# ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

# ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

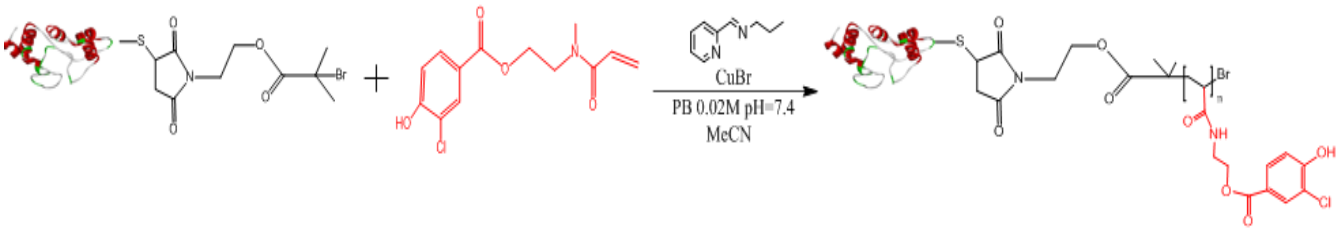
# ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

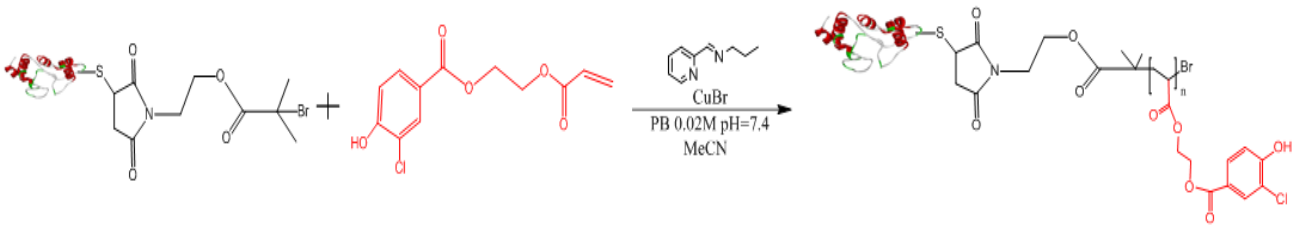
## ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ
## ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΒΙΟΫΛΙΚΩΝ

**Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Κέλλυ Βελώνια**
**Επιβλέπων καθηγητής: Γεώργιος Βασιλικογιαννάκης**

# ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

# ΣΥΝΘΕΣΗ ΑΠΟΚΡΙΝΟΜΕΝΩΝ ΣΕ ΑΛΛΑΓΕΣ ΤΟΥ pH ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ




**ΣΩΚΡΑΤΗΣ ΚΑΛΦΑΟΓΛΟΥ**
**ΑΜ 1971**
**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2018**

**ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

**ABSTRACT**

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**

**ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

**1.1 ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ**

**1.2 ΑΜΦΙΦΙΛΑ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΗ**

**1.3 ΑΠΟΚΡΙΣΙΜΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ – ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΕ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΟΥ pH**

**1.4 ΓΙΓΑΝΤΙΑ ΑΜΦΙΦΙΛΑ ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΗ**

**1.5 ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΥ- ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΥ ATRP**

**1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

**2.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΜΑΛΕΪΜΙΔΟ-ATRP ΕΚΚΙΝΗΤΗ**

**2.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ATRP-ΒΙΟΜΑΚΡΟΕΚΚΙΝΗΤΗ BSA-Br**

**2.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΥ**

**2.3.1 Σύνθεση βιοπολυμερούς BSA-polyCHB**

**2.3.2 Σύνθεση βιοπολυμερούς BSA-polyACH**

**2.4 ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΣΕ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΟΥ pH**

**2.5 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΕ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΟΥ pH**

**2.5.1 Απόκριση βιοπολυμερούς BSA-polyCHB**

**2.5.2 Απόκριση βιοπολυμερούς BSA-polyACH**

**2.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

**<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3</u>**

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## 3.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

## 3.2 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.2.1 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (size exclusion chromatography, SEC)

### 3.2.2 Ηλεκτροφόρηση σε φυσικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (PAGE)

### 3.2.3 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance– NMR)

## 3.3 ΣΥΝΘΕΣΗ

### 3.3.1 Σύνθεση του 4,10-διοξατρικυκλο [5.2.1.0] δεκ-8-ενο-3,5-διόνη (1)

### 3.3.2 Βρωμο-2-μεθυλο-προπιονικό οξύ 2- (2,5-διοξο-2,5-διυδρο-πυρρολ-1-υλ) - αιθυλεστέρας (I)

### 3.3.3 Σύνθεση του ATRP-Βιομακροεκκινητή BSA-Br

### 3.3.4 Παρασκευή βιοπολυμερών BSA–polyCHB και BSA–polyACH

**ΣΧΗΜΑΤΑ**

**Σχήμα 1.** Μορφολογίες νανοδομημένων συμπολυμερών σε τήγμα.

**Σχήμα 2.** Αυτοοργάνωση αμφίφιλου δισυσταδικού πολυμερούς.

**Σχήμα 3.** Φυσικά, χημικά ερεθίσματα και οι παρατηρούμενες -συνήθως αντιστρεπτές- αποκρίσεις των συνθετικών πολυμερών .

**Σχήμα 4.** (α) Σύζευξη αντικαρκινικού φαρμάκου σε αμφίφιλο πολυμερές (β) απελευθέρωση αντικαρκινικού φαρμάκου από πολυμερές αποκρίσιμο σε μεταβολές του pH με αύξηση της οξύτητας.

**Σχήμα 5.** Σύζευξη συνθετικού πολυμερούς στο κυστεϊνικό κατάλοιπο πρωτεΐνης για τη δημιουργία ενός βιοϋβριδίου πολυμερούς-πρωτεΐνης.

**Σχήμα 6.** Μηχανισμός ATRP πολυμερισμού.

**Σχήμα 7.** Συνθετική πορεία του μαλεϊμίδο-ATRP εκκινητή I.

**Σχήμα 8.** Σύνθεση του μαλεϊμίδο-ATRP εκκινητή I από την προστατευμένη του μορφή

**Σχήμα 9.** Φάσμα $^{1}$HNMR του ATRP εκκινητή I.

**Σχήμα 10.** Συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή του BSA-μακροεκκινητή II.

**Σχήμα 11**. Αριστερά: Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου σε μη- αποδιατακτικές συνθήκες: Θέση 1: φυσική BSA, Θέση 2&3: BSA-μακροεκκινητής II. Δεξιά:Χρωματογραφήματα SEC της φυσικής BSA (κόκκινη γραμμή) και του BSA-μακροεκκινητή II (μαύρη γραμμή).

**Σχήμα 12.** Συνθετική πορεία βιοπολυμερούς BSA – polyCHB.

**Σχήμα 13.** Αριστερά: Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου σε μη αποδιατακτικές συνθήκες: Θέση 1 : φυσική BSA, Θέση 2 : BSA-μακροεκκινητής III, Θέση 3: BSA-polyCHB. Δεξιά: Χρωματογράφημα SEC της φυσικής BSA (μαύρη γραμμή) και του προϊόντος BSA-polyCHB (κόκκινη γραμμή).

**Σχήμα 14.** Συνθετική πορεία του βιοπολυμερούς BSA – polyACH.

**Σχήμα 15.** Αριστερά: Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου σε μη αποδιατακτικές συνθήκες: Θέση 1 : BSA-polyACH, Θέση 2 : BSA-μακροεκκινητής II , Θέση 3: BSA. Δεξιά: Χρωματογράφημα SEC της φυσικής BSA (μαύρη γραμμή) και του προϊόντος BSA-polyACH (κόκκινη γραμμή).

**Σχήμα 16.** Χρωματογράφημα της φυσικής BSA (μαύρη γραμμή), του προϊόντος BSA-polyCHB (κόκκινη γραμμή) και του προϊόντος BSA-polyACH (μπλέ γραμμή).

**Σχήμα 17.** Αντιστρεπτή αντίδραση αποπρωτονίωσης των μονομερών CHB (A) και ACH (B) με οξύ/βάση.

**Σχήμα 18.** Αριστερά: υδρόφιλο βιοπολυμερές σε pH 9.2. Δεξιά: υδρόφοβο βιοπολυμερές σε pH 7.4. Στις φωτογραφίες απεικονίζονται διαλύματα του βιοπολυμερούς BSA-polyCHB.

**Σχήμα 19.** Αριστερά: Συγκεντρώσεις βιοπολυμερούς και βάσης. Δεξιά: Διάγραμμα μεταβολής της T% συναρτήσει του pH διαλύματος BSA-polyCHB. Πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση του διαλύματος με προσθήκη διαλύματος 0.05M NaOH.

**Σχήμα 20.** $2^{η}$ παράγωγος %T.

**Σχήμα 21.** A) Τιτλοδότηση του ιδίου δείγματος με προσθήκη 0.01M HCL. B) Τιτλοδότηση του βιοπολυμερούς BSA-polyCHB με προσθήκη 0.01 M NaOH.

**Σχήμα 22.** A)Δεύτερη τιτλοδότηση βιοπολυμερούς BSA-polyCHB με προσθήκη 0.01MNaOH. B) Αντίστροφη τιτλοδότηση του δείγματος με την προσθήκη 0.01M HCL και Γ) ο πίνακας με τις ποσότητες οξέος και βάση που χρησιμοποιήθηκαν.

**Σχήμα 23.** Διαγράμματα της $2^{ης}$ παραγώγου % T.

**Σχήμα 24.** Διαγράμματα της $2^{ης}$ παραγώγου % T.

**Σχήμα 25.** A) Τιτλοδότηση του βιοπολυμερούς BSA-polyCHB με προσθήκη NAOH(μαύρη γραμμή) και επανάληψη τιτλοδότησης στο ίδιο δείγμα (κόκκινη γραμμή). B) Αντίστροφη τιτλοδότηση με προσθήκη HCl (μαύρη γραμμή) και επανάληψη της διαδικασίας (κόκκινη γραμμή). Γ) Μεταβολή της συγκέντρωσης του βιοπολυμερούς μετά το τέλος των δύο κύκλων.

**Σχήμα 26.** A)Τιτλοδότηση του βιοπολυμερούς BSA-polyACH με προσθήκη 0.05MNaOH. B) Αντίστροφη τιτλοδότηση του δείγματος με προσθήκη 0.05 MHCL.

**Σχήμα 27.** Διαγράμματα της $2^{ης}$ παραγώγου % T.

**Σχήμα 28.** Τιτλοδότηση του βιοπολυμερούς BSA-polyACH με προσθήκη βάσης (A) και οξέος(B). Ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν και αλλαγή της συγκέντρωσης του προϊόντος (Γ) .

**Σχήμα 29.** Διαγράμματα της $2^{ης}$ παραγώγου % T.

**Σχήμα 30.** A) Τιτλοδότηση του βιοπολυμερούς BSA-polyACH, με προσθήκη NAOH (μαύρη γραμμή) και δεύτερη τιτλοδότηση του ιδίου δείγματος (κόκκινη γραμμή). B)Τιτλοδότηση του βιοπολυμερούς BSA-polyACH με προσθήκη HCl (μαύρη γραμμή) και επανάληψη της τιτλοδότησης (κόκκινη γραμμή).

**Σχήμα 31.** Συνθετική πορεία του μαλεϊμίδο-ATRP εκκινητή I.

**Σχήμα 32.** Σύνθεση της ένωσης 1 από το μηλεϊνικό ανυδρίτη

**Σχήμα 33.** Σύνθεση του μαλεϊμίδο-ATRP εκκινητή I από την προστατευμένη του μορφή

**Σχήμα 34.** Συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή BSA μακροεκκινητή II

**Σχήμα 35.** Insitu ATRP σύνθεση των γιγάντιων αμφίφιλων βιοπολυμερών BSA-polyCHB και BSA-polyACH

## ΠΙΝΑΚΕΣ

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1.** Συγκεντρώσεις βάσης/ οξέος

**ΠΙΝΑΚΑΣ 2.** Αντιδραστήρια

**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.** Σύνθεση γιγάντιων αμφίφιλων βιοπολυμερών BSA-polyCHB και BSA-polyACH

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Τα φάσματα NMR των ενώσεων της εργασίας

**Σχήμα 36.** Φάσμα $^{1}$HNMR του ATRPεκκινητή I.

**Σχήμα 37.** Φάσμα $^{1}$HNMR του 4,10-διοξατρικυκλο [5.2.1.0] δεκ-8-ενο-3,5-διόνη (1)

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Το ενδιαφέρον των ερευνητών στον κλάδο των πολυμερών εστιάζεται τα τελευταία χρόνια και στη δημιουργία “έξυπνων” πολυμερών, δηλαδή πολυμερών με την ιδιότητα να αποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα αλλάζοντας τις ιδιότητές τους. Τα “έξυπνα” αυτά πολυμερή μπορούν να σχεδιαστούν με στόχο να είναι βιοσυμβατά και να μιμούνται βιολογικά συστήματα έτσι ώστε να συμβάλλουν στη βελτίωση της ανθρώπινης υγείας και στην ποιότητα ζωής. Ο σκοπός της διπλωματικής αυτής εργασίας ήταν η σύνθεση γιγάντιων αμφίφιλων βιοπολυμερών - συζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς – με την ιδιότητα απόκρισης σε μεταβολές του pH.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση ενός διλειτουργικού εκκινητή ATRP πολυμερισμού και στη συνέχεια χρησιμοποιώντας την πρωτεΐνη αλβουμίνη από ορό βοοειδών (BSA, λευκωματίνη), έγινε η σύνθεση του βιομακροεκκινητή. Τέλος, χρησιμοποιώντας τα αποκρίσιμα σε μεταβολές του pH μονομερή 2-(3-chloro-4-hydroxybenzamido)ethyl acrylate (CHB) και 2-(acryloyloxy)ethyl 3-chloro-4-hydroxybenzoate (ACH), πραγματοποιήθηκε η σύνθεση γιγάντιων αμφίφιλων συζυγών πολυμερούς-πρωτεΐνης.

Η μελέτη της απόκρισης των βιοπολυμερών σε μεταβολές του pH καθώς και ο προσδιορισμός της τιμής του pH όπου επέρχεται αλλαγή της διαλυτότητας των βιοπολυμερών (κρίσιμο σημείο), εξετάστηκε με μέτρηση της διαπερατότητας διαλυμάτων των βιοπολυμερών σε διαφορετικά pH με τη βοήθεια φασματοσκοπίας UV-Vis. Επιβεβαιώθηκε η επαναληψιμότητα του πειράματος καθώς και η δυνατότητα αναστρέψιμης απόκρισης του δείγματος.

**ABSTRACT**

Special interest of scientists in the field of polymers is focused in the synthesis of “smart” polymers, that is polymers that can respond to external stimuli by changing their properties. These “smart” polymers can be designed to be biocompatible and mimic biological systems and thus can play an important role in improving human health and the quality of life. The purpose of this thesis was the synthesis of pH-responsive of Giant Amphiphiles i.e. protein-polymer bioconjugates.

Initially, the synthesis of a bifuctional ATRP initiator was accomplished, and then, by utilizing Bovine Serum Albumin (BSA), the synthesis of the corresponding biomacroinitiator was achieved. By using as monomers 2-(3-chloro-4-hydroxybenzamido)ethyl acrylate (CHB) and 2-(acryloyloxy)ethyl 3-chloro-4-hydroxybenzoate (ACH), the synthesis of pH responsive Giant Amphiphiles i.e. protein-polymer- bioconjugates, was realized.

The study of the response of the biopolymers against pH changes as well as the identification of the turning pH point, in which the change of solubility is realized (critical point), was achieved by measuring the transmittance of biopolymer solutions at different pH values with UV-Vis spectroscopy. The results confirmed that the new biopolymers were pH responsive and the response was reversible.

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Το ενδιαφέρον των ερευνητών για τον κλάδο των πολυμερών έχει ξεκινήσει πριν από πολλές δεκαετίες και υπάρχουν πρωτοποριακές εξελίξεις με εφαρμογές σε πολλούς κλάδους της βιομηχανίας χρηστικών και καταναλωτικών προϊόντων και της ιατρικής.[1,2]

Τα αμφίφιλα συμπολυμερή, αποτελούν μία ιδιαίτερη κατηγορία πολυμερών τα οποία περιλαμβάνουν τουλάχιστον μία υδρόφιλη και μία υδρόβοφη συστάδα σε κάθε πολυμερική αλυσίδα. Τα αμφίφιλα συμπολυμερή χαρακτηρίζονται από διαφορετική διαλυτότητα των συστάδων τους.[3] Τα πολυμερή που αποκρίνονται σε φυσικά ή χημικά εξωτερικά ερεθίσματα (όπως η θερμοκρασία, το pH ή η ιονική ισχύς) και υπόκεινται σε αντιστρεπτές αλλαγές των ιδιοτήτων τους ονομάζονται αποκρίσιμα ή "έξυπνα πολυμερή".[2, 4, 5, 6]

Κλάδος της επιστήμης των πολυμερών που στοχεύει στη δημιουργία βιοσυζυγών (bioconjugates) πολυμερούς-πρωτεΐνης περιλαμβάνει και τη σύζευξη με "έξυπνα πολυμερή". Τα βιοπολυμερή αυτά αναμένεται να παρουσιάζουν βελτιωμένες ιδιότητες, συνδυάζοντας τα πλεονεκτήματα και των δύο συστατικών.[5,7] Στο πλαίσιο των προσπαθειών αυτών εντάσσεται και η δημιουργία Γιγάντιων Αμφίφιλων βιο-πολυμερών (Giant Amphiphiles), τα οποία στοχεύουν στη μίμηση των βιολογικών συστημάτων και καθώς παρουσιάζουν ιδιότητες όπως βιοσυμβατότητα, αναμένεται να βρουν πολλές εφαρμογές στο τομέα της βιοϊατρικής.[8,9, 10,11]

Οι όξινες συνθήκες που επικρατούν στον οργανισμό στην περίπτωση παθολογικών καταστάσεων, όπως π.χ ο καρκίνος, έχουν οδηγήσει τους ερευνητές στη μελέτη σύνθεσης γιγάντιων αμφίφιλων βιοπολυμερών αποκρινόμενων σε μεταβολές του pH. Η μεταβολής της αμφιλικότητας των πολυμερών αυτών επέρχεται σε μία συγκεκριμένη τιμή που ονομάζεται κρίσιμη τιμή pH (critical point). [12,13,14].

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία εντάσσεται στο πλαίσιο των ερευνών αυτών. Ειδικότερα χρησιμοποιώντας, τα αποκρίσιμα σε μεταβολές του pH μονομερή 2-(3-chloro-4-hydroxybenzamido)ethyl acrylate (CHB) και 2-(acryloyloxy)ethyl 3-chloro-4-hydroxybenzoate (ACH), τα οποία συντέθηκαν και μελετήθηκαν σε άλλες ερευνητικές μελέτες [15,16], πραγματοποιείται η σύνθεση, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία,[11,17] των γιγάντιων αμφίφιλων συζυγών πολυμερούς –πρωτεΐνης, BSA–polyCHB και BSA–polyACH, που αποκρίνονται σε μεταβολές του pH και υπολογίστηκε η κρίσιμη τιμή pH. Εξετάστηκε επίσης η επαναληψιμότητα καθώς και η δυνατότητα αναστρέψιμης απόκρισης του δείγματος.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

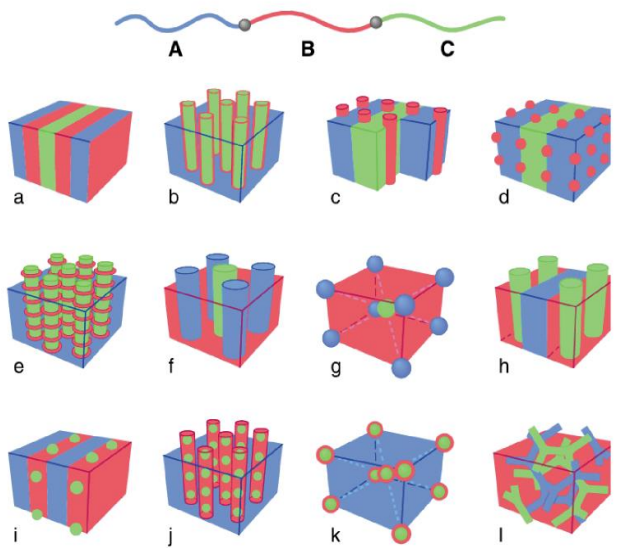
### 1.1 ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ

Το ενδιαφέρον των ερευνητών για τον κλάδο των πολυμερών έχει εκδηλωθεί πριν από πολλές δεκαετίες με αποτέλεσμα να υπάρχουν πολλά καινοτόμα επιτεύγματα στον τομέα αυτό για τα οποία έχουν απονεμηθεί και βραβεία Νόμπελ. Τα πολυμερή σήμερα παίζουν ένα σπουδαίο ρόλο στη σύγχρονη ζωή και υπάρχουν πρωτοποριακές εξελίξεις με εφαρμογές σε πολλούς κλάδους της βιομηχανίας όπως π.χ. χρωμάτων, πλαστικών, καλλυντικών, ρούχων αλλά και της επιστήμης με ιδιαίτερη έμφαση στην ιατρική και στη φαρμακευτική. Ο Λόρδος Todd, πρόεδρος της Βασιλικής Εταιρείας του Λονδίνου και βραβευμένος με το Nobel Χημείας το 1957 είχε πει χαρακτηριστικά: «Έχω την τάση να πιστεύω ότι η ανάπτυξη του πολυμερισμού υπήρξε το μεγαλύτερο ίσως επίτευγμα της χημείας, διότι είχε το μεγαλύτερο αντίκτυπο στην καθημερινή μας ζωή από κάθε άλλον».[1]

Τα πολυμερή είναι μόρια μεγάλου μεγέθους και αποτελούνται από αλυσίδες επαναλαμβανόμενων μονάδων, τα μονομερή, συνδεόμενα μεταξύ τους με ομοιοπολικούς δεσμούς, ενώ το σύμπλεγμα αυτών των μορίων συγκρατούνται με διάφορους τύπους διαμοριακών δυνάμεων όπως δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις διπόλου – διπόλου και δυνάμεις London. Το πολυμερές που περιέχει ένα μοναδικό είδος επαναλαμβανόμενης μονάδας ονομάζεται ομοπολυμερές (homopolymer), ενώ εκείνο το οποίο περιέχει πάνω από μία επαναλαμβανόμενη μονάδα ονομάζεται συμπολυμερές (copolymer).[1]

Όταν τα διαφορετικά μονομερή σχηματίζουν συστάδες (blocks) κατά μήκος της πολυμερικής αλυσίδας, το συμπολυμερές ονομάζεται συσταδικό συμπολυμερές. Οι συστάδες αυτές, σε αρκετές περιπτώσεις, έχουν την τάση να αυτοοργανώνονται (self- assembly) και να σχηματίζουν ποικίλες, σε μορφολογία, δομές, σε διαλύτη εκλεκτικό για μια συγκεκριμένη συστάδα (θερμοδυναμικά ευννοούμενο διαλύτη), όπως για παράδειγμα σφαιρικά και κυλινδρικά μικύλλια ή μορφές νανοδομημένων υλικών σε τήγμα που παρουσιάζουν μεγάλη συμμετρία , όπως στο σχήμα 1 που ακολουθεί.[1,18]

Ένα γραμμικό ABC τρισυσταδικό πολυμερές σχηματίζει συστάδες που έχουν την τάση να διαχωρίζονται σε μικροφάσεις, η έκταση και η ποικιλομορφία των οποίων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως ο όγκος και το μήκος των συστάδων, ο συνδυασμός της αλληλουχίας των συστάδων καθώς και η αρχιτεκτονική των αλυσίδων.




***Σχήμα 1.*** *Μορφολογίες νανοδομημένων συμπολυμερών σε τήγμα.*[18]

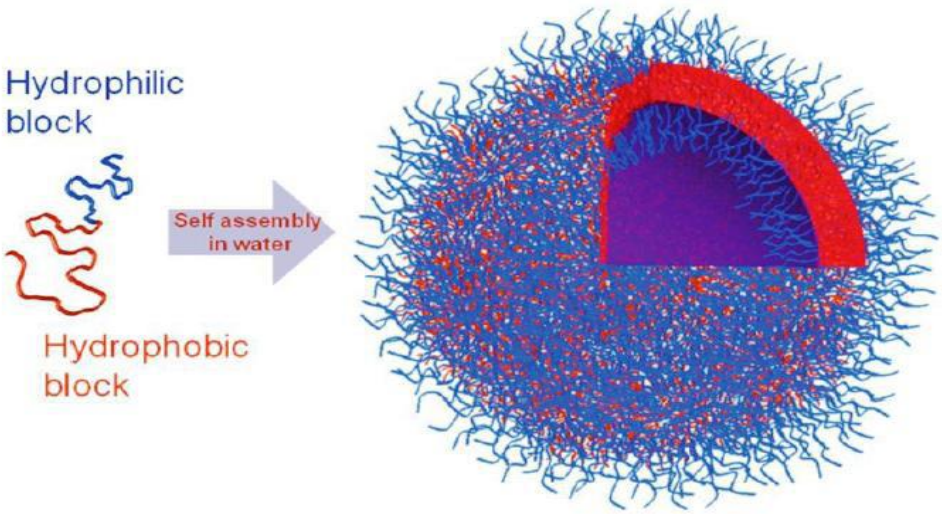
Η μοναδική τους αυτή ιδιότητα τα καθιστά ενδιαφέροντα μακρομόρια για πολλαπλές εφαρμογές όπως αποθήκευση πληροφοριών, ικανότητα να δρουν σαν ξενιστές φαρμάκων, φωτονικοί κρύσταλλοι, κλπ.

## 1.2 ΑΜΦΙΦΙΛΑ ΣΥΜΠΟΛΥΜΕΡΗ

Η λέξη “αμφίφιλο” προέρχεται από τις λέξεις "άμφω" και "φίλος" και αναφέρεται σε ένα μόριο που έχει δύο διακριτά τμήματα. Το πολικό, που έλκεται από πολικούς διαλύτες (συχνά είναι υδρόφιλο) και το άπολο που έλκεται από μη πολικούς διαλύτες (υδρόφοβο). Τα αμφίφιλα μόρια περιέχουν μία πολική κεφαλή και μια μη πολική ουρά.[3]

Τα αμφίφιλα συμπολυμερή, περιλαμβάνουν τουλάχιστον μία υδρόφιλη και μία υδρόβοφη συστάδα σε κάθε πολυμερική αλυσίδα. Οι ασύμβατες αυτές συστάδες συσσωματώνονται, σχηματίζοντας διάφορες μορφολογίες απουσία διαλύτη. Στην περίπτωση της διάλυσής τους σε διαλύτη παρατηρείται αυτοοργάνωση των συστάδων σε δομές ανάλογες με τη δομή και την αρχιτεκτονική τους. Στις πιο συνηθισμένες δομές των μικκυλίων σε υδατικό διάλυμα, στον πυρήνα του μικκυλίου συσσωματώνονται οι υδρόφοβες συστάδες, ενώ οι υδρόφιλες σχηματίζουν την κορώνα του μικκυλίου που περιβάλλει τον υδρόφοβο πυρήνα.[3,19,20]

Στο σχήμα 2 παρουσιάζεται ενδεικτικά η εικόνα της αυτοοργάνωσης, σε μορφή μεμβρανών, ενός αμφίφιλου δισυσταδικού συμπολυμερούς σε υδατικό διάλυμα, μετά την επίτευξη θερμοδυναμικής ισορροπίας.



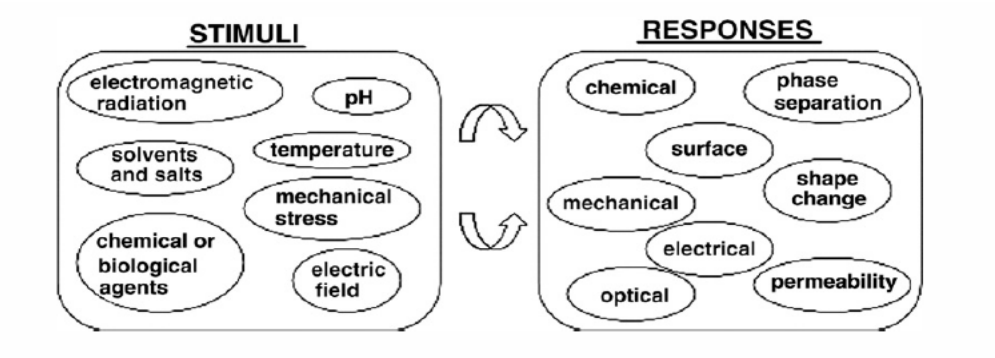

***Σχήμα 2.*** *Αυτοοργάνωση αμφίφιλου δισυσταδικού πολυμερούς.*[20]

Ο αμφίφιλος χαρακτήρας μπορεί να δημιουργηθεί και με τροποποίηση της διαλυτότητας μίας συστάδας σε κάποιο διαλύτη μετά την σύνθεση του συμπολυμερούς, μέσω αλλαγής του pH, της θερμοκρασίας, της ιοντικής ισχύος καθώς επίσης και με συμπλοκοποίηση με άλλες δομικές ομάδες ή συστάδες που αυξάνουν επιλεκτικά την υδροφιλικότητα ή την υδροφοβικότητα αυτής της συστάδας και οδηγούν στη δημιουργία διάφορων νανοδομών.[20]

## 1.3 ΑΠΟΚΡΙΣΙΜΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ – ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΕ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΟΥ pH

Έντονο είναι το ενδιαφέρον των επιστημόνων στον κλάδο των πολυμερών για τη σύνθεση υλικών που αποκρίνονται σε φυσικά η χημικά ερεθίσματα και ονομάζονται "αποκρίσιμα πολυμερή" (stimuli-responsive) ή "έξυπνα πολυμερή". Ως απόκριση στα ασκούμενα εξωτερικά ερεθίσματα εμφανίζουν αλλαγές στη διαμόρφωσή τους οι οποίες είναι συνήθως αντιστρεπτές.[2,4,5,6]

Στο σχήμα 3[5] απεικονίζονται παραδείγματα ερεθισμάτων στα οποία αποκρίνονται τα συνθετικά πολυμερή καθώς και οι συνεπακόλουθες αλλαγές. Η αλλαγή της ιοντικής ισχύος ή του pH (χημικό ερέθισμα) για παράδειγμα, μεταβάλλουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων και του διαλύτη ή μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων σε μοριακό επίπεδο, ενώ η μεταβολή της θερμοκρασίας, του ηλεκτρικού ή του μαγνητικού πεδίου (φυσικό ερέθισμα) επηρεάζει θερμοδυναμικές παραμέτρους όπως είναι η ενθαλπία και η εντροπία και μεταβάλλει τις μοριακές αλληλεπιδράσεις .




***Σχήμα 3.****Φυσικά, χημικά ερεθίσματα και οι παρατηρούμενες -συνήθως αντιστρεπτές- αποκρίσεις των συνθετικών πολυμερών*[5]

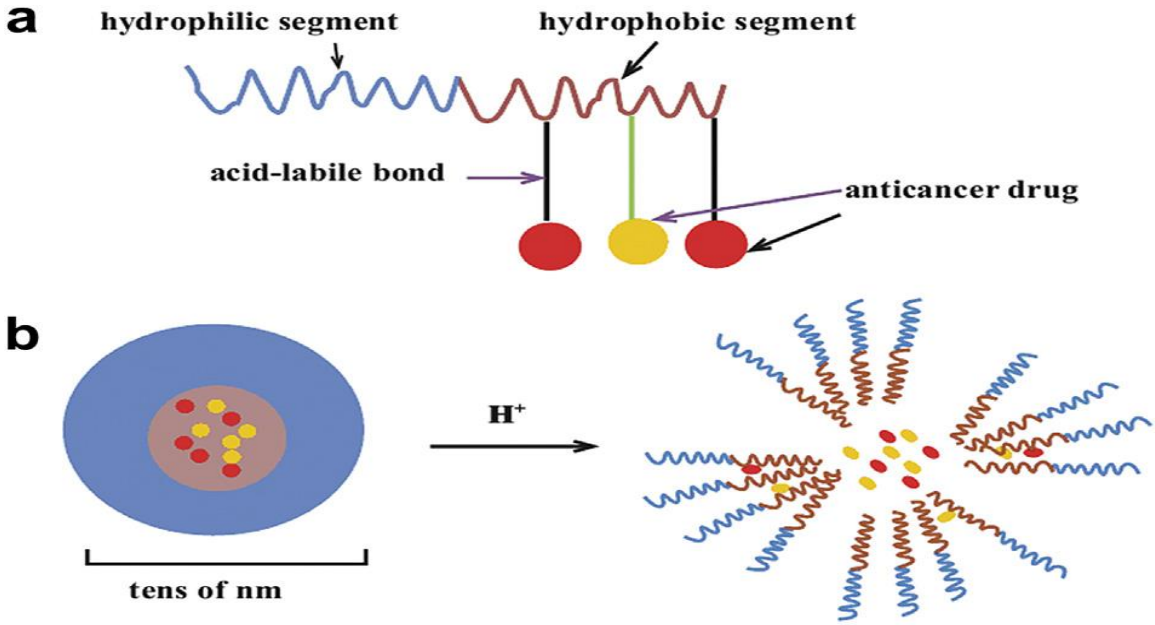
Τα πολυμερή αυτά έχουν πολλές εφαρμογές στον τομέα της βιομηχανίας χρωμάτων, καλλυντικών, της περιβαλλοντολογικής αποκατάστασης, στις έξυπνες επιφάνειες, στους αισθητήρες και βιο-αισθητήρες αλλά και στον τομέα της βιολογίας, της φαρμακευτικής και της ιατρικής.[2,5,6] Ειδικότερα στον τομέα της φαρμακευτικής και της ιατρικής η έρευνα εστιάζεται στη σύνθεση αμφίφιλων πολυμερών που ανταποκρίνονται σε μεταβολές του pH. Η αιτία του αυξημένου ενδιαφέροντος είναι οι όξινες συνθήκες που επικρατούν στον οργανισμό στην περίπτωση παθολογικών καταστάσεων, όπως καρκίνος , φλεγμονές , μολύνσεις κλπ.

