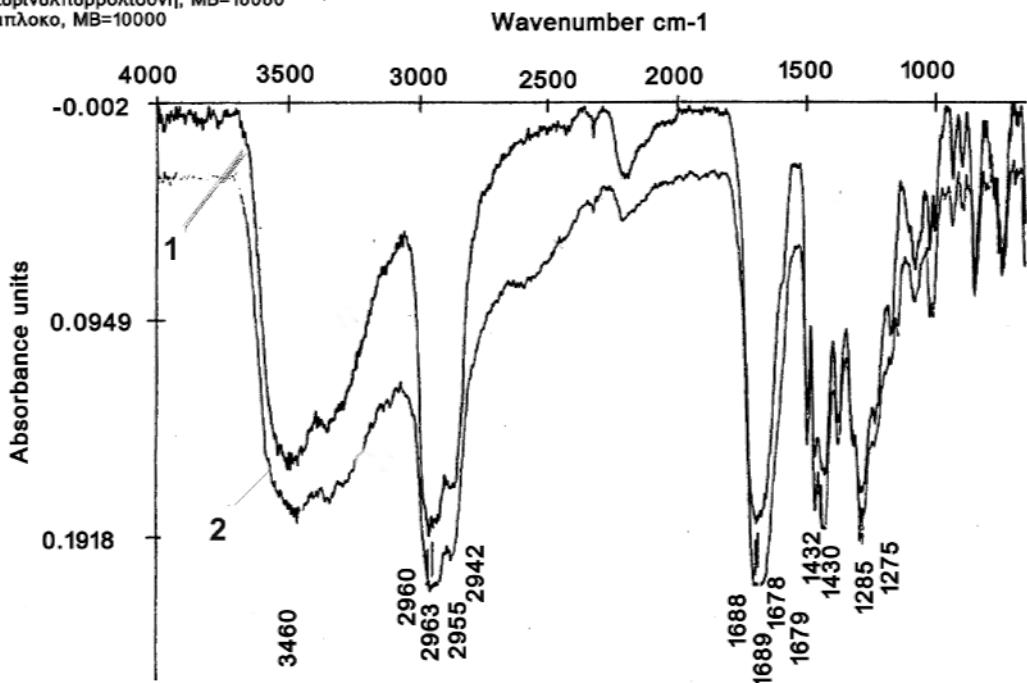
Σχήμα V.1 : Φάσμα υπερύθρου (IR) του σορβικού οξέος¹⁸

¹⁸ Διδακτορική διατριβή του Τζατζαράκη Εμμανουήλ, Σύνθεση και βιολογική έρευνα χημειοθεραπευτικών ελεγχόμενης απόδοσης για τον έλεγχο των μυκοτοξικώσεων και μυκητιάσεων, Ηράκλειο 2000.

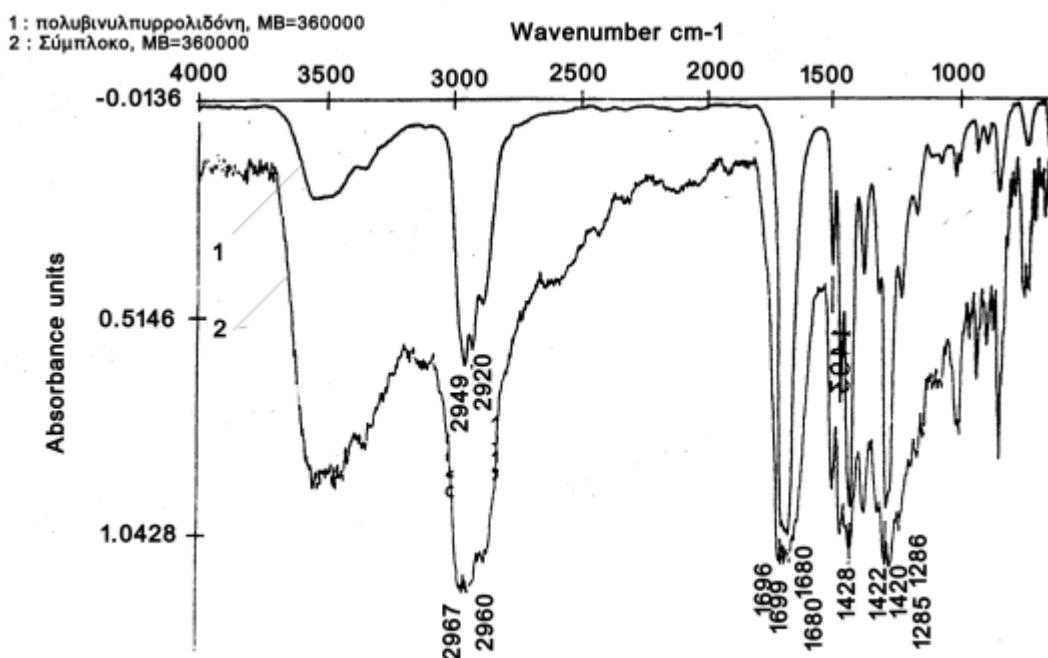
Επίσης τα φάσματα των συμπλοκών παρουσιάζουν απορρόφηση στην περιοχή $2400\text{-}2600\text{cm}^{-1}$ οι οποίες δεν υπάρχουν στα φάσματα της πολύβινυλοπυρρολιδόνης. Συνήθως σε τέτοια συστήματα το φαινόμενο αυτό αποδίδεται στην εμφάνιση του υδρογονικού δεσμού (δεσμευμένο -OH, δόνηση τάσης). Η χαρακτηριστική περιοχή απορρόφησης του υδρογονικού δεσμού ανάμεσα σε υδροξυλικές ομάδες είναι περίπου στις 3350cm^{-1} . Όσο πιο ισχυρός είναι ο υδρογονικός δεσμός, τόσο χαμηλότερη είναι η συχνότητα απορρόφησης του στο IR. Έτσι οι υδροξυλικές ομάδες σε καρβοξυλικά οξέα εμφανίζουν πιο ισχυρούς υδρογονικούς δεσμούς και κατά συνέπεια η περιοχή απορρόφησής τους είναι ακόμα χαμηλότερα.

Η ένταση της απορρόφησης αυτής αυξάνεται από τα σύμπλοκα με μικρά μοριακά βάρη σε αυτά με μεγαλύτερα μοριακά βάρη. Αυτό ισχυροποιεί την άποψη ότι η δημιουργία του συμπλόκου πραγματοποιείται με δεσμό υδρογόνου μεταξύ του πρωτονίου του καρβοξυλίου του οξέος και του καρβονυλίου του δακτυλίου της πολυβινυλοπυρρολιδόνης.¹⁸

1: Πολυβινυλοπυρρολιδόνη, MB=10000
2 : Σύμπλοκο, MB=10000



Σχήμα V.2 : Φάσμα υπερύθρου (IR) της πολυβινυλοπυρρολιδόνης μοριακού βάρους 10^4 (1) και του συμπλόκου 1 με μοριακό βάρος 10^4 (2)¹⁸



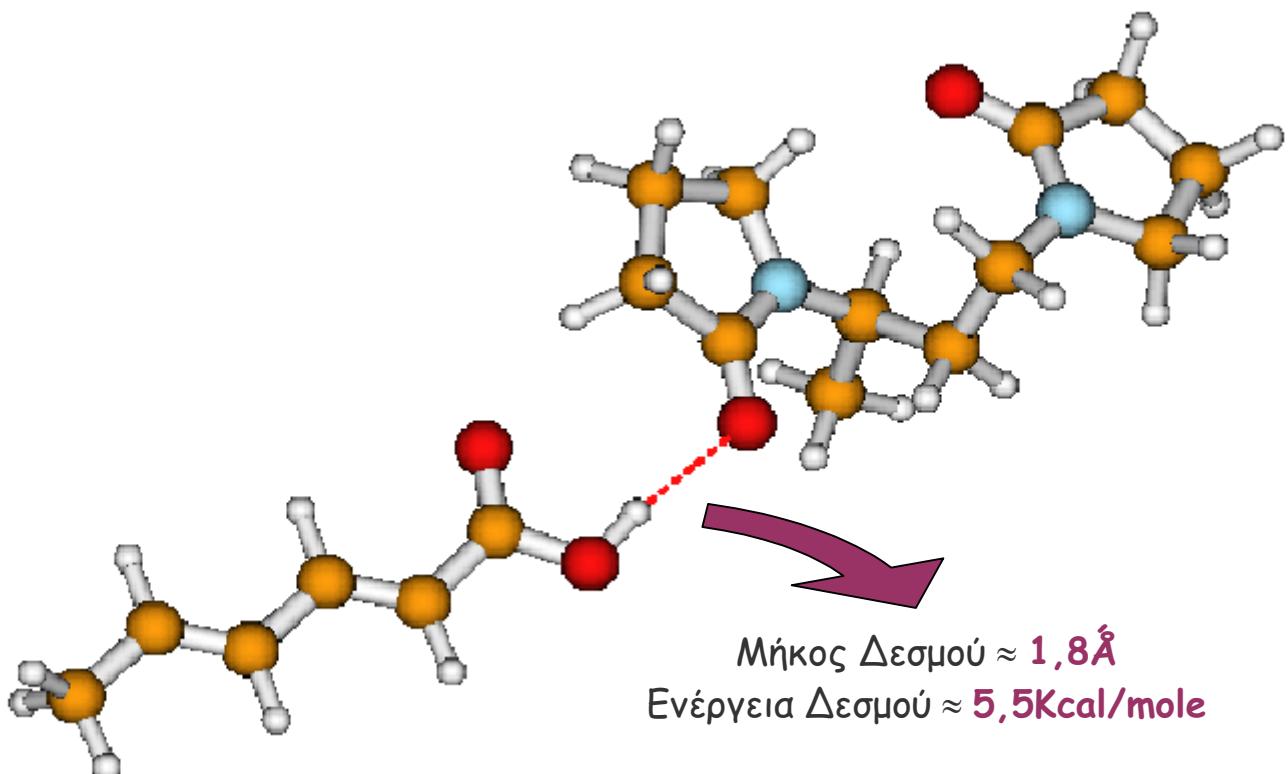
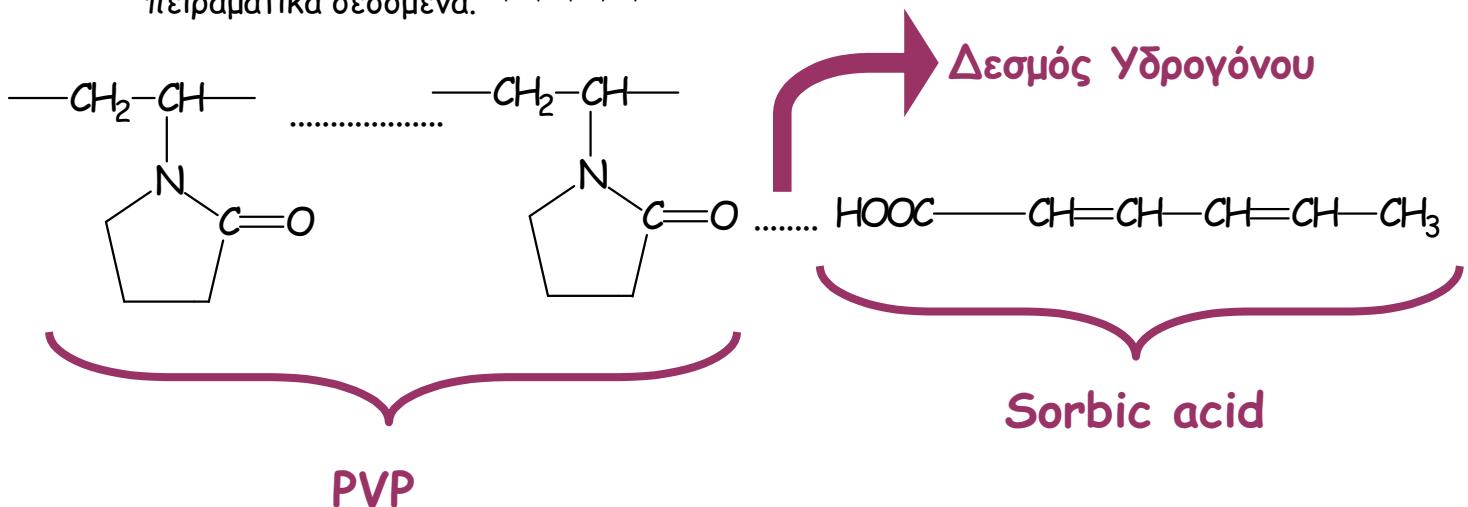
Σχήμα V.3 : Φάσμα υπερύθρου (IR) της πολυβινυλοπυρρολιδόνης μοριακού βάρους 360×10^3 (1) και του συμπλόκου 6 με μοριακό βάρος 360×10^3 (2)¹⁸

Τα παραπάνω επιβεβαιώθηκαν μέσω της υπολογιστικής Χημείας με το υπολογιστικό πακέτο Gaussian, όπου έγινε χρήση των ημιεμπειρικών μεθόδων. Οι ημιεμπειρικές μέθοδοι (semi empirical methods) στηρίζονται στο σκελετό των ab initio υπολογισμών και χρησιμοποιούν διαφορετικές προσεγγίσεις κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να πετύχουν όσο το δυνατόν τη μεγαλύτερη απλοποίηση στους υπολογισμούς. Έχουν προταθεί διάφορες ημιεμπειρικές μέθοδοι που καθεμία περιλαμβάνει ορισμένες προσεγγίσεις, από το βαθμό των οποίων καθορίζεται η ακρίβεια των αποτελεσμάτων που μας δίνουν. Αυτό είναι και το κυριότερο μειονέκτημα αυτών των μεθόδων που όμως είναι τελικά μικρής σημασίας αν λάβουμε υπόψη τις σημαντικές απλοποίησεις των υπολογισμών που επιφέρουν οι χρησιμοποιούμενες προσεγγίσεις.

Μια προσέγγιση η οποία χρησιμοποιείται αρκετές φορές στις ημιεμπειρικές μεθόδους, είναι η απόρριψη των εσωτερικών τροχιακών, που μαζί με τους πυρήνες αποτελούν τα cores και συνήθως αναφέρεται ως προσέγγιση των ηλεκτρονίων σθένους (valence electron approximation).

Είναι γενικά μια αποδεκτή αρχή αφού οι ιδιότητες του χημικού δεσμού των ατόμων εξαρτώνται μόνο από τα εξωτερικά τους ηλεκτρόνια ή ηλεκτρόνια σθένους.

Για να αντισταθμιστούν όλες αυτές οι προσεγγίσεις τα εναπομείναντα ολοκληρώματα τίθενται ως παράμετροι, που η τιμή τους καθορίζεται από πειραματικά δεδομένα.^{46,47,48,49,50,51}



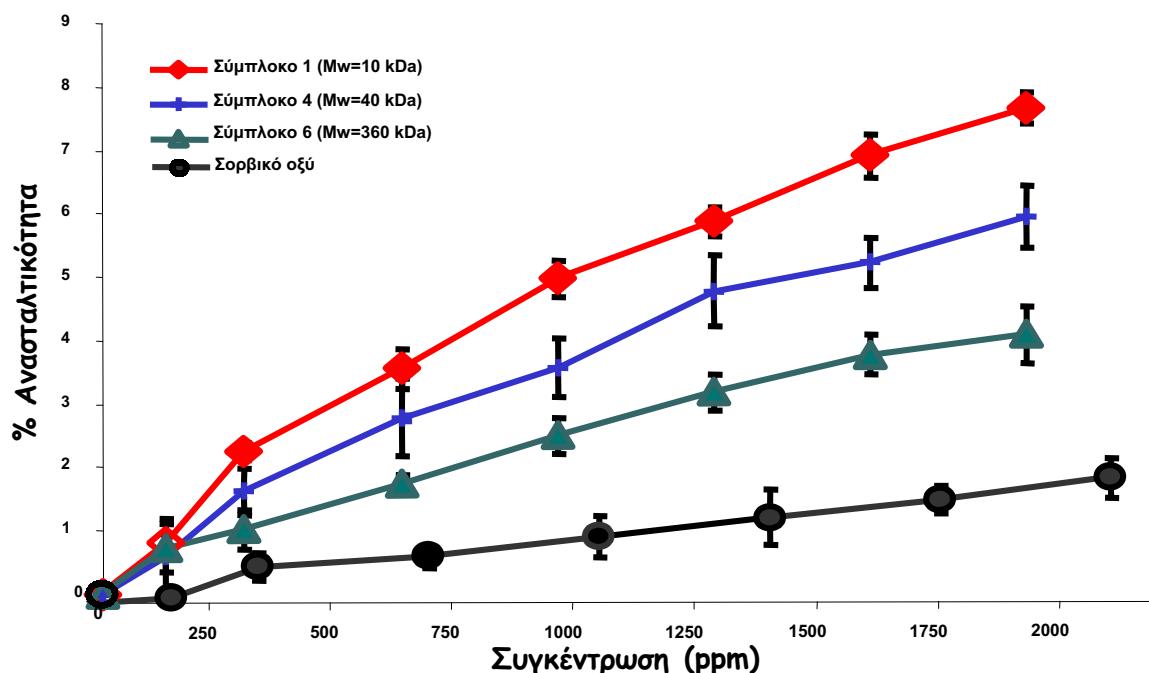
Χρησιμοποιώντας τις ημιεμπειρικές μεθόδους PM3 (Parametric Method 3) και AM1 (Austin Model 1) ισχυροποιήθηκε η άποψη ότι η δημιουργία συμπλόκου πραγματοποιείται με δεσμό υδρογόνου μεταξύ του πρωτονίου του καρβοξυλίου του οξέος και του καρβονυλίου του δακτυλίου της πολυβινυλοπυρρολιδόνης.

Επιπλέον προσδιορίσαμε το μήκος και την ενέργεια του υδρογονικού δεσμού (μήκος δεσμού 1,8 Å και ενέργεια δεσμού 5,5 Kcal/mol). Η παραπάνω τιμή για την ενέργεια δεσμού υδρογόνου έρχεται σε συμφωνία με τα στοιχεία της βιβλιογραφίας σύμφωνα τα οποία ο σχηματισμός δεσμού υδρογόνου ελευθερώνει ενέργεια, η οποία είναι **2-10 Kcal/mol**.

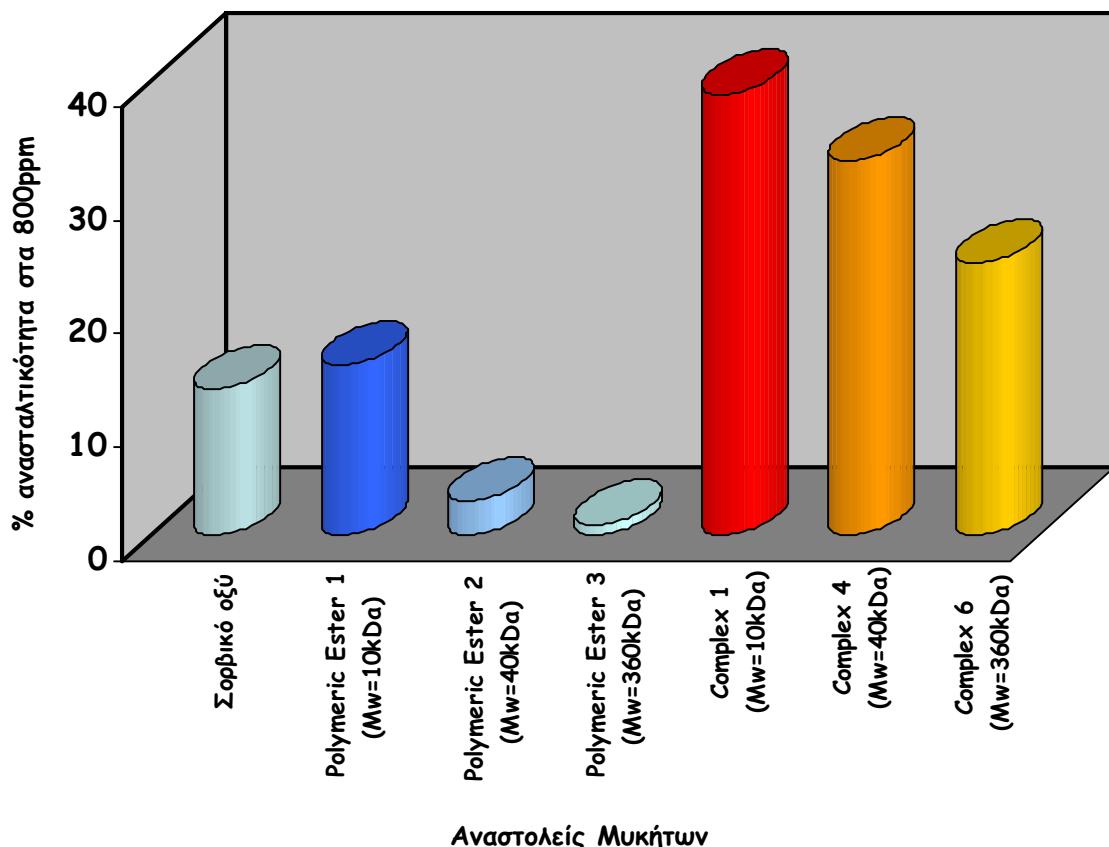
V.1β. Μελέτη της Βιολογικής Δράσης των πολυμερικών συμπλόκων του σορβικού οξέος.

Μελέτες έχουν δείξει ότι οργανικά οξέα, με μικρή ανθρακική αλυσίδα, όπως του σορβικού οξέος, μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη των παθογόνων ή δυνητικά παθογόνων μυκήτων, αλλά και να μειώσουν την παραγωγή των μυκοτοξινών. Οι ουσίες αυτές θεωρείται ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη του μύκητα ή τον σκοτώνουν, καταστρέφοντας την εκλεκτική διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης και μεταβάλλοντας τη δίοδο ουσιών που αποτελούν τροφή για τον μύκητα.

Όταν προστέθηκε PVP, σε συγκεντρώσεις από 0 έως 100 mg/ml χωρίς την παρουσία σορβικού οξέος, δεν παρατηρήθηκε καμιά επίδραση στη βλαστική ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*.^{18,52}



Σχήμα V.4 : Επίδραση του σορβικού οξέος (σε υδατικό διάλυμα), του συμπλόκου 1 ($M_w=10 \times 10^3$), του συμπλόκου 4 ($M_w=40 \times 10^3$) και του συμπλόκου 6 ($M_w=360 \times 10^3$) στη βλαστική ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* στους 27°C, στο σκοτάδι.^{18,52}



Σχήμα V.5 : Τιμές % της ανασταλτικότητας στη βλαστική ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium oxysporum* σε συγκέντρωση 800 ppm του σορβικού οξέος (σε υδατικό διάλυμα) των πολυμερικών εστέρων 1, 2, και 3 με μοριακά βάρη 10×10^3 , 40×10^3 και 360×10^3 αντίστοιχα και των συμπλόκων 1, 4 και 6 με μοριακά βάρη 10×10^3 , 40×10^3 και 360×10^3 αντίστοιχα.^{18,52}

Από τα παραπάνω Σχήματα παρατηρείται ότι όλα τα σύμπλοκα παρουσιάζουν καλύτερη βιολογική δράση από το ίδιο το σορβικό οξύ σε υδατικό διάλυμα. Επιπλέον η δραστικότητα των συμπλόκων είναι συνάρτηση του μοριακού τους βάρους. Τη μεγαλύτερη βιολογική δράση εμφανίζεται να έχει το σύμπλοκο 1 με μοριακό βάρος 10×10^3 και τη μικρότερη τα σύμπλοκα 5 και 6 με μοριακά βάρη 90×10^3 και 360×10^3 αντίστοιχα. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι η βιολογική δράση των συμπλόκων οφείλεται στο σορβικό οξύ, εφόσον η PVP είναι, όπως αποδείχθηκε, αδρανές υλικό και δεν επιφέρει καμιά επίδραση στη βλάστηση του μύκητα.

V.1γ. Χαρακτηρισμός των πολυμερικών συμπλόκων του σορβικού οξέος με Σκέδαση Φωτός.

**Σύμπλοκα σορβικού οξέος με την πολυβινυλοπυρρολιδόνη
(διαφορετικού μοριακού βάρους, ίδιας αναλογίας)**

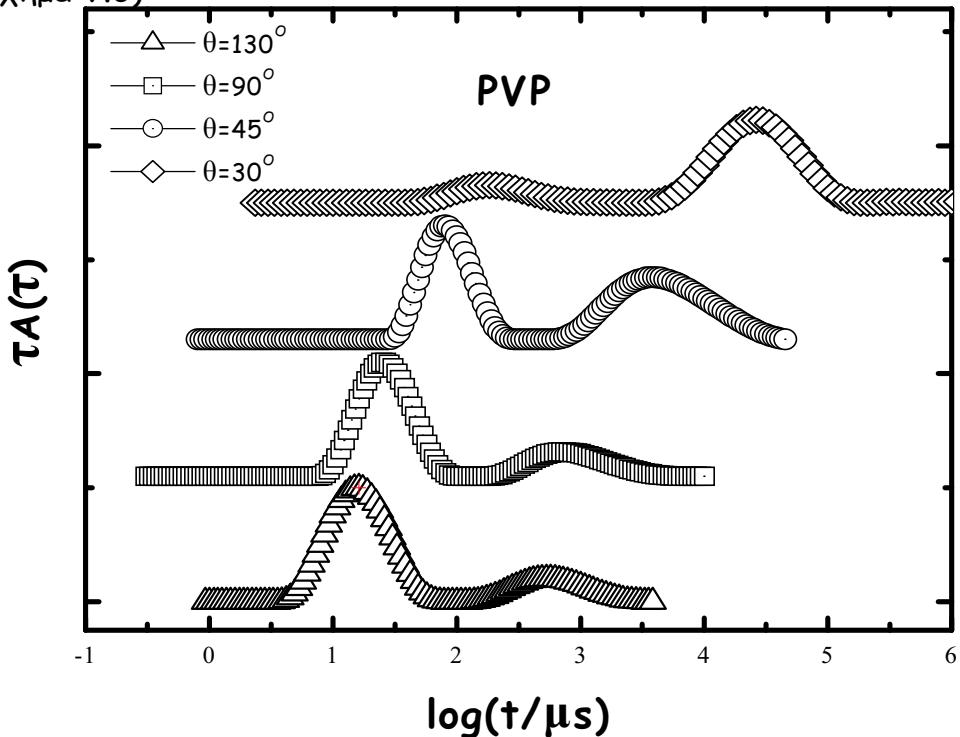
Πολυμερικό Δείγμα	Αναλογία ΣΟ:ΡΒΡ	% w/w σε σορβικό οξύ	Μοριακό βάρος ΡΒΡ
Δείγμα 0	0.25:2.5	10	2600
Δείγμα 1	0.25:10	2.5	10000
Δείγμα 2	0.25:10	2.5	25000
Δείγμα 3	0.25:10	2.5	30000
Δείγμα 4	0.25:10	2.5	40000
Δείγμα 5	0.25:10	2.5	90000
Δείγμα 6	0.25:10	2.5	360000

**Σύμπλοκα σορβικού οξέος με την πολυβινυλοπυρρολιδόνη
(ίδιου μοριακού βάρους, διαφορετικής αναλογίας)**

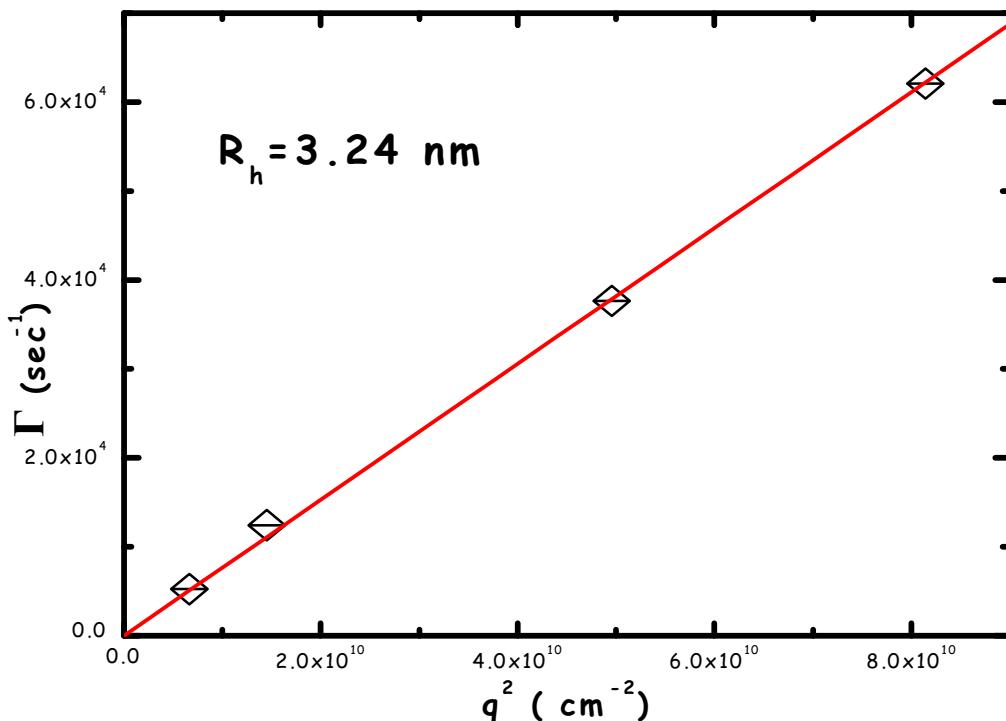
Πολυμερικό Δείγμα	Αναλογία ΣΟ:ΡΒΡ	% w/w σε σορβικό οξύ	Μοριακό βάρος ΡΒΡ
Δείγμα α	0.0625:20	0.3125	10000
Δείγμα β	0.125:20	0.625	10000
Δείγμα γ	0.25:20	1.25	10000
Δείγμα δ	0.5:20	2.5	10000
Δείγμα ε	0.75:20	3.75	10000

Μελέτη της πολυβινυλοπυρρολιδόνης

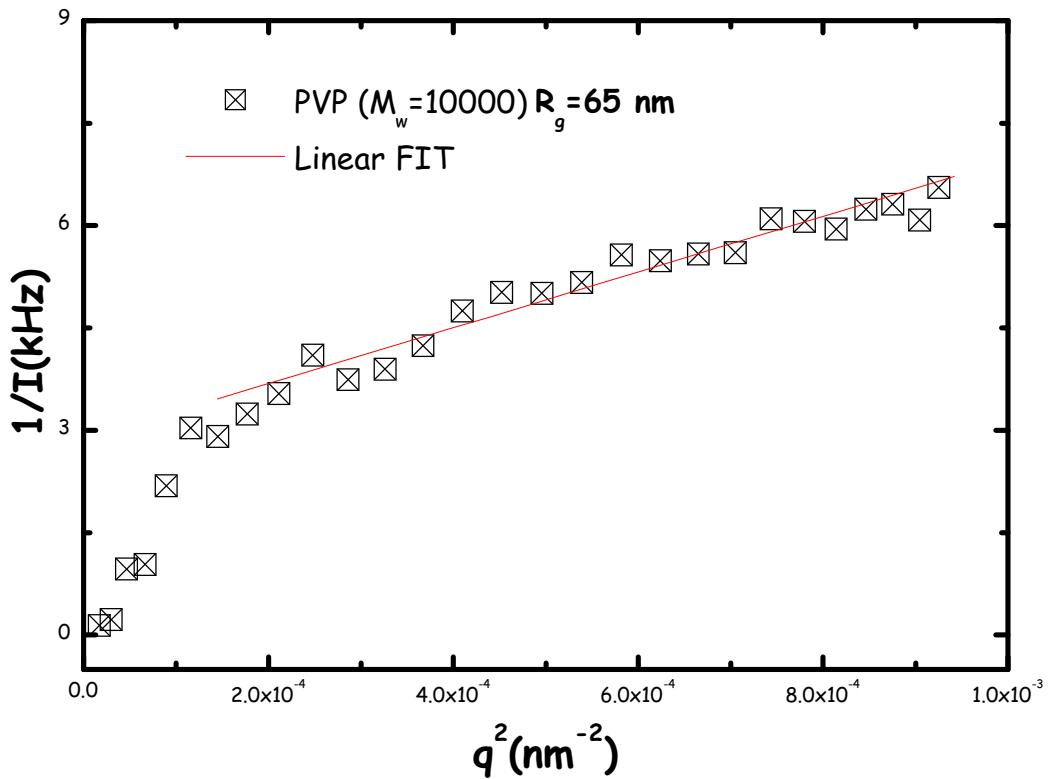
Από τη μελέτη της PVP μέσω της δυναμικής σκέδασης φωτός, παρατηρήθηκαν δύο δυναμικές διαδικασίες, μια γρήγορη και μια αργή (σχήμα V.6)



Σχήμα V.6 : Κατανομή των χρόνων όπως προέκυψε από τον αντίστροφο μετασχηματισμό Laplace με χρήση του CONTIN για τη PVP με $M_w=10000D$.



Σχήμα V.7 : Ο ρυθμός χαλάρωσης $\Gamma=1/\tau$ με το q^2 για τη γρήγορη διαδικασία της PVP με $M_w=10000D$



Σχήμα V.8 : Το αντίστροφο της σκεδαζόμενης έντασης ως συνάρτηση του q^2 όπως προκύπτει από μετρήσεις Στατική Σκέδαση Φωτός

Όπως παρατηρούμε στο σχήμα V.7, οι χρόνοι χαλάρωσης, για τη γρήγορη διαδικασία, είναι ανάλογοι του τετραγώνου του διανύσματος σκέδασης q . Η κλίση της καμπύλης δίνει τον συντελεστή διάχυσης D , αφού $\Gamma = Dq^2$, ενώ από την εξίσωση Stokes - Einstein (σχέση 34) υπολογίζεται η υδροδυναμική ακτίνα. Για την PVP, η υδροδυναμική ακτίνα, από τη γρήγορη διαδικασία υπολογίστηκε στα $3,24 \text{ nm}$.

Σε πειράματα δυναμικής σκέδασης φωτός που έχουν γίνει σε υδατικά διαλύματα της PVP, για μεγάλη περιοχή συγκεντρώσεων, παρατηρούνται δύο διαδικασίες διάχυσης σε ημιαραιά συστήματα, ενώ σε αραιά συστήματα παρατηρείται συνήθως μια διαδικασία. Η αργή διαδικασία αποδίδεται σε συσσωματώματα (clusters) που δημιουργούνται από χαλαρά μπλεγμένες αλυσίδες.⁵³

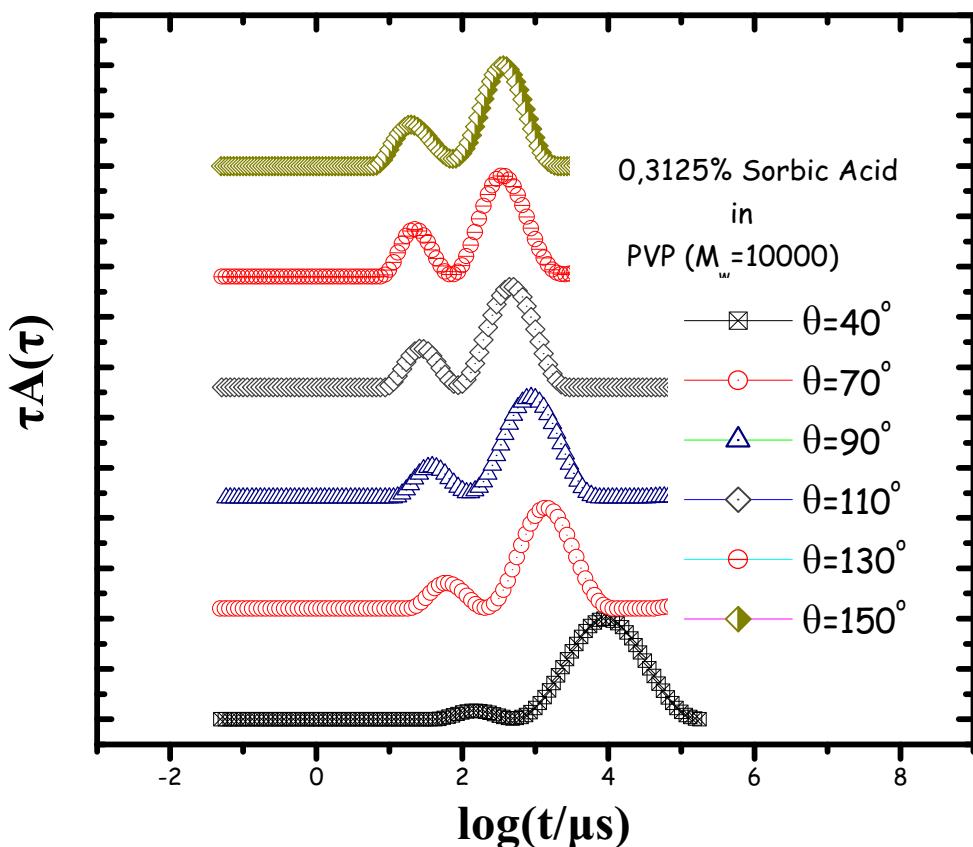
Οι μετρήσεις της στατικής σκέδασης φωτός δίνουν πληροφορίες για τα συσσωματώματα (cluster) που δημιουργούνται από τις πολυμερικές αλυσίδες της PVP. Μέσω αυτής της τεχνικής υπολογίστηκε η γυροσκοπική ακτίνα R_g αυτών των συσσωματωμάτων γύρω στα 65 nm (Σχήμα V.8).

Μελέτη συμπλόκων με διαφορετική αναλογία σορβικού οξέος/PVP.

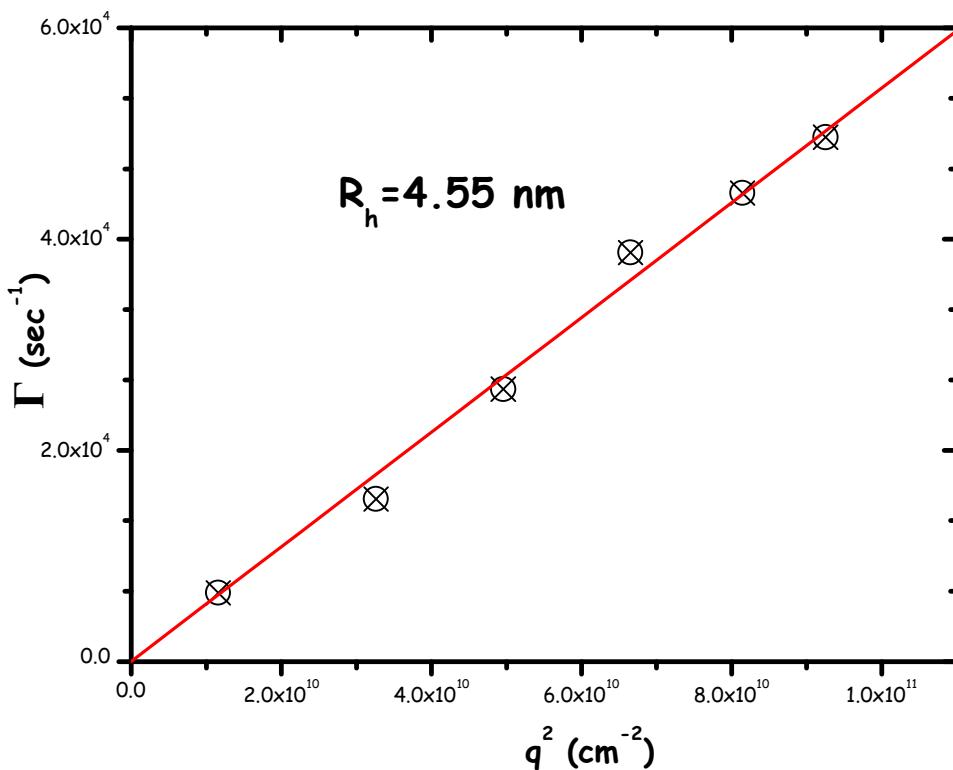
Από τα σύμπλοκα του σορβικού οξέος με την πολυβινυλοπυρρολιδόνη, στα οποία παρέμενε το μοριακό βάρος σταθερό ενώ μεταβαλλόταν η αναλογία σορβικού οξέος/PVP, δείγματα α - ε, παρατίθενται οι μετρήσεις της δυναμικής σκέδασης φωτός των δειγμάτων α και β, καθώς και τα συνολικά απότελέσματα.

Για το δείγμα α με μοριακό βάρος κατά βάρος της PVP $M_w=10000D$ και αναλογία σορβικού οξέος/PVP 0.0625/20.

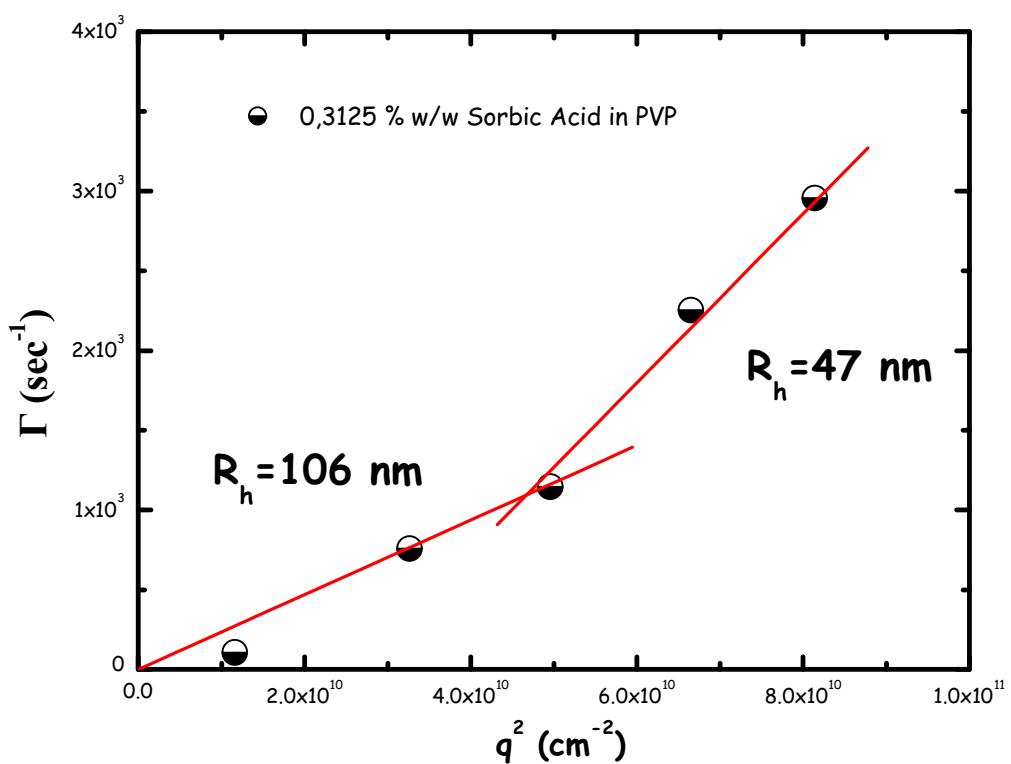
Γωνία σκέδασης	Θερμοκρασία	Ένταση (KHz)	Fast Mode			Slow Mode		
			log t (μs)	T_f (sec)	D (cm ² /sec)	log t (μs)	T_s (sec)	D (cm ² /sec)
90	298.7	299.2	1.61	4.07E-05	4.95E-07	2.86	7.24E-04	2.78E-08
110	298.7	250.6	1.44	2.75E-05	5.46E-07	2.63	4.27E-04	3.52E-08
130	298.7	283.2	1.37	2.34E-05	5.24E-07	2.53	3.39E-04	3.62E-08



Σχήμα V.9 : Κατανομή των χρόνων όπως προέκυψε από τον αντίστροφο μετασχηματισμό Laplace με χρήση του CONTIN για το δείγμα α..



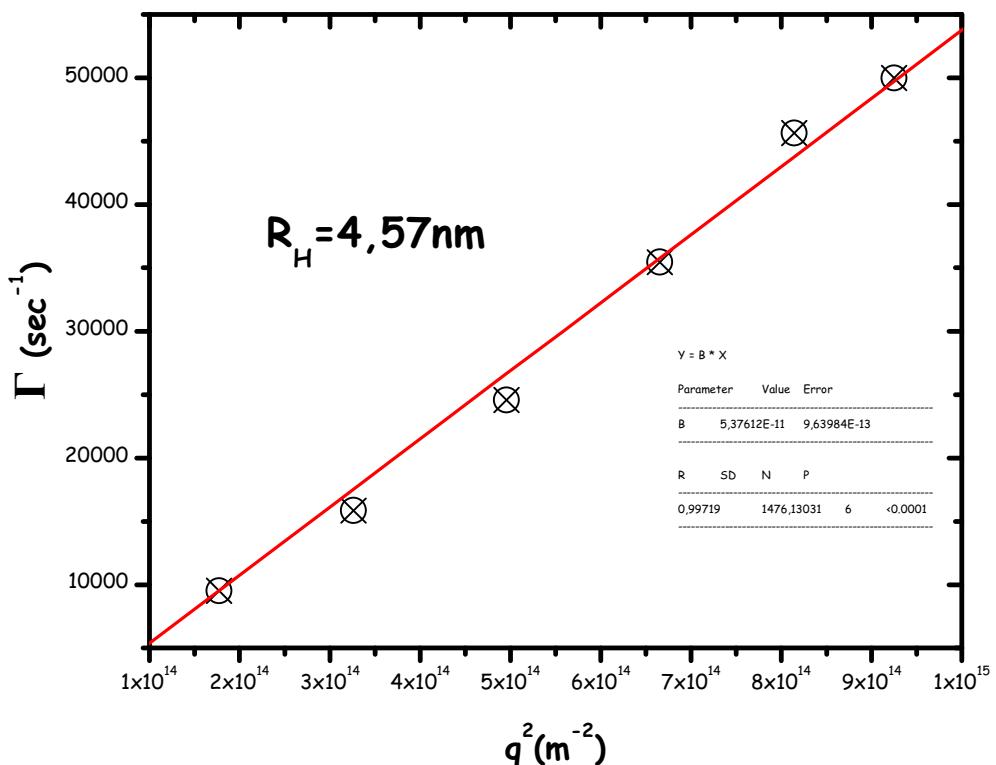
Σχήμα V.10 : Ο ρυθμός χαλάρωσης με το q^2 (γρήγορη διαδικασία) για το δείγμα α.



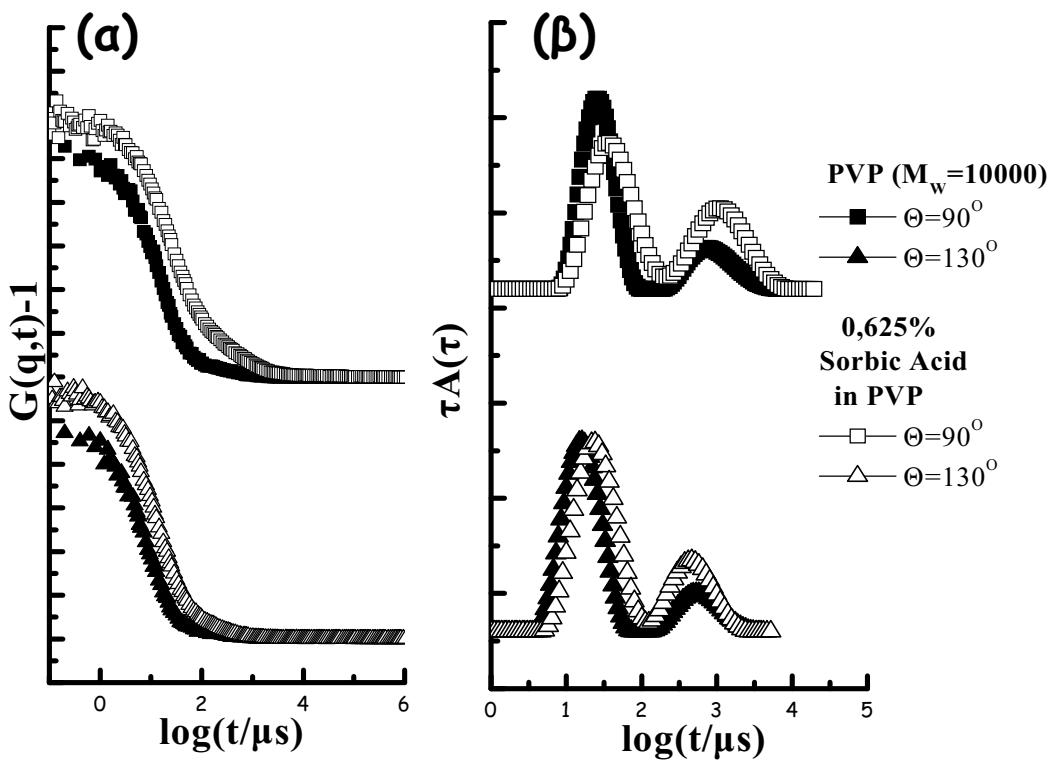
Σχήμα V.11 : Ο ρυθμός χαλάρωσης με το q^2 (αργές διαδικασίες) για το δείγμα α.

Για το **δείγμα β** με μοριακό βάρος κατά βάρος της PVP $M_w=10000D$ και αναλογία σορβικού οξέος/PVP 0.125/20.

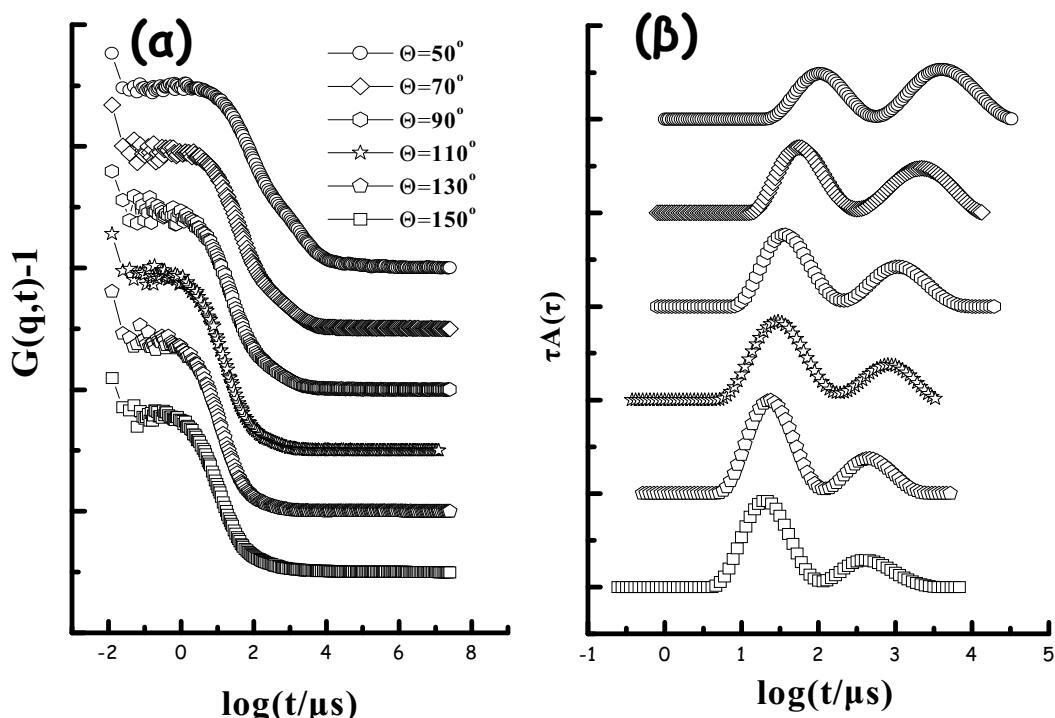
Γωνία σκέδασης	Θερμοκρασία	Ένταση (KHz)	Fast Mode			Slow Mode		
			logt (μs)	T_f (sec)	D (cm ² /sec)	logt (μs)	T_s (sec)	D (cm ² /sec)
50	298.7	169.6	2.02	1.05E-04	5.39E-07	3.44	2.75E-03	2.05E-08
70	298.7	105.2	1.80	6.31E-05	4.86E-07	3.28	1.91E-03	1.61E-08
90	298.7	86.0	1.61	4.07E-05	4.95E-07	3.03	1.07E-03	1.88E-08
110	298.7	78.9	1.45	2.82E-05	5.33E-07	2.65	4.47E-04	3.37E-08
130	298.7	92.5	1.34	2.19E-05	5.61E-07	2.45	2.82E-04	4.36E-08
150	298.7	153.0	1.30	2.00E-05	5.42E-07	2.50	3.16E-04	3.42E-08



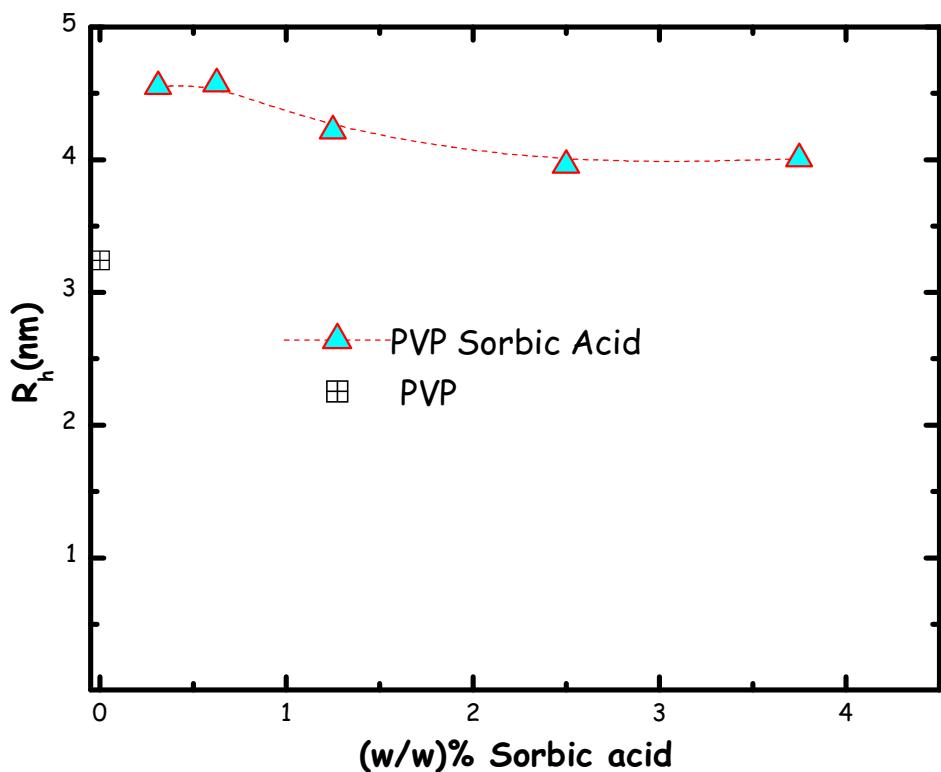
Σχήμα V.12 : Ο ρυθμός χαλάρωσης με το q^2 (γρήγορη διαδικασία) για το δείγμα β.



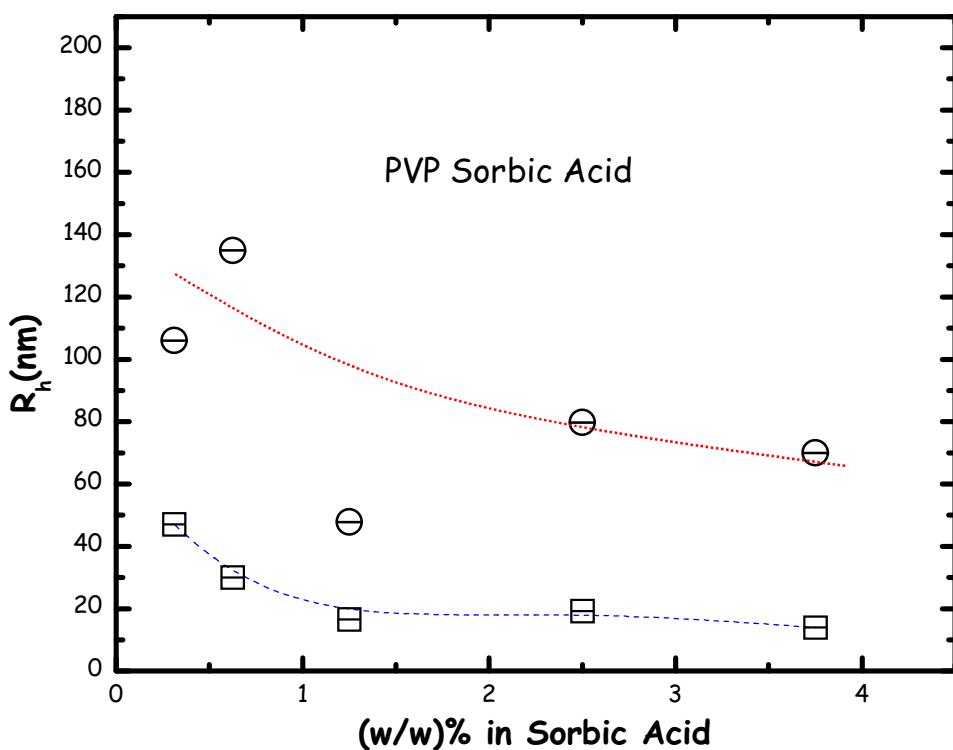
Σχήμα V.13 : (a) Χρονική συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για τη PVP και το δείγμα β σε διάφορες γωνίες σκέδασης, (β) Κατανομή των χρόνων όπως προέκυψε από τον αντίστροφο μετασχηματισμό Laplace με χρήση του CONTIN



Σχήμα V.14 : (a) Χρονική συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για το δείγμα β σε διάφορες γωνίες σκέδασης, (β) Κατανομή των χρόνων όπως προέκυψε από τον αντίστροφο μετασχηματισμό Laplace με χρήση του CONTIN.



Σχήμα V.15 : Οι υδροδυναμικές ακτίνες (R_h) των πολυμερικών συμπλόκων, για τη γρήγορη διαδικασία, σε σχέση με τη συγκέντρωση του σορβικού οξέος



Σχήμα V.16 : Οι υδροδυναμικές ακτίνες (R_h) των πολυμερικών συμπλόκων, για τις δύο αργές διαδικασίες, σε σχέση με τη συγκέντρωση του σορβικού οξέος

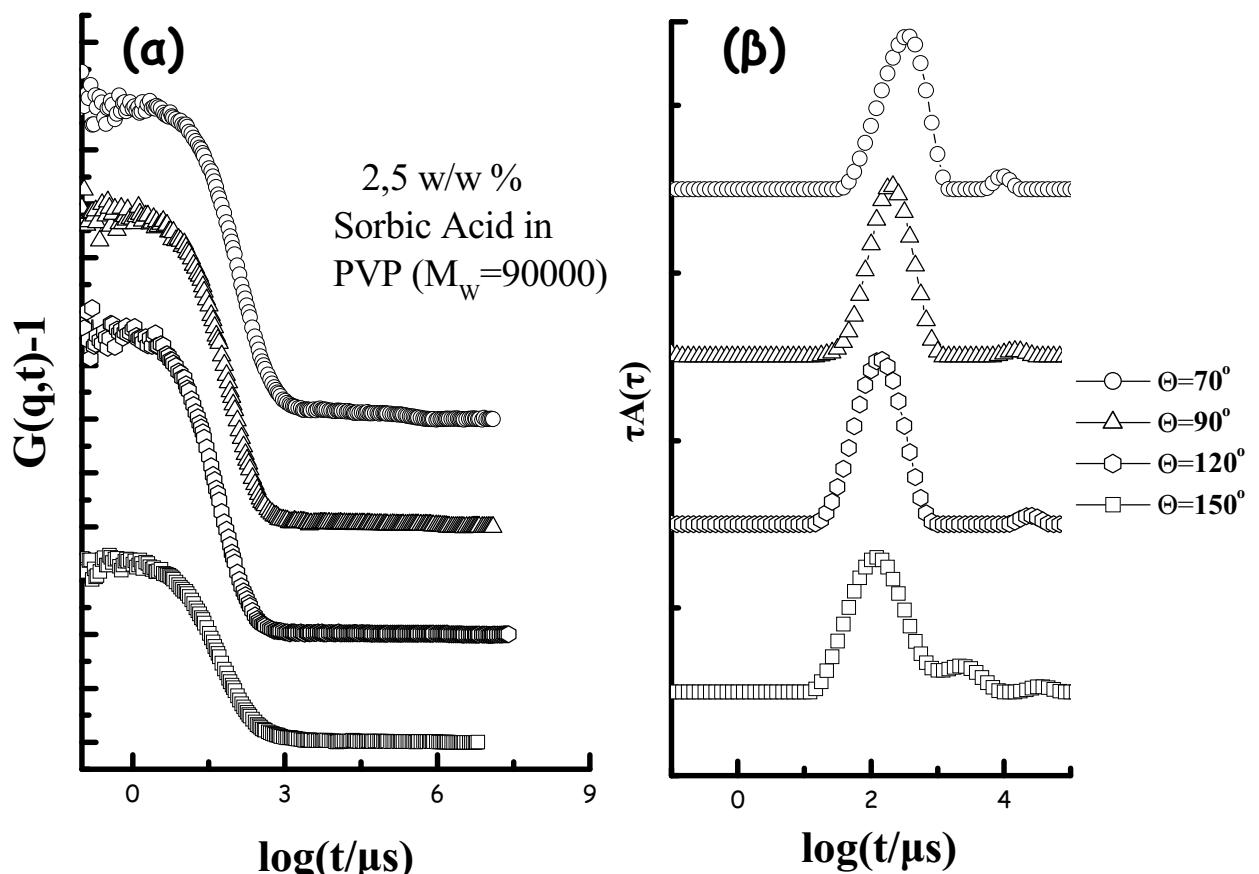
Σ' όλα τα δείγματα α - ε, παρατηρήθηκαν δύο κορυφές μετά τον αντίστροφο μετασχηματισμό Laplace, μια γρήγορη και μια αργή (Σχήματα V.9, V.10, V.12, V.14). Όμως, από την εξάρτηση του ρυθμού χαλάρωσης, της αργής διαδικασίας με το q^2 προκύπτουν δύο διαδικασίες χαλάρωσης⁵⁴ (Σχήμα V.11) οι οποίες οφείλονται σε πολυμερικά συσσωματώματα (clusters) που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και έχουν τάση να μειώσουν το μεγεθός τους (Σχήμα V.16).

Η υδροδυναμική ακτίνα, όπως αυτή προκύπτει από τη γρήγορη διαδικασία, ήταν για όλα τα σύμπλοκα μεγαλύτερη από εκείνη της καθαρής PVP (Σχήμα V.15). Επιπλέον, η αύξηση της συγκέντρωσης του υδρόφοβου σορβικού οξέος στην πολυμερική αλυσίδα είχε ως αποτέλεσμα να μειωθεί η υδροδυναμική ακτίνα του συμπλόκου, δηλαδή να οδηγήσει σε σύμπλοκα με πιο κλειστή πολυμερική αλυσίδα. (Σχήμα V.16)

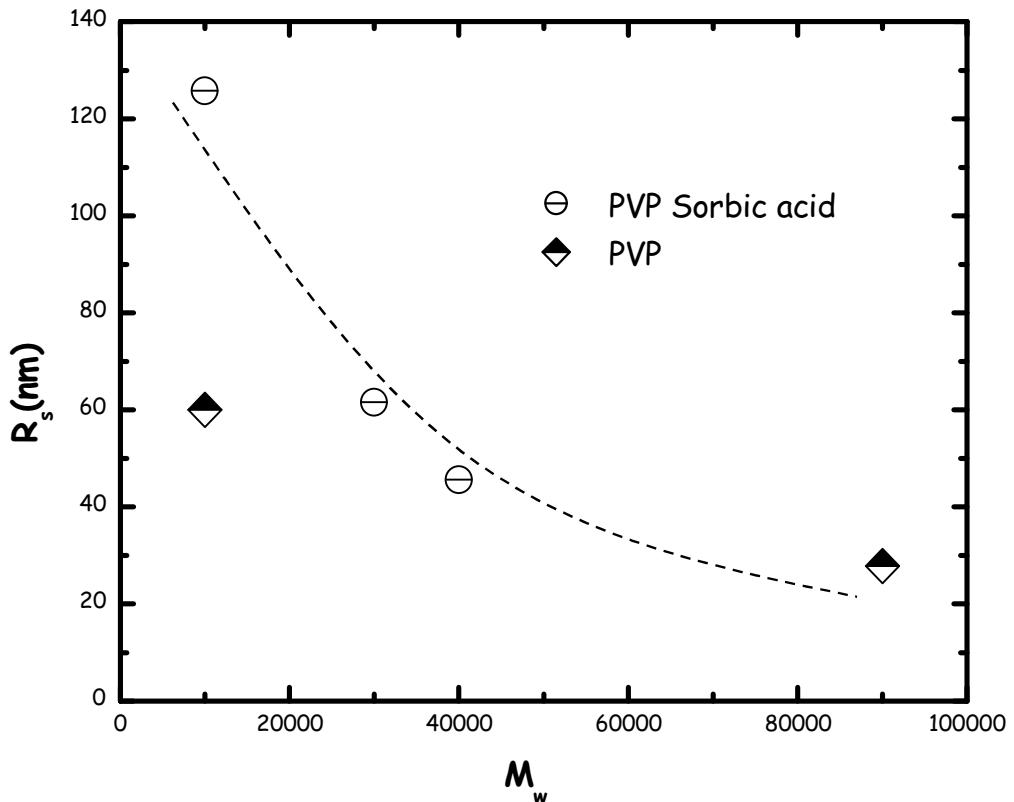
Μελέτη συμπλόκων σορβικού οξέος-PVP με διαφορετικό μοριακό βάρος.

Στή συνέχεια μελετήθηκαν τα σύμπλοκα του σορβικού οξέος με την πολυβινυλοπυρολιδόνη, στα οποία η αναλογία σορβικού οξέος/PVP παρέμενε σταθερή, ενώ το μοριακό βάρος κατά βάρος της PVP αυξανόταν από 10000D έως 360000D, δείγματα 0-6. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα για το δείγμα 5, καθώς και τα συνολικά αποτελέσματα για τα συγκεκριμένα δείγματα.

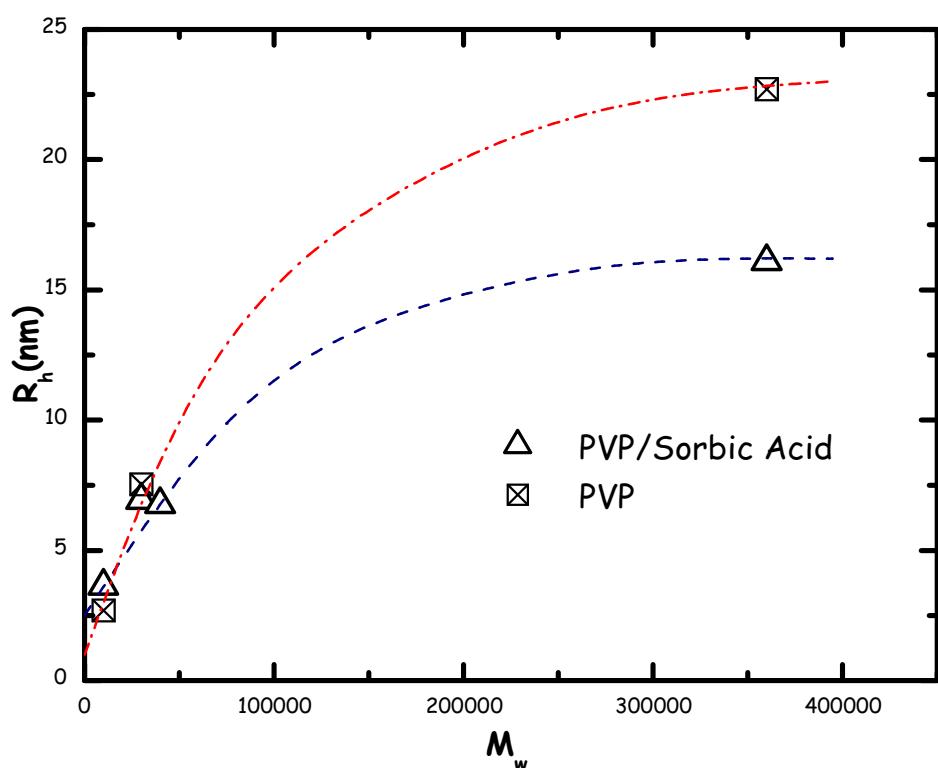
Fast Mode					
Γωνία σκέδασης	Θερμοκρασία	Ένταση (KHz)	$\log t$ (μs)	T_f (sec)	D (cm ² /sec)
70	295.9	109.7	2.41	2.57E-04	1.19E-07
90	295.9	90.3	2.26	1.82E-04	1.11E-07
120	295.9	94.4	2.05	1.12E-04	1.20E-07
150	295.8	252.9	1.91	8.13E-05	1.33E-07



Σχήμα V.17 : (a) Χρονική συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για το δείγμα 5, $M_w=90000D$ σε διάφορες γωνίες σκέδασης, (b) Κατανομή των χρόνων όπως προέκυψε από τον αντίστροφο μετασχηματισμό Laplace με χρήση του CONTIN.



Σχήμα V.18 : Οι υδροδυναμικές ακτίνες (R_h) της PVP και των συμπλόκων της με το σορβικό οξύ, για την αργή διαδικασία, σε σχέση με το μέσο μοριακό βάρος κατά βάρος M_w .



Σχήμα V.19 : Οι υδροδυναμικές ακτίνες (R_h) της PVP και των συμπλόκων της με το σορβικό οξύ, για τη γρήγορη διαδικασία, σε σχέση με το μέσο μοριακό βάρος κατά βάρος M_w .

Για μικρά μοριακά βάρη η υδροδυναμική ακτίνα, όπως αυτή προκύπτει από τη γρήγορη διαδικασία, των πολυμερικών συμπλόκων του σορβικού οξέος είναι σχεδόν ίδια με εκείνη της καθαρής PVP. Όσο μεγαλώνει το μοριακό βάρος παρατηρείται ότι η υδροδυναμική ακτίνα των πολυμερικών συμπλόκων είναι αισθητά μικρότερη από εκείνη της καθαρής PVP, αλλά και αρκετά μεγαλύτερη από εκείνη των συμπλόκων με μικρό μοριακό βάρος (Σχήμα V.19). Επιπλέον το μέγεθος των συσσωματωμάτων, που αποδίδονται στην αργή διαδικασία χαλάρωσης, μειώνεται όσο αυξάνεται το μοριακό βάρος. (Σχήμα V.18)

Διαπιστώνεται λοιπόν ότι για μικρά μοριακά βάρη (π.χ. $MB=10^*10^3$) η ανθρακική αλυσίδα της PVP είναι περισσότερο ανοικτή και ευθύγραμμη. Οι ενεργές ομάδες του πολυμερικού φορέα είναι περισσότερο προσιτές στα μόρια του σορβικού οξέος και κατά συνέπεια η δημιουργία δεσμού με το σορβικό οξύ καθίσταται ευκολότερη. Σ' αυτή την περίπτωση ο καλύτερος σχηματισμός των συμπλόκων με PVP μικρού μοριακού βάρους συνδυάζεται με την μεγαλύτερη ευκινησία της PVP στο διάλυμα και την καλύτερη πρόσβαση του σορβικού οξέος στις ενεργές ομάδες της PVP.

Για την PVP με μεγαλύτερο μοριακό βάρος, η ευκινησία είναι μειωμένη, κάτι που εμποδίζει τη δημιουργία του συμπλόκου, επιπλέον η ανθρακική αλυσίδα τους είναι πολυπλοκότερη, ενώ η παρουσία του υδροφοβικού σορβικού οξέος την αναγκάζει να συσπειρωθεί ακόμα περισσότερο σε σχέση με τη καθαρή PVP.

Όλα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα βιολογικά αποτελέσματα. Παρόλο που η φύση της σύνδεσης του σορβικού οξέος πάνω στην PVP είναι η ίδια για όλα τα σύμπλοκα (δεσμός υδρογόνου), η δράση τους φαίνεται να εξαρτάται και από την μακροδομή τους. Στα σύμπλοκα μικρού μοριακού βάρους η συσσώρευση του μυκοστατικού στα κυτταρικά τοιχώματα του μύκητα, πραγματοποιείται καλύτερα λόγω του μικρού μεγέθους των μορίων και της μεγάλης κινητικότητας. Σε αντίθεση στα σύμπλοκα μεγάλου μοριακού βάρους το σορβικό οξύ είναι περισσότερο εγκλωβισμένο, γι' αυτό και δεν μπορεί να δράσει ελεύθερα με τρόπο ανάλογο με τα σύμπλοκα μικρότερου μοριακού βάρους.⁵²



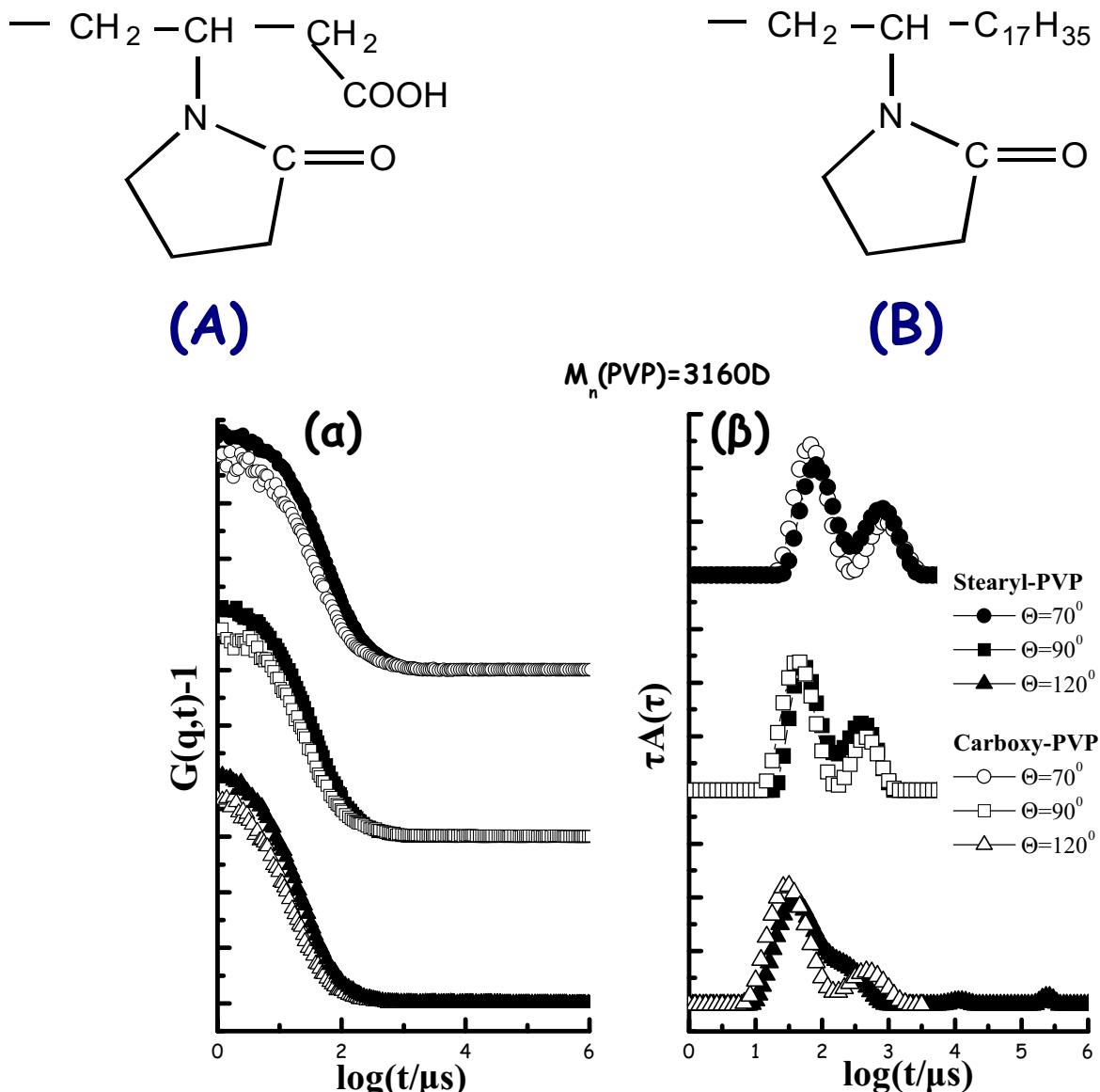
V.2 Αμφιφιλικά Παράγωγα της PVP

Ορισμένες κατηγορίες αμφιφιλικών υδατοδιαλυτών πολυμερών, συμπεριλαμβανομένων και αμφιφιλικών παραγώγων της πολύβινυλοπυρρολιδόνης(PVP), βρέθηκαν να ασκούν αποτελεσματική στερεοχημική προστασία σε λιποσωμάτια *in vivo*. Τόσο η PVP όσο και τα αμφιφιλικά παράγωγα της (Stearyl-PVP), έχουν την ικανότητα να ενσωματώνονται στη μεμβράνη των λιποσωματίων.

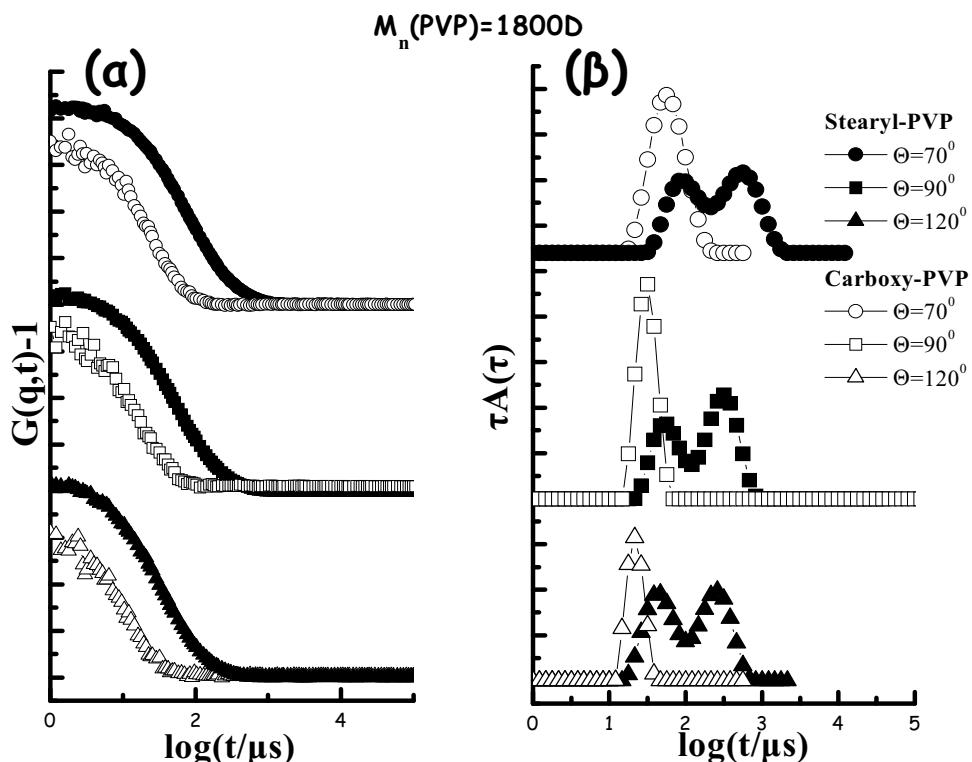
Διερευνήσαμε με δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) την διαφορετικότητα της πολυμερικής δομής ανάμεσα στην PVP και στα αμφιφιλικά παράγωγα της, καθώς και την επίδραση των υδρόφιβων και υδρόφιλων τμημάτων τους στη σταθερότητα των σχηματιζόμενων μικκυλίων.

V.2a Χαρακτηρισμός των αμφιφιλικών παραγάγων της PVP με Σκέδαση Φωτός.

Τα πολυμερικά δείγματα που μελετήθηκαν είχαν δύο διαμορφώσεις: η (A) που έχει ένα carboxy end group και η (B) που έχει ένα stearyl end group. Επίσης είχαν τρία μέσα μοριακά βάρη κατά αριθμό M_n : 3160D, 4700D και 1800D.

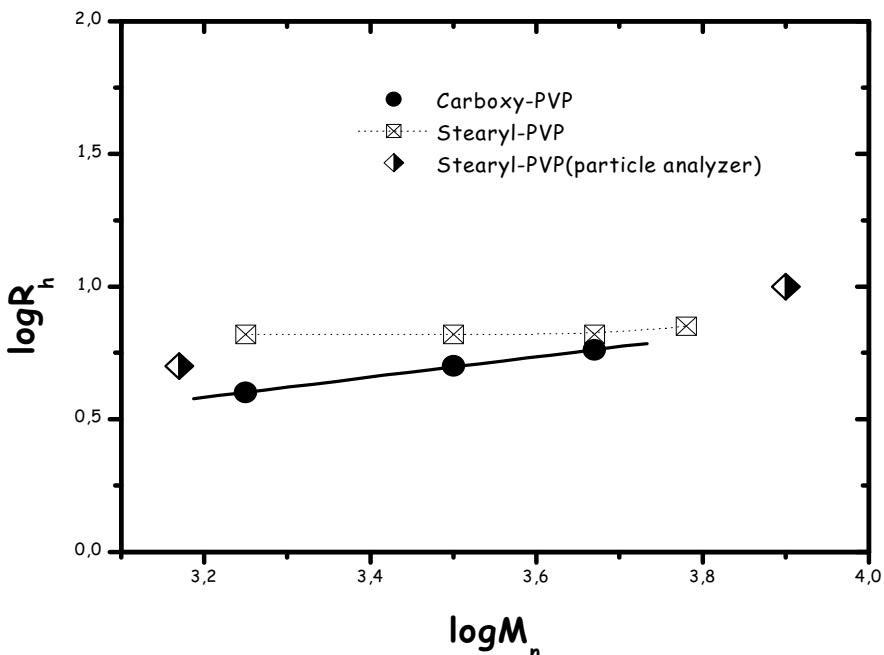


Σχήμα V.20 : (a) Χρονική συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για τη PVP με ένα carboxy end group, $M_n=3160D$ και τη PVP με ένα Stearyl end group ($C_{17}H_{35}$), $M_n=3160D$ σε διάφορες γωνίες σκέδασης, (β) Κατανομή των χρόνων όπως προέκυψε από τον αντίστροφο μετασχηματισμό Laplace με χρήση του CONTIN



Σχήμα V.21 : (a) Χρονική συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για τη PVP με ένα carboxy end group, $M_n=1800D$ και τη PVP με ένα Stearyl end group ($C_{17}H_{35}$), $M_n=1800D$ σε διάφορες γωνίες σκέδασης, (β) Κατανομή των χρόνων όπως προέκυψε από τον αντίστροφο μετασχηματισμό Laplace με χρήση του CONTIN

Παρατηρήθηκε ότι τα αμφιφιλικά πολυμερή της PVP με μοριακό βάρος μεταξύ 1500 και 8000 παρέχουν ικανοποιητική στερική προστασία σε λιποσωμάτια. Ο βαθμός της προστασίας εξαρτάται από δύο παράγοντες: α) από τη συγκέντρωση του πολυμερούς και β) από το μέγεθος της PVP. Βρέθηκε ότι βασικό στοιχείο αυτής της προστασίας είναι η ευκαμψία των πολυμερικών αλυσίδων οι οποίες σχηματίζουν μια στιβάδα πάνω από την επιφάνεια των λιποσωματίων. Για να διαπιστωθεί ποια από τα αμφιφιλικά παράγωγα της PVP προσαρτώνται πιο ισχυρά επάνω στην επιφάνεια των λιποσωματίων διερευνήθηκαν οι ιδιότητές τους σε μορφή διαλύματος ως προς την κρίσιμη συγκέντρωση για σχηματισμό μικκυλίων. Βρέθηκε ότι τα παράγωγα του S-PVP σχηματίζουν μικκύλια σε υδατικά διαλύματα με μέσο μέγεθος μεταξύ 5 και 20 nm.⁴²



Σχήμα V.22 : Γραφική παράσταση ανάμεσα στο λογάριθμο της υδροδυναμικής ακτίνας και τον λογάριθμο M_n

Οι μετρήσεις σκέδασης ακτίνων Laser δίνουν ακριβέστερες τιμές, σε ότι αφορά το μέγεθος της υδροδυναμικής ακτίνας των μικκυλίων, οι οποίες κυμαίνονται μεταξύ 6.5 και 7 nm για μοριακά βάρη μεταξύ 1800 και 6000. Επίσης οι συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης για αυτή τη σειρά μοριακών βαρών δείχνουν μια συνεχή αύξηση στη σχετική αναλογία μεταξύ της γρήγορης και της αργής διαδικασίας. Αυτό μπορεί να συσχετιστεί με την αύξηση της τιμής της κρίσιμης συγκέντρωσης για σχηματισμό μικκυλίων καθώς προχωρούμε από τα μικρά προς τα μεγαλύτερα μοριακά βάρη, αφού η αύξηση του μοριακού βάρους μειώνει την υδροφοβικότητα της συνολικής πολυμερικής αλυσίδας.

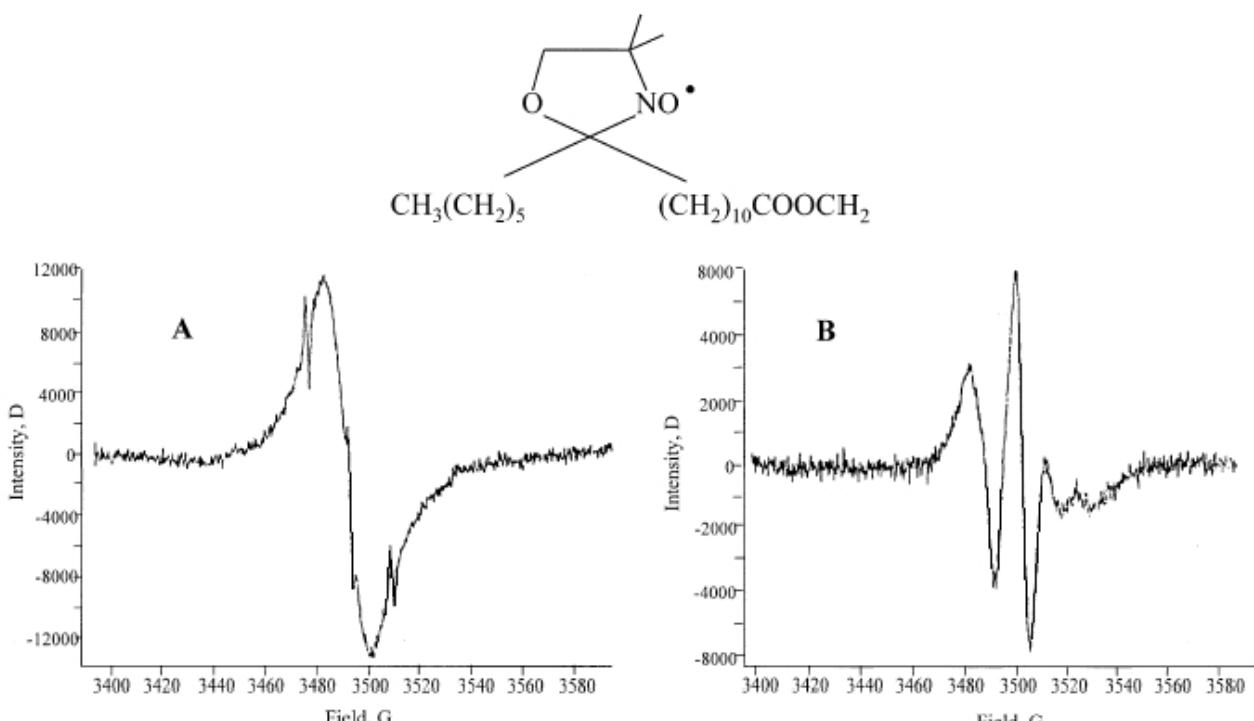
Η PVP με τις καρβοξυ-τελικές ομάδες παρουσιάζει ομαλή συμπεριφορά σε ότι αφορά την ακτίνα του σε σχέση με το μοριακό του βάρος και δίνει κλίση στο σχετικό σχήμα V.22 ίση με 0,37. Αυτή η τιμή χαρακτηρίζει σφαιρικά μακρομόρια.

Η σχετική σταθερότητα των μικκυλίων που σχηματίζονται για αυτές τις ενδιάμεσες τιμές μοριακών βαρών εξαρτάται αφ' ενός από την ισχύ των υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων στον πυρήνα των μικκυλίων η οποία πρέπει να είναι τέτοια ώστε να συγκρατεί τα μικκύλια σταθερά, αφ' ετέρου δε από

την ενέργεια της ελεύθερης κίνησης των υδρόφιλων PVP αλυσίδων του S-PVP τα οποία βρίσκονται σε επαφή με την υδατική φάση και αποσταθεροποιούν με τις κινήσεις τους τα μικκύλια.

V.2.β Μελέτη μέσω της Φασματοσκοπίας Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (ESR).

Η δυνατότητα πρόσβασης άλλων υδρόφοβων υποκαταστατών στα υδρόφοβα μέρη των αμφιφιλικών δειγμάτων PVP διερευνήθηκε με φασματοσκοπία Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού (ESR) μέσω της χρήσης του DOXYL spin-probe ($1,1'4,4'$ -tetramethyl-piperidine-N-oxyl). Η δομή του DOXYL spin-probe και τα ESR φάσματα παρουσία και απουσία του στεατικού υποκαταστάτη παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα V.23 : Φάσματα ESR (a) παρουσία (b) απουσία του στεατικού υποκαταστάτη.

Τα φάσματα ESR έδειξαν ότι για όλα τα δείγματα S-PVP οι ακραίες υδρόφοβες ομάδες ήταν διαθέσιμες για αλληλεπίδραση με το DOXYL spin-probe. Όπως φαίνεται στο φάσμα του S-PVP με το DOXYL spin-probe, παίρνει κανείς ένα πολυπλοκότερο φάσμα που αντικατοπτρίζει την διαφορετική (δυναμική συμπεριφορά) κινητικότητα του DOXYL που έχει συγκεντρωθεί εκλεκτικά στη φάση των υδρόφοβων υποκαταστατών του αμφιφιλικού πολυμερούς. Το φάσμα της PVP χωρίς την ύπαρξη του στεατικού υποκαταστάτη δίνει ένα τυπικό φάσμα του DOXYL το οποίο αποδίδεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των ριζών του DOXYL.⁴²



V.3 Πολυμερικά Παράγωγα με Αμινοξέα

Δύο πολυμερικές οικογένειες, οι οποίες αποτελούν μήτρες χημικής ακινητοποίησης ουσιών, όπως πεπτίδια και μικρές πρωτεΐνες, εξετάστηκαν *in vitro* για την βιοδραστικότητα τους. Στη μια πολυμερική οικογένεια το αμινοξύ (glycine, β -alanine, γ -aminobutyric acid) και ϵ -aminocaproic acid) είναι συνδεδεμένο με την πολυβινυλοπυρρολιδόνη και allylglycidyl αιθέρα (NVP-AGE), ενώ στην άλλη τα ίδια αμινοξέα είναι συνδεδεμένα με εποξείδιο τη πολυβινυλοπυρρολιδόνης (ENVP).

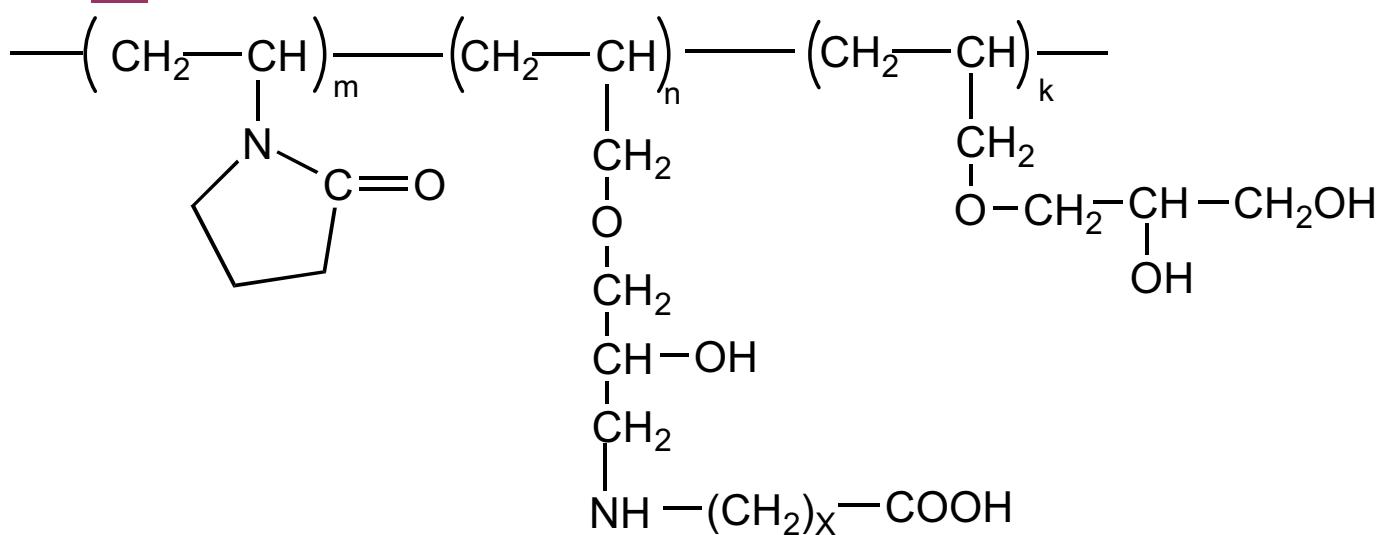
Εξετάσθηκε αν τα παραπάνω πολυμερικά παράγωγα συμβάλλουν α) στην ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και β) στην αύξηση ή στην καταστολή του πολλαπλασιασμού των T-λεμφοκυττάρων, εξαιτίας άλλων πολυκλωνικών διεγέρσεων των T-λεμφοκυττάρων ή κατά την παρουσία αντιγόνων.

Διερευνήσαμε με δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) τη διαφορετικότητα της πολυμερικής δομής και της διαμόρφωσης στο διάλυμα ανάμεσα στη PVP και στα σύμπλοκα της με τα παραπάνω αμινοξέα.

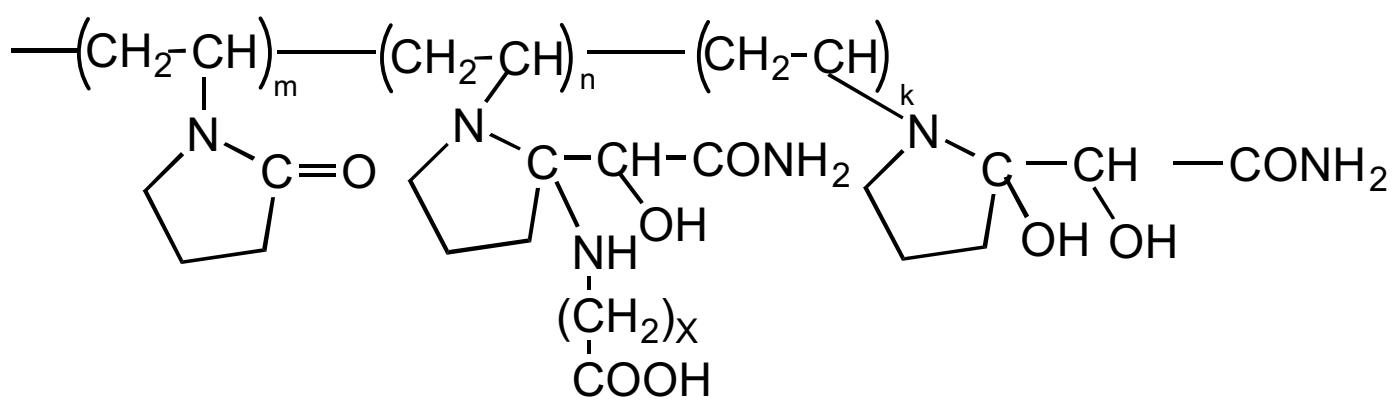
Πολυμερικά παράγωγα της PVP με αμινοξέα που μελετήθηκαν.

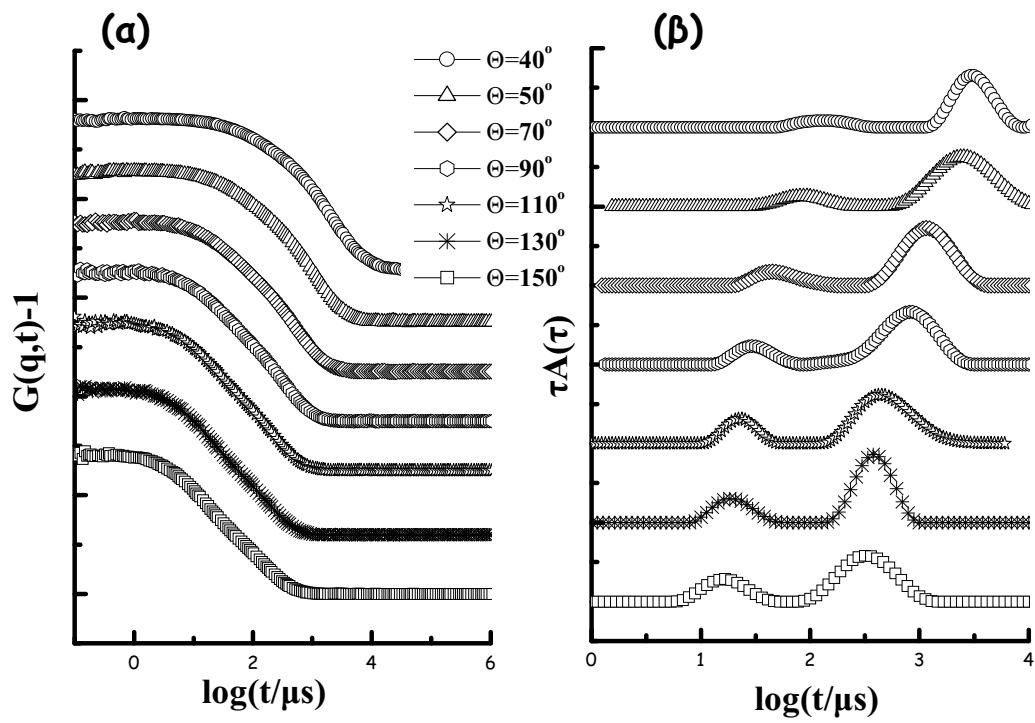
Polymer form	\overline{M}_n	Type of molecular structure	N-vinyl pyrrolidone linkage content (mol%)	Glycine linkage content (mol%)	allylglycidil ether linkage content (mol%)
VP-AGE	12000	A($x=1$)	90	7,8	2,2
EPVP	12000	B($x=1$)	89,7	8	2,3
				β-alanine acid linkage content (mol%)	
VP-AGE	12000	A($x=2$)	90	8,1	1,9
EPVP	12000	B($x=2$)	89,3	8,4	2,3
				γ-amino butanoic acid linkage content (mol%)	
VP-AGE	12000	A($x=3$)	90	8,3	1,7
EPVP	12000	B($x=3$)	89,5	8,4	2,3
				ϵ aminocaproic acid linkage content (mol%)	
VP-AGE	12000	A($x=5$)	90	8,2	1,8
EPVP	12000	B($x=5$)	89,6	8,1	2,3

A:

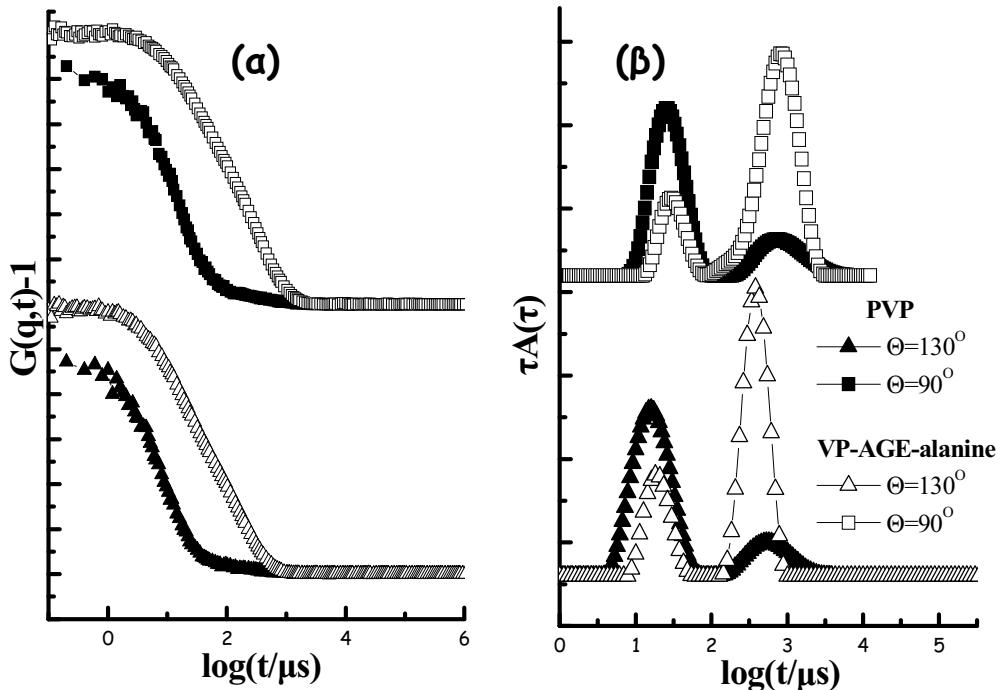


B:

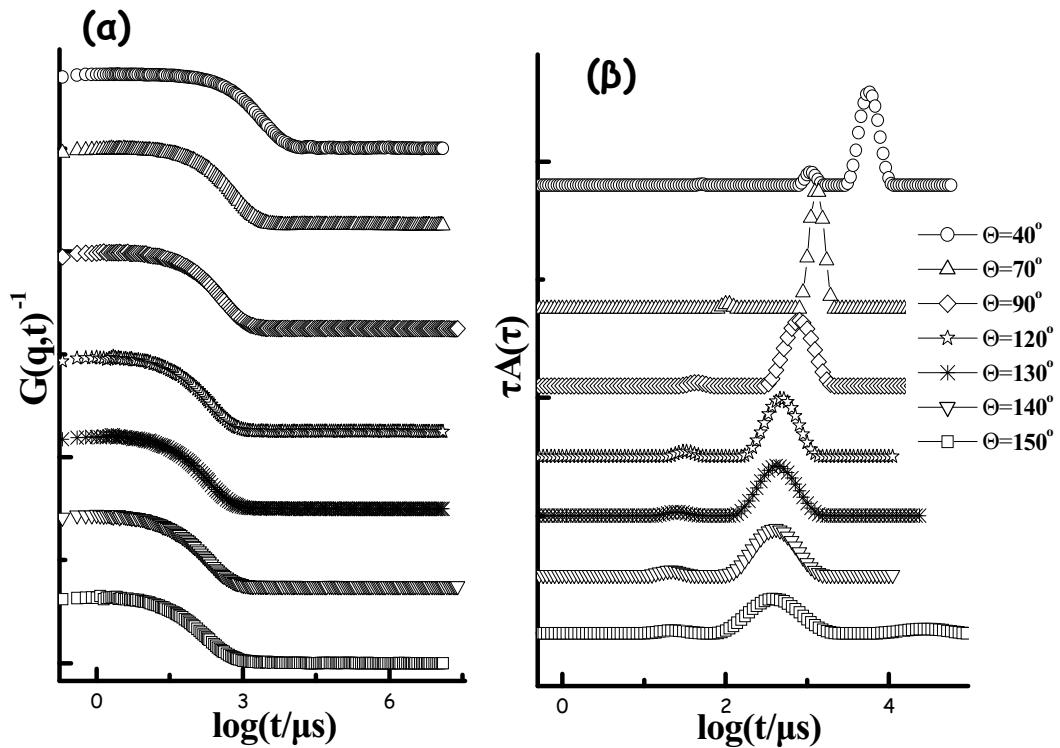




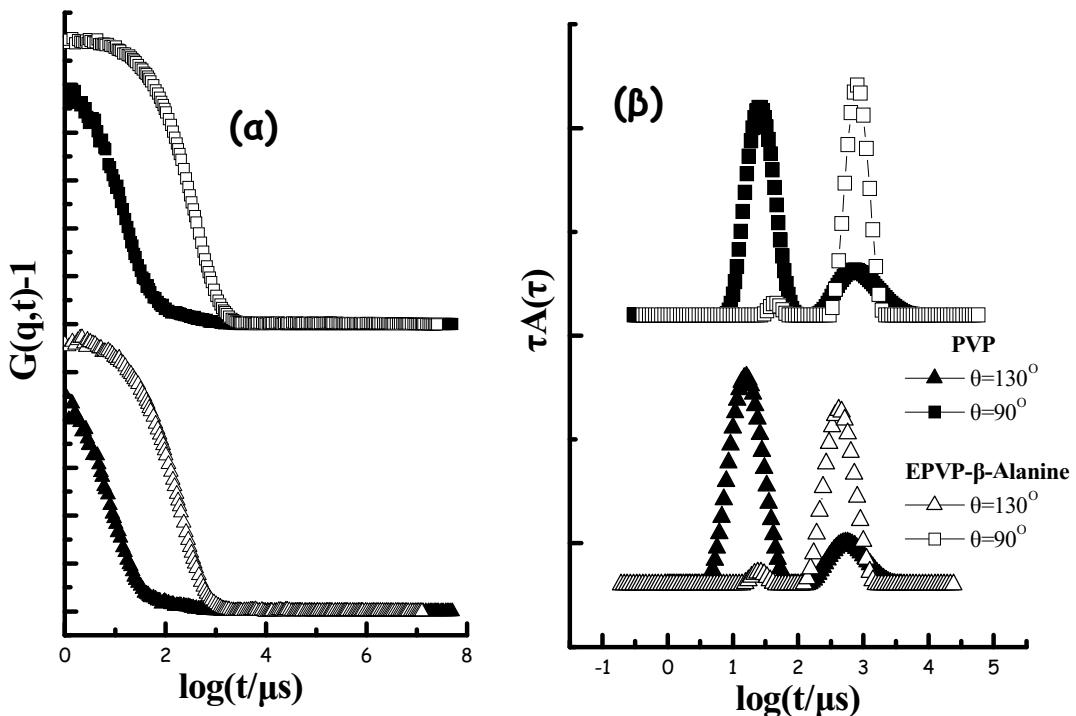
Σχήμα V.24 : (a) Χρονική συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για τη VP-AGE alanine σε διάφορες γωνίες σκέδασης, (β) Κατανομή των χρόνων όπως προέκυψε από τον αντίστροφο μετασχηματισμό Laplace με χρήση του CONTIN



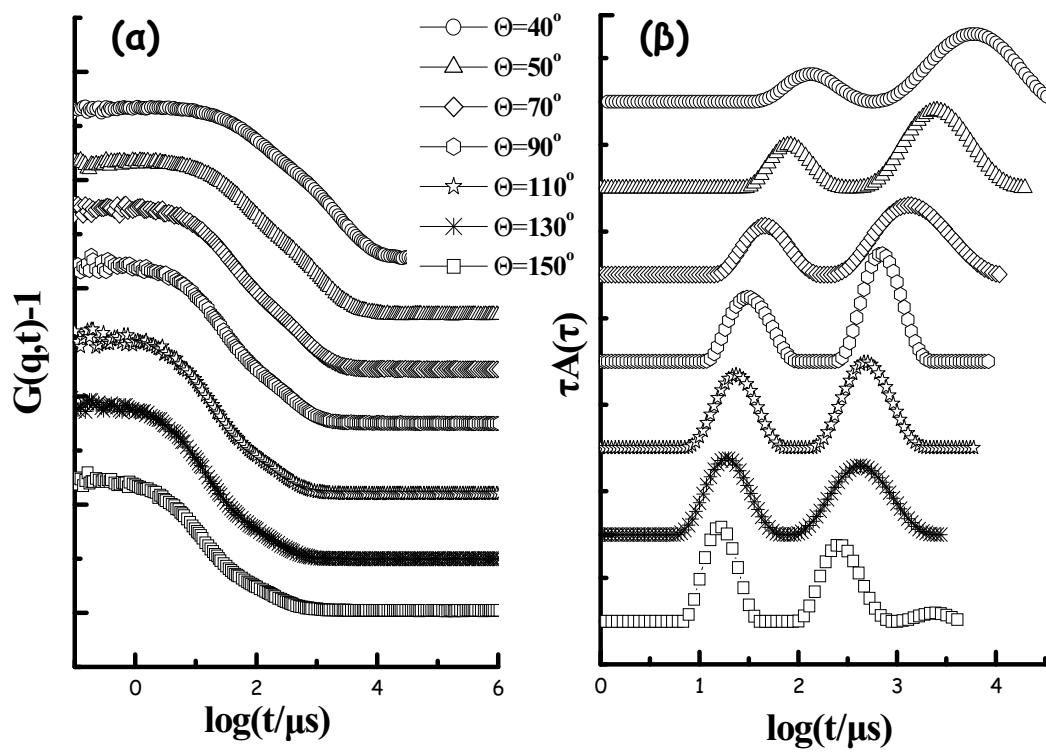
Σχήμα V.25 : (a) Χρονική συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για τη VP-AGE alanine και το PVP σε διάφορες γωνίες σκέδασης, (β) Κατανομή των χρόνων όπως προέκυψε από τον αντίστροφο μετασχηματισμό Laplace με χρήση του CONTIN



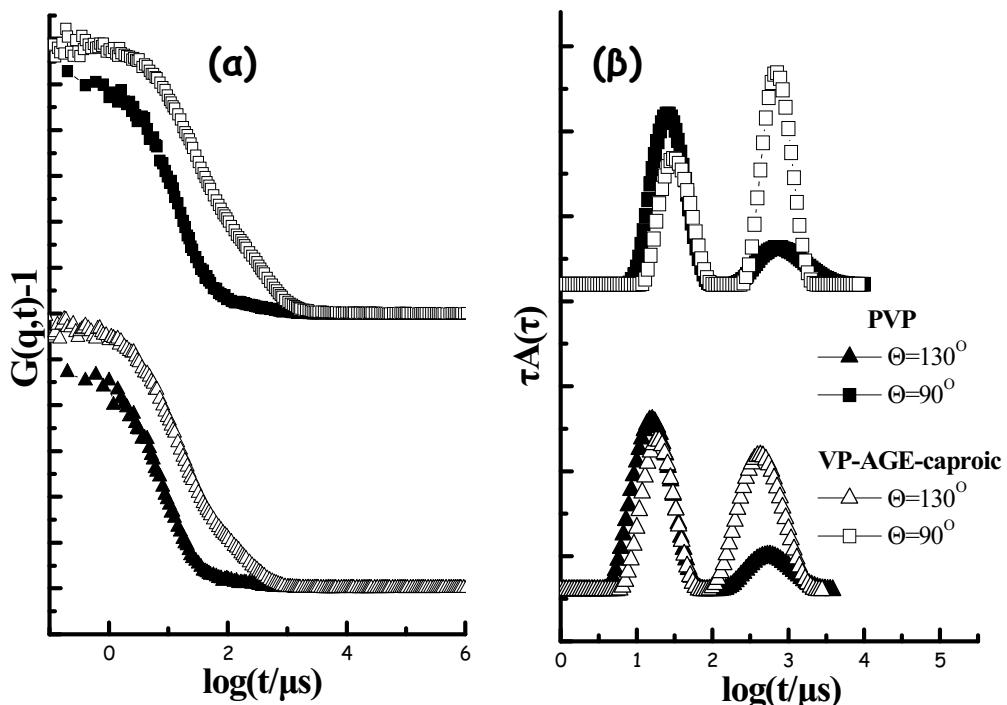
Σχήμα V.26 : (a) Χρονική συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για τη EPVP-β alanine σε διάφορες γωνίες σκέδασης, (β) Κατανομή των χρόνων όπως προέκυψε από τον αντίστροφο μετασχηματισμό Laplace με χρήση του CONTIN



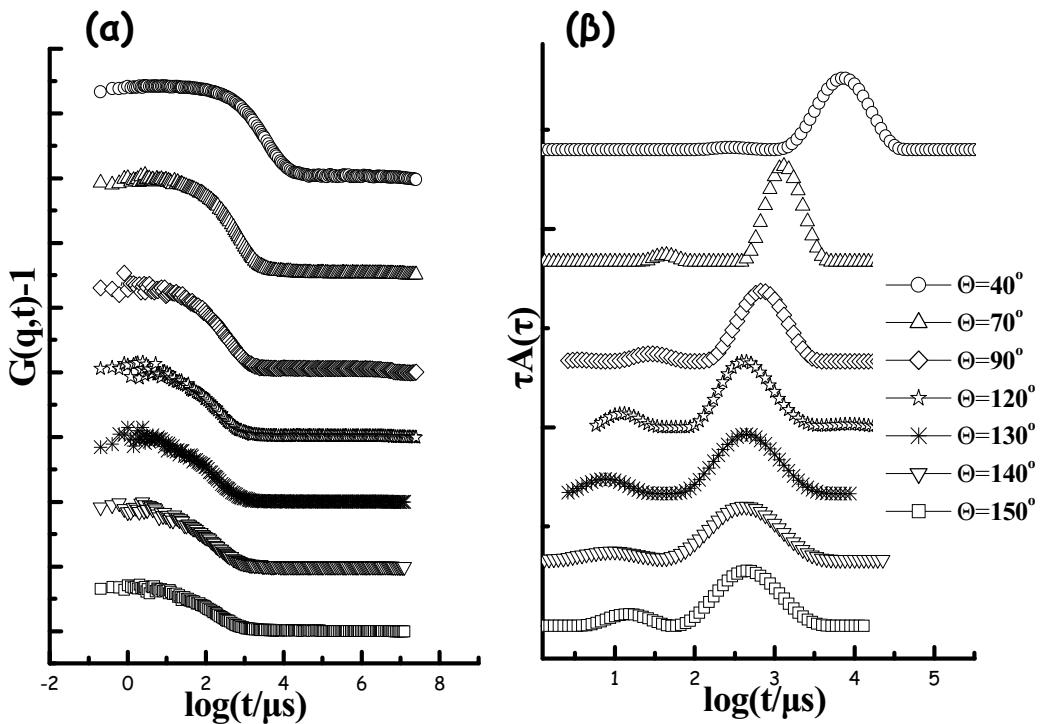
Σχήμα V.27 : (a) Χρονική συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για τη EPVP-β alanine και το PVP σε διάφορες γωνίες σκέδασης, (β) Κατανομή των χρόνων όπως προέκυψε από τον αντίστροφο μετασχηματισμό Laplace με χρήση του CONTIN



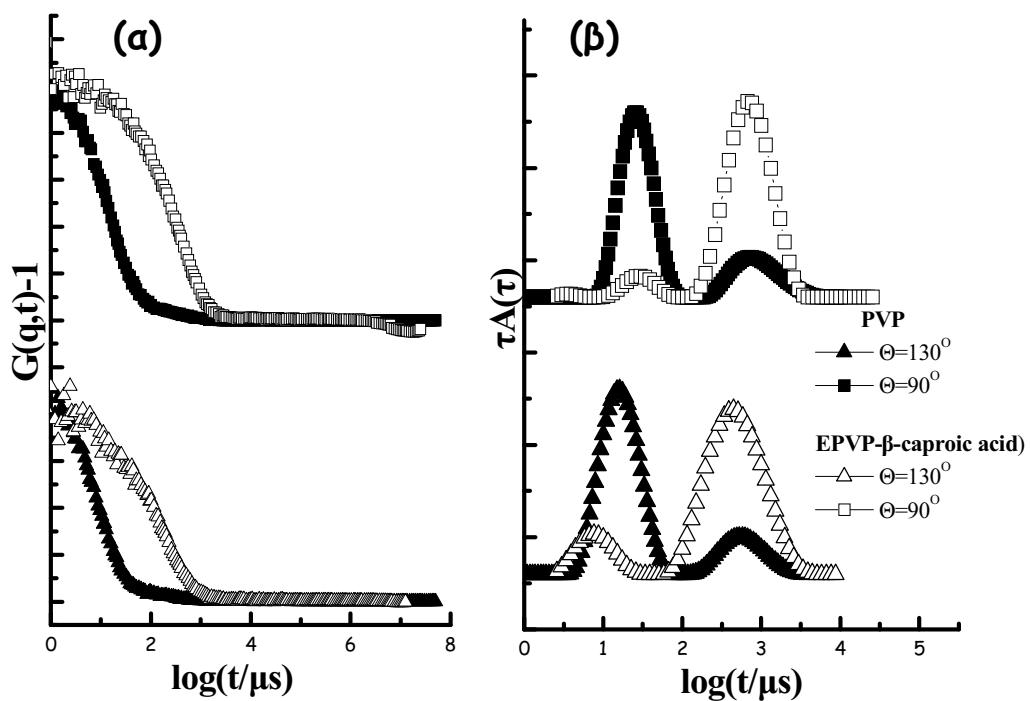
Σχήμα V.28 : (a) Χρονική συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για τη VP-AGE caproic σε διάφορες γωνίες σκέδασης, (β) Κατανομή των χρόνων όπως προέκυψε από τον αντίστροφο μετασχηματισμό Laplace με χρήση του CONTIN



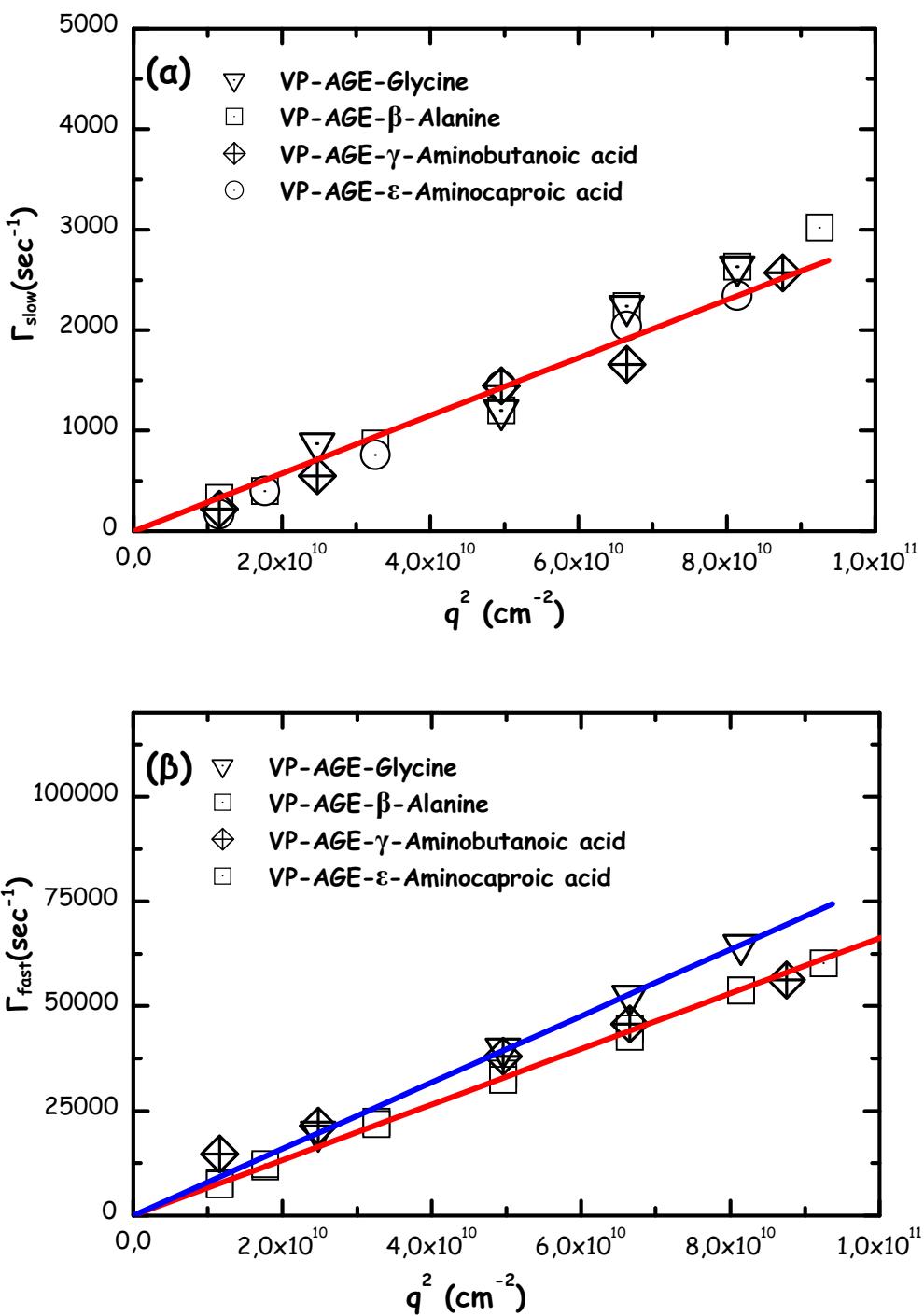
Σχήμα V.29 : (a) Χρονική συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για τη VP-caproic και το PVP σε διάφορες γωνίες σκέδασης, (β) Κατανομή των χρόνων όπως προέκυψε από τον αντίστροφο μετασχηματισμό Laplace με χρήση του CONTIN



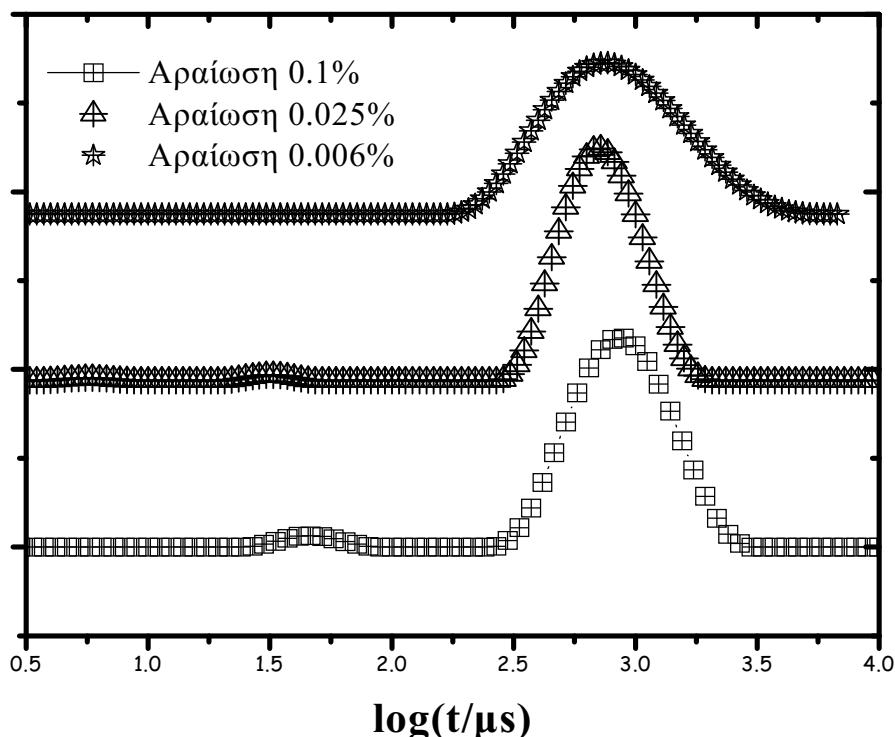
Σχήμα V.30 : (a) Χρονική συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για τη EPVP-β-caproic σε διάφορες γωνίες σκέδασης, (β) Κατανομή των χρόνων όπως προέκυψε από τον αντίστροφο μετασχηματισμό Laplace με χρήση του CONTIN



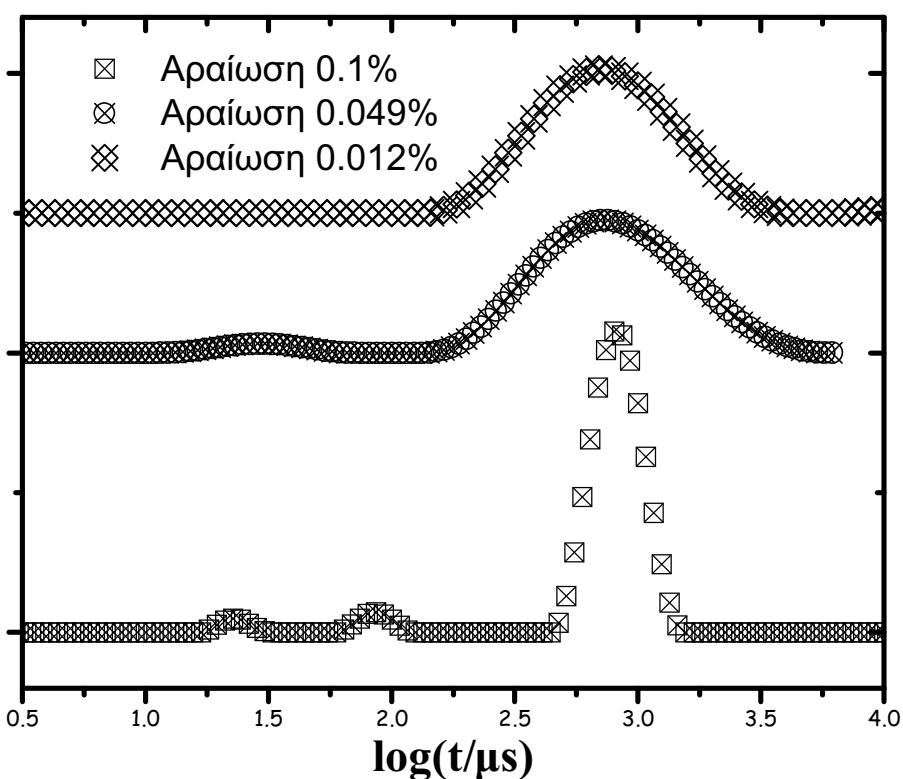
Σχήμα V.31 : (a) Χρονική συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για τη EPVP-β-caproic και το PVF σε διάφορες γωνίες σκέδασης, (β) Κατανομή των χρόνων όπως προέκυψε από τον αντίστροφο μετασχηματισμό Laplace με χρήση του CONTIN



Σχήμα V.32 : Ο ρυθμός χαλάρωσης $\Gamma=1/\tau$ με το q^2 για την (a) αργή, (β) γρήγορη διαδικασία για όλα τα VP-AGE πολυμερικά παράγωγα.



Σχήμα V.33 : Κατανομή των χρόνων όπως προέκυψε από τον αντίστροφο μετασχηματισμό Laplace με χρήση του CONTIN για την EPVP- β -alanine σε διαδοχικές αραιώσεις.



Σχήμα V.34 : Κατανομή των χρόνων όπως προέκυψε από τον αντίστροφο μετασχηματισμό Laplace με χρήση του CONTIN για την VP-glycine σε διαδοχικές αραιώσεις.

Από τη μελέτη των δειγμάτων μέσω της δυναμικής σκέδασης φωτός, παρατηρήθηκαν δύο δυναμικές διαδικασίες, μια γρήγορη και μια αργή. Οι χρόνοι χαλάρωσης είναι ανάλογοι του τετραγώνου του διανύσματος σκέδασης q , όπως αυτό φαίνεται από το Σχήμα 32 που αναφέρονται στα διάφορα πολυμερικά παράγωγα που μελετήθηκαν. Οι δύο διαφορετικές γραμμικές περιοχές, που είναι εμφανείς στο σχήμα, αντιπροσωπεύουν δύο ξεχωριστές διαδικασίες χαλάρωσης. Από τη μελέτη που έγινε με τη σκέδαση φωτός παρατηρήθηκε ότι η δομή και η συμπεριφορά των συμπολυμερών σε υδατικό περιβάλλον είναι σχεδόν παρόμοια με αυτή της PVP.

Η υδροδυναμική ακτίνα για την PVP και το VP-AGE-glycine υπολογίστηκε στα 3,2nm, ενώ για τα VP-AGE-alanine, VP-AGE-aminobutanoic και VP-AGE-aminocaproic στα 3,7nm. Η υδροδυναμική ακτίνα με τιμή $R_h=93nm$ που προήλθε από την αργή διαδικασία, υποδεικνύει ότι η διαδικασία αυτή οφείλεται σε μικκύλια πολυμερικών συστατικών μεγάλου μεγέθους, τόσο για την PVP, όσο και για τα VP-AGE/EPVP.

Στα VP-AGE/EPVP πολυμερή, παρατηρούνται τέτοια πολυμερικά συσσωματώματα (clusters), τόσο σε ημιαραιά, όσο και σε αραιά διαλύματα (Σχήματα 33, 34). Επίσης στα VP-AGE/EPVP πολυμερή, δημιουργούνται ισχυρότερα πολυμερικά συσσωματώματα (clusters), όπως αυτό προκύπτει από τη μεγαλύτερη σε ένταση κορυφή της αργής διαδικασίας, σε σύγκριση με την PVP.

Η υδροδυναμική ακτίνα R_h και η γυροσκοπική ακτίνα R_g , δίνουν πληροφορίες, σε μια διάσταση και είναι μια χρονική αποτύπωση της συμπεριφοράς της δονούμενης πολυμερικής αλυσίδας. Επιπλέον έχει διαπιστωθεί ότι τα μακρομόρια δεν μπορούν να περιγραφούν επαρκώς μόνο από μια από τις παραπάνω ακτίνες. Αντίθετα η σύγκριση και των δύο μεγεθών μας δίνει στοιχεία για την εσωτερική αρχιτεκτονική του συσσωματώματος. Γι' αυτό το σκοπό είναι απολύτως χρήσιμος ο συντελεστής σχήματος ή ασύμμετρος συντελεστής $\rho=R_g/R_h$. Τιμές του ρ κοντά στο 0,78, αντιστοιχούν σε ομογενής σφαίρες, ενώ τιμές μεγαλύτερες του 2 αντιστοιχούν σε extended coils και επιμήκη ελλειψοειδή.¹⁴

Οι μετρήσεις για στατική σκέδαση φωτός, έδωσαν τιμές για τη γυροσκοπική ακτίνα 65nm και 170nm για τα clusters της PVP και EPVP αντίστοιχα. Συνεπώς το ρ για τη καθαρή PVP είναι ίσο με 0,70 και μπορεί να συσχετιστεί με σφαίρα, ενώ για τη EPVP/glycine είναι 1,83 και μπορεί να συσχετιστεί με διαμόρφωση σπείρας που έχει εκταθεί (extended coil).

Στη βιολογική μελέτη χρησιμοποιήθηκε φυσιολογικό PBLS από αίμα δοτών, ώστε να προσομοιώσουμε πιο ρεαλιστικά την *in vivo* κατάσταση. Παρόλο που η παρουσία των συμπολυμερών στις καλλιέργειες δεν επέφερε κάποια εμφανή δραστηριότητα όπως αναμενόταν, διαπιστώθηκαν ποσοτικές διαφοροποιήσεις σε κυτταρικούς πολλαπλασιασμούς όταν τα κύτταρα διεγείρονταν πολυκλωνικά ή μέσω παρουσίας αντιγόνων. Επίσης παρατηρήθηκαν παρόμοια αποτελέσματα στην ανοσοδραστική απόκριση. Παρόλο που τα VP-AGE και EPVP πολυμερή είναι δομικά παρόμοια, η βιοδραστικότητα τους όταν συμμετέχουν σε ανοσοδραστικές διαδικασίες είναι διαφορετική, με την οικογένεια της EPVP να παρουσιάζει μεγαλύτερη ανοσοδραστικότητα. Αυτό πιθανόν να οφείλεται και στη διαφορετικότητα που παρατηρείται ανάμεσα στις κορυφές των VP-AGE και EPVP πολυμερών. Στα EPVP η πρώτη κορυφή, που οφείλεται στη γρήγορη διαδικασία φαίνεται ότι έχει μικρότερη ένταση σε σχέση με τη δεύτερη κορυφή που αποδίδεται στα συσσωματώματα, ενώ κάτι τέτοιο δεν παρατηρείται στα VP πολυμερή. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι στα EPVP πολυμερή δημιουργούνται ισχυρότερα συσσωματώματα και γι' αυτό το λόγο, ίσως παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανοσοδραστικότητα. Στον παρακάτω πίνακα γίνεται μια περιληπτική αναφορά στην ανοσοδραστική ικανότητα των συμπολυμερών της PVP.⁵⁵

Ανοσοενεργή ικανότητα των πολυμερικών παραγάγων της PVP με αμινοξέα.

PVP	-	-	-	-
VP-AGE	-	-	-	-
VP-AGE-glycine	-	-	↓	-
VP-AGE-β-alanine	-	-	-	-
VP-AGE-γ-aminobutyric acid	-	↓	-	↑ All IgG
VP-AGE-ε-aminocaproic acid	-	-	-	↑ All IgG
Epoxydized-PVP	↑	-	-	-
Epoxy-PVP-glycine	↑	↑	-	-
Epoxy-PVP-β-alanine	↑	↑	-	-
Epoxy-PVP-γ-aminobutyric acid	↑	↑	-	-
Epoxy-PVP-ε-aminocaproic acid	↑	↓	-	↑ IgG1, IgG2

↑ = presence of polymer increased proliferation

↓ = presence of polymer decreased proliferation

- = presence of polymer had no effect

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

A) Πολυμερικά σύμπλοκα σορβικού οξέος με PVP.

Διαπιστώθηκε ότι όσο αυξάνεται το μοριακό βάρος της PVP τόσο μειώνεται η υδροδυναμική ακτίνα των πολυμερικών συμπλόκων πιθανόν λόγω εγκλωβισμού των υδρόφοβων σορβικών μέσα στις αλυσίδες μεγάλου μοριακού βάρους της PVP. Η υδροδυναμική ακτίνα δε φαίνεται να επηρεάζεται δραστικά όσο μειώνεται το μοριακό βάρος της PVP κάτι που συνδυάζεται με τη μεγαλύτερη ευκινησία της PVP μικρού μοριακού βάρους στο διάλυμα και την καλύτερη πρόσβαση του σορβικού οξέος στις ενεργές ομάδες της PVP.

Διαπιστώθηκε ότι η βιολογική δράση των συμπλόκων είναι καλύτερη από την αντίστοιχη των πολυμερικών εστέρων του σορβικού οξέος. Αυτό αποδίδεται στη φύση του δεσμού μεταξύ σορβικού οξέος και PVP. Ο ομοιοπολικός δεσμός στους πολυμερικούς εστέρες είναι πολύ ισχυρότερος από το δεσμό υδρογόνου στα σύμπλοκα και έχει ως αποτέλεσμα η απελευθέρωση του σορβικού οξέος να γίνεται με βραδύτερους ρυθμούς. Και στις δύο σειρές παραγώγων του σορβικού οξέος (σύμπλοκα και πολυμερικοί εστέρες) η βιολογική δράση αποδεικνύεται ότι είναι συνάρτηση του μοριακού βάρους. Συγκεκριμένα όσο πιο μικρό είναι το μοριακό βάρος τόσο αυξάνει η βιολογική δράση τους έναντι στο μύκητα *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-cucumerinum*.

Όλα τα πολυμερικά σύμπλοκα του σορβικού οξέος έχουν μεγαλύτερη δραστικότητα από το σορβικό οξύ σε υδατικό διάλυμα. Το σύμπλοκο με μοριακό βάρος 10000D εμφανίζεται να έχει την υψηλότερη μυκοστατική δράση. Η βιολογική δράση των συμπλόκων του σορβικού οξέος, είναι συνάρτηση της μακροδομής τους και αυξάνεται με τη μείωση του μοριακού βάρους επιβεβαιώνοντας τη σχέση βιολογικής δράσης και μακροδομής.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοντέλο για παραπέρα έρευνα και ανάπτυξη νέων πολυμερικών βιοδραστικών ουσιών με επιθυμητές ιδιότητες που η μέχρι τώρα χρήση τους περιορίζεται είτε εξαιτίας της μεγάλης τοξικότητας τους είτε λόγω της φτωχής υδατοδιαλυτότητας τους. Επίσης τα σύμπλοκα έχουν σταθερή χημική δομή όπως αποδεικνύεται και από τη σταθερότητα των κορυφών στα φάσματα αυτοσυσχέτισης και το κυριότερο είναι υδατοδιαλυτά, κάτι που διευκολύνει την εφαρμογή τους ως ουσίες με υψηλή βιολογική δράση σε αντίθεση με το σορβικό οξύ στο οποίο η φτωχή διαλυτότητα στο νερό

αποτελεί πρόβλημα στη χρήση. Η χρήση τους ως πρόσθετα με αντιβακτηριακή, αντιμικροβιακή και μυκοστατική δράση συμβάλει στη μείωση της ανάπτυξης βακτηριδίων, μικροβίων και παθογόνων ή δυνητικά παθογόνων μυκήτων.

Β) Αμφιφιλικά παράγωγα της PVP.

Παρατηρήθηκε ότι τα αμφιφιλικά πολυμερή της PVP (stearyl-PVP) με μοριακά βάρη μεταξύ 1500 και 8000 παρέχουν αποτελεσματική στερεοχημική προστασία σε λιποσωμάτια *in vivo*, λόγω της ικανότητάς τους να ενσωματώνονται στη μεμβράνη των λιποσωμάτων. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η προστασία εξαρτάται από μέγεθος του πολυμερούς, διερευνήθηκαν με δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) οι ιδιότητές τους σε μορφή διαλύματος. Βρέθηκε ότι τα παράγωγα του Stearyl-PVP σχηματίζουν μικκύλια σε υδατικά διαλύματα με μέσο μέγεθος μεταξύ 6,5 και 7 nm για μοριακά βάρη μεταξύ 1500 και 6000. Η αύξηση του μοριακού βάρους του πολυμερούς συμβαδίζει με αντίστοιχη αύξηση του αριθμού των μικρών μικκυλίων όπως προκύπτει από τις συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί με τη μείωση της υδροφοβικότητας που αναμένεται για τα μεγαλύτερου μοριακού βάρους πολυμερή.

Γ) Πολυμερικά παράγωγα της PVP με αμινοξέα.

Πολυμερικά παράγωγα της βινυλοπυρροιδόνης-allylglycidyl αιθέρα (VP-AGE) και ενός από τα παρακάτω αμινοξέα (glycine, β -alanine, γ-aminobutyric και ε-aminocaproic acid) εξετάστηκαν *in vitro* για την βιοδραστικότητα τους. Παρόμοια πειράματα πραγματοποιήθηκαν και για παράγωγα του εποξειδίου της πολυβινυλοπυρροιδόνης (EPVP) με τα αντίστοιχα αμινοξέα. Πιο συγκεκριμένα, εξετάσθηκε αν τα παραπάνω συμβάλλουν α) στην ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και β) στην αύξηση ή στην καταστολή του πολλαπλασιασμού των T-λεμφοκυττάρων, εξαιτίας άλλων πολυκλωνικών διεγέρσεων των T-λεμφοκυττάρων ή κατά την παρουσία αντιγόνων και βρέθηκε ότι υπάρχει ανοσοενίσχυση στην περίπτωση των αμινοξέων που είναι συνδεδεμένα με EPVP. Διερευνήθηκε με δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) η διαφορετικότητα της πολυμερικής δομής και της διαμόρφωσης στο διάλυμα ανάμεσα στις δύο οικογένειες πολυμερικών παραγώγων της PVP (VP-AGE-αμινοξύ και EPVP-αμινοξύ). Μέσω σύγκρισης με την καθαρή PVP διαπιστώθηκε η ισχυρή παρουσία

πολυμερικών συσσωματωμάτων στην περίπτωση της EPVP με την αυξημένη βιοδραστικότητα.

Ο φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός των πολυμερικών μορφών του σορβικού οξέος, των αμφιφιλικών παραγώγων της PVP, και των πολυμερικών παραγώγων με αμινοξέα, όπως και η συσχέτιση της μακροδομής τους με τη βιολογική τους δράση ήταν ο κύριος στόχος της συγκεκριμένης διατριβής. Οι πολυμερικές μορφές που διερευνήθηκαν αποσκοπούν στην βελτίωση της βιολογικής δράσης, της βιοσυμβατότητας και της υδατοδιαλυτότητας των μικρο- και μακρομοριακών βιοδραστικών ουσιών.

Βιβλιογραφία

-
- ¹ *Opinion on the results of the risk Assessment of: 1-Vinyl-2-Pyrrolidone.* European Commission, September 2001.
- ² Eberhart J.P., *Structural and Chemical Analysis of Materials*, Wiley, England, 1991.
- ³ Berne J.B., Pecora R, *Dynamic Light Scattering*, Wiley Interscience Publications, New York, 1976.
- ⁴ Schmitz K.S., *Dynamic Light Scattering by Macromolecules*, Academic Press, London, 1990.
- ⁵ G.C. Berry, P.M. Cotts, E.I. duPont, *Static and Dynamic Light Scattering*, 1997
- ⁶ Αρκετές πληροφορίες για την τεχνική δυναμικής σκέδασης φωτός, καθώς και για τη περιγραφή της πειραματικής διάταξης βρίσκονται στη διατριβή του Dr. G. Petekidis, *Dynamics and Conformation of Hairy-Rod Polymer in Isotropic Solutions*, 1997, Physics Department, University of Crete.
- ⁷ Αρκετές πληροφορίες για την τεχνική δυναμικής σκέδασης φωτός, καθώς και για τη περιγραφή της πειραματικής διάταξης βρίσκονται στη διατριβή του Γ. Βλάχου, *Δυναμική Πολυμερικών Πολυκλαδικών Αστεριών*, Ηράκλειο, 1999.
- ⁸ http://www.protein-solutions.com/psi_books/psi_books.htm
- ⁹ F.Kohlrausch, *Pog. Ann. Phys.*, 199,352, 1863.
- ¹⁰ G. Williams and D.C. Watts, *Faraday Soc.*, 66, 80, 1971.
- ¹¹ Provencher S. W., *Makromol. Chem.*, 180, 201, 1979.
- ¹² Provencher S. W., *Computer Physics Communications*, 27, 213, 1982.
- ¹³ Absolute Macromolecular Characterization, Wyatt Technology Corporation.
- ¹⁴ Ulrich Adolphi and Werner-Michael Kuliche, *Coil dimensions and conformation of macromolecules in aqueous media from flow field-flow fractionation/multi-angle laser light scattering illustrated by studies on pullulan*, *Polymer Vol.38 No.7, pp.1513-1519*, 1997.
- ¹⁵ Παντίδου Μ.Ε. Βασικές γνώσεις μικητολογίας, Αθήνα, Εκδόσεις Foto Offset, 1976
- ¹⁶ Pasteiner S., *Mycotoxins in animals*, Husbandry, 1994.
- ¹⁷ Ζάχου ΓΔ, Μαθήματα φυτοπαθολογίας, Γενικής φυτοπαθολογίας, Θεσσαλονίκη, Εκδόσεις Υπηρεσία Δημοσιευμάτων, 1988.

-
- ¹⁸ Διδακτορική διατριβή του Τζατζαράκη Εμμανουήλ, *Σύνθεση και βιολογική έρευνα χημειοθεραπευτικών ελεγχόμενης απόδοσης για τον έλεγχο των μυκοτοξικώσεων και μυκητιάσεων*, Ηράκλειο 2000.
- ¹⁹ J. L. Richard, R. J. Cole, S. O. Archibald, et. al., (*Task Force Members*), *Mycotoxins, economic and health risks*, Council for Agricultural Science Technology, Report No. 116 (1989).
- ²⁰ M. Gareis, J. Bauer, A. Montgelas and B. Gedek, *Applied Environmental Microbiology*, 47(2), (1984) 416-418.
- ²¹ J. E. Lennox and L. J. McElroy, *American Society of Microbiology*, 48(2), (1984) 1031-1033.
- ²² J. N. Sofos, D. J. Fagerberg and C. L. Quarles, *Environment and Health*, 64, (1985) 832-840.
- ²³ A. Mahjoub and L. B. Bullerman, *Archives of Institute Pasteur Tunis*, 63(4), (1986) 513-525.
- ²⁴ M. Skrinjar, M. Danev and G. Dimic, *Folia Microbiology*, 40(3), (1995) 253-256
- ²⁵ Bangham A.D., M.M. Standish and J.C. Watkins, 1965, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, *J. Mol. Bio.* 13, no. 1:238-52.
- ²⁶ Gregoriadis G, and A.T. Florence, 1993, *Liposomes in drug delivery, Clinical, diagnostic and ophthalmic potential*. Drugs 45, no. 1:15-28.
- ²⁷ Davidson R.N., S.L. Croft, A. Scott, M. Maini, A.H. Moody and A.D. Bryceson, 1991, *Liposomal amphotericin B in drug-resistant visceral leishmaniasis*. Lancet 337, no.8749:1061-2
- ²⁸ Kim S., 1993, Liposomes as carriers of cancer chemotherapy. Current status and future prospects, Drugs 46, no. 4:618-38
- ²⁹ Gregoriadis G., 1995, *Engineering liposomes for drugs delivery: progress and problems*. Trends Biotechnol 13, no. 12:527-37.
- ³⁰ Fries L.F., D.M. Gordon, R.L. Richards, J.E. Egan, M.R. Hollingdale, M. Gross, C. Silverman and C.R. Alving, 1992, Liposomal malaria vaccine in humans: a safe and potent adjuvant strategy, *Proc Natl Acad Sci USA* 89, no. 1:358-62.
- ³¹ Yasutomi Y., S. Koenig, R.L. Woods, J. Madsen, N.M. Wassef, C.R. Alving, H.J. Klein, T.E. Nolan, L.J. Boots, J.A. Kessler and et.al. 1995, A vaccine-elicited, single viral epitope-specific cyrotoxic T lymphocyte response does not protect against intravenous, cell-free simian immunodeficiency virus challenge. *J Virol* 69, no. 4:2279-84.

-
- ³² Glunk R., R. Mischler, S. Brantschen, M. Just, B. Althaus and S.J. Cryz, Jr. 1992, Immunopotentiating reconstituted influenza virus virisome vaccine delivery system for immunization against hepatitis, *A. J. Clin Invest* 90, no. 6:2494-5.
- ³³ M. Raditsch, V. Witzemann, *FEBS Lett.* 354 (1994) 177.
- ³⁴ A. Gaballo, F. Zanotti, G. Raho, S. Papa, *FEBS Lett.* 463 (1999) 7.
- ³⁵ H. Kamada et al., *Cancer Res.* 60 (2000) 6416.
- ³⁶ S.K. Mendiratta, A. Quezada, M. Matar, N.M. Thull, J.S. Bishop, J.L. Nordstrom, F. Pericle, *Hum. Gene Ther.* 11 (2000) 1851.
- ³⁷ M. Tzatzarakis, A.M. Tsatsakis, M. Lotter, M.I. Shtilman, D.J. Vakalounakis, *Food Addit. Contam.* 17 (2000) 965.
- ³⁸ S. Tsunoda et al., *J. Control. Release* 68 (2000) 335.
- ³⁹ M. Risbud, M. Bhonde, R. Bhonde, *Cell Transplant.* 10 (2001) 195.
- ⁴⁰ A. Zafiropoulos, E. Andersson, E. Krambovitis, C.A. Borrebaeck, *J. Immunol. Meth.* 200 (1997) 181.
- ⁴¹ A. Zafiropoulos, M. Kandilogiannaki, C. Dahlenborg, C.A. Borrebaeck, E. Krambovitis, *Int. J. Mol. Med.* 6 (2000) 475.
- ⁴² V.P. Torchilin, T.S. Levchenko, K.R. Whiteman, A.A. Yaroslavov, A.M. Tsatsakis, A.K. Rizos, E.V. Michailova, M.I. Shtilman, Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidones: synthesis, properties and liposome surface modification, *biomaterials* 22 3035-3044, 2001
- ⁴³ Devarajan R, Arunachalam V, Kumarashvamy MDK, Tajuddin I and Iogher T. Darzan's glycidic ester condensation reaction on Poly-(N-vinylpyrrolidone). *J Appl Polym Science*, 44:1473-1475, 1992.
- ⁴⁴ S. Baritaki, E. Krambovitis, J. Alifragis, A. K. Rizos, M. Shtilman and A. M. Tsatsakis, *Immunoreactivity and light scattering studies of polyvinyl pyrrolidone polymeric derivatives*, *Journal of Non-Crystalline Solids* 307-310, 898-904 (2002).
- ⁴⁵ Kevin W., Mattison, Ulf Nobmann and David Dolak, The role of the hydrodynamic radius in biomolecular characterization.
- ⁴⁶ Κωνσταντίνος Τσίπης: Εισαγωγή στη κβαντική χημεία.
- ⁴⁷ Andrew R Leach : Molecular Modelling principles and applications.
- ⁴⁸ Frank Jensen: Introduction to Computational Chemistry.
- ⁴⁹ www.caow.kun.nl/~borkent/compcourse/fred/ch5.html
- ⁵⁰ www.asc.edu/seminars/chemovtw/tsld005.html.
- ⁵¹ www.icm.ac.cn/~xxia/webchin/software/semiempirical.html.

-
- ⁵² J. Alifragis, A.K. Rizos, A.M. Tsatsakis, M. Tzatzarakis, M. Shtilman, *New Polymeric Systems with Controlled Release Action: A Light Scattering*, Journal of non-Crystalline Solids, 307-310 (2002) 882-886.
- ⁵³ Eisele and Burchard Macromolecules, 17 (1984) 1636.
- ⁵⁴ A.B. Rodd, D.E. Dustan, D.V. Boger *Characterisation of xanthan gum solution using dynamic light scattering and rheology*, Carbohydrate Polymers 42 (2000) 159-174.
- ⁵⁵ Stavroula Baritaki, George N. Tzanakakis, John Alifragis, Alexis Zafiropoulos, Ravshan I. Tashmukhamedov, Aristidis Tsatsakis, Mikhail I. Shtilman, Apostolos K. Rizos, Elias Krambovitis, *Light scattering and in vitro biocompatibility studies of polyvinylpyrrolidone derivatives with amino acid-dependent groups* J Biomed Mater Res 2002,63(6):830-7.

Δημοσιεύσεις σε επιστημονικά περιοδικά με κριτές

1. "Near Constant Loss from Conductivity Relaxation Measurements in Glassy and Crystalline LiAlSi₂O₆"
A. K. Rizos, J. Alifragis , K. L. Ngai and P. Heitjans
J. Chem. Phys. 114, 931 (2001).
2. "New polymeric systems with controlled release action: a light scattering investigation".
J. Alifragis, A. K. Rizos, A. M. Tsatsakis, M. Tzatzarakis and Michail Shtilman,
Journal of Non-Crystalline Solids 307-310, 882-886 (2002).
3. "Immunoreactivity and light scattering studies of polyvinyl pyrrolidone polymeric derivatives",
S. Baritaki, E. Krambovitis, J. Alifragis, A. K. Rizos, M. Shtilman and A. M. Tsatsakis,
Journal of Non-Crystalline Solids 307-310, 898-904 (2002).
4. "Light scattering and in vitro biocompatibility studies of polyvinylpyrrolidone derivatives with amino acid-dependent groups"
Stavroula Baritakia, George N. Tzanakakis, John Alifragis, Alexis Zafiropoulos, Ravshan I. Tashmukhamedov, Aristidis Tsatsakis , Mikhail I. Shtilman, Apostolos K. Rizos , Elias Krambovitis
J. Biomed. Mater. Res. 63, 830 (2002).