



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

**ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ

Διδακτορική Διατριβή

Υβριδικά υλικά με βάση νανοδομημένους
άνθρακες και λειτουργικά δενδριτικά πολυμερή:
Σύνθεση, χαρακτηρισμός και εφαρμογές

ΚΥΡΙΑΚΗ - ΜΑΡΙΝΑ ΛΥΡΑ

Μηχανικός Επιστήμης Υλικών

Επίβλεψη

Ζήλη Σιδεράτου

Ερευνήτρια Α' ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ

Πετρούλα Ταραντίλη

Καθηγήτρια ΕΜΠ

Αθήνα 2021



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ

**Υβριδικά υλικά με βάση νανοδομημένους
άνθρακες και λειτουργικά δενδριτικά
πολυμερή: Σύνθεση, χαρακτηρισμός και
εφαρμογές**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΥΡΙΑΚΗ - ΜΑΡΙΝΑ ΛΥΡΑ

Μηχανικός Επιστήμης Υλικών

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ω. ΣΙΔΕΡΑΤΟΥ, Ερευν. Α΄ ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ

Π. ΤΑΡΑΝΤΙΛΗ, Καθ. ΕΜΠ

Δ. ΤΣΙΟΥΡΒΑΣ, Ερευν. Α΄ ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ω. ΣΙΔΕΡΑΤΟΥ, Ερευν. Α΄ ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ

Π. ΤΑΡΑΝΤΙΛΗ, Καθ. ΕΜΠ

Δ. ΤΣΙΟΥΡΒΑΣ, Ερευν. Α΄ ΕΚΕΦΕ ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ

Κ. ΧΑΡΙΤΙΔΗΣ, Καθ. ΕΜΠ

Σ. ΒΟΥΓΙΟΥΚΑ, Αναπλ. Καθ. ΕΜΠ

Δ. ΓΟΥΡΝΗΣ, Καθ. Παν. Ιωαννίνων

Μ. ΠΑΡΑΒΑΤΟΥ, Ερευν. Α΄ ΕΚΕΦΕ

ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ

Αθήνα 2021

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής υπό της Ανώτατης Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου δεν υποδηλοί αποδοχήν των γνώμών του συγγραφέως. (Ν. 5343/1932, Άρθρο 202).

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	1
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	14
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	18
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	20
EXTENDED ABSTRACT.....	25
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΥΛΙΚΑ ΑΝΘΡΑΚΑ</u>	30
1.1 Αλλοτροπικές μορφές άνθρακα	30
1.2 Γραφένιο	31
1.2.1 Οξειδίο του γραφενίου	31
1.2.2 Μέθοδοι σύνθεσης και εφαρμογές	32
1.3 Νανοσωλήνες άνθρακα.....	34
1.3.1 Μέθοδοι σύνθεση και εφαρμογές.....	36
1.4 Νανοδίσκοι άνθρακα	41
1.5 Κβαντικές τελείες άνθρακα	44
1.5.1 Μέθοδοι σύνθεσης και εφαρμογές	47
Βιβλιογραφία 1 ^{ου} Κεφαλαίου.....	52
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ ΚΑΙ ΟΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥΣ</u> ..	60
2.1 Δενδριτικά πολυμερή.....	60
2.2 Υπερδιακλαδισμένα πολυμερή	62
2.2.1 Σύνθεση και χαρακτηρισμός υπερδιακλαδισμένων πολυμερών	62
2.3 Υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη	65
2.3.1 Παράγωγα υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης ως φορείς φαρμάκων	68
2.3.2 Παράγωγα υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης ως αντιβακτηριακά υλικά.....	74
2.4 Διαμεμβρανικοί μεταφορείς.....	76
2.4.1 Δενδριτικοί διαμεμβρανικοί μεταφορείς.....	77
2.4.2 Βιολογικές εφαρμογές των διαμεμβρανικών μεταφορέων.....	80
Βιβλιογραφία 2 ^{ου} Κεφαλαίου.....	83

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΒΡΙΔΙΚΑ ΝΑΝΟΔΟΜΗΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΑΝΘΡΑΚΑ..... 90

3.1 Υβριδικά νανοϋλικά.....	90
3.2 Υβριδικά νανοϋλικά άνθρακα ως φορείς φαρμάκων.....	92
3.3 Υβριδικά νανοϋλικά άνθρακα ως αντιβακτηριακά υλικά.....	100
Βιβλιογραφία 3 ^ο Κεφαλαίου.....	108

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ 114

4.1 Αντιδραστήρια και διαλύτες	114
4.2 Σύνθεση γουανιδιωμένων παραγώγων της πολυαιθυλενιμίνης.....	117
4.3 Σύνθεση οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος τροποποιημένων με γουανιδιωμένα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης	118
4.3.1 Οξείδωση νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος (oxCNTs) .	118
4.3.2 Σύνθεση οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα τροποποιημένων με γουανιδιωμένα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης.....	119
4.4 Επισήμανση με ροδαμίνη των οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα τροποποιημένων με γουανιδιωμένα πολυμερή.....	119
4.5 Σύνθεση οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος τροποποιημένων με παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης που φέρουν ομάδες τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων	120
4.5.1 Σύνθεση παραγώγων της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης που φέρουν ομάδες τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων.....	120
4.5.2 Σύνθεση οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος τροποποιημένων με παράγωγα υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης που φέρουν ομάδες τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων.....	121
4.6 Σύνθεση οξειδωμένων νανοδίσκων άνθρακα τροποποιημένων με γουανιδιωμένα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης	121
4.6.1 Οξείδωση νανοδίσκων άνθρακα.....	121
4.6.2 Σύνθεση οξειδωμένων νανοδίσκων άνθρακα με γουανιδιωμένα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης	122
4.7 Σύνθεση οξειδωμένων νανοδίσκων άνθρακα τροποποιημένων με φθορίζουσες νανοτελείες άνθρακα.....	122
4.7.1 Σύνθεση φθορίζουσών νανοτελειών άνθρακα	122
4.7.2 Σύνθεση οξειδωμένων νανοδίσκων άνθρακα τροποποιημένων με φθορίζουσες νανοτελείες άνθρακα.....	123
4.8 Τεχνικές χαρακτηρισμού των υβριδικών υλικών	123
4.8.1 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).....	123
4.8.1.1 Αρχή της μεθόδου.....	123
4.8.1.2 Πειραματική διαδικασία	125
4.8.2 Φασματοσκοπία υπέρυθρου (FTIR).....	125
4.8.2.1 Αρχή της μεθόδου.....	125
4.8.2.2 Πειραματική διαδικασία	129
4.8.3 Φασματοσκοπία Raman	129
4.8.3.1 Αρχή της μεθόδου.....	129
4.8.3.2 Πειραματική διαδικασία	131

4.8.4 Φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-vis).....	131
4.8.4.1 Αρχή της μεθόδου.....	131
4.8.4.2 Πειραματική διαδικασία.....	133
4.8.5 Περίθλαση ακτίνων-X (XRD).....	133
4.8.5.1 Αρχή της μεθόδου.....	133
4.8.5.2 Πειραματική διαδικασία.....	135
4.8.6 Θερμοβαρυμετρική ανάλυση (TGA).....	135
4.8.6.1 Αρχή της μεθόδου.....	135
4.8.6.2 Πειραματική διαδικασία.....	137
4.8.7 Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων-X (XPS).....	137
4.8.7.1 Αρχή της μεθόδου.....	137
4.8.7.2 Πειραματική διαδικασία.....	139
4.8.8 Μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM).....	139
4.8.8.1 Αρχή της μεθόδου.....	139
4.8.8.2 Πειραματική διαδικασία.....	142
4.8.9 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM).....	142
4.8.9.1 Αρχή της μεθόδου.....	142
4.8.9.2 Πειραματική διαδικασία.....	144
4.8.10 Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM).....	144
4.8.10.1 Αρχή της μεθόδου.....	144
4.8.10.2 Πειραματική διαδικασία.....	145
4.8.11 Προσδιορισμός ζ-δυναμικού.....	146
4.8.11.1 Αρχή της μεθόδου.....	146
4.8.11.2 Πειραματική διαδικασία.....	147
4.8.12 Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS).....	148
4.8.12.1 Αρχή της μεθόδου.....	148
4.8.12.2 Πειραματική διαδικασία.....	149
4.9 Δέσμευση δοξορουβικίνης στα υβριδικά υλικά.....	150
4.9.1 Δέσμευση δοξορουβικίνης και προσδιορισμός συγκέντρωσης της στα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K.....	150
4.9.2 Δέσμευση δοξορουβικίνης και προσδιορισμός συγκέντρωσης της στα oxCNDs@FCDs.....	151
4.10 <i>In vitro</i> μελέτη της pH-αποκρινόμενης αποδέσμευσης DOX από τα oxCNTs@GPEIs.....	151
4.11 Βιολογική μελέτη των υβριδικών υλικών σε καρκινικές και μη καρκινικές κυτταρικές σειρές.....	152
4.11.1 Μελέτη κυτταροτοξικότητας των υβριδικών υλικών.....	154
4.11.1.1 Αρχή της μεθόδου.....	154
4.11.1.2 Πειραματική διαδικασία.....	155
4.11.2 Κυτταρομετρία ροής.....	156
4.11.2.1 Αρχή της μεθόδου.....	156
4.11.2.2 Πειραματική διαδικασία.....	157
4.11.3 Συνεστιακή μικροσκοπία.....	158
4.11.3.1 Αρχή της μεθόδου.....	158
4.11.3.2 Πειραματική διαδικασία.....	161
4.12 Αντιβακτηριακή μελέτη.....	162