Τα αποκρινόμενα σε μεταβολές pH αμφίφιλα πολυμερή, μπορούν να δεχτούν ή να αποδώσουν ένα πρωτόνιο καθώς περιλαμβάνουν στη δομή τους σαν ρυθμιστικό παράγοντα μια όξινη ή βασική ομάδα. Ειδικότερα, σε υδατικά διαλύματα με ουδέτερο ή βασικό pH η αποκρίσιμη ομάδα μπορεί να αποπρωτονιωθεί αποκτώντας αρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα το πολυμερές να οδηγείται σε διόγκωση, λόγω της αύξησης της πυκνότητας του φορτίου και να γίνεται υδρόφιλο. Αντίθετα όταν η αποκρίσιμη ομάδα πρωτονιωθεί σε όξινες συνθήκες, το πολυμερές γίνεται υδρόφοβο και μειώνεται ο όγκος του. Η τιμή στην οποία αλλάζει η διαλυτότητα του πολυμερούς ονομάζεται κρίσιμη τιμή pH (critical point). [12,13,14,21,22,23, 24,25,26]

Για τη σπουδαιότητα των υλικών αυτών στον τομέα της υγείας, μπορούμε να αναφέρουμε για παράδειγμα ότι τα συμβατικά λιποσώματα, που χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά των φαρμάκων παρουσιάζουν μειωμένη φυσικοχημική και βιολογική σταθερότητα μειώνοντας έτσι το χρόνο παραμονής τους στον οργανισμό. Αντιθέτως, τα νέα πολυμερικά προϊόντα επιτυγχάνουν την αποδέσμευση του φαρμακομορίου που έχει ενσωματωθεί σε αυτά με αργό ρυθμό και έτσι περιορίζονται οι ανεπιθύμητες παρενέργειες.[14,27] Ιδιαίτερα ενθαρρυντικά είναι τα αποτελέσματα στην αντιμετώπιση του καρκίνου όπου τα πολυμερικά μικκύλια τα οποία συναρμολογούνται από τα αμφίφιλα σύμπλοκα συμπολυμερών έχουν αποδειχτεί πολύ αποτελεσματικά. Αυτό οφείλεται στην ύπαρξη ενός υδρόφοβου πυρήνα ο

οποίος χρησιμεύει για τη φόρτωση των υδρόφοβων φαρμάκων και ενός υδρόφιλου κελύφους που χρησιμεύει για την παρεμπόδιση της προσρόφησης των πρωτεϊνών και την παρατεταμένη κυκλοφορία του φαρμάκου στο αίμα.[12,28]

Στο σχήμα 4 που ακολουθεί, στο α' μέρος παρουσιάζονται αμφίφιλα συμπολυμερή κατά συστάδες στα οποία είναι συζευγμένα τα αντικαρκινικά φάρμακα. Στο β' μέρος απεικονίζονται τα ευαίσθητα στο pH πολυμερικά μικκύλια τα οποία είναι σταθερά κάτω από φυσιολογικό pH 7.4, αλλά σταδιακά απελευθερώνουν φάρμακα σε όξινο περιβάλλον, όπως συμπαγείς όγκους, ενδοσώματα και λυσοσώματα μέσω της διάσπασης των ασταθών δεσμών.[29,30]



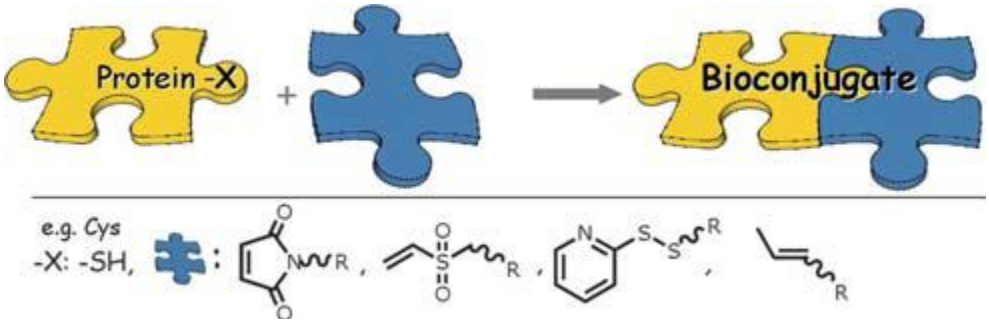

***Σχήμα 4.*** *α) Σύζευξη αντικαρκινικού φαρμάκου σε αμφίφιλο πολυμερές β) απελευθέρωση αντικαρκινικού φαρμάκου από πολυμερές αποκρίσιμο σε μεταβολές του pH με αύξηση της οξύτητας.*[29]

### 1.4 ΓΙΓΑΝΤΙΑ ΑΜΦΙΦΙΛΑ ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΗ

Στον κλάδο των (βιο)πολυμερών τα τελευταία χρόνια μελετώνται ιδιαίτερα η σύνθεση και οι ιδιότητες των βιοσυζυγών μορίων (bioconjugates) τα οποία αποτελούνται από βιολογικά συστατικά όπως είναι οι πρωτεΐνες, και από συνθετικά τμήματα όπως τα πολυμερή, και αναμένεται να συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα και των δύο συστατικών τους.[5,7,8]

Η βιοσύζευξη - δηλαδή η σύνδεση του βιολογικού τμήματος με το συνθετικό- εξαρτάται από τη δομή του βιολογικού τμήματος, από τη χημική συγγένεια του συνθετικού τμήματος, αλλά και άλλους πρακτικούς περιορισμούς όπως οι συνθήκες της αντίδρασης, η διαλυτότητα

κλπ. Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι λειτουργικές ομάδες που επιτρέπουν τη σύζευξη μίας πρωτεΐνης με ένα συνθετικό μόριο στο κυστεϊνικό κατάλοιπο της πρωτεΐνης.[8]




***Σχήμα 5.*** *Σύζευξη συνθετικού πολυμερούς στο κυστεϊνικό κατάλοιπο πρωτεΐνης για τη δημιουργία ενός βιοϋβριδίου πολυμερούς-πρωτεΐνης.* [8]

Τα συζυγή πολυμερούς-πρωτεΐνης αναμένεται, όπως αναφέρθηκε και προηγούμενα, να συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα των συνθετικών συστατικών με αυτά του πρωτεϊνικού τους τμήματος. Ειδικότερα το υδρόφοβο πολυμερές αναμένεται να ενισχύσει τη σταθερότητα του βιοσυζυγούς, να συμβάλλει στη αύξηση της διαλυτότητάς του σε μη υδατικούς διαλύτες και να αυξήσει τη συνολική λειτουργικότητα της δομής. Από την άλλη πλευρά η πρωτεΐνη αναμένεται να συμβάλλει θετικά στη βιοσυμβατότητα του συζυγούς και στη μείωση της πολυδιασποράς που συνήθως εμφανίζουν τα συνθετικά συμπολυμερή.[7,8] Λόγω αυτών των χαρακτηριστικών τα βιοσυζυγή πολυμερούς-πρωτεΐνης μελετώνται για διάφορες φαρμακολογικές και βιοϊατρικές εφαρμογές.

## 1.5 ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΥ- ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΥ ATRP

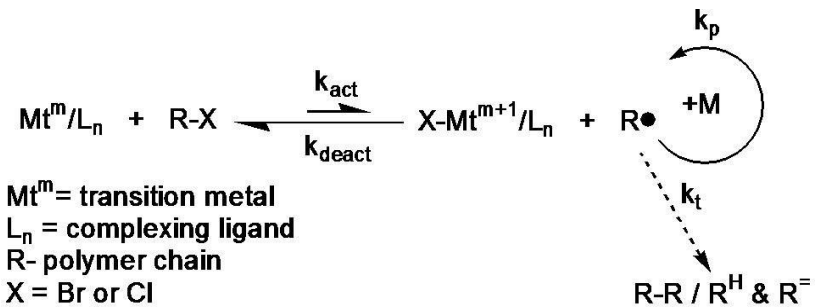
Πολυμερισμός ονομάζεται η χημική αντίδραση κατά την οποία οι επαναλαμβανόμενες ομάδες, τα μονομερή, ενώνονται και σχηματίζουν το πολυμερές. [1]

Ο πολυμερισμός ελευθέρων ριζών (FRP) και ο ζωντανός πολυμερισμός (LP) αποτελούν δύο είδη του πολυμερισμού ανάπτυξης της αλυσίδας. Στο ζωντανό πολυμερισμό δεν λαμβάνουν χώρα μη αντιστρεπτές αντιδράσεις τερματισμού και δεν υπάρχει στάδιο τερματισμού – η αντίδραση διεξάγεται μέχρι να καταναλωθούν όλα τα μονομερή. Στον FRP πολυμερισμό, οι ρίζες που εκκινούν, προάγονται και τερματίζονται σχεδόν ακαριαία, τα πολυμερή ουσιαστικά αναπτύσσονται κάτω από διαφορετικές συνθήκες με αποτέλεσμα να παρατηρείται σαφώς ευρύτερη κατανομή του μήκους της πολυμερικής αλυσίδας και να

υπάρχει περιορισμένος έλεγχος στη σύσταση και τις ιδιότητες του παραγόμενου πολυμερούς.[1,31,32,33]

Ο ελεγχόμενος/ζωντανός πολυμερισμός ριζών (CLRP) ή αναστρέψιμος πολυμερισμός ριζών μέσω απενεργοποίησης, αποτελεί μία εναλλακτική προσέγγιση του FRP. Αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο στον τομέα σύνθεσης των πολυμερών καθώς συνδυάζει τα πλεονεκτήματα του ριζικού πολυμερισμού όπως είναι η ποικιλία μονομερών και η μεγάλη ταχύτητα αντίδρασης αλλά και τα πλεονεκτήματα του ζωντανού πολυμερισμού όπως οι στενές κατανομές μοριακών βαρών, τα ελεγχόμενα μοριακά βάρη, και ο σχηματισμός συσταδικών συμπολυμερών, αστεροειδών πολυμερών και άλλων τύπων πολυμερών με σαφώς καθορισμένες αρχιτεκτονικές.[1,33,34] Τρεις είναι οι βασικοί μηχανισμού του ελεγχόμενου ριζικού πολυμερισμού: ο πολυμερισμός ελευθέρων ριζών μέσω μεταφοράς ατόμου (ATRP), ο πολυμερισμός ελευθέρων ριζών αντίστροφης προσθήκης-διάσπασης μέσω μεταφοράς αλυσίδας (RAFT), και ο σταθερός πολυμερισμός ελεύθερων ριζών (SFRP).[1,33, 35,36,37]

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε ο ATRP μηχανισμός και για το λόγο αυτό θα αναλυθεί περισσότερο. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης πολυμερισμού απαιτείται ένας εκκινητής (απαρχητής) ο οποίος φέρει ένα αλογόνο, ένας μεταλλικός καταλύτης, που είναι ενωμένος με ένα υποκαταστάτη, το μονομερές και ο διαλύτης. Η ισορροπία του μηχανισμού μπορεί να απεικονισθεί με την εξίσωση: $R\text{-}X \leftrightarrow R^{\cdot} + X$ όπου R-X συμβολίζεται ο εκκινητής και X είναι η ομάδα που έχει τη δυνατότητα να απομακρυνθεί και είναι αλογόνο όπως το χλώριο ή το βρώμιο. Με την απόσπαση της ομάδας X σχηματίζονται ρίζες $R^{\cdot}$ στις οποίες στηρίζεται η ανάπτυξη της πολυμερικής αλυσίδας. Αυτό γίνεται με τη συνδρομή μεταλλικού καταλύτη ($Mt^m$), όπως είναι ο χαλκός, το ρουθήνιο, το νικέλιο και ο σίδηρος. Το μέταλλο δημιουργεί χηλικό σύμπλοκο ($Mt^mL_n$) με υποκαταστάτες (L) που είναι οργανικές βάσεις, όπως οι διπυρίδινες ή οι αμίνες, οι οποίες σταθεροποιούν το μέταλλο σε διάφορες οξειδωτικές καταστάσεις (m).[1,33,38] Στο σχήμα 6 που ακολουθεί παρουσιάζεται ο μηχανισμός του ATRP πολυμερισμού.




***Σχήμα 6.*** *Μηχανισμός ATRP πολυμερισμού.*[38]

Στο στάδιο ενεργοποίησης, η ομάδα X του εκκινητή δεσμεύεται ομοιοπολικά στον ενεργοποιητή με ταυτόχρονη οξείδωση στην αντίστοιχη υψηλή οξειδωτική κατάσταση του μετάλλου, $X\text{-}Mt^{m+1}L_n$. Το νέο σύμπλοκο που δημιουργείται, μπορεί να μεταφέρει γρήγορα την ομάδα X πίσω στις ρίζες μετατρέποντάς τις σε αδρανή αλκυλικά (ψευδο) αλογονίδια.

Η μέθοδος ATRP θεωρείται πολύ αποτελεσματική στη σύνθεση πρωτεϊνικών γιγάντιων αμφίφιλων βιοπολυμερών και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε πολλά εργαστήρια λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει.[32,35,36,38] Οι στρατηγικές σύζευξης πολυμερών με πρωτεΐνες που αναφέρθηκαν αρχικά στη βιβλιογραφία παρουσίασαν σημαντικά μειονεκτήματα και χαμηλές αποδόσεις λόγω της ασυμβατότητας της διαλυτότητας της πρωτεΐνης και του υδρόφοβου πολυμερούς καθώς επίσης εξαιτίας της σταθερότητας της πρωτεΐνης σε οργανικό περιβάλλον. Επιπλέον οι συμβατικές μέθοδοι σύζευξης του πολυμερούς με την πρωτεΐνη είχαν χαμηλές αποδόσεις και επομένως ήταν απαραίτητο ένα επιπλέον στάδιο για την απομόνωση του βιοσυζυγούς.[9,11,39] Για να ξεπεραστούν τα προβλήματα αυτά, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ανάπτυξης του πολυμερούς από την πρωτεΐνη (grafting from) με τη βοήθεια ATRP μηχανισμού ο οποίος μπορεί να πραγματοποιηθεί για μία μεγάλη ποικιλία μονομερών, οδηγεί σε πολυμερή με χαμηλό δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και παρέχει τη δυνατότητα δημιουργίας ποικίλων λειτουργικών δομών.[8,9,10,11,38]

## 1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως αναλύθηκε στις προηγούμενες ενότητες 1.3 και 1.4 , τα αποκρίσιμα αμφίφιλα βιο-πολυμερή αναμένεται να εμφανίσουν σπουδαίες εφαρμογές σε πολλούς κλάδους επιστημών και ιδιαίτερα στον κλάδο της ιατρικής και της φαρμακευτικής. Στο πλαίσιο των ερευνητικών εργασιών στον τομέα αυτό, εντάσσεται και η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία, σκοπός της οποίας είναι η σύνθεση γιγάντιων βιοπολυμερών -συζυγών πρωτεΐνης-πολυμερούς- τα οποία είναι αποκρίσιμα σε μεταβολές του pH.

Για το σκοπό αυτό, ως βάση, χρησιμοποιήθηκαν μονομερή που συντέθηκαν και μελετήθηκαν από τους συνεργάτες του εργαστηρίου F. Mastrotto και και G. Mantovanni σε προηγούμενες ερευνητικές μελέτες[15,16]και πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα μονομερή2-(3-chloro-4-hydroxybenzamido)ethyl acrylate (CHB) και 2-(acryloyloxy)ethyl 3-chloro-4-hydroxybenzoate (ACH). Η σύνθεση των αποκρινόμενων σε μεταβολές του pH πολυμεροσωμάτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως νανομεταφορείς φαρμάκων πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια σύμφωνα με το πειραματικό πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε

στο εργαστήριο από τον Ν. Δραμουντάνη χρησιμοποιώντας ATRP grafting-from πολυμερισμό.[11,17]

Πιο συγκεκριμένα, αρχικά πραγματοποιήθηκε η σύνθεση ενός βιομακροεκκινητή, χρησιμοποιώντας την αλβουμίνη από ορό βοοειδών (BSA, λευκωματίνη), σαν πρώτυπη πρωτεΐνη εξαιτίας της ύπαρξης μίας λειτουργικής κυστεΐνης στη θέση 34. Ακολούθησε ATRP grafting των μονομερών CHB και ACH από τον μακροεκκινητή για τη δημιουργία των αποκρίσιμων Γιγάντιων Αμφίφιλων μορίων. Τα οργανικά προϊόντα χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία $^{1}$HNMR, ενώ τα βιοπολυμερή με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης και χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC).

Στη συνέχεια εξετάστηκε η απόκριση των βιοπολυμερών σε μεταβολές του pH με φασματοσκοπία UV-Vis. Πιο συγκεκριμένα με μέτρηση της μεταβολής της διαπερατότητας εξετάστηκε αν οι μεταβολές στο pH επέφεραν αλλαγές στον αμφίφιλο χαρακτήρα των βιοπολυμερών και έγινε προσπάθεια προσδιορισμού του κρίσιμου σημείου pH (pH critical point). Μελετήθηκε επίσης η επαναληψιμότητα καθώς και η ικανότητα αναστρέψιμης απόκρισης.

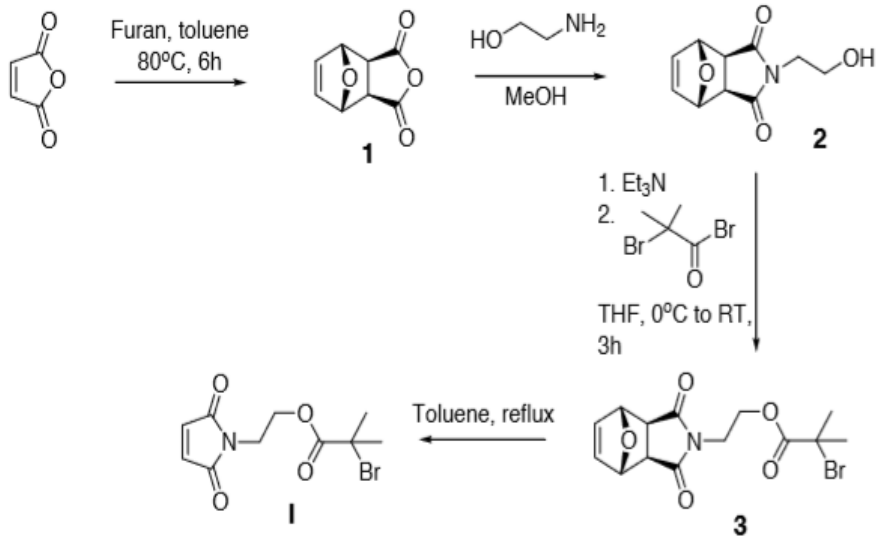
**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αρχικά αναφέρθηκε, ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η σύνθεση γιγάντιων αμφίφιλων βιοπολυμερών καθώς και η μελέτη της απόκρισης στη μεταβολή του pH. Στο κεφάλαιο αυτό θα παρουσιασθούν οι αντιδράσεις σύνθεσης του βιοεκκινητή που πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη βιβλιογραφία[11] καθώς και η συνθετική πορεία των γιγάντιων αμφίφιλων βιοπολυμερών των μονομερών 2-(3-chloro-4-hydroxybenzamido)ethyl acrylate (CHB) και 2-(acryloyloxy)ethyl 3-chloro-4-hydroxybenzoate (ACH),[15] που πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε στη διπλωματική εργασία του Ν. Δραμουντάνη.[17] Επίσης θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα της απόκρισης των βιοπολυμερών σε μεταβολές του pH. Η χρωματογραφία SEC, η φασματοσκοπία $^1$H NMR, η ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (PAGE) σε μη αποδιατακτικές συνθήκες και η φασματοσκοπία υπεριώδους–ορατού (UV-Vis) ήταν οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των βιοπολυμερών.

### 2.1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΜΑΛΕΪΜΙΔΟ-ATRP ΕΚΚΙΝΗΤΗ I[9,11,40]

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του εκκινητή I ο οποίος στο ένα άκρο φέρει μαλεϊμίδιο και στο άλλο φέρει εκκινητή ATRP πολυμερισμού. Στο σχήμα που ακουλουθεί παρουσιάζεται σχηματικά η συνολική συνθετική πορεία του μαλεϊμίδο-ATRP εκκινητή I.

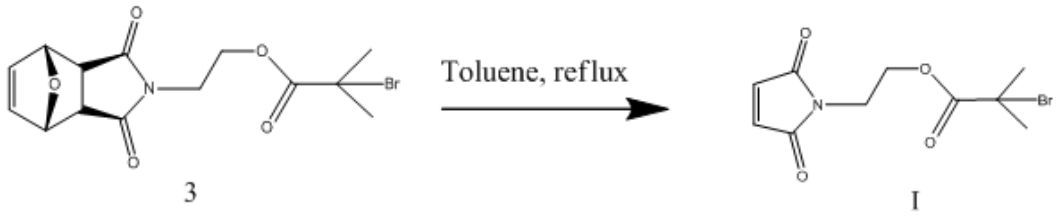



***Σχήμα 7.*** *Συνθετική πορεία του μαλεϊμίδο-ATRP εκκινητή I*[11]

Στη συγκεκριμένη εργασία για τη σύνθεση του μαλεϊμιδο-ATRP εκκινητή I δεν πραγματοποιήθηκαν όλες οι αντιδράσεις του σχήματος 7 καθώς τα μόρια 1, 2 και 3 υπήρχαν διαθέσιμα στο εργαστήριο. Ο μαλεϊμίδο-ATRP εκκινητής I αποτελεί από μόνος του ένα

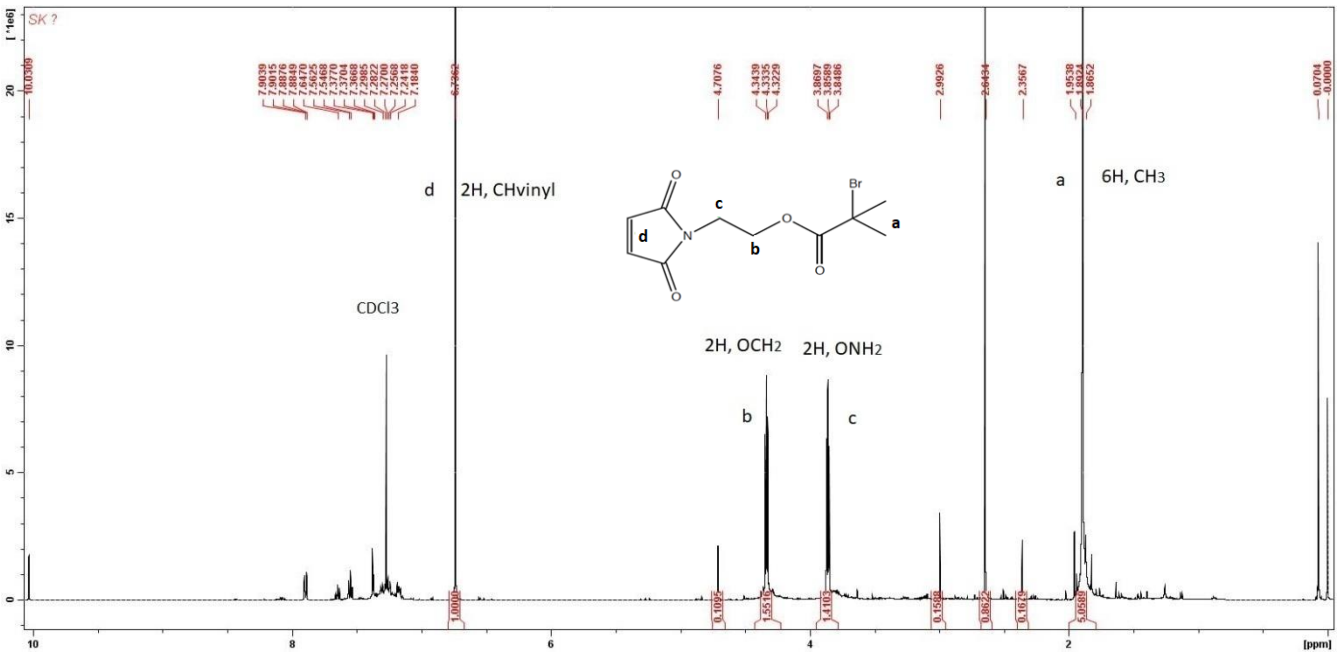
πολυμερίσιμο μονομερές και για αυτό συντίθεται και αποθηκεύεται σε μια προστατευμένη μορφή ( ένωση 3), που δεν του επιτρέπει να αυτο-πολυμεριστεί. Έτσι απαραίτητη ήταν μόνο η διαδικασία της αποπροστασίας του προκειμένου να παραχθεί ο διλειτουργικός εκκινητής.

Το στάδιο της αποπροστασίας πραγματοποιήθηκε σε διαλύτη τολουόλιο και θέρμανση του διαλύματος μέχρι βρασμού υπό αδρανή ατμόσφαιρα αζώτου για 8 ώρες (σχήμα 8). Η αντίδραση αυτή είναι γνωστή ως retroDiels-Alder.




***Σχήμα 8.*** *Σύνθεση του μαλεϊμίδο-ATRP εκκινητή I από την προστατευμένη του μορφή .*[11]

Το προϊόν που σχηματίστηκε από την αντίδραση χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία $^1$H-NMR (σχήμα 9). Χαρακτηριστική ήταν η κορυφη στα 6.73 ppm που αποδόθηκε στα βινυλικά πρωτόνια του προϊόντος.

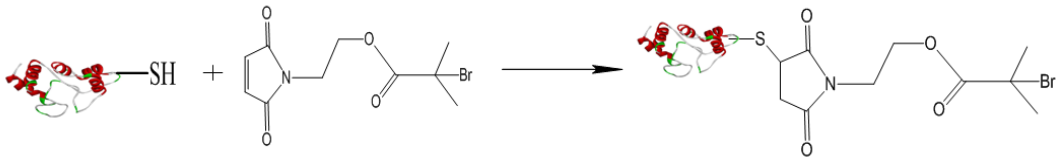



***Σχήμα 9.*** *Φάσμα $^1$HNMR του ATRP εκκινητή **I**,* $^1$HNMR (500 MHz, $CDCl_3$, 298 K): δ = 1.95 (s,6H, $CH_3$), 3.86(t, J = 5.3 Hz, 2H, $NCH_2$), 4.32 (t, J =4.7, 5.3 Hz, 2H, $OCH_2$); 6.73 (t, J = 1.0 Hz, 2H, $CH_{vinyl}$).

## 2.2 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ATRP-ΒΙΟΜΑΚΡΟΕΚΚΙΝΗΤΗ BSA-Br.

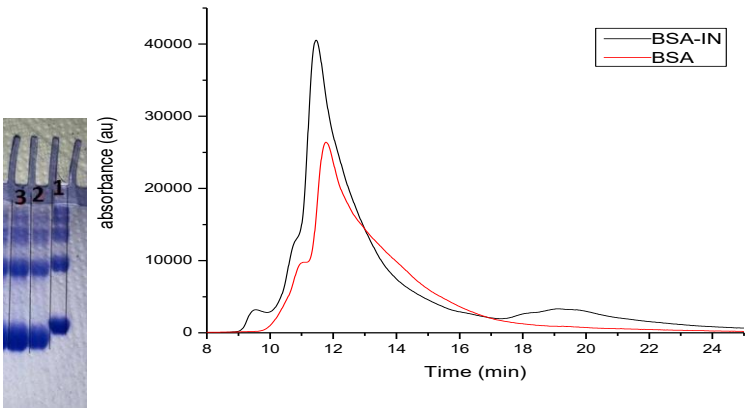
Η πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία ήταν η αλβουμίνη ορού βοοειδών. Η πρωτεΐνη αυτή επιλέχθηκε λόγω της ύπαρξης μιας ελεύθερης θειόλης στην

κυστεΐνη του καταλοίπου 34[10] η οποία, επειδή βρίσκεται εκτεθειμένη στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, είναι ιδανική καθώς μπορεί εύκολα να αντιδράσει με τον τροποποιημένο μαλεϊμίδο-ATRP εκκινητή I. Το προϊόν της αντίδρασης φέρει στο άκρο του ομάδα που δρα σαν εκκινητής για αντιδράσεις ATRP πολυμερισμού (προϊόν II).




***Σχήμα 10.*** *Συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή BSA μακροεκκινητή* ***II****.*[11]

Ειδικότερα, για την πραγματοποίηση της αντίδρασης αρχικά παρασκευάστηκε ένα διάλυμα 150 mM μαλεϊμίδο-ATRP εκκινητής I σε 10% DMSO (0.18 mmol, 1.2 ml, 40 equiv). Στη συνέχεια παρασκευάστηκε 0.35mM διάλυμα της πρωτεΐνης BSA σε 20 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7.4 (0.0045 mmol, 13 ml, 1 equiv) και ακολούθησε στάγδην προσθήκη του διαλύματος του εκκινητή στο διάλυμα της πρωτεΐνης. Η αντίδραση αυτή αφέθηκε σε ήπια ανάδευση για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε εμπλουτισμός του προϊόντος BSA-μακροεκκινητή II με διαπίδυση (dialysis) χρησιμοποιώντας μεμβράνες αναγεννημένης κυτταρίνης. Το μίγμα της αντίδρασης τοποθετήθηκε σε μεμβράνη κυτταρίνης με MWCO 20kDa και η διαπίδυση έγινε δύο φορές αρχικά ως προς 5 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.4 και στη συνέχεια ως προς 20mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.4. Ακολούθησε λυοφιλοποίηση και ο μακροεκκινητής αποθηκεύθηκε στους -20 °C πριν από τον ATRP πολυμερισμό του. Για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της αντίδρασης έγινε ηλεκτροφόρηση με πηκτή ακρυλαμιδίου σε μη αποδιατακτικές συνθήκες. Στο σχήμα 11 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα αποτελέσματα χαρακτηρισμού του BSA-μακροεκκινητή II.



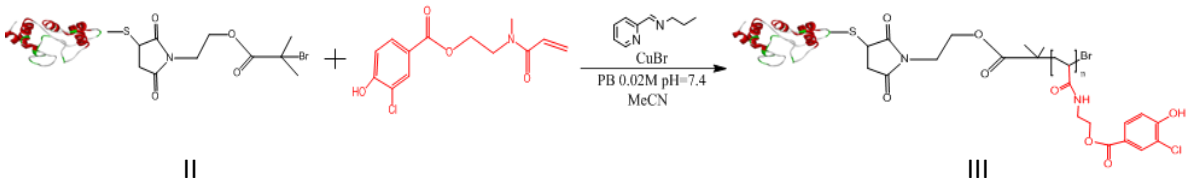

***Σχήμα 11****. Αριστερά: Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου σε μη- αποδιατακτικές συνθήκες : Θέση 1 : φυσική BSA, Θέση 2&3 : BSA- μακροεκκινητής II. Δεξιά: Χρωματογραφήματα SEC της φυσικής BSA (κόκκινη γραμμή) και του BSA-μακροεκκινητή II (μαύρη γραμμή).*

Ειδικότερα, στις θέσεις 2 και 3 της πηκτής πολυακρυλαμιδίου παρατηρήθηκε διαφορετική ικανότητα μετανάστευσης του βιομακροεκκινητή σε σχέση με αυτή της φυσικής πρωτεΐνης (θέση 1). Αξίζει να τονιστεί ότι η διαφορετική μεγαλύτερη ικανότητα μετανάστευσης του προϊόντος στην πηκτή αποδίδεται στην αλλαγή φορτίου ή/και σχήματος.[11] Η χρωματογραφία SEC δεν έδειξε σημαντική διαφορά στους χρόνους έκλουσης αντιδρώντος και προϊόντος, όπως είχε παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες κάτω από τις ίδιες συνθήκες.[11]

## 2.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΟΛΥΜΕΡΙΣΜΟΥ [11,17]

### 2.3.1 Σύνθεση βιοπολυμερούς BSA-polyCHB

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ATRP grafting from πολυμερισμός του μονομερούς CHB με εκκινητή τον BSA-μακροεκκινητή II. Στο σχήμα 12 που ακολουθεί παρουσιάζεται σχηματικά η αντίδραση σύνθεσης του βιοπολυμερούς BSA-polyCHB ( προϊόν III).

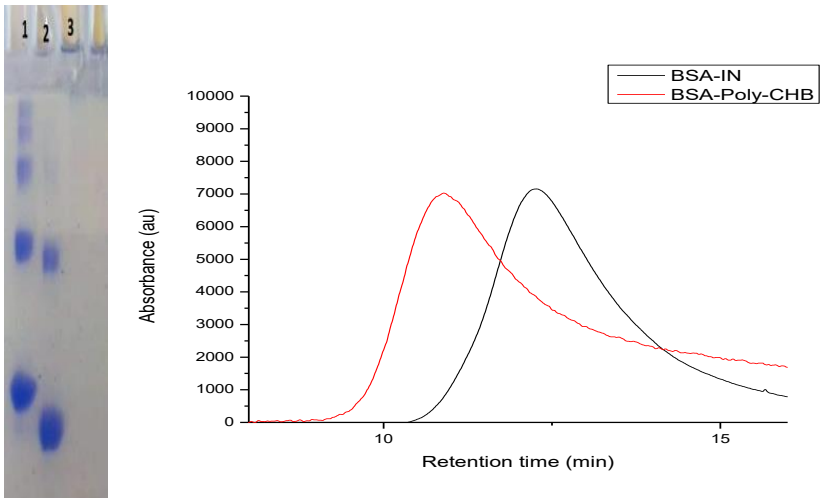



***Σχήμα 12.*** *Συνθετική πορεία του βιοπολυμερούς BSA–polyCHB*

Σε μια φιάλη schlenk τοποθετήθηκαν 0.22 gr του μονομερούς (0.84 mmol, 1000 equiv) και διαλύθηκαν σε 0.962 ml οργανικού διαλύτη MeCN. Ακολούθησε προσθήκη 9.3 ml, 20 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και τέλος ο υποκαταστάτης *N*-(προπυλο)-2-πυριδυλομεθανιμίνη (10 μl, 0.0588 mmol, 70 equiv). Ακολούθησε διασπορά με τη βοήθεια υπερήχων προκειμένου να σχηματιστεί γαλάκτωμα. Από το μείγμα αφαιρέθηκε το οξυγόνο με τη βοήθεια 3 κύκλων ψύξης-κενού-απόψυξης (freeze-pump-thaw). Η έναρξη του πολυμερισμού έγινε με την προσθήκη του διαλύματος του μονομερούς σε δεύτερο σωλήνα Schlenk που περιείχε BSA-μακροεκκινητή II (~ 59 mg, 0.00084 mmol, 1 equiv) και CuBr (0.0049 gr, 0.0344 mmol , 40 equiv) υπό ατμόσφαιρα $N_2$. Η αντίδραση τέθηκε υπό ανάδευση για 12 ώρες υπό αδρανείς συνθήκες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στα συγκεκριμένα πειράματα πολυμερισμού χρησιμοποιήθηκε αναλογία μονομερούς προς BSA-μακροεκκινητή II η οποία ήταν 1000:1 και αναλογία BSA-μακροεκκινητή II:CuBr: Ligand ήταν 1:40:70.

Για την απομόνωση του προϊόντος, έγινε διαπίδυση αρχικά δύο φορές ως προς 5mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών διαλύματος, 2mM EDTA για την απομάκρυνση του χαλκού και στη συνέχεια ως προς 20 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών διαλύματος με τη βοήθεια μεμβράνης με MWCO 20kDA. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση

(σχήμα 13) σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μη αποδιατακτικές συνθήκες στην οποία παρατηρήθηκε απουσία της χαρακτηριστικής μπάντας του BSA-μακροεκκινητή II (θέση 2). Το τελικό προϊόν III, BSA-polyCHB, (θέση 3) δεν παρουσίασε ικανότητα μετανάστευση στην πηκτή όπως ήταν αναμενόμενο εξαιτίας του αμφίφιλου χαρακτήρα των παραγόμενων βιομακρομορίων.

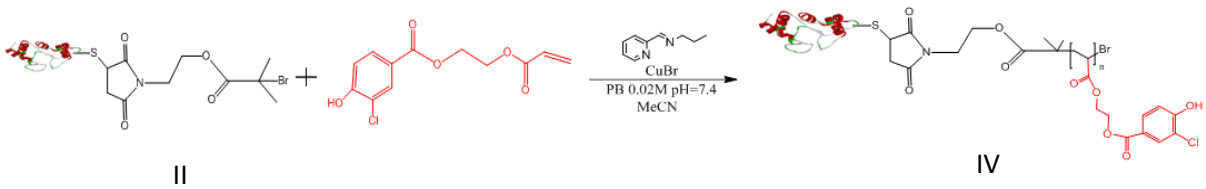



***Σχήμα 13.*** *Αριστερά: Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου σε μη αποδιατακτικές συνθήκες: Θέση 1 : φυσική BSA , Θέση 2 : BSA-μακροεκκινητής II , Θέση 3: BSA-polyCHB . Δεξιά: Χρωματογράφημα SEC της φυσικής BSA (μαύρη γραμμή) και του προϊόντος BSA-polyCHB (κόκκινη γραμμή).*

Στη μελέτη με SEC χρωματογραφία (σχήμα 13), παρατηρήθηκε μία νέα κορυφή για το προϊόν BSA-polyCHB με χρόνο έκλουσης μικρότερο από αυτόν του BSA-μακροεκκινητή II , γεγονός που αποδίδεται στο μεγαλύτερο μοριακό βάρος και τον αμφίφιλο χαρακτήρα του προϊόντος και αποτελεί μία επιπλέον ένδειξη σχηματισμού προϊόντος.

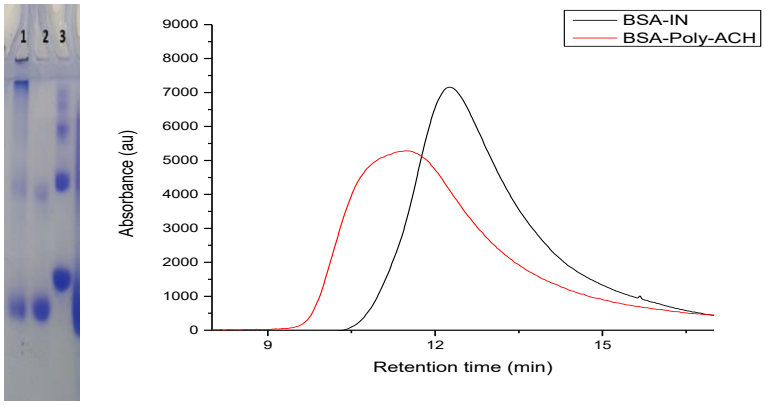
### 2.3.2 Σύνθεση βιοπολυμερούς BSA-polyACH

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ATRP grafting from πολυμερισμός του μονομερούς ACH από το BSA–μακροεκκινητή II (σχήμα 14). Το μονομερές ACH φέρει ένα άτομο οξυγόνου αντί για ένα άτομο αζώτου στη θέση του αμιδίου του μονομερούς CHB.



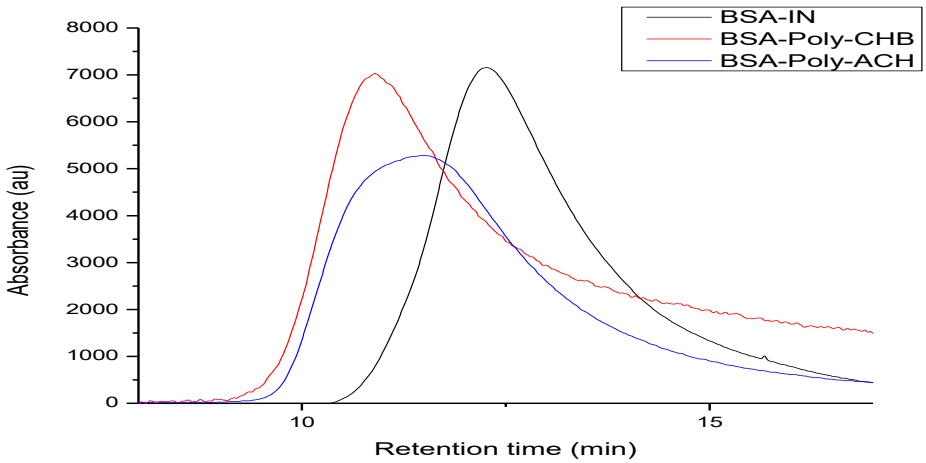

***Σχήμα 14.*** *Συνθετική πορεία του βιοπολυμερούς BSA – polyACH*

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση του βιοπολυμερούς BSA-polyACH (προϊόν IV) και τον εμπλουτισμό του ήταν η ιδία με αυτή που παρουσιάστηκε στην προηγούμενη παράγραφο.[11,17)




***Σχήμα 15.*** *Αριστερά: Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου σε μη αποδιατακτικές συνθήκες : Θέση 1 : BSA-polyACH , Θέση 2 : BSA-μακροεκκινητής II, Θέση 3: BSA. Δεξιά: Χρωματογράφημα SEC της φυσικής BSA (μαύρη γραμμή) και του προϊόντος BSA-polyACH (κόκκινη γραμμή)*

Κατά τη μελέτη του προϊόντος με χρωματογραφία SEC παρατηρήθηκε μια νέα κορυφή για το προϊόν BSA-polyACH με χρόνο έκλουσης μικρότερο από αυτόν του BSA-μακροεκκινητή II (σχήμα 15). Το εύρος και η κατανομή της παρατηρούμενης κορυφής στο χρωματογράφημα του προϊόντος ήταν ενδεικτικά της μη ποσοτικής απόδοσης. Η ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου σε μη-αποδιατακτικές συνθήκες επιβεβαίωσε την παρουσία BSA-μακροεκκινητή II στο μελετούμενο δείγμα, καθώς εκτός από την μπάντα που είχει μεταναστεύσει ελάχιστα στην πηκτή πολυακριλαμιδίου (και αποδόθηκε στο προϊόν της αντίδρασης), παρατηρήθηκε και η χαρακτηριστική μπάντα του BSA-μακροεκκινητή II (σχήμα 15). Στο σχήμα 16 παρουσιάζονται συνδυαστικά τα χρωματογραφήματα των δύο αμφίφιλων πολυμερών BSA-polyCHB και BSA-polyACH. (προϊόντα III και IV)

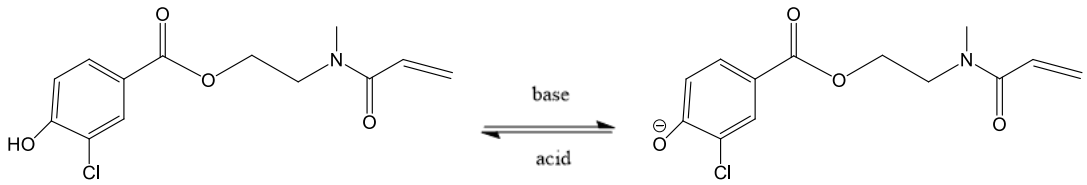



***Σχήμα 16.*** *Χρωματογράφημα της φυσικής BSA (μαύρη γραμμή), του προϊόντος BSA-polyCHB (κόκκινη γραμμή) και του προϊόντος BSA-polyACH (μπλέ γραμμή).*

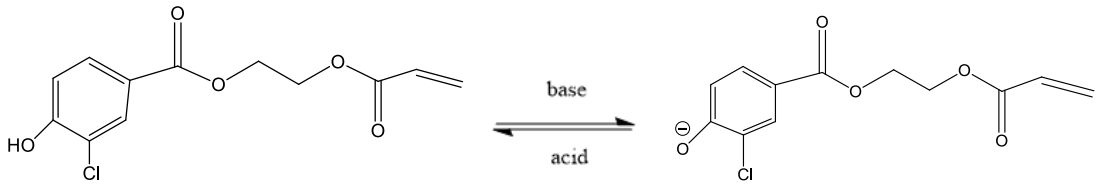
## 2.4 ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΣΕ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΟΥ pH

Τα μονομερή CHB και ACH που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των γιγάντιων αμφίφιλων μορίων είναι βινυλικά παράγωγα υποκατεστημένων αρωματικών αλκοολών και τα πολυμερή τους χαρακτηρίζονται από ικανότητα απόκρισης σε μεταβολές του pH.[15] Το υδροξύλιο του μονομερούς μπορεί να αποπρωτονιωθεί μετά από αύξηση του pH προς το αντίστοιχο ανιόν καθιστώντας το πολυμερές υδρόφιλο (Σχήμα 17).

A)

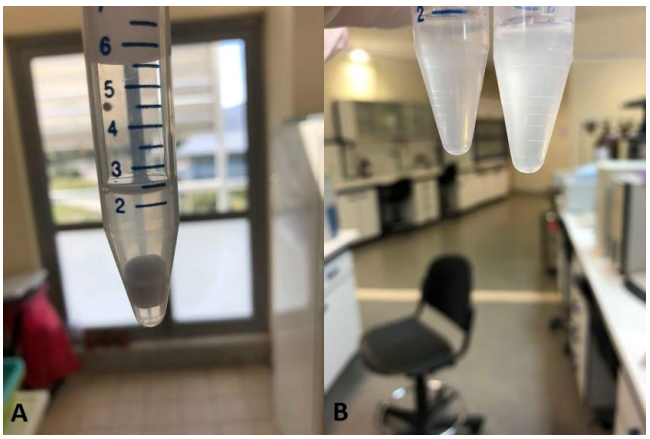



B)




***Σχήμα 17.*** *Αντιστρεπτή αντίδραση αποπρωτονίωσης των μονομερών CHB (A) και ACH (B) με οξύ/βάση.*

Το διάλυμα των αμφίφιλων βιοπολυμερών ήταν θολό μετά τον εμπλουτισμό τους (σχήμα 18B) καθώς σύμφωνα με τη βιβλιογραφία[15,16] η υδροξυλομάδα βρίσκεται στην πρωτονιωμένη μορφή της σε pH 7.4 καθιστώντας το βιοπολυμερές υδρόφοβο. Μετά από αύξηση του pH με προσθήκη βάσης, το διάλυμα του βιοπολυμερούς έγινε διαυγές (σχήμα 18A) καθιστώντας το βιοπολυμερές υδρόφιλο σε βασικό pH.




***Σχήμα 18:*** *Αριστερά: υδρόφιλο βιοπολυμερές σε pH 9.2. Δεξιά: υδρόφοβο βιοπολυμερές σε pH 7.4. Στις φωτογραφίες απεικονίζονται διαλύματα του βιοπολυμερούς BSA-polyCHB*

Για να μελετηθεί η απόκριση του βιοπολυμερούς κατά την μεταβολή του pH, μετρήθηκε η τιμή της διαπερατότητας (T%) για κάθε μεταβολή του pH έως ότου πραγματοποιηθεί η αλλαγή φάσης. Όταν το διάλυμα του υδρόφοβου βιοπολυμερούς παρουσιάζει χαμηλές % τιμές διαπερατότητας, ενώ μετά από πλήρη αποπρωτονίωση της υδροξυλομάδας του μονομερούς η αλλαγή φάσης (υδρόφιλο) εκφράζεται από υψηλές τιμές % διαπερατότητας.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι έγιναν συγκριτικά πειράματα για τον προσδιορισμό των κατάλληλων πειραματικών συνθηκών που θα επέτρεπαν ακριβή προσδιορισμό των μεταβολών της % διαπερατότητας (T%) με τη μεταβολή του pH. Στόχος των πειραμάτων ήταν η εύρεση των κατάλληλων συγκεντρώσεων οξέος και βάσης για την τιτλοδότηση σε συνθήκες που δεν επιφέρουν απότομες μεταβολές στο pH ή σημαντική αλλαγή στη συγκέντρωση του δείγματος. Επίσης έγινε προσπάθεια να περιοριστεί η ύπαρξη μεγάλης περίσσειας οξέος (HCl) ή βάσης (NaOH) μετά την τιτλοδότηση ώστε να μπορεί να μελετηθεί η αντιστρεψιμότητα της απόκρισης χωρίς να απαιτείται σημαντική προσθήκη οξέος ή βάσης για την αντίδραση εξουδετέρωσης: $HCl + NaOH \rightarrow NaCl + H_2O$. Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις οξέος/βάσης που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Συγκεντρώσεις βάσης/οξέος**

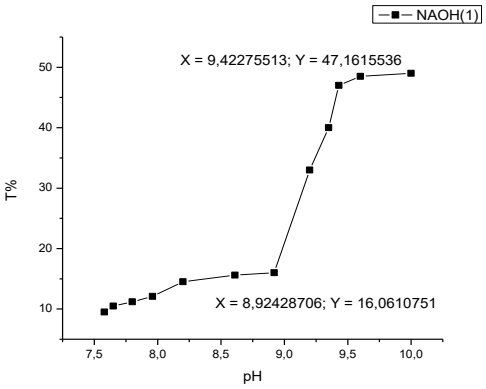
| | MW(g/mol) | Molarity (M) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NaOH | 39.997 | 0.02 | 0.05 | 0.5 | 1 |
| HCl | 36.460 | 0.01 | 0.02 | 0.05 | 0.25 |

## 2.5 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΕ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΟΥ pH

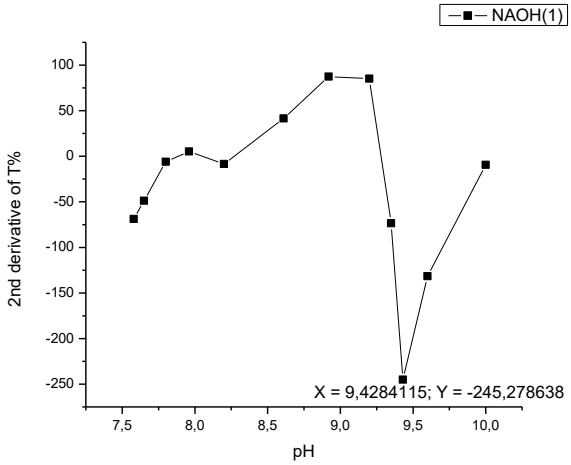
### 2.5.1 Απόκριση βιοπολυμερούς BSA-polyCHB

Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα της μεταβολής της T% σε συνάρτηση με τη μεταβολή του pH για το βιοπολυμερές BSA-polyCHB , οι πίνακες με τις ποσότητες οξέος/βάσης που χρησιμοποιήθηκαν καθώς επίσης και οι αλλαγές στις συγκεντρώσεις των δειγμάτων μετά το τέλος κάθε πειράματος.

| BSA-polyCHB | NaOH (0.05M) |
|---|---|
| 100μl + 1900 miliQ | $n=5*10^{11}$mol |
| Cαρχ=$5*10^{-6}$M | 10μl NaOH |
| Cτελικη=$4.7*10^{-6}$ M | Συνολικά: 100μl |




***Σχήμα 19.*** *Αριστερά: Συγκεντρώσεις βιοπολυμερούς και βάσης. Δεξιά: Διάγραμμα μεταβολής της T% συναρτήσει του pH διαλύματος BSA-polyCHB . Πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση του διαλύματος με προσθήκη διαλύματος 0.05M NaOH.*



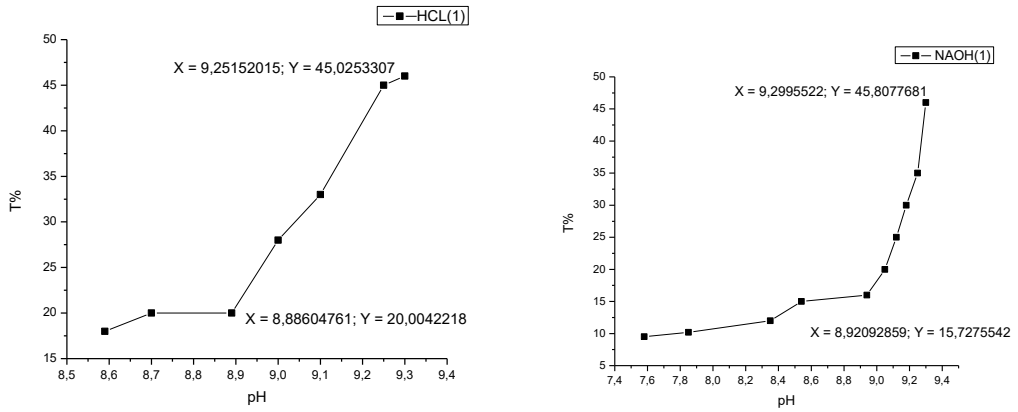

***Σχήμα 20.*** *$2^{η}$παραγώγος % T.*

Ειδικότερα, στην τιτλοδότηση που απεικονίζει το σχήμα 20 για το βιοπολυμερές BSA-polyCHB , παρατηρήθηκε ότι η σταδιακή προσθήκη 100 μl NaOH, 0.05M (10 μl για κάθε μέτρηση) είχε σαν αποτέλεσμα μια σαφώς απότομη αύξηση της τιμής της %T σε καθορισμένο εύρος pH, δηλαδή, σε αυτό το εύρος, το υδρόφοβο βιοπολυμερές έγινε υδρόφιλο και επομένως το διάλυμα έγινε διαυγές. Το σημείο αλλαγής (κρίσιμο σημείο) υπολογίστηκε μέσω της δεύτερης παραγώγου (σχήμα 20) και προσδιορίστηκε στο pH=9.42.

Σε περαιτέρω πειράματα με στόχο την επαλήθευση του σημείου απόκρισης έγινε προσπάθεια περιορισμού της περίσσειας βάσης και οξέος ώστε να ληφθούν όσο το δυνατόν περισσότερες τιμές της % T συναρτήσει του pH κοντά στο σημείο που πραγματοποιείται η μεταβολή διαλυτότητας. Στα σχήματα 21 και 22 που ακολουθούν παρουσιάζεται η απόκριση του βιοπολυμερούς σε μεταβολές του pH (μετάβαση από υδρόφοβο σε υδρόφιλο) και η μελέτη

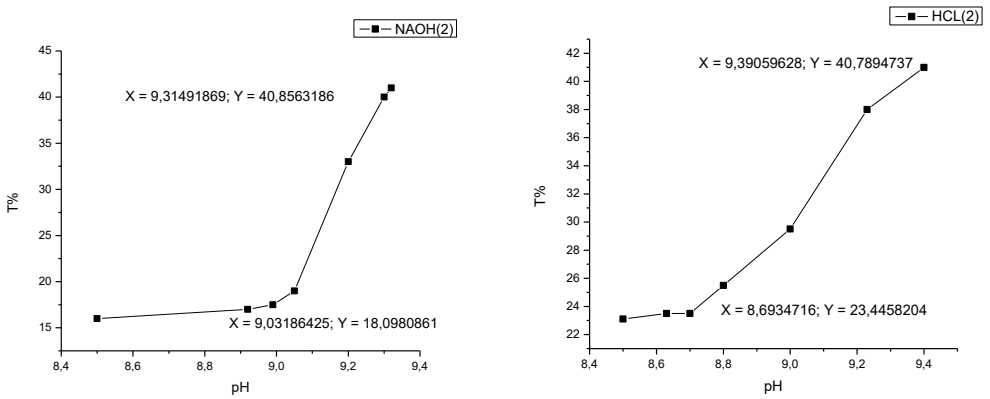
της αντιστρεψιμότητας αυτής της μεταβολής. Η προσθήκη διαλύματος μικρότερης συγκέντρωσης βάσης ή οξέος (σχήμα 22Γ) έδωσε τη δυνατότητα να ληφθούν περισσότερες τιμές % Τ συναρτήσει του pH. Θέλοντας να αποδείξουμε την επαναληψιμότητα της απόκρισης επαναλήφθηκε το ίδιο πείραμα με το ίδιο δείγμα.

A) B)




***Σχήμα 21.*** *A) Τιτλοδότηση του ιδίου δείγματος με προσθήκη 0.01M HCL. B) Τιτλοδότηση του βιοπολυμερούς BSA-polyCHB με προσθήκη 0.01 M NaOH*

A) B)



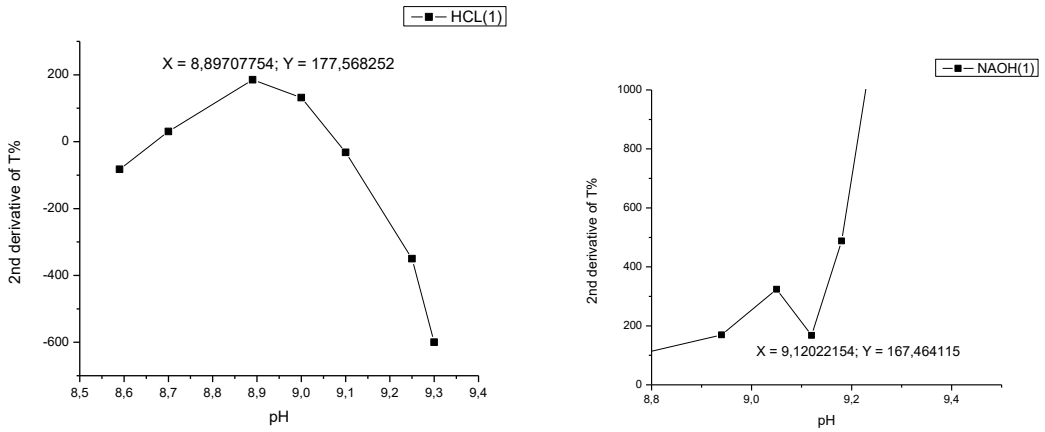

Γ)

| NAOH (0.01M) | HCL (O.01M) |
|---|---|
| n= $10^{-11}$ mol | n=$10^{-11}$ mol |
| Συνολικά: 80 μl | Συνολικά: 80 μl |

***Σχήμα 22.*** *A) Δεύτερη τιτλοδότηση βιοπολυμερούς BSA-polyCHB με προσθήκη 0.01 M NaOH. B)Αντίστροφη τιτλοδότηση του δείγματος με την προσθηκή 0.01M HCL και Γ) ο πίνακας με τις ποσότητες οξέος και βάση που χρησιμοποιήθηκαν.*

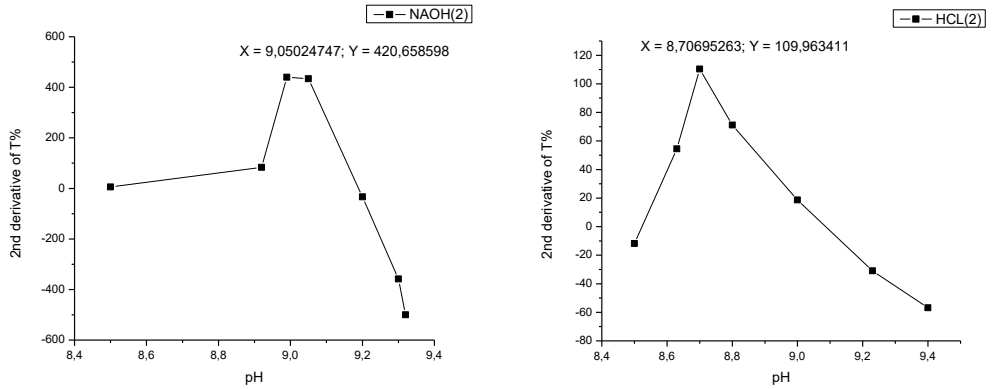
Ωστόσο παρατηρήθηκαν αποκλίσεις στο σημείο αλλαγής φάσης για το δείγμα, όπως φαίνεται στα διαγράμματα που ακολουθούν. Συγκεκριμένα, στην πρώτη τιτλοδότηση με την προσθήκη βάσης το κρίσιμο σημείο προσδιορίστηκε με τη βοήθεια της δεύτερης παραγώγου σε 9.12 (σχήμα 23B) ενώ στη δεύτερη τιτλοδότηση σε 9.05 (σχήμα 24A). Αντίστοιχα, με την προσθήκη οξέος το κρίσιμο σημείο προσδιορίστηκε 8.89 (σχήμα 23A) στην πρώτη και 8.7 (σχήμα 24B) στην δεύτερη τιτλοδότηση. Ιδανικά, το σημείο αλλαγής θα έπρεπε να είναι ακριβώς το ίδιο και στους τέσσερις κύκλους πειραμάτων, ωστόσο λόγω των πειραματικών δυσκολιών που προαναφέρθηκαν, αυτό δεν ήταν εφικτό. Οι αποκλίσεις ωστόσο είναι μικρές καθώς η αλλαγή φάσης πραγματοποιείται σε εύρος pH μεταξύ 8.7 και 9.4.

A) B)




***Σχήμα 23.****Διαγράμματα της 2ης παραγώγου % T.*

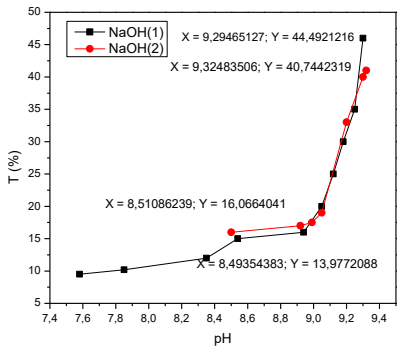
A) B)



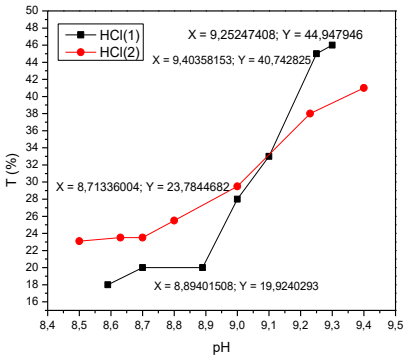

***Σχήμα 24.*** *Διαγράμματα της 2ης παραγώγου % T.*

Στο σχήμα 25 που ακολουθεί παρατηρείται ότι η απόκριση του βιοπολυμερούς στις μεταβολές του pH είναι αντιστρέψιμη και επαναλήψιμη καθώς τα διαγράμματα που προκύπτουν είναι πανομοιότυπα με τη νέα προσθήκη ίδιων ποσοτήτων οξέος/ βάσης στο δείγμα, γεγονός που επαληθεύει τις μικρές αποκλίσεις.

*A)*




*B)*




Γ)

| Βίο-πολυμερές : BSA-polyCHB | |
|---|---|
| $C_{αρχική}$ = 5*10$^{-6}$ M | $C_{τελική}$ = 4,2*10$^{-6}$ M |

***Σχήμα 25.*** *Α) Τιτλοδότηση του βιοπολυμερούς BSA-polyCHB με προσθήκη NAOH (μαύρη γραμμή) και επανάληψη τιτλοδότησης στο ίδιο δείγμα (κόκκινη γραμμή). Β) Αντίστροφη τιτλοδότηση με προσθήκη HCl (μαύρη γραμμή) και επανάληψη της διαδικασίας (κόκκινη γραμμή). Γ) Μεταβολή της συγκέντρωσης του βιοπολυμερούς μετά το τέλος των δύο κύκλων.*

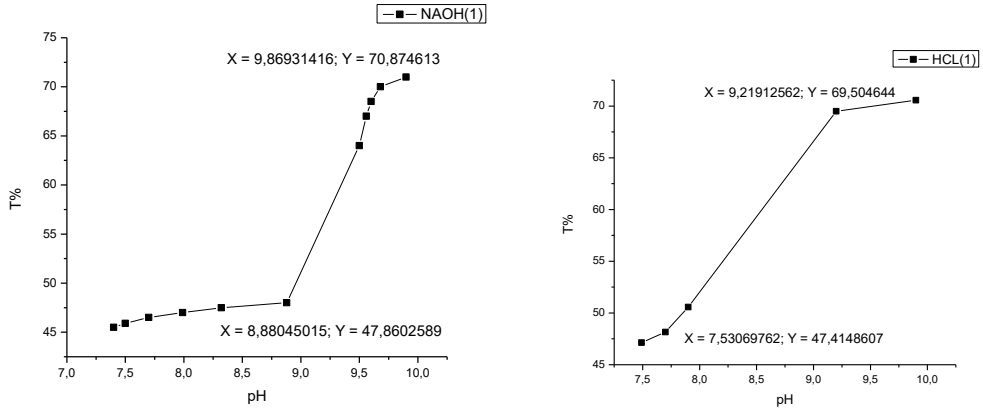
### 2.5.2 Απόκριση βιο-πολυμερούς BSA-polyACH

Η ίδια πειραματική διαδικασία εφαρμόστηκε και στην περίπτωση του δεύτερου προϊόντος BSA-polyACH. Τα δύο βιοπολυμερή έχουν παρόμοια δομή (το μονομερές ACH φέρει ένα άτομο οξυγόνου αντί για ένα άτομο αζώτου που φέρει το μονομερές CHB), και επομένως τα δύο προϊόντα αποκρίθηκαν με παρόμοιο τρόπο στις μεταβολές του pH.

Στα σχήματα 26 και 28 παρουσιάζονται οι μεταβολές της % T συναρτήσει του pH για το βιοπολυμερές BSA-polyACH και παρατηρείται ότι, και σε αυτή την περίπτωση, η απόκριση είναι αντιστρέψιμη και επαναλήψιμη (σχήμα 30). Το σημείο αλλαγής και σε αυτή την περίπτωση υπολογίστηκε μέσω της δεύτερης παραγώγου του διαγράμματος και προσδιορίστηκε σε 9.55 για την πρώτη τιτλοδότηση (σχήμα 27Α) και σε 9.48 για τη δεύτερη

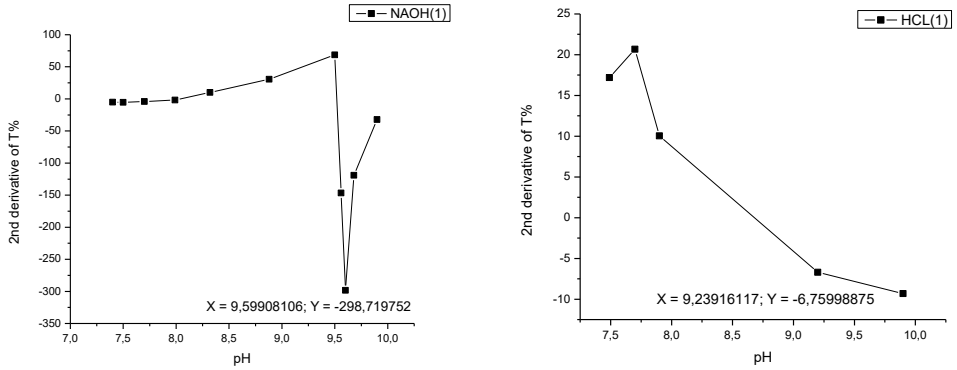
(σχήμα 29 Α). Αντίστοιχα στην αντίστροφη τιτλοδότηση προσδιορίστηκε 9.23 (Σχήμα 27Β) και 9.60 (σχήμα 29 Β). Οι μετρήσεις αυτές παρουσίασαν σημαντικές αποκλίσεις στο σημείο αλλαγής διαλυτότητας.

A) B)



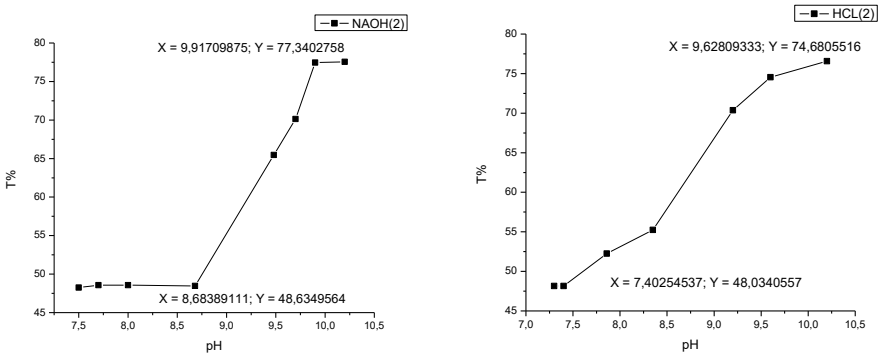

***Σχήμα 26**. Α) Τιτλοδότηση του βιοπολυμερούς BSA-polyACH με προσθήκη 0.05M NaOH. Β) Αντίστροφη τιτλοδότηση του δείγματος με προσθήκη 0.05M HCL.*

A) B)




***Σχήμα 27.** Διαγράμματα της 2ης παραγώγου % Τ.*

*A)* *B)*

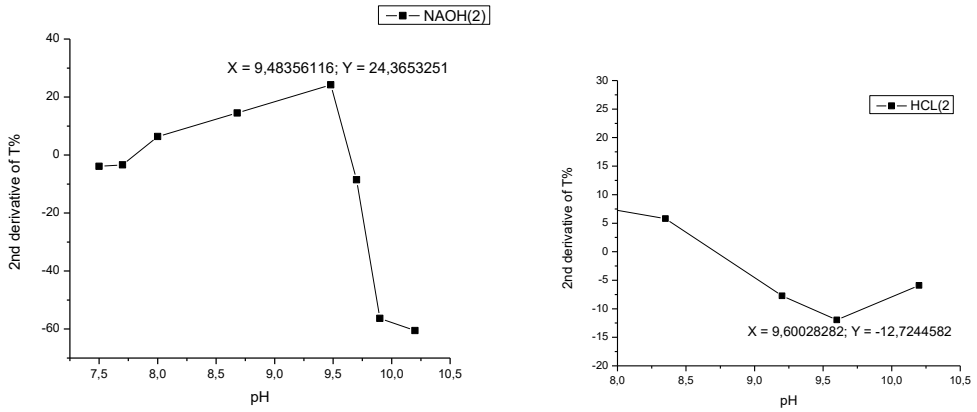


Γ)

| Βιο-πολυμερές. BSA-polyACH | NaOH (0.05M) |
|---|---|
| 500μl + 1500 miliQ | n=5*$10^{-11}$mol |
| Καρχική=2.5*$10^{-5}$M | 10μl NaOH |
| Στελικη=2.2*$10^{-5}$ M | Συνολικά: 100μl |

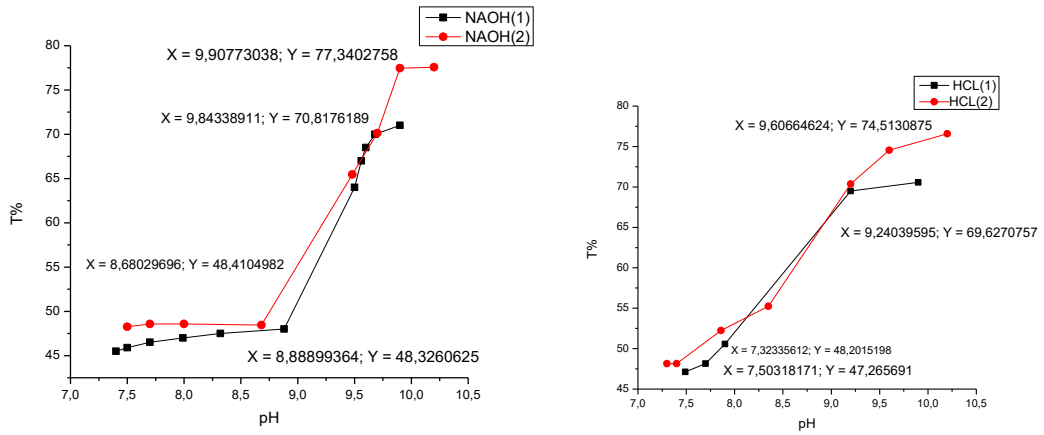
***Σχήμα 28.*** *Τιτλοδότηση του βιοπολυμερούς BSA-polyACH με προσθήκη βάσης (Α) και οξέος (Β). Γ) Ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν και αλλαγή της συγκέντρωσης του προϊόντος (Γ)*

A) B)




***Σχήμα 29.*** *Διαγράμματα της 2ης παραγώγου % T.*

A) B)




***Σχήμα 30.*** *Α) Τιτλοδότηση του βιοπολυμερούς BSA-polyACH με προσθήκη NAOH (μαύρη γραμμή) και δεύτερη τιτλοδότηση του ιδίου δείγματος (κόκκινη γραμμή). Β) Τιτλοδότηση του βιοπολυμερούς BSA-polyACH με προσθήκη HCl (μαύρη γραμμή) και επανάληψη της τιτλοδότησης (κόκκινη γραμμή).*

## 2.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο σκοπός αυτής της πτυχιακής εργασίας ήταν η σύνθεση πρωτεϊνικών αμφίφιλων βιο-πολυμερών τα οποία να είναι αποκρίσιμα σε αλλαγές του pH καθώς και ο καθορισμός του κρίσιμου σημείου, της τιμής δηλαδή του pH όπου παρατηρείται μεταβολή στον αμφίφιλο χαρακτήρα των βιοπολυμερών. Για το σκοπό αυτό αρχικά πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η σύνθεση του απαραίτητου BSA-μακροεκκινητή II χρησιμοποιώντας την πρωτεΐνη αλβουμίνη από ορό βοοειδών και τον μαλεϊμίδο-ATRP εκκινητή I.

Με grafting from αντιδράσεις ATRP πολυμερισμού και χρησιμοποιώντας τα μονομερή 2-(3-chloro-4-hydroxybenzamido)ethyl acrylate (CHB) και 2-(acryloyloxy)ethyl 3-chloro-4-hydroxybenzoate (ACH) και τον BSA-μακροεκκινητή II πραγματοποιήθηκεη σύνθεση των πρωτεϊνικών αμφίφιλων πολυμερών BSA-polyCHB και BSA-polyACH. Τα προϊόντα χαρακτηρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης κα χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών.

Στη συνέχεια μελετήθηκε αν τα νέα βιοπολυμερή που παρασκευάστηκαν φέρουν την ίδια ιδιότητα με τα αντίστοιχα συνθετικά πολυμερή, αν δηλαδή είναι αποκρίσιμα σε μεταβολές του pH. Με μέτρηση της διαπερατότητας μελετήθηκε η απόκριση των βιοπολυμερών σε μεταβολές του pH και διαπιστώθηκε ότι αυτές οι μεταβολές επιφέρουν αλλαγές στον αμφίφιλο χαρακτήρα του βιοπολυμερούς. Προσδιορίστηκε επίσης το κρίσιμο σημείο, η τιμή του pH κατά την οποία γίνεται η μετάβαση του πολυμερούς από υδρόφοβο σε υδρόφιλο. Ειδικότερα αποδείχτηκε ότι η σταδιακή αύξηση του pH είχε σαν αποτέλεσμα μια σαφώς απότομη αύξηση της τιμής της %T σε καθορισμένο εύρος pH. Το εύρος αυτό προσδιορίστηκε μεταξύ 8.7 και 9.6 για τα δύο βιοπολυμερή ενώ βρέθηκε ότι η απόκριση είναι αντιστρέψιμη. Για να επιτευχθεί αυτό πραγματοποιήθηκαν πολλά συγκριτικά πειράματα για τον προσδιορισμό των κατάλληλων πειραματικών συνθηκών. Στόχος των πειραμάτων ήταν η εύρεση των κατάλληλων συγκεντρώσεων οξέος και βάσης για την τιτλοδότηση σε συνθήκες που δεν επιφέρουν απότομες μεταβολές στο pH ή σημαντική αλλαγή στη συγκέντρωση του δείγματος

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

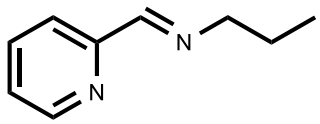
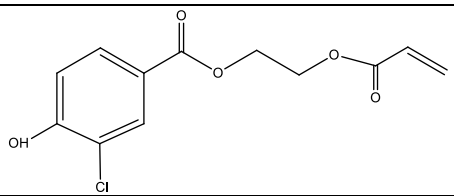
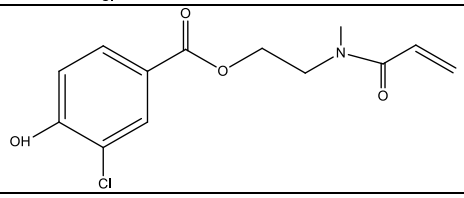
## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν των εταιριών Fluka, Sigma-Aldrich, AcrosChemicals, FisherScientific, Bio-Rad, AlfaAesar, Fluka και ArmarIsotopes χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Για διαπίδυση χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες κυτταρίνης (Biotech Regenerated Cellulose Dialysis Membranes) με MWCO 10 kDa ή 25 kDa της εταιρίας Spectrum Labs.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 2.Αντιδραστήρια**

| | | |
|---|---|---|
| Ligand |  | N-(Propyl)-2-pyridymethanimine |
| Μονομερές ACH |  | 2-(acryloyloxy)ethyl 3-chloro-4-hydroxybenzoate |
| Μονομερές CHB |  | 2-(3-chloro-4-hydroxybenzamido)ethyl acrylate |

Η σύνθεση των μονομερών ACH και CHB πραγματοποιήθηκε από την Dr. F. Mastrotto[15]στα πλαίσιο έρευνας για σύνθεση νανομεταφορέων χρήσιμων για τη μεταφορά φαρμάκων. Ειδικότερα, σκοπός της ήταν η σύνθεση πολυμεροσωμάτων, τα οποία θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως νανομεταφορείς φαρμάκων, χρησιμοποιώντας τα νέα ακρυλικά και ακρυλαμιδικά μονομερή, τα οποία φέρουν αρωματικές αλκοόλες και είναι αποκρίσιμα σε μεταβολές του pH.

### 3.2 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.2.1 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους (*size exclusion chromatography, SEC*).

Η SEC είναι αποτελεί μία από τις πολλές μορφές υγρής χρωματογραφίας στην οποία ένα μείγμα διαλυμένων ουσιών διαχωρίζεται, όταν το διάλυμα περνά από την κατάλληλη στήλη. Καθώς το διάλυμα (κινητή φάση) περνά από τη στήλη, οι διαλυμένες ουσίες

κατακρατούνται με διαφορετικό βαθμό ανάλογα με την αλληλεπίδραση τους με το υλικό πλήρωσης της στήλης.[1,41,42] Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μέγεθος των μορίων.

Στη συγκεκριμένη μελέτη η υγρή χρωματογραφία αποκλεισμού (SEC) διεξήχθη με τη χρήση του συστήματος Shimadzu εξοπλισμένου με απαερωτή DGU-14A, αντλία LC-10AD, φούρνο CTO-10A, αυτόματο δειγματολήπτηSIL-10AD, ανιχνευτή δείκτη διάθλασης RID-10A και ανιχνευτή απορρόφησης ορατού – υπεριώδους (UV Vis) SPD-10A Shimadzu.

Το σύστημα ήταν εφοδιασμένο με στήλη χρωματογραφίας 5μm BioBasic SEC 300, με τη χρήση ενός μείγματος 10% MeCN σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 5mM, pH 7.4 ως διαλύτη έκλουσης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου με ρυθμό ροής 0.5ml/min). Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν στα 254 nm και 280 nm και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με το λογισμικό χρωματογραφίας EZStart 7.3.

### 3.2.2 Ηλεκτροφόρηση σε φυσικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια αναλυτική μέθοδος με την οποία μπορούμε να εξετάσουμε την κίνηση φορτισμένων μορίων μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η μετατόπιση των μορίων επηρεάζεται από το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο, το μέγεθος των πόρων της πηκτής καθώς και το μέγεθος, σχήμα, φορτίο, και χημική σύσταση των μορίων προς διαχωρισμό. Ο τρόπος που κινείται κάθε μόριο μέσα στη πηκτή είναι μοναδικός και είναι η βάση για την ανάλυση και το διαχωρισμό σε όλες τις ηλεκτροφορητικές μεθόδους.

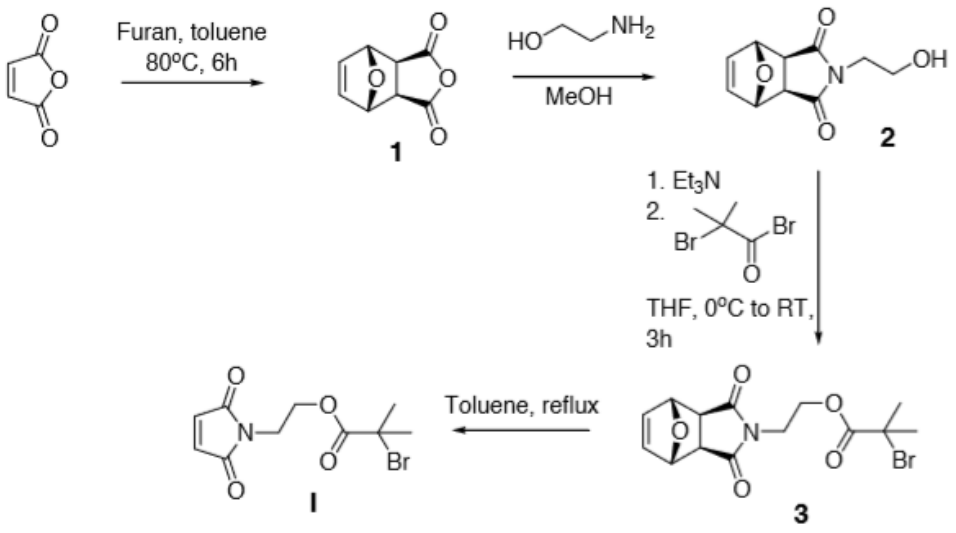
Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης PAGE (Ornstein-Davis) σε μη αποδιατακτικές συνθήκες χρησιμοποιώντας πήκτωμα στοίβαξης 4% και πήκτωμα διαχωρισμού10%.

### 3.2.3 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance – NMR)

Στη συγκεκριμένη μελέτη , τις ενώσεις τις χαρακτηρίσαμε μελετώντας τη σύσταση τους με φασματοσκοπία $^{1}H$, $^{13}C$, χρησιμοποιώντας το φασματογράφο Bruker 500MHz . Οι χημικές μετατοπίσεις καταγράφηκαν σε κλίμακα δ (ppm ) με σημείο αναφοράς το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS). Οι ακόλουθες συντομογραφίες χρησιμοποιήθηκαν για να εξηγήσουν τις πολλαπλές ιδιότητες: s = μονήρης, d = διπλό, dd = διπλό ζεύγους, t = τριπλό, m = πολλαπλό.

## 3.3 ΣΥΝΘΕΣΗ

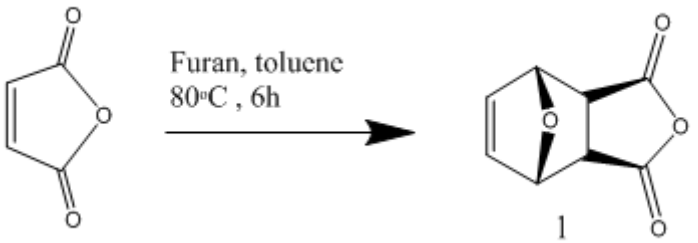
Η συνθετική πορεία του μαλεϊμίδο-ATRP I εκκινητή παρουσιάζεται στο σχήμα που ακολουθεί.[9,11,40]




***Σχήμα 31.*** *Συνθετική πορεία του μαλεϊμίδο-ATRP εκκινητή I*[11]

Όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα 2.1 στη συγκεκριμένη μελέτη για τη σύνθεση του μαλεϊμιδο-ATRP εκκινητή I χρησιμοποιήθηκε η προστατευμένη του μορφή που υπήρχε διαθέσιμη στο εργαστήριο (προϊόν 3). Στη μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε επίσης και το πρώτο βήμα της ανωτέρω συνθετικής πορείας της οποίας όμως το προϊόν 1 δεν χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του μαλεϊμιδο-ATRP εκκινητή I και αποθηκεύτηκε σε ξηρά μορφή στο ψυγείο του εργαστηρίου.

### 3.3.1 Σύνθεση του 4,10-διοξατρικυκλο [5.2.1.0] δεκ-8-ενο-3,5-διόνη (1)[11]:



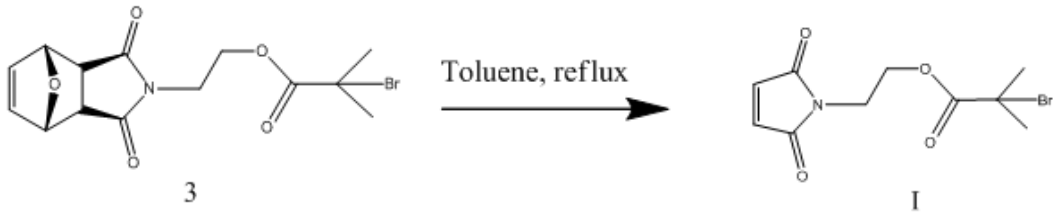

***Σχήμα 32.*** *Σύνθεση της ένωσης 1 από το μηλεϊνικό ανυδρίτη*[11]

Μηλεϊνικός ανυδρίτης (13.63 g ,138.98 mmol, 2equiv) διαλύθηκε σε 68.15 mL τολουολίου και το μείγμα θερμάνθηκε στους 80 °C. Στη συνέχεια προστέθηκε φουράνιο (15.26 mL, 208.5 mmol, 3 equiv) με σύριγγα και το θολό διάλυμα αναδεύτηκε για 6 ώρες. Στη συνέχεια το μείγμα αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 1 ώρα, οι λευκοί κρύσταλλοι που σχηματίστηκαν συλλέχτηκαν με διήθηση και εκπλύθηκαν με 2 x 10mL πετρελαϊκού αιθέρα με αποτέλεσμα να λάβουμε 19.66 g (114.36 mmol, 88% απόδοση) του προϊόντος.

$^1$H NMR (500MHz, $CDCl_3$, 298 K): δ = 3.17 (s, 2H, CH), 5.45 (t, J =1.0Hz, 2H, CHO), 6.57 (t, J = 1.0 Hz,2H, $CH_{vinyl}$).

### 3.3.2 Βρωμο-2-μεθυλο-προπιονικό οξύ 2- (2,5-διοξο-2,5-διυδρο-πυρρολ-1-υλ) -αιθυλεστέρας (I)[11]

Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζεται το τελευταίο στάδιο της συνθετικής πορείας:

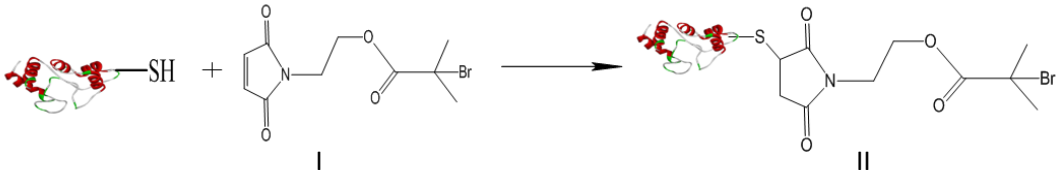



***Σχήμα 33.*** *Σύνθεση του μαλεϊμίδο-ATRP εκκινητή I από την προστατευμένη του μορφή .*[11]

Το διάλυμα του προϊόντος 3 (0.198 g, 0.419 mmol) διαλύθηκεσε ξηρό τολουόλιο (10 ml) και θερμάνθηκε μέχρι βρασμού υπό ατμόσφαιρα αζώτου για 8 ώρες. Ακολούθησε απομάκρυνση του διαλύτη υπό κενό και το προϊόν χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία $^1$HNMR.

$^1$HNMR (500 MHz, $CDCl_3$, 298 K): δ = 1.95 (s,6H, $CH_3$), 3.86(t, J = 5.3 Hz, 2H, $NCH_2$), 4.32 (t, J =4.7 5.3 Hz, 2H, $OCH_2$); 6.73 (t, J = 1.0 Hz, 2H, $CH_{vinyl}$).

### 3.3.3 Σύνθεση του ATRP-Βιομακροεκκινητή BSA-Br[11]



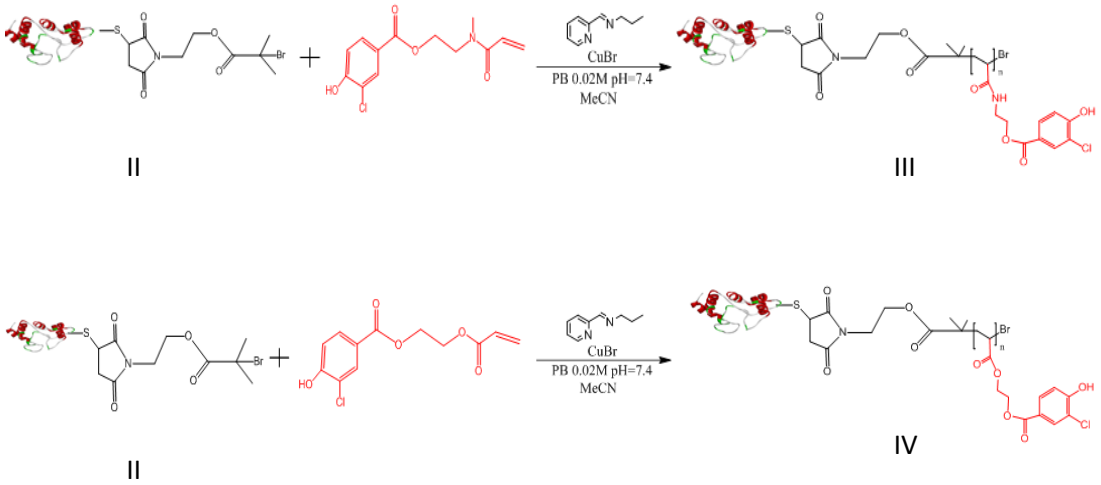

***Σχήμα 34.*** *Συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή BSA μακροεκκινητή II.*

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης αρχικά παρασκευάστηκε ένα διάλυμα 150 mM μαλεϊμίδο-ATRP εκκινητής I σε 10% DMSO (0.18 mmol, 1.2 ml, 40 equiv). Στη συνέχεια παρασκευάστηκε 0.35mM διάλυμα της πρωτεΐνης BSA σε 20 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7.4 (0.0045 mmol, 13 ml, 1 equiv). Ακολούθησε στάγδην προσθήκη του διαλύματος του εκκινητή στο διάλυμα της πρωτεΐνης και το μίγμα της αντίδρασης ανακινήθηκε ήπια για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Για τον καθαρισμό του προϊόντος έγινε διαπίδυση αρχικά δύο φορές ως προς ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 5 mM και στη συνέχεια ως προς

ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 20 mM χρησιμοποιώντας μεμβράνες διαπίδυσης με MWCO 10kDa.

### 3.3.4 Παρασκευή βιοπολυμερών BSA–polyCHB και BSA–polyACH

Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζεται διαγραμματικά η παρασκευή των γιγάντιων αμφίφιλων βιοπολυμερών BSA–polyCHB ( προϊόν III) και BSA–polyACH( προϊόν IV)




***Σχήμα 35.*** *In situ ATRP σύνθεση των γιγάντιων Αμφίφιλων βιοπολυμερών BSA-polyCHB και BSA-polyACH*

Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα μονομερή ACH και CHB όπως προαναφέρθηκε και στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται αναλυτικά οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν και οι αναλογίες των μονομερών ACH και CHB και του BSA μακροεκκινητή. Ο λόγος BSA μακροεκκινητή II : CuBr : Ligand διατηρήθηκε σταθερός σε 1: 40: 70 σε όλα τα πειράματα.

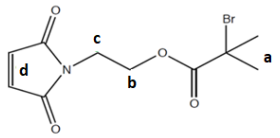
**ΠΙΝΑΚΑΣ 3.5 Σύνθεση γιγάντιων αμφίφιλων βιοπολυμερών BSA-polyCH B και BSA-polyACH**

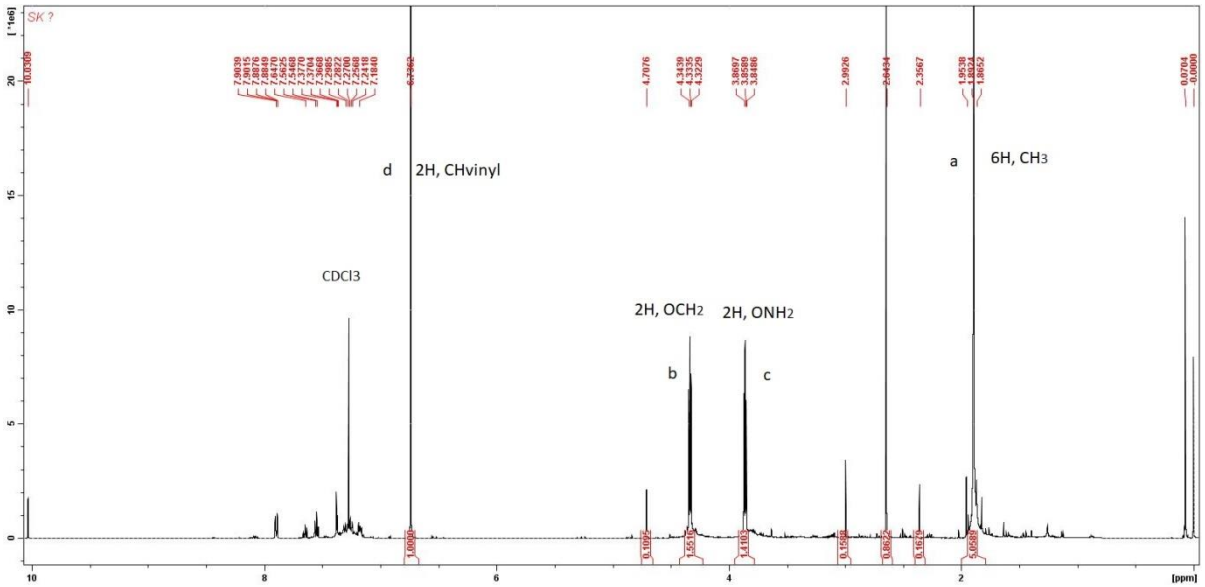
| Αντιδραστήρια | Μοριακό Βάρος | M ή V | mmol | Αναλογία |
|---|---|---|---|---|
| **BSA II** | 66790.13 | 3.2 ml | 0.00084 | 1 |
| **Monomer ( ACH/CHB)** | 270.58/269.45 | 0.22 gr | 0.84 | 1000 |
| **Ligand** | 147 | 0.0086 gr | 0.0588 | 70 |
| **CuBr** | 143.45 | 0.0049 gr | 0.0344 | 40 |
| **MeCN** | 78.13 | 0.962 ml | - | - |
| **Buffer (7.4)** | - | 9.3 ml | - | - |

Σε μια φιάλη schlenk τοποθετήθηκαν 0.22 gr του μονομερούς (0.84 mmol, 1000 equiv) και διαλύθηκαν σε 0.962 ml οργανικού διαλύτη MeCN. Ακολούθησε προσθήκη 9.3 ml 20 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και τέλος ο υποκαταστάτης*N*-(προπυλο)-2-πυριδυλομεθανιμίνη (10 μl, 0.0588 mmol, 70 equiv). Ακολούθησε διασπορά με τη βοήθεια υπερήχων προκειμένου να σχηματιστεί γαλάκτωμα. Από το μείγμα αφαιρέθηκε το οξυγόνο με την βοήθεια 3 κύκλων ψύξης-κενού-απόψυξης (freeze-pump-thaw). Η έναρξη του πολυμερισμού έγινε με την προσθήκη του διαλύματος του μονομερούς σε δεύτερο σωλήνα Schlenk που περιείχε BSA-μακροεκκινητή II (~ 59 mg, 0.00084mmol, 1 equiv) και CuBr (0.0049 gr, 0.0344 mmol , 40 equiv) υπό ατμόσφαιρα $N_2$. Η αντίδραση τέθηκε υπό ανάδευση για 12 ώρες υπό αδρανείς συνθήκες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στα συγκεκριμένα πειράματα πολυμερισμού χρησιμοποιήθηκε αναλογία μονομερούς προς BSA-μακροεκκινητή II η οποία ήταν 1000:1 και αναλογία BSA-μακροεκκινητή II:CuBr: Ligand ήταν 1:40:70.

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ :** Φάσματα NMR των ενώσεων της εργασίας

1) Μαλεϊμίδο-ATRP εκκινητής I

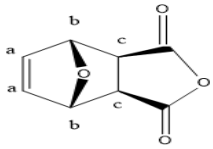


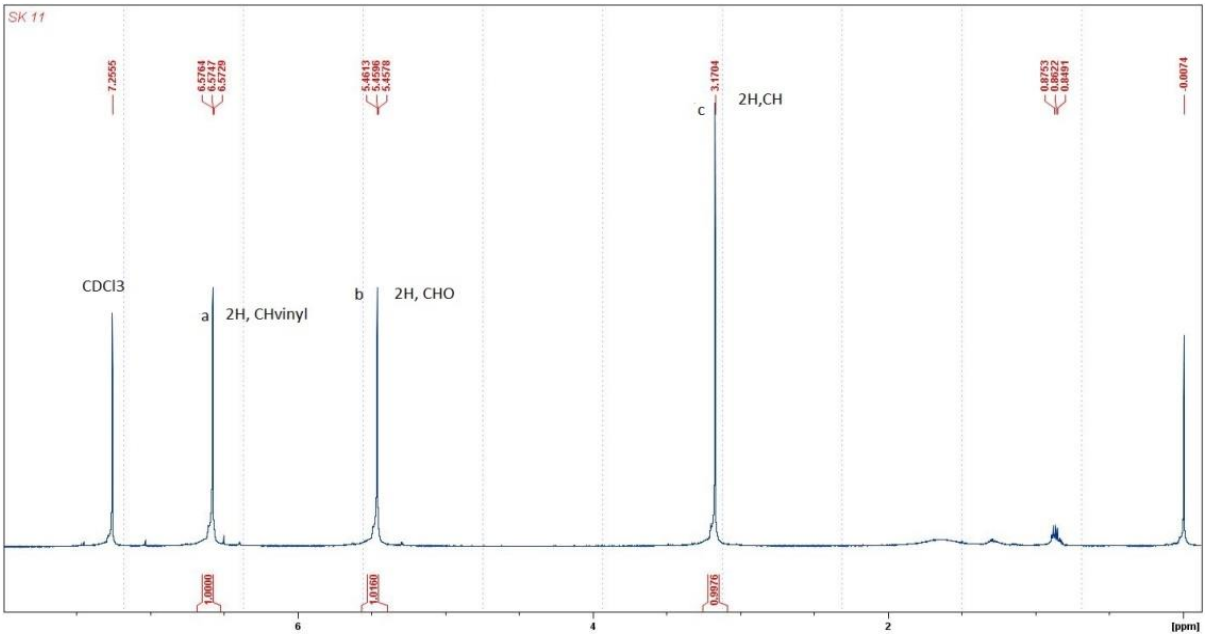




***Σχήμα 36.*** *Φάσμα $^1$HNMR του ATRP εκκινητή I.*

$^1$HNMR (500 MHz, $CDCl_3$, 298 K): δ = 1.95 (s,6H, $CH_3$), 3.86(t, J = 5.3 Hz, 2H, $NCH_2$), 4.32 (t, J =4.7, 5.3 Hz, 2H, $OCH_2$); 6.73 (t, J = 1.0 Hz, 2H, $CH_{vinyl}$).

2) 4,10-διοξατρικυκλο [5.2.1.0] δεκ-8-ενο-3,5-διόνη (1) :




***Σχήμα 37.*** *Φάσμα $^1$HNMR του 4,10-διοξατρικυκλο [5.2.1.0] δεκ-8-ενο-3,5-διόνη(1)*

$^1$HNMR (500MHz, $CDCl_3$, 298 K): δ = 3.17 (s, 2H, CH), 5.45 (t, J =1.0Hz, 2H, CHO), 6.57 (t, J = 1.0 Hz,2H, $CH_{vinyl}$).

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**


[1] Hiemenz P. and Lodge T. *"Χημεία Πολυμερών"* ***Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης 2014.***

[2] Wei M., GaoY., Li X. and Serpe M. *"Stimuli-responsive polymers and their applications"* ***Royal Society of Chemistry, Polymer Chemistry, 2017***, 8, 127-143, DOI:10.1039/c6py01585a.

[3] Velonia K., Cornelissen J., Feiters M., Rowan A. and Nolte R. *" Aggregation of Amphiphiles as a Tool to Create Novel Functional Nano-Objects"* **Nanoscale Assembly, Chemical Techniques, 2005,** pp119-185.

[4] Kim Y. and Matsunaga Y. *"Thermo-responsive polymers and their application as smart biomaterials"* ***Journal of Materials Chemistry B, 2017,*** 5, 4307-4321, DOI:10.1039/c7tb00157f.

[5] Schmaljohann D. *"Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery"* ***Advanced Drug Delivery Review, 2006,*** 58 , 1655–1670.

[6] Alard C., Soubhye J., Berger G., Gelbcke M., Spassov S., Amighi K., Goole J., and Meyer F. *"Triple-stimuli responsive polymers with fine tuneable magnetic response"* ***Royal Society of chemistry, Polymer chemistry, 2017****,* DOI: 10.1039/C7PY00218A.

[7] Huang X., Li M., Green D., Williams D., Patil A. and Mann S. *"Interfacial assembly of protein-polymer nano-conjugates into stimulus-responsive biomimetic protocells"* ***Nature Communications, 2013****,* 4: 2239/DOI:10.1038/ncomms 3239.

[8] Velonia K. "*Protein-polymer amphiphilic chimeras: recent advances and future challenges"* ***Royal Society of chemistry"Polymer Chemistry, 2010,*** 1, 944-952, DOI:10.1039/b9py00362b.

[9] Le Droumaguet B., Mantovani G., Haddleton D. and Velonia K. *"Formation of giant amphiphiles by post-functionalization of hydrophilic protein–polymerconjugates"* ***Journal of Materials Chemistry,2007,*** 17(19):1916-1922 , DOI: 10.1039/B618079E.

[10] Daskalaki E., Le Droumaguet B., Gerard D. and Velonia K. *"Multifunctional Giant Amphiphiles via simultaneous copper(I)-catalyzed azide–alkyne cycloaddition and living radical polymerization"* ***The Royal Society of chemistry, Chem Commum., 2011,*** DOI:10.1039/c1cc15075h.

[11] Le Droumaguet B. and Velonia K. *"In Situ ATRP-Mediated Hierarchical Formation of Giant Amphiphilic Bionanoreactors"* ***Angewandte chemie, Int.Ed, 2008,*** 47, 6263-6266.

[12] Teo J., Chin W., Ke X., Gao S., Liu S., Cheng W., Hedrick J., Yang Y. *"pH and redox Dual-Responsive Biodegradable Polymeric Micelles with High Drug Loading for Effective Anticancer*

*Drug Delivery"* ***Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 2016*** DOI: 10.1016/j.nano.2016.09.016.

[13] Matini T., Francini N., Battocchio A., Spain S., Mantovani G., Vicent M., Sanchis J., Gallon E., Mastrotto F., Salmaso S., Calicetic P. and Alexander C*. "Synthesis and characterization of variable conformation pH responsive block co-polymers for nucleic acid delivery and targeted cell entry"* ***Polym. Chem. 2014***, 5, 1626, DOI: 10.1039/c3py00744h.

[14] Gu L., Wang N., Nusblat L., Soskind R., Roth C. and Uhrich K. "*pH-responsive amphiphilic macromolecular carrier for doxorubicin delivery"* ***Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 2017,*** 32(I) 3-16 , DOI:101177/0883911516643219.

[15] Mastrotto F., Breena F., Siciliaa G., Murdanb S., Johnstonec A. , Marsha G., Grainger-Boultbya C., Russellc N., Alexander C. and Mantovani G**.** *"One-pot RAFT and fast polymersomes assembly: a 'beeline' from monomers to drug-loaded nanovectors"* ***Royal Society of Chemistry, Polymer Chemistry, 2016 ,*** 10.1039/C6PY01292B.

[16] Mastrotto F., Salmaso S., Alexander C., Mantovani G. and Caliceti P. *"Novel pH-responsive nanovectors for controlled release of ionisable drugs"* ***Journal of Materials Chemistry B, 2013***, 1, 5335-5346,DOI: 10.1039/C3TB20360C.

[17] Δραμουντάνης Ν. *"ATRP polymerization for the creation of multiresponsive amphiphilic copolymers"* ***Bachelor thesis, University of Crete, Department of Materials Science and Technology, Laboratory of Synthetic Biomaterials,2017.***

[18] Park C., Yoon J. and Thomas E. *"Enabling nanotechnology with self assembled block copolymer patterns"* **Polymer, 2003**, 44 ,6725–6760.www.elsevier.com/locate/polymer.

[19] Χρυσοστόμου Β. *" Αμφίφιλα Συμπολυμερή Κατά Συστάδες πολυ(Μεθακρυλικού Εστέρα της Διμεθυλοαμινοαιθανόλης) –b–πολυ(Μεθακρυλικού Εστέρα της Δωδεκανόλης):Σύνθεση, Χημική Τροποποίηση, Χαρακτηρισμός, Αυτοοργάνωση σε Διαλύματα και Σύμπλεξη με DNA"* **Ερευνητική Εργασία Διπλώματος Ειδίκευσης, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Θετικών Επιστημών , Τμήμα Χημείας, *2017*.**

[20] LoPresti C., Lomas H., Massignani M., Smart T. and Battaglia G*. "Polymersomes: nature inspired nanometer sized compartments"*, ***Journal of Materials Chemistry, 2009,*** *19*(22), pp.3576-3590, DOI: 10.1039/B818869F.

[21] Liu L., Yao W., Rao Y., Lu X. and Gao J. *"pH-Responsive carriers for oral drug delivery: challenges and opportunities of current platforms"* ***Drug delivery, 2017,*** 24:1, 569-581, DOI: 10.1080/10717544.2017.1279238.

[22] Ortega F. *"pH-responsive polymers: properties, synthesis and applications"* ***In book: Smart Polymers and their Applications, 2014,*** page 45-92, Woodhead Publishing Limited, DOI: 10.1533/9780857097026.1.45.

[23] Bersani S., Caballer M., Chiara Brazzale C., Barattin M. and *Salmaso S. "pH-sensitive stearoyl-PEG-poly(methacryloyl sulfadimethoxine) decorated liposomes for the delivery of gemcitabine to cancer cells"* ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2014,*** vol 88, 670-682.

[24] Mastrotto F., Salmaso S., Lee Y., Alexander C., Caliceti P. and Giuseppe Mantovani G. *"pH-responsive poly(4-hydroxybenzoyl methacrylates) –design and engineering of intelligent drug delivery nanovectors"* ***Polymer Chemistry, 2013,*** 4, 4375, DOI: 10.1039/c3py00496a.

[25] Kocak G., Tuncer C. and Bütün V. *"pH-Responsive polymers"* ***Polymer chemistry, 2017,*** 8,144, DOI: 10.1039/C6PY01872F.

[26] Uppalapati S., Kong N., Norberg O., Ramström O. and Yan M. *"Ionization of covalent immobilized poly(4-vinylphenol) monolayers measured by ellipsometry, QCM and SPR"* ***Appl Surf Sci. 2015***, 343: 166–171, DOI :10.1016/j.apsusc.2015.03.014.

[27] Karanth H. and Murthy P. *"pH-Sensitive liposomes—principle and application in cancer therapy"* ***Journal of pharmacy and pharmacology,2007,*** 59:469-483, DOI:10.1211/jpp.59.4.0001.

[28] Wu W., Luo L., Wang Y., Wu Q., Dai H., Li Y., Durkan C., Wang N., and Wang G. *"Endogenous pH-responsive nanoparticles with programmable size changes for targeted tumor therapy and imaging applications"* ***Theranostics, 2018,*** 8(11):3038-3058, DOI:10.7150/thno.23459.

[29] Liu Y., Wang W., Yang J., Zhou C. and Sun J. *"pH-sensitive polymeric micelles triggered drug release for extracellular and intracellular drug targeting delivery"* ***Asian Journal of pharmaceutical Science, 2013,*** 8, 159-167, DOI10.1016/j.ajps.2013.07.021.

[30] Χουντελέση Μ. *" Ορθολογικός σχεδιασμός, ανάπτυξη και αξιολόγηση χιμαιρικών pH-ευαίσθητων λιποσωμάτων με ενσωματωμένη Διμεθοξυκουρκουμίνη"* ***Διπλωματική Εργασία για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης , Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, 2017.***

[31] Mastan E., Li X. and Zhu S. *"Modeling and Simulation in Polymer Reaction Engineering: A Modular Approach"* ***Polymer Science, 2015,*** 45, 71-101.

[32] Mishra V. and Kumar R. *"Living radical polymerization: A review"* ***Journal of Scientific Research Banaras Hindu University Varanasi, 2012,*** 56, 141-176, ISSN : 0447-9483.

[33] Κορομηλάς Ν.*"Ανάπτυξη και μελέτη λειτουργικών συμπολυμερών που φέρουν Βιοστατικές ομάδες"* ***Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, 2016.***

[34] Matyjaszewski K. *"Controlled Radical Polymerization: State-of-the-Art in 2014"* ***ACS Symposium Series, vol 1187, American Chemical Society: Washington DC, 2015***, 1,1-17, DOI: 10.1021/bk-2015-1187.ch001.

[35] Matyjaszewski K. and Spanswick J.*"Controlled/living radical polymerization"* ***Materialstoday, 2015,*** ISSN:1369 7021 © Elsevier Ltd 2005.

[36] Matyjaszewski K., and Tsarevsky N. *"Nanostructured functional materials prepared by atom transfer radical polymerization"* ***Nature Chemistry, 2009***1, 276-288, DOI: 10.1038/nchem.257.

[37] Matyjaszewski K. and Xia J. *"Atom Transfer Radical Polymerization"* ***Chemical Reviews, 2001,*** 101(9):2921-2990, DOI:10.1021/cr940534g.

[38]Matyjaszewski K. *"Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): Current Status and Future Perspectives"* ***American Chemical Society Publications, M*acromolecules*, 2012,*** 45,10, pp4015-4039, DOI: 10.1021/ma3001719.

**[39]** Velonia K., Rowan A. and Nolte A. *"Lipase Polystyrene Giant Amphiphiles"* ***Journal of American chemistry Society, 2002,*** 124, 4224-4225, DOI: 10.1021/ja017809b.

[40] Mantovani G., Lecolley F., Tao L., Haddleton D., Clerx J., Cornelissen J. and Velonia K. " Design and Synthesis of N- Maleimido-Functionalized Hydrophilic Polymers via Copper-Mediated Living Radiacal Polymerization : A Suitable Alternative to PEGylation chemistry" **Journal of American chemistry Society 2005**, 127, 2966-2973.

[41] Harris D. *"Ποσοτική χημική ανάλυση"* ***Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2010.***

[42] SkoogD., HollerJ. and CrouchS.*"Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης"* ***Εκδόσεις Κωσταράκη, 2007.***