4.12.1 Μελέτη ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Escherichia coli</i> XL1-blue παρουσία των υλικών oxCNTs@30-QPEI, oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI	163
4.12.2 Κινητική μελέτη της ανάπτυξης των βακτηρίων παρουσία GPEI5K και GPEI25K	164
4.12.3 Μελέτη της ανάπτυξης των βακτηρίων παρουσία των υβριδικών υλικών (oxCNTs@GPEI5K, oxCNTs@GPEI25K και oxCNDs@GPEI5K, oxCNDs@GPEI25K).....	165
4.12.3.1 Αρχή της μεθόδου.....	165
4.12.3.2 Πειραματική διαδικασία	166
4.12.4 Μελέτη της βακτηριοκτόνου δράσης των υβριδικών υλικών (Resazurin Assay).....	167
4.12.4.1 Αρχή της μεθόδου.....	167
4.12.4.2 Πειραματική διαδικασία	167
4.12.5 Έλεγχος της μορφολογίας των βακτηρίων <i>E. coli</i> με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM).....	168
4.12.5.1 Πειραματική διαδικασία	168
Βιβλιογραφία 4 ^{ου} Κεφαλαίου.....	170

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... 174

5.1 Υβριδικά υλικά άνθρακα ως φορείς φαρμάκων..... 174

5.1.1 Μελέτη των υβριδικών υλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K ως φορείς φαρμάκων	174
5.1.1.1 Σύνθεση και χαρακτηρισμός των γουανιδιωμένων παραγώγων GPEI5K και GPEI25K.....	174
5.1.1.2 Σύνθεση και χαρακτηρισμός των υβριδικών υλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K	179
5.1.1.3 Χαρακτηρισμός των υδατικών διασπορών των υβριδικών υλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K	191
5.1.1.4 Δέσμευση δοξορουβικίνης στα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K	193
5.1.1.5 Βιολογική μελέτη των υβριδικών υλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K με δεσμευμένη δοξορουβικίνη (DOX)	196
5.1.2 Μελέτη του υβριδικού υλικού oxCNDs@FCDs ως φορέα φαρμάκων ..	210
5.1.2.1 Σύνθεση και χαρακτηρισμός του υβριδικού υλικού oxCNDs@FCDs	210
5.1.2.2 Χαρακτηρισμός των υδατικών διασπορών του υβριδικού υλικού oxCNDs@FCDs	220
5.1.2.3 Δέσμευση δοξορουβικίνης στα oxCNDs@FCDs.....	223
5.1.2.4 Βιολογική μελέτη των oxCNDs@FCDs με δεσμευμένη δοξορουβικίνη (DOX)	224

5.2 Υβριδικά υλικά άνθρακα ως αντιβακτηριακά υλικά 232

5.2.1 Αντιβακτηριακή μελέτη των υβριδικών υλικών oxCNTs@30-QPEI, oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI.....	232
5.2.1.1 Σύνθεση και χαρακτηρισμός των παραγώγων της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης που φέρουν τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα	233

5.2.1.2	Σύνθεση και χαρακτηρισμός των oxCNTs@30-QPEI, oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI.....	235
5.2.1.3	Χαρακτηρισμός των υδατικών διασπορών των υβριδικών υλικών oxCNTs@30-QPEI, oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI.....	244
5.2.1.4	Μελέτη της αντιβακτηριακής δράσης των oxCNTs@30-QPEI, oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI	248
5.2.1.5	Έλεγχος της μορφολογίας των βακτηρίων <i>Escherichia coli</i> XL1-blue με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM) παρουσία των oxCNTs@30-QPEI, oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI	251
5.2.1.6	Μελέτη κυτταροτοξικότητας σε καρκινικά και ευκαρυωτικά κύτταρα παρουσία των oxCNTs@30-QPEI, oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI	253
5.2.2	Αντιβακτηριακή μελέτη των υβριδικών υλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K.....	255
5.2.2.1	Κινητική μελέτη της ανάπτυξης των δύο βακτηριακών στελεχών παρουσία των GPEIs και μελέτη της βακτηριοκτόνου δράσης τους	255
5.2.2.2	Μελέτη της ανάπτυξης των δύο βακτηριακών στελεχών παρουσία των oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K.....	260
5.2.2.3	Μελέτη της βακτηριοκτόνου δράσης των oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K (Resazurin Assay).....	264
5.2.2.4	Έλεγχος της μορφολογίας των βακτηρίων <i>Escherichia coli</i> με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM) παρουσία των oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K.....	267
5.2.2.5	Μελέτη κυτταροτοξικότητας σε ευκαρυωτικά κύτταρα παρουσία των oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K	269
5.2.3	Αντιβακτηριακή μελέτη των υβριδικών υλικών oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K.....	271
5.2.3.1	Σύνθεση και χαρακτηρισμός των oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K.....	271
5.2.3.2	Χαρακτηρισμός των υδατικών διασπορών των υβριδικών υλικών oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K	280
5.2.3.3	Μελέτη της ανάπτυξης των δύο βακτηριακών στελεχών παρουσία των oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K	281
5.2.3.4	Μελέτη της βακτηριοκτόνου δράσης των oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K (Resazurin Assay)	284
5.2.3.5	Έλεγχος της μορφολογίας των βακτηρίων <i>Escherichia coli</i> με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM) παρουσία των oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K	287
5.2.3.6	Μελέτη κυτταροτοξικότητας σε ευκαρυωτικά κύτταρα παρουσία των oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K	289
	Βιβλιογραφία 5 ^{ου} Κεφαλαίου.....	291
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ	299
6.1	Γενικά συμπεράσματα	299
6.1.1	Τροποποιημένοι νανοσωλήνες άνθρακα με δενδριτικούς διαμεμβρανικούς μεταφορείς, ως φορείς φαρμάκων	299
6.1.2	Τροποποιημένοι νανοδίσκοι άνθρακα με φθορίζουσες νανοτελείες άνθρακα για ταυτόχρονη ανίχνευση και μεταφορά φαρμάκων	301

6.1.3 Τροποποιημένοι νανοσωλήνες άνθρακα με παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης, που φέρουν τεταρτοταγείς αμμωνιακές ομάδες ως αντιβακτηριακά υλικά.....	303
6.1.4 Τροποποιημένοι νανοσωλήνες άνθρακα με γουανιδιωμένα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης, ως αντιβακτηριακά υλικά.....	305
6.1.5 Τροποποιημένοι νανοδίσκοι άνθρακα με γουανιδιωμένα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης, ως αντιβακτηριακά υλικά.....	306
6.2 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα	308
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ	310

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Κεφάλαιο 2

Πίνακας 2.1: Τα κυριότερα πεπτίδια που εμφανίζουν την ιδιότητα να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες..... 77

Κεφάλαιο 4

Πίνακας 4.1: Αντιδραστήρια των πολυμερικών παραγώγων QPEI και GPEI..... 114

Πίνακας 4.2: Διαλύτες των πολυμερικών παραγώγων QPEI και GPEI..... 114

Πίνακας 4.3: Υλικά για τις οξειδώσεις των CNTs και CNDs 115

Πίνακας 4.4: Υλικά για την σύνθεση των FCDs 115

Πίνακας 4.5: Υλικά για την μελέτη των καρκινικών και ευκαρυωτικών κυττάρων 116

Πίνακας 4.6: Υλικά για την αντιβακτηριακή μελέτη 117

Κεφάλαιο 5

Πίνακας 5.1: Ατομικά ποσοστά % των oxCNTs τροποποιημένων με τα GPEIs 181

Πίνακας 5.2: Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης των oxCNTs, GPEIs και oxCNTs@GPEIs και υπολογισμός εξ αυτών των ποσοστών GPEI στα oxCNTs 187

Πίνακας 5.3: Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης των oxCNTs, QPEIs και oxCNTs@QPEIs και υπολογισμός εξ αυτών των ποσοστών QPEI στα oxCNTs 240

Πίνακας 5.4: Πίνακας τιμών EC₅₀ των oxCNTs@QPEIs στα βακτήρια *Escherichia coli* XL1-blue 251

Πίνακας 5.5: Πίνακας τιμών EC₅₀ των GPEI5K και GPEI25K στα βακτήρια *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus* 259

Πίνακας 5.6: Πίνακας τιμών EC₅₀ των oxCNTs, oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K στα βακτήρια *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus*..... 267

Πίνακας 5.7: Πίνακας τιμών EC₅₀ των oxCNDs, oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K στα βακτήρια *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus* 286

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Κεφάλαιο 1

Εικόνα 1.1: Γραφικές δομές άνθρακα	30
Εικόνα 1.2: Η 2D δομή του γραφενίου ως δομικό υλικό όλων των άλλων διαστάσεων του άνθρακα.....	31
Εικόνα 1.3: Αντίδραση μεθόδου Hummers -Offerman	33
Εικόνα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση των SWCNTs.....	35
Εικόνα 1.5: Σχηματική αναπαράσταση των DWCNTs	36
Εικόνα 1.6: Σχηματική αναπαράσταση των MWCNTs.....	36
Εικόνα 1.7: Διάταξη εκκένωσης τόξου.....	37
Εικόνα 1.8: Διάταξη εξάχνωσης με laser.....	38
Εικόνα 1.9: Διάταξη CCVD.....	39
Εικόνα 1.10: Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης: (A) νανοδίσκων και νανοκώνων άνθρακα και (B) πέντε διαφορετικών ειδών νανοκώνων με γωνία κορυφής: (a) 19.28°, (b) 38:98°, (c) 60:08°, (d) 84:68° και (e) 112.98°, και (f) υψηλής ανάλυσης εικόνα της κορυφής νανοκωνίου (η γραμμή κάτω δεξιά υποδηλώνει 200 nm, εκτός της (f) που υποδηλώνει 5 nm	42
Εικόνα 1.11: Σχηματική αναπαράσταση της ενεργειακής κατάστασης ενός μορίου, μιας κβαντικής τελείας και ενός bulk υλικού	45
Εικόνα 1.12: Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου φθορισμού των κβαντικών τελειών	45
Εικόνα 1.13: Σχηματική αναπαράσταση των τριών κατηγοριών που χωρίζονται οι κβαντικές τελείες άνθρακα	46
Εικόνα 1.14: Σχηματική απεικόνιση των μεθόδων σύνθεσης και των εφαρμογών των κβαντικών τελειών άνθρακα	48

Κεφάλαιο 2

Εικόνα 2.1: Δενδριτική αρχιτεκτονική	60
Εικόνα 2.2: Κατηγορίες πολυμερών	60
Εικόνα 2.3: Σχηματική αναπαράσταση των υποκατηγοριών της οικογένειας των δενδριτικών πολυμερών.....	61
Εικόνα 2.4: Υπερδιακλαδισμένο πολυμερές που προέκυψε από τον πολυμερισμό μονομερών τύπου AB ₂ , όπου σημειώνονται τα διαφορετικά είδη επαναλαμβανόμενων μονάδων	64
Εικόνα 2.5: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της υπερδιακλαδισμένης πολυγλυκερόλης.....	65
Εικόνα 2.6: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης	66
Εικόνα 2.7: Σχηματική αναπαράσταση του πολυμερισμού της αζιριδίνης (πάνω μέρος) και του μηχανισμού του κατιονικού πολυμερισμού της αζιριδίνης (κάτω μέρος)	67

Εικόνα 2.8: Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας των παραγώγων της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης που φέρουν ισοβουτυλαμιδικές ομάδες με διάφορους βαθμούς υποκατάστασης	69
Εικόνα 2.9: Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας του συστήματος PEI-FI-(PEG-HA)/DOX	70
Εικόνα 2.10: Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας του συστήματος FA-mPEI/DOX.....	71
Εικόνα 2.11: Ενδοκυττάριος εντοπισμός των PEI-TPP που περιείχαν εγκλεισμένη DOX (PEI-TPP-DOX) με συνεστιακή μικροσκοπία σε καρκινικά κύτταρα DU145, τα οποία έχουν επωαστεί με 200 nM MitoTracker® Green FM για 15 min (αριστερά) και 250 nM PEI-TPP-DOX (μεσαία εικόνα) για 3 h, καθώς και ο συνδυασμός των δύο εικόνων που δείχνουν τον συνεντοπισμό των δύο χρώσεων	71
Εικόνα 2.12: Διαγραμματική απεικόνιση της ανάπτυξης του καρκινικού όγκου των καρκινικών κυττάρων DU145 σε SCID μύες με χορήγηση ελεύθερης DOX, νανοσωματιδίων PEI(1300)-TPP(C10), εγκλεισμένης DOX στα νανοσωματίδια PEI(1300)-TPP(C10) και του συγχωρηγούμενου συστήματος PEI(1300)-TPP(C10)-DOX/PEI(1300)-TPP(C10)-CQ.....	73
Εικόνα 2.13: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης του παραγώγου και η επίδραση του στα <i>E. coli</i> βακτήρια.....	76
Εικόνα 2.14: Το μόριο της γουανιδίνης.....	78
Εικόνα 2.15: Δομή των δενδριτικών μορίων που διαπερνούν κυτταρικές μεμβράνες. Στην εξωτερική επιφάνεια των μορίων υπάρχουν γουανιδικές ομάδες και το εσωτερικό τμήμα φέρει υδρογονανθρακικές αλυσίδες μεταβλητού μήκους με $n, k=2-6$	79
Εικόνα 2.16: Μοριακή αναγνώριση μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ γουανιδικής ομάδας και φωσφορικής ή καρβοξυλικής ομάδας.....	80
Εικόνα 2.17: Εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού των κυττάρων A549 μετά από 3 ώρες επώασης με το γουανιδιωμένο παράγωγο DGL 2 ^{ns} γενιάς.....	81
Εικόνα 2.18: Σχέδιο της αντίδρασης για την σύνθεση των τροποποιημένων DAB δενδριμερών.....	82

Κεφάλαιο 3

Εικόνα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας του CNT-PEI(FITC)-mAb.....	95
Εικόνα 3.2: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης των P123-MWNTs-CPT υπερμοριακών συμπλόκων	96
Εικόνα 3.3: Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας των DOX/CNTs-PEG και DOX/CNTs-PEG-FOL	97
Εικόνα 3.4: Σχηματική απεικόνιση της αντικαρκινικής δράσης της DOX, η οποία μεταφέρθηκε με το σύστημα GOFA-DOX/HACPN σε όγκους ανοσοκατεσταλμένων μύων BALB/c που τους είχαν εμβολιάσει υποδόρια με καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7.....	99
Εικόνα 3.5: Σχηματική αναπαράσταση της χημικής τροποποίησης των MWCNTs με MEA, DEA και TEA	102
Εικόνα 3.6: Εικόνες TEM βακτηρίων <i>E. coli</i> επωασμένων: (A) με τροφικό μέσο και (B) με 85 μg/mL GO για 2 h στους 37 °C.....	103

Εικόνα 3.7: Σχηματική αναπαράσταση της παρασκευής νανοσύνθετων υλικών με βάση το οξείδιο του γραφενίου. 1:GO, 2:GO-PLL, 3:rGO-PLL, 4:rGO, 5:GO-DS, 6:GO-DS-PLL, 7:rGO-DS, 8:rGO-DS-PLL.....	105
Εικόνα 3.8: Χημική τροποποίηση του GO: (A) με την πολύ(L-λυσίνη) (PLL) και (B) με πολυβινυλο-N-καρβαζόλη (PVK).....	106
Εικόνα 3.9: Αντιβακτηριακή δράση (a) της μεμβράνης PES και των νανοσύνθετων μεμβρανών με (b) 1.5% GO-Ly και με (c) 1.5% CRGO-Ly έναντι των βακτηρίων <i>Escherichia coli</i>	107

Κεφάλαιο 4

Εικόνα 4.1: Σχηματική αναπαράσταση φασματοσκοπίας NMR.....	124
Εικόνα 4.2: Μερικές μορφές δόνησης και κάμψης	127
Εικόνα 4.3: Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου της εσωτερικής ολικής ανάκλασης.....	128
Εικόνα 4.4: (α) Στο σχήμα φαίνεται ότι η σκέδαση Rayleigh είναι ισχυρότερη από τις σκεδάσεις Raman, (β) προέλευση της σκέδασης Rayleigh και Raman.....	130
Εικόνα 4.5: Ηλεκτρονικές μεταβάσεις που παρατηρούνται με φασματοσκοπία UV-vis.....	133
Εικόνα 4.6: Περίθλαση ακτίνων-X από τον κρύσταλλο.....	135
Εικόνα 4.7: Παράδειγμα καμπύλης TGA	136
Εικόνα 4.8: Σχηματική αναπαράσταση ενός συστήματος XPS.....	138
Εικόνα 4.9: Σχηματική αναπαράσταση διάταξης AFM. Η δέσμη λέιζερ ανακλάται από την πίσω πλευρά του προβόλου της ακίδας πάνω στο φωτοαισθητήρα, ο οποίος τροφοδοτεί το κύκλωμα ανάδρασης με ένα σήμα τάσης. Από το σύστημα ελέγχου το διορθωτικό σήμα καταλήγει στο σαρωτή για τη ρύθμιση του ύψους του και τη διατήρηση σταθερής δύναμης, δηλαδή σταθερής απόστασης ακίδας-επιφάνειας, κατά τη σάρωση.....	140
Εικόνα 4.10: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου λειτουργίας του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης	142
Εικόνα 4.11: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου λειτουργίας του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης.....	145
Εικόνα 4.12: Σχηματική αναπαράσταση της στοιβάδας Stern και της ιοντικής διπλοστοιβάδας.....	146
Εικόνα 4.13: Πειραματική διάταξη δυναμικής σκέδασης φωτός.....	149
Εικόνα 4.14: Αναγωγή του MTT σε φορμαζίνη.....	154
Εικόνα 4.15: Αρχή λειτουργίας του κυτταρομετρητή. Τα σωματίδια περνούν διαμέσου της ακτίνας λέιζερ και η σκεδαζόμενη, καθώς και η φθορίζουσα ακτινοβολία συλλέγεται από τους ανιχνευτές και μετατρέπεται σε ηλεκτρικά σήματα	157
Εικόνα 4.16: Βασικά εξαρτήματα ενός συνεστιακού μικροσκοπίου.....	159
Εικόνα 4.17: Συνοπτική απεικόνιση της μεθόδου spread plate	166
Εικόνα 4.18: Μετατροπή της ρεσαζουρίνης στο φθορίζον μόριο ρεσορουφίνης.....	167

Κεφάλαιο 5

Εικόνα 5.1: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης των γουανιδιωμένων παραγώγων της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης.....	174
Εικόνα 5.2: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης των υβριδικών υλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K	179
Εικόνα 5.3: Εικόνα AFM των oxCNTs	188
Εικόνα 5.4: Εικόνες AFM των oxCNTs@GPEI5K.....	188
Εικόνα 5.5: Εικόνες AFM των oxCNTs@GPEI25K.....	189
Εικόνα 5.6: Εικόνες SEM των oxCNTs (A), oxCNTs@GPEI5K (B) και oxCNTs@GPEI25K (C). Η κλίμακα είναι 200 nm	189
Εικόνα 5.7: Εικόνες TEM υψηλής ανάλυσης των oxCNTs@GPEI5K (A, B, C) και oxCNTs@GPEI25K (D, E, F) και σκοτεινού πεδίου των oxCNTs@GPEI5K (G) και oxCNTs@GPEI25K (H) συνοδευόμενες από τις εικόνες χαρτογράφησης κατανομής άνθρακα (πράσινο) και αζώτου (κόκκινο) των αντίστοιχων περιοχών	190
Εικόνα 5.8: Διασπορές των oxCNTs (1), oxCNTs@GPEI5K (2) και oxCNTs@GPEI25K (3) σε νερό (1 mg/mL) αμέσως μετά τους υπερήχους (A), μετά από ηρεμία 1 μήνα (B) και μετά από 6 μήνες ηρεμίας (C).....	191
Εικόνα 5.9: Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας σε καρκινικά κύτταρα DU145 παρουσία των υβριδικών υλικών επισημασμένα με ροδαμίνη. Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία των επισημασμένων oxCNTs@GPEI5K-Rh (A,B) και oxCNTs@GPEI25K-Rh (C,D) σε συγκέντρωση 2 μg/mL για 3 h. Η κλίμακα είναι στα 10 μM.....	206
Εικόνα 5.10: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης των φθοριζουσών νανοτελειών άνθρακα	211
Εικόνα 5.11: Εικόνες SEM των oxCNDs. Η κλίμακα είναι 1 μm (A) και 100 nm (B,C).....	217
Εικόνα 5.12: Εικόνες SEM των oxCNDs@FCDs. Η κλίμακα είναι 1 μm (A,B) και 100 nm (C).....	218
Εικόνα 5.13: Εικόνες TEM των oxCNDs. Η κλίμακα είναι 1 μm (A,B), 20 nm (C) και 10 nm (D).....	218
Εικόνα 5.14: Εικόνες TEM των oxCNDs@FCDs. Η κλίμακα είναι 5 μm (A), 1 μm (B-Δ), 500 nm (E), 200 nm (ΣΤ), 50 nm (Ζ), 20 nm (H) και 10 nm (Θ).....	219
Εικόνα 5.15: Εικόνες φωτεινού πεδίου TEM των oxCNDs@FCDs (A, B), συνοδευόμενες από τις εικόνες χαρτογράφησης κατανομής των στοιχείων άνθρακα (πράσινο), αζώτου (κόκκινο) και οξυγόνου (μπλε) των αντίστοιχων περιοχών.....	220
Εικόνα 5.16: Φωτογραφίες υδατικών διασπορών των oxCNDs@FCDs (1) και oxCNDs (2): (A) συγκέντρωσης 1 mg/mL αμέσως μετά τους υπερήχους και (B) συγκέντρωσης 0.2 mg/mL που δείχνει το φαινόμενο σκέδασης Tyndall.....	221
Εικόνα 5.17: Ενδοκυττάριος εντοπισμός της DOX (κόκκινο) με συνεστιακή μικροσκοπία σε καρκινικά κύτταρα DU145, τα οποία επώαστηκαν παρουσία: (A) ελεύθερης DOX και (B) δεσμευμένης DOX στα oxCNDs@FCDs (μπλε) για 5 ώρες. Η συγκέντρωση της DOX σε όλα τα πειράματα ήταν 1 μM και του υβριδικού νανοϋλικού 13.2 μg/mL.....	228
Εικόνα 5.18: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης των παραγώγων της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης που φέρουν τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα (QPEIs)	233

Εικόνα 5.19: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης των υβριδικών υλικών oxCNTs@QPEIs	236
Εικόνα 5.20: Εικόνες AFM της μορφολογίας των oxCNTs@50-QPEI	241
Εικόνα 5.21: Εικόνες AFM της μορφολογίας των oxCNTs@80-QPEI	241
Εικόνα 5.22: Εικόνες SEM των (A) oxCNTs@30-QPEI, (B) oxCNTs@50-QPEI και (C, D) oxCNTs@80-QPEI. Η κλίμακα είναι 100 nm	242
Εικόνα 5.23: Εικόνα TEM των (A) oxCNTs@50-QPEI. Εικόνα φωτεινού πεδίου (B) συνοδευόμενη από την εικόνα χαρτογράφησης κατανομής αζώτου (κόκκινο) της αντίστοιχης περιοχής (C). Εικόνες HRTEM του oxCNTs@80-QPEI (D-F) καθώς και ένα τυπικό φάσμα EELS αζώτου των oxCNTs@80-QPEI (G)	243
Εικόνα 5.24: Υδατικές διασπορές των oxCNTs (1), oxCNTs@30-QPEI (2) oxCNTs@50-QPEI (3) και oxCNTs@80-QPEI (4) σε νερό (1 mg/mL) αμέσως μετά τους υπερήχους (A), μετά από ηρεμία: 1 μήνα (B), 3 μηνών (C), 6 μηνών (D), 12 μηνών (E) και 18 μηνών(F)	245
Εικόνα 5.25: Εικόνες SEM των <i>Escherichia coli</i> βακτηρίων μετά από επώαση με θρεπτικό μέσο (A) και με συγκέντρωση ίση με το EC ₅₀ των oxCNTs@30-QPEI (B), oxCNTs@50-QPEI (C) και oxCNTs@80-QPEI (D). Η κλίμακα είναι 1 μm	251
Εικόνα 5.26: Αποικίες ανάπτυξης βακτηρίων <i>E. coli</i> και <i>S. aureus</i> παρουσία των oxCNTs	261
Εικόνα 5.27: Αποικίες ανάπτυξης βακτηρίων <i>E. coli</i> και <i>S. aureus</i> παρουσία των oxCNTs@GPEI5K	262
Εικόνα 5.28: Αποικίες ανάπτυξης βακτηρίων <i>E. coli</i> και <i>S. aureus</i> παρουσία των oxCNTs@GPEI25K	262
Εικόνα 5.29: Εικόνες SEM των <i>Escherichia coli</i> βακτηρίων μετά από επώαση με θρεπτικό μέσο (A) και με συγκέντρωση ίση με το ήμισυ του EC ₅₀ των oxCNTs@GPEI5K (B) και oxCNTs@GPEI25K (C). Η κλίμακα των εικόνων είναι 1 μm, εκτός της B (δεξιά) που είναι 10 μm	268
Εικόνα 5.30: Σχηματική αναπαράσταση της παρασκευής των υβριδικών μορίων oxCNDs@GPEIs	272
Εικόνα 5.31: Εικόνες SEM των oxCNDs (A,B,Γ), των oxCNDs@GPEI5K (Δ,Ε,ΣΤ) και των oxCNDs@GPEI25K (Ζ,Η,Θ). Η κλίμακα είναι 1 μm στις εικόνες (A,Δ,Ε,Ζ) και 100 nm στις εικόνες (B,Γ,ΣΤ,Η,Θ)	278
Εικόνα 5.32: Εικόνες TEM των oxCNDs@GPEI5K (A-Δ) και των oxCNDs@GPEI25K (E-H). Η κλίμακα είναι 1 μm (A, E), 500 nm (B, ΣΤ), 500 nm (Γ, Ζ), 50 nm (Δ) και 20 nm (H)	279
Εικόνα 5.33: Εικόνες σκοτεινού πεδίου TEM των oxCNDs@GPEI5K (A) και των oxCNDs@GPEI25K (B), συνοδευόμενες από τις εικόνες χαρτογράφησης κατανομής των στοιχείων άνθρακα (πράσινο), αζώτου (κόκκινο) και οξυγόνου (μπλε) των αντίστοιχων περιοχών. Η κλίμακα είναι 200 nm (A) και 500 nm (B)	280
Εικόνα 5.34: Φωτογραφίες υδατικών διασπορών των oxCNDs (1), oxCNDs@GPEI5K (2) και oxCNDs@GPEI25K (3): (A) συγκέντρωσης 1 mg/mL αμέσως μετά τους υπερήχους και (B) συγκέντρωσης 0.2 mg/mL που απεικονίζει το φαινόμενο σκέδασης Tyndall	281
Εικόνα 5.35: Αποικίες ανάπτυξης βακτηρίων <i>E. coli</i> και <i>S. aureus</i> παρουσία των oxCNDs	282

Εικόνα 5.36: Αποικίες ανάπτυξης βακτηρίων <i>E. coli</i> και <i>S. aureus</i> παρουσία των οxCNDs@GPEI5K	282
Εικόνα 5.37: Αποικίες ανάπτυξης βακτηρίων <i>E. coli</i> και <i>S. aureus</i> παρουσία των οxCNDs@GPEI25K	283
Εικόνα 5.38: Εικόνες SEM των <i>Escherichia coli</i> βακτηρίων μετά από επώαση με θρεπτικό μέσο (A) και με συγκέντρωση ίση με το ήμισυ του EC ₅₀ των οxCNDs@GPEI5K (B) και οxCNDs@GPEI25K (C). Η κλίμακα των εικόνων είναι 1 μm	288

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Κεφάλαιο 5

Σχήμα 5.1: Φάσματα ^1H NMR των GPEI5K (A) και GPEI25K (B) σε D_2O	175
Σχήμα 5.2: Φάσματα ^{13}C NMR στα 125.1 MHz των GPEI5K (A) και GPEI25K (B) σε D_2O	176
Σχήμα 5.3: Φάσματα FTIR των GPEI παραγώγων	177
Σχήμα 5.4: Φάσματα XPS υψηλής ανάλυσης C1s (A, B) και N1s (C, D) των GPEI5K και GPEI25K.....	178
Σχήμα 5.5: Φάσμα XPS υψηλής ανάλυσης C1s των oxCNTs	180
Σχήμα 5.6: Φάσματα XPS των oxCNTs@GPEI5K (A) και oxCNTs@GPEI25K (B).....	181
Σχήμα 5.7: Φάσματα XPS υψηλής ανάλυσης C1s (A, B) και N1s (C, D) των oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K	182
Σχήμα 5.8: Φάσματα FTIR των: (A) oxCNTs, GPEI5K και oxCNTs@GPEI5K και (B) oxCNTs, GPEI25K και oxCNTs@GPEI25K.....	183
Σχήμα 5.9: Φάσματα Raman των oxCNTs, oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K	184
Σχήμα 5.10: Καμπύλες θερμοβαρουμετρικής ανάλυσης (TGA) των oxCNTs, των GPEIs και των oxCNTs@GPEIs	185
Σχήμα 5.11: Φάσματα ^1H NMR των oxCNTs@GPEI5K (πάνω) και oxCNTs@GPEI25K (κάτω) συμπεριλαμβανομένου του μηλεϊνικού οξέος.....	187
Σχήμα 5.12: Μελέτη σταθερότητας των υδατικών διασπορών (1 mg/mL) των oxCNTs (μαύρο), oxCNTs@GPEI5K (κόκκινο) και oxCNTs@GPEI25K (μπλε) χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία UV-vis	192
Σχήμα 5.13: Φάσματα απορρόφησης της ελεύθερης DOX (κόκκινο) και της μη δεσμευμένης στα oxCNTs@GPEI5K (μαύρο) και oxCNTs@GPEI25K (μπλε)	194
Σχήμα 5.14: Αποδέσμευση της DOX από τα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K σε pH = 7.4 και 5.5	196
Σχήμα 5.15: Βιωσιμότητα των DU145 (A) και PC3 (B) ύστερα από επώαση με διάφορες συγκεντρώσεις των νανοφορέων oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, της ελεύθερης DOX και της δεσμευμένης DOX στους νανοφορείς (oxCNTs@GPEI5K/DOX, oxCNTs@GPEI25K/DOX) για 3 h. Η επιβίωση των κυττάρων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT ύστερα από 24 και 48 ώρες μετά την επώαση. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ και χωρίς στατιστική σημασία (ns), $p > 0.05$	197
Σχήμα 5.16: Βιωσιμότητα της μη καρκινικής κυτταρικής σειράς HEK293 ύστερα από επώαση με διάφορες συγκεντρώσεις των νανοφορέων oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, της ελεύθερης DOX και της δεσμευμένης DOX στους νανοφορείς (oxCNTs@GPEI5K/DOX, oxCNTs@GPEI25K/DOX) για 3 h. Η επιβίωση των κυττάρων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT ύστερα από 24 και 48 ώρες μετά την επώαση. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ και χωρίς στατιστική σημασία (ns), $p > 0.05$	198
Σχήμα 5.17: Βιωσιμότητα της μη καρκινικής κυτταρικής σειράς HEK293 και της καρκινικής σειράς DU145 ύστερα από επώαση με διάφορες συγκεντρώσεις των oxCNTs, GPEI5K και GPEI25K και των αρχικών πολυμερών PEI5K και PEI25K για 3 h. Η επιβίωση των κυττάρων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT ύστερα από 24 μετά την επώαση. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο t-test, όπου ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$	200

Σχήμα 5.18: Κυτταρική πρόσληψη της DOX σε κύτταρα DU145 με κυτταρομετρία ροής. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ελεύθερη DOX και δεσμευμένη DOX στους νανοφορείς oxCNTs@GPEI5K ή oxCNTs@GPEI25K καθώς και με τους νανοφορείς για 1, 3, 5 h. Η συγκέντρωση της DOX σε όλα τα πειράματα ήταν 1 μM , ενώ η αντίστοιχη συγκέντρωση των νανοφορέων ήταν 2 $\mu\text{g/mL}$. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 201

Σχήμα 5.19: Κυτταρική πρόσληψη της DOX σε κύτταρα HEK293 με κυτταρομετρία ροής. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ελεύθερη DOX και δεσμευμένη DOX στους νανοφορείς oxCNTs@GPEI5K ή oxCNTs@GPEI25K καθώς και με τους νανοφορείς για 1, 3, 5 h. Η συγκέντρωση της DOX σε όλα τα πειράματα ήταν 1 μM , ενώ η αντίστοιχη συγκέντρωση των νανοφορέων ήταν 2 $\mu\text{g/mL}$. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 202

Σχήμα 5.20: Συγκριτική μελέτη της πρόσληψης της DOX από καρκινικά κύτταρα DU145 και μη καρκινικά κύτταρα HEK293, ύστερα από επώαση με ελεύθερη DOX (3 μM) και με τα συστήματα oxCNTs@GPEI5K/DOX και oxCNTs@GPEI25K/DOX (1 μM , ως προς την DOX) για 3 ώρες. (Α) Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας που απεικονίζουν την ενδοκυττάρια πρόσληψη της DOX (κόκκινο), τους πυρήνες των κυττάρων (μπλε) καθώς και την υπέρθεση των δύο εικόνων (overlay) με τον αντίστοιχο συντελεστή συσχέτισης Pearson. Η κλίμακα είναι στα 10 μM . (Β) Ποσοτικοποίηση της έντασης φθορισμού της DOX στις κυτταρικές σειρές. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 204

Σχήμα 5.21: Ποσοτικός προσδιορισμός των ζωντανών, των όψιμων αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων DU145 ύστερα από επώαση με ελεύθερη και δεσμευμένη DOX, καθώς και των υβριδικών νανοϋλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, για 3 h με τις χρωστικές Annexin V-FITC/7-AAD. Η συγκέντρωση της DOX είναι 1 μM και η αντίστοιχη συγκέντρωση των νανοφορέων είναι 2 $\mu\text{g/mL}$ 208

Σχήμα 5.22: Φάσματα FTIR των oxCNDs, FCDs και του υβριδικού υλικού oxCNDs@FCDs 212

Σχήμα 5.23: Φάσματα XPS των FCDs, oxCNDs και oxCNDs@FCDs 213

Σχήμα 5.24: Φάσματα Raman των oxCNDs και oxCNDs@FCDs 213

Σχήμα 5.25: Καμπύλες θερμοβαρυστρικής ανάλυσης (TGA) των oxCNDs, FCDs και oxCNDs@FCDs 214

Σχήμα 5.26: Φάσμα ^1H NMR των oxCNDs@FCDs παρουσία μηλεϊνικού οξέος... 216

Σχήμα 5.27: Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων-X των oxCNDs και oxCNDs@FCDs 217

Σχήμα 5.28: Φάσματα διέγερσης και εκπομπής φθορισμού ($\lambda_{\text{ex}}=352$ nm) των FCDs (Α) καθώς και φάσματα εκπομπής φθορισμού ($\lambda_{\text{ex}}=352$ nm) των oxCNDs@FCDs (Β) και των oxCNDs (Γ) 222

Σχήμα 5.29: Φάσματα εκπομπής φθορισμού των oxCNDs@FCDs συναρτήσει του μήκους κύματος διέγερσης. Ένθετο Σχήμα: Τα αντίστοιχα κανονικοποιημένα φάσματα εκπομπής φθορισμού σε διάφορα μήκη κύματος διέγερσης..... 222

Σχήμα 5.30: Φάσματα απορρόφησης της ελεύθερης δοξορουβικίνης (κόκκινο) και του υπερκείμενου διαλύματος του υβριδικού νανοϋλικού με δεσμευμένη DOX, oxCNDs@FCDs/DOX (μαύρο) σε νερό..... 223

Σχήμα 5.31: Κυτταρική βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων DU145 (Α) και PC3 (Β). Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία ελεύθερης δοξορουβικίνης, oxCNDs@FCDs και του συστήματος oxCNDs@FCDs/DOX. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ και χωρίς στατιστική σημασία (ns), $p > 0.05$ 224

Σχήμα 5.32: Κυτταρική βιωσιμότητα των φυσιολογικών κυττάρων HEK293. Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία ελεύθερης δοξορουβικίνης, oxCNTs@FCDs και του συστήματος oxCNTs@FCDs/DOX. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ και χωρίς στατιστική σημασία (ns), $p > 0.05$	226
Σχήμα 5.33: Ποσοτική ανάλυση της μέσης έντασης φθορισμού της ελεύθερης DOX και του υβριδικού νανοϋλικού με και χωρίς την DOX, σε συγκέντρωση 1 μM ως προς το φάρμακο, για 5 και 24 ώρες επώασης στα καρκινικά κύτταρα DU145. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$	227
Σχήμα 5.34: Ποσοτικοποίηση του συνολικού φθορισμού της DOX με συνεστιακή μικροσκοπία στα καρκινικά κύτταρα DU145. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου *** $p < 0.001$	229
Σχήμα 5.35: % Ποσοτικός προσδιορισμός των ζωντανών, των όψιμων αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων DU145 που επώαστηκαν με ελεύθερη και δεσμευμένη DOX, καθώς και του υβριδικού νανοϋλικού oxCNTs@FCDs, για (A) 5 h και (B) 24 h μετρούμενα με χρώση 7-AAD. Η συγκέντρωση της DOX είναι 1 μM και η αντίστοιχη συγκέντρωση του νανοφορέα είναι 13.2 $\mu\text{g/mL}$	230
Σχήμα 5.36: Φάσματα ^1H NMR των 30-QPEI, 50-QPEI και 80-QPEI σε D_2O	234
Σχήμα 5.37: Φάσματα ^{13}C NMR των 30-QPEI, 50-QPEI και 80-QPEI σε D_2O	234
Σχήμα 5.38: Φάσματα FTIR (A) των oxCNTs, 30-QPEI, και oxCNTs@30-QPEI, (B) των oxCNTs, 50-QPEI, και oxCNTs@50-QPEI και (C) των oxCNTs, 80-QPEI, και oxCNTs@80-QPEI	237
Σχήμα 5.39: Φάσματα Raman των oxCNTs (μαύρο), oxCNTs@30-QPEI (κόκκινο), oxCNTs@50-QPEI (μπλέ) και oxCNTs@80-QPEI (μώβ).....	238
Σχήμα 5.40: Καμπύλες θερμοβαρυστρικής ανάλυσης (TGA) των oxCNTs και των oxCNTs@QPEIs.....	239
Σχήμα 5.41: Φάσματα UV-vis των υδατικών διασπορών των oxCNTs (a), oxCNTs@30-QPEI (b), oxCNTs@50-QPEI (c) και oxCNTs@80-QPEI (d)	246
Σχήμα 5.42: Μελέτη σταθερότητας των υδατικών διασπορών (1 mg/mL) των oxCNTs, oxCNTs@30-QPEI, oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI μετά από έκθεση σε υπερήχους (χρόνος 0) και έπειτα από ηρεμία: 1 μήνα, 6 μηνών και 12 μηνών	247
Σχήμα 5.43: Μέση υδροδυναμική διάμετρος και τιμές ζ-δυναμικού oxCNTs@QPEIs σε υδατική διασπορά 0.05 mg/mL και $\text{pH} = 7.0$	248
Σχήμα 5.44: Μεταβολή της έντασης φθορισμού RFP στα 590 nm (λ_{ex} : 545 nm) κατά την ανάπτυξη των <i>E. coli</i> XL1-blue	249
Σχήμα 5.45: Κυτταροτοξικότητα μετά από 6 h επώαση του gram (-) <i>E. coli</i> XL1-blue βακτηρίου παρουσία των oxCNTs και oxCNTs@QPEIs για συγκεντρώσεις 5-400 $\mu\text{g/mL}$. Η ένταση φθορισμού RFP είναι στα 590 nm (διέγερση: 545 nm).....	250
Σχήμα 5.46: Κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων DU145 και 3T3. Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία των oxCNTs και oxCNTs@QPEIs για 24 h	254
Σχήμα 5.47: Καμπύλες ανάπτυξης των βακτηρίων <i>E. coli</i> παρουσία των GPEI5K (A) και GPEI25K (B)	256
Σχήμα 5.48: Καμπύλες ανάπτυξης των βακτηρίων <i>S. aureus</i> παρουσία των GPEI5K (A) και GPEI25K(B).....	257
Σχήμα 5.49: Βιωσιμότητα των <i>E. coli</i> και <i>S. aureus</i> βακτηρίων, τα οποία είχαν επωαστεί με διάφορες συγκεντρώσεις GPEI5K (αριστερά) και GPEI25K (δεξιά). Η επιβίωση των βακτηρίων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της ρεσαζουρίνης μετά από	

24 ώρες επώασης. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ και χωρίς στατιστική σημασία (ns), $p > 0.05$	258
Σχήμα 5.50: Ποσοστό αναστολής ανάπτυξης των βακτηρίων <i>E. coli</i> (αριστερά) και <i>S. aureus</i> (δεξιά) παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων oxCNTs, oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ και χωρίς στατιστική σημασία (ns), $p > 0.05$	264
Σχήμα 5.51: Βιωσιμότητα των <i>E. coli</i> (αριστερά) και <i>S. aureus</i> (δεξιά) βακτηρίων, τα οποία είχαν επωαστεί με διάφορες συγκεντρώσεις oxCNTs, oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K. Η επιβίωση των βακτηρίων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της ρεσαζουρίνης μετά από 24 ώρες επώασης. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ και χωρίς στατιστική σημασία (ns), $p > 0.05$	265
Σχήμα 5.52: Κυτταρική βιωσιμότητα των ευκαρυωτικών κυττάρων HEK293. Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία των oxCNTs, oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$	270
Σχήμα 5.53: Φάσματα FTIR (A) των oxCNDs, GPEI5K, και oxCNDs@GPEI5K και (B) των oxCNDs, GPEI25K, και oxCNDs@GPEI25K	272
Σχήμα 5.54: Φάσματα XPS των oxCNDs (A), oxCNDs@GPEI5K (B) και oxCNDs@GPEI25K (Γ)	273
Σχήμα 5.55: Συγκριτικά φάσματα Raman των oxCNDs, oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K	274
Σχήμα 5.56: Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων-X των oxCNDs, oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K	275
Σχήμα 5.57: Καμπύλες θερμοβαρυστρικής ανάλυσης (TGA) των oxCNDs, των GPEIs και των oxCNDs@GPEIs	276
Σχήμα 5.58: Φάσματα ^1H NMR του (A) oxCNDs@GPEI5K και (B) oxCNDs@GPEI25K σε D_2O	277
Σχήμα 5.59: Ποσοστό αναστολής ανάπτυξης των βακτηρίων <i>E. coli</i> (αριστερά) και <i>S. aureus</i> (δεξιά) παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων oxCNDs, oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ και χωρίς στατιστική σημασία (ns), $p > 0.05$	284
Σχήμα 5.60: Βιωσιμότητα των <i>E. coli</i> (αριστερά) και <i>S. aureus</i> (δεξιά) βακτηρίων, τα οποία είχαν επωαστεί με διάφορες συγκεντρώσεις oxCNDs, oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K. Η επιβίωση των βακτηρίων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της ρεσαζουρίνης μετά από 24 ώρες επώασης. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ και χωρίς στατιστική σημασία (ns), $p > 0.05$	285
Σχήμα 5.61: Κυτταρική βιωσιμότητα των ευκαρυωτικών κυττάρων HEK293. Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία των oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K για 24 h. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$	290

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Λειτουργικών Νανο-υλικών Οργανωμένης Δομής, του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας, του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος», υπό την επίβλεψη της Ερευνήτριας Α΄ Ω. Σιδεράτου.

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Πετρούλα Α. Ταραντίλη που με εμπιστεύτηκε και με έκανε δεκτή στην ομάδα των υποψήφιων διδασκάλων της καθώς και για τη βοήθεια που μου πρόσφεραν όποτε υπήρξε ανάγκη.

Σημαντικό ρόλο στην ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής έχουν παίξει πολλοί άνθρωποι, οι οποίοι με βοήθησαν ο καθένας με τον δικό του τρόπο. Αρχικά, τις βαθιές μου ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην επιβλέπουσα μου Ερευνήτρια Α΄ Δρ. Ωραιοζήλη Σιδεράτου, η οποία με καθοδηγούσε στο σχεδιασμό και την εκτέλεση των πειραμάτων, για τις γνώσεις που μου μετέδωσε ώστε να εξελιχθώ αλλά και για τις συμβουλές της με σκοπό την επίλυση τυχόν προβλημάτων που προέκυψαν. Στην συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον Ερευνητή Α΄ Δρ. Δημήτριο Τσιούρβα για αμέριστη βοήθειά του σε όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον Καθηγητή Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Δημήτριο Γουρνή, που είναι παρόν δίπλα μου και στην μετέπειτα ερευνητική μου πορεία, τον Καθηγητή ΕΜΠ, κ. Κωνσταντίνο Χαριτίδη, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΜΠ, κα. Σταματίνα Βουγιούκα και την Ερευνητή Α΄, κα. Μαρία Παραβατού.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω από το Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων τον Καθηγητή του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών κ. Μιχαήλ Καρακασίδη για τις μετρήσεις Raman, τον Δρ. Κωνσταντίνο Σπύρου και την υποψήφια διδάκτωρ Ελένη Θώμου για τις μετρήσεις XPS καθώς και τον Δρ. Αντώνιο Κουλουμπή για τις μετρήσεις AFM.

Στην συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω από το Ε.Κ.Ε.Φ.Ε «Δημόκριτος» τον Ερευνητή Α΄ Φώτιο Κατσαρό που με εμπιστεύτηκε να χρησιμοποιήσω το FTIR, τον Δρ. Σέργιο Παπαγεωργίου για τις μετρήσεις TGA, τον Δρ. Ηλία Σακέλλη για τις εικόνες TEM και την Δρ. Αγγελική Παπαβασιλείου για τις εικόνες SEM. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Αλέξανδρο Αθανασόπουλο και τον Δρ. Μιχάλη

Ζαχαριάδη για τις εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας, τον Ερευνητή Α΄ Χάρη Πρατσίνη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε να χρησιμοποιήσω το Flow cytometry και τον Ερευνητή Α΄ Luc Swevers που μου επέτρεψε να χρησιμοποιήσω το Tecan για τις μετρήσεις κυτταροτοξικότητας.

Στο πλαίσιο της διδακτορικής μου διατριβής είχα την τύχη να συνεργαστώ με την προπτυχιακή φοιτήτρια Σοφία Τέλλη, αλλά και με το μεταπτυχιακό φοιτητή Γιάννη Τουρνή, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω για τη βοήθεια και τη συνεργασία που είχαμε κατά την διάρκεια των πειραμάτων. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στις συνεργάτιδες μου Δρ. Αρχοντία Καμινάρη και Δρ. Αικατερίνη Παναγιωτάκη για την εκμάθηση των βιολογικών πειραμάτων, αλλά και για τη γενικότερη υποστήριξη κατά την διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής.

Σημαντική για εμένα ήταν και η οικονομική στήριξη που έλαβα μετά από κρίση από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ). Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).

Ολοκληρώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την στήριξη και την αγάπη που μου δίνουν καθημερινά για να προχωράω στην ζωή μου.

Κυριακή – Μαρίνα Λύρα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός υβριδικών υλικών με βάση νανοδομημένους άνθρακες και κατάλληλα επιλεγμένα λειτουργικά δενδριτικά πολυμερή και ακολούθως η μελέτη τους σε βιολογικές εφαρμογές. Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία, ότι οι νανοδομημένοι άνθρακες παρουσιάζουν εξαιρετικές ηλεκτρικές, μηχανικές και θερμικές ιδιότητες και έχουν μοναδικά δομικά χαρακτηριστικά. Για το λόγο αυτό, έχουν μελετηθεί ως αισθητήρες, φορείς φαρμάκων και γονιδίων, αντιβακτηριακά υλικά και άλλες εφαρμογές.

Στην συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη υβριδικών νανοϋλικών με βάση τους τροποποιημένους νανοσωλήνες και τους νανοδίσκους άνθρακα, τα οποία στη συνέχεια μελετήθηκαν ως φορείς φαρμάκων με αντικαρκινικές ιδιότητες ή ως αντιβακτηριακά υλικά. Λόγω του ότι τα υλικά άνθρακα δεν έχουν καλή διασπορά σε διαλύτες και ειδικώς σε υδατικά μέσα, τροποποιήθηκαν με κατάλληλα επιλεγμένα λειτουργικά δενδριτικά πολυμερή ώστε αφενός να αυξηθεί η υδροφιλικότητα τους και άρα η συμβατότητα τους με τα υδατικά μέσα και αφετέρου να αποκτήσουν επιθυμητές ιδιότητες ανάλογα με την εφαρμογή. Για τον λόγο επιλέχθηκαν δενδριτικά πολυμερή που φέρουν ομάδες που διευκολύνουν την διέλευση δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης, αλλά και ομάδες που βελτιώνουν τις αντιβακτηριακές ιδιότητες των τελικών προϊόντων.

Αναλυτικά, στο πρώτο τμήμα της διατριβής δόθηκε έμφαση στην τροποποίηση νανοσωλήνων άνθρακα με δενδριτικούς διαμεμβρανικούς μεταφορείς καθώς και στην τροποποίηση νανοδίσκων άνθρακα με φθορίζουσες νανοτελείες άνθρακα με στόχο να μελετηθούν ως φορείς φαρμάκων. Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκαν υβριδικά υλικά με βάση τους οξειδωμένους νανοσωλήνες άνθρακα (oxCNTs) και λειτουργικά δενδριτικά πολυμερή, παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης (PEI) δύο διαφορετικών μέσων μοριακών βαρών 5000 και 25000, των οποίων οι πρωτοταγείς αμινομάδες είχαν υποκατασταθεί ποσοτικά (~100%) με ομάδες γουανιδίνης (GPEI5K και GPEI25K). Η επιτυχής πρόσδεση των πολυμερών πάνω στους νανοσωλήνες μέσω ηλεκτροστατικών δεσμών, δεσμών υδρογόνου και δυνάμεων van der Waals βεβαιώθηκε με χρήση διαφόρων τεχνικών, όπως ^1H και ^{13}C NMR, FTIR, Raman, XPS, TGA και XRD, ενώ τα ποσοστά των GPEIs στα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K βρέθηκε ότι είναι 22.7 και 27.5% w/w, αντίστοιχα. Επιπλέον, από τη μελέτη της μορφολογίας τους με μικροσκοπίες SEM,

TEM και AFM βρέθηκε ότι τα πολυμερή είναι σταθερά προσδεδεμένα και περιβάλουν ομογενώς τα τοιχώματα των νανοσωλήνων. Η σταθερότητα των υδατικών τους διασπορών αξιολογήθηκε οπτικά, αλλά και με φασματοσκοπία UV-vis και μετρήσεις ζ-δυναμικού, όπου βρέθηκε ότι παραμένουν σταθερές για τουλάχιστον 6 μήνες εξαιτίας της παρουσίας των γουανιδινικών ομάδων που προσδίδουν υδροφιλικότητα στους νανοσωλήνες άνθρακα. Στη συνέχεια, για να αξιολογηθούν τα συστήματα αυτά ως νανοφορείς αντικαρκινικών φαρμάκων, η δοξορουβικίνη (DOX), ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο αντικαρκινικό φάρμακο της ομάδας των ανθρακυκλινών, δεσμεύτηκε σε ποσοστό 44 και 52% w/w στα υβριδικά νανοϋλικά oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, αντίστοιχα, κυρίως μέσω π-π αλληλεπιδράσεων. Μελέτη της αποδέσμευσης της DOX από τα υβριδικά υλικά σε δύο διαφορετικές συνθήκες pH, (7.4 και 5.5) έδειξε ότι στο όξινο περιβάλλον η DOX αποδεσμεύεται από τα νανοϋλικά με πιο γρήγορο ρυθμό από ότι στο φυσιολογικό pH. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η αντικαρκινική δράση της δεσμευμένης DOX στα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K καθώς και ο εντοπισμός της μέσα στα κύτταρα. Επίσης, διερευνήθηκε ο μηχανισμός της αντικαρκινικής δράσης της μέσω του προσδιορισμού του ποσοστού της απόπτωσης/νέκρωσης των κυττάρων. Με βάση τα αποτελέσματα, βρέθηκε ότι το σύστημα oxCNTs@GPEI5K/DOX εμφανίζει αυξημένη και εκλεκτική τοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα σε αντίθεση με τα μη καρκινικά, ενώ αντιθέτως το σύστημα oxCNTs@GPEI25K/DOX εμφανίζει σημαντικά μεγάλη τοξικότητα, ανεξάρτητα από τον τύπο των κυττάρων. Τέλος, βρέθηκε ότι και τα δύο συστήματα αυξάνουν σημαντικά τη δραστηριότητα της DOX σε σχέση με την ελεύθερη, μέσω ενός νεκρωτικού, μη αποπτωτικού, γρήγορου και καταστροφικού μηχανισμού από τον οποίο τα καρκινικά κύτταρα δεν μπορούν να ανακάμψουν. Συμπερασματικά, μεταξύ των δύο νανοφορέων, το oxCNTs@GPEI5K είναι πιο αποτελεσματικό σύστημα μεταφοράς της DOX, το οποίο παρουσιάζει σημαντική εκλεκτική τοξικότητα έναντι των καρκινικών κυττάρων, αποτελώντας ένα ελπιδοφόρο σύστημα για θεραπεία του καρκίνου.

Αντίστοιχη μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ένα νέο υβριδικό υλικό (oxCNDs@FCDs) με βάση τους τροποποιημένους νανοδίσκους άνθρακα, οι οποίοι αντιπροσωπεύουν μια εναλλακτική προσέγγιση του κλασικού γραφενίου, με φθορίζουσες τελείες άνθρακα ως ένα σύστημα ταυτόχρονης ανίχνευσης και μεταφοράς φαρμάκων (theranostics). Το υβριδικό αυτό υλικό χαρακτηρίστηκε φυσικοχημικά με φασματοσκοπίες φθορισμού, ^1H NMR, FTIR και XPS, ενώ η δομή του

χαρακτηρίστηκε με XRD και TGA. Η μορφολογία του μελετήθηκε με μικροσκοπίες SEM και TEM. Από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν συμπεραίνεται ότι οι φθορίζουσες νανοτελείες άνθρακα είναι ομοιόμορφα δεσμευμένες σε όλη την επιφάνεια των oxCNDs σε ποσοστό 23% w/w, χωρίς να προκαλούν σημαντική μεταβολή της γραφιτικής δομής τους. Επιπλέον, μελετήθηκε η ικανότητά τους να διασπείρονται αποτελεσματικά σε υδατικά μέσα, ενώ με φασματοσκοπία φθορισμού αποδείχθηκε ότι παρουσιάζουν ισχυρό μπλε φθορισμό μετά από διέγερση στην περιοχή UV. Ακολούθως το νέο υβριδικό υλικό μελετήθηκε ως προς τη δυνατότητα του να χρησιμοποιηθεί ως αποτελεσματικό σύστημα ταυτόχρονης ανίχνευσης και μεταφοράς φαρμάκων. Αποδείχθηκε ότι η DOX δεσμεύεται επιτυχώς στα oxCNDs@FCDs κυρίως μέσω π-π αλληλεπιδράσεων, σε ποσοστό ~41% w/w. Στη συνέχεια μελετήθηκε η αντικαρκινική δράση της δεσμευμένης DOX καθώς και ο εντοπισμός τόσο της DOX, όσο και των oxCNDs@FCDs μέσα στα κύτταρα. Βρέθηκε ότι τα oxCNDs@FCDs αυξάνουν σημαντικά τη δραστηριότητα της DOX σε σχέση με την ελεύθερη, μέσω ενός νεκρωτικού, μη αποπτωτικού, γρήγορου και καταστροφικού μηχανισμού. Συνεπώς, οι τροποποιημένοι νανοδίσκοι άνθρακα με φθορίζουσες νανοτελείες άνθρακα, οι οποίοι εμφανίζουν χαμηλή τοξικότητα, εκλεκτική και ενισχυμένη μεταφορά της DOX στα καρκινικά κύτταρα καθώς και δυνατότητα εντοπισμού στα κύτταρα λόγω της ιδιότητάς τους να φθορίζουν, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν ως ένα ασφαλές και αποτελεσματικό σύστημα ανίχνευσης και μεταφοράς φαρμάκων με εκλεκτικότητα στα καρκινικά κύτταρα.

Στο δεύτερο μέρος της διατριβής αναπτύχθηκαν υβριδικά υλικά, τα οποία μελετήθηκαν ως προς τις αντιβακτηριακές τους ιδιότητες. Συγκεκριμένα, οξειδωμένοι νανοσωλήνες άνθρακα τροποποιήθηκαν μη ομοιοπολικά με παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης των οποίων οι πρωτοταγείς αμινομάδες είχαν υποκατασταθεί με τεταρτοταγείς αμμωνιακές ομάδες (QPEI). Ο βαθμός υποκατάστασης των πρωτοταγών αμινομάδων της PEI ήταν 30%, 50% και 80% και τα τελικά υβριδικά υλικά που προέκυψαν ήταν τα oxCNTs@30-QPEI, oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI. Η δομή τους καθώς και η επιτυχής πρόσδεση των πολυμερών πάνω στην επιφάνεια των νανοσωλήνων αξιολογήθηκε με FTIR, Raman, TGA και στοιχειακή ανάλυση. Το ποσοστό των QPEIs στα oxCNTs@30-QPEI, oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI υπολογίστηκε ότι είναι 16%, 20% και 23% w/w, αντίστοιχα. Επίσης, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους μελετήθηκαν με μικροσκοπίες SEM, TEM και AFM, όπου βεβαιώνουν ότι τα τοιχώματα των oxCNTs

περιβάλλονται ομογενώς από τα πολυμερή. Αποτέλεσμα αυτού είναι να αυξάνεται η υδροφιλικότητα των oxCNTs και κατά συνέπεια να αυξάνεται και η ικανότητα τους να διασπαρθούν σε υδατικά διαλύματα, λαμβάνοντας υδατικές τους διασπορές που παραμένουν σταθερές για τουλάχιστον 18 μήνες. Ακολούθησε αντιβακτηριακή μελέτη των υλικών σε μετασχηματισμένα gram (-) βακτήρια *Escherichia coli* XL1-blue, που εκφράζουν την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (RFP). Βρέθηκε ότι όλα τα oxCNTs@QPEIs εμφανίζουν βελτιωμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες σε σχέση με τα oxCNTs καθώς και ότι η δράση τους αυξάνεται όσο αυξάνεται και ο βαθμός υποκατάστασης της PEI από 30% στα 80%. Τέλος, η μελέτη κυτταροτοξικότητας των oxCNTs@QPEIs έδειξαν ότι δεν εμφανίζουν σχεδόν καμία τοξικότητα σε συγκεντρώσεις ίσες με αυτές που απαιτούνται για να θανατωθεί το 50% του αρχικού πληθυσμού των βακτηρίων (EC_{50}) τιμές. Συνεπώς, τα υβριδικά υλικά oxCNTs@QPEIs είναι ελπιδοφόρα συστήματα για εφαρμογές ως ασφαλή, αντιβακτηριακά υλικά.

Στην συνέχεια, μελετήθηκε η αντιβακτηριακή δράση των GPEIs στα gram (+) *S. aureus* βακτήρια και στα gram (-) *E. coli* βακτήρια. Βρέθηκε ότι και τα δύο γουανιδιωμένα παράγωγα είναι πιο τοξικά στο στέλεχος *S. aureus* σε σχέση με το *E. coli*, με το GPEI25K να είναι ελαφρώς πιο τοξικό στα *E. coli* από ότι το GPEI5K, ενώ στα *S. aureus* και τα δύο πολυμερή εμφανίζουν ανάλογη τοξικότητα. Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα αυτά μελετήθηκε, στη συνέχεια η αντιβακτηριακή δράση των υβριδικών υλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K στα δύο στελέχη βακτηρίων, *E. coli* και *S. aureus*. Από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, συμπεραίνεται ότι και τα δύο υβριδικά υλικά, με βέλτιστο το oxCNTs@GPEI5K, εμφανίζουν βελτιωμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες και ιδιαίτερα έναντι των κατά gram (-) *E. coli* βακτηρίων. Τέλος, η μελέτη κυτταροτοξικότητας των oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K έδειξε ότι εμφανίζουν χαμηλή τοξικότητα σε συγκεντρώσεις ίσες με τις EC_{50} τιμές τους. Συνεπώς, συμπεραίνεται ότι και τα δύο oxCNTs@GPEIs είναι ελπιδοφόρα συστήματα ικανά να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές ως ασφαλή, αντιβακτηριακά υλικά.

Τέλος, λόγω των θετικών αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την αντιβακτηριακή μελέτη των oxCNTs@GPEIs αλλά και της διαπίστωσης ότι τα GPEIs παίζουν σημαντικό ρόλο στις αντιβακτηριακές ιδιότητες των υλικών, τροποποιήθηκαν οξειδωμένοι νανοδίσκοι άνθρακα (oxCNDs) με τα γουανιδιωμένα δενδριτικά πολυμερή GPEI5K και GPEI25K, προκειμένου να μελετηθεί η αντιβακτηριακή τους

δράση. Η επιτυχής πρόσδεση των πολυμερών πάνω στους νανοδίσκους πιστοποιήθηκε με φασματοσκοπίες FTIR, Raman και XPS, ενώ η δομή τους μελετήθηκε με XRD και TGA. Το ποσοστό των πολυμερών στα υβριδικά υλικά υπολογίστηκε ότι είναι 8.4% και 10.5% w/w για τα oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K αντίστοιχα. Η μορφολογία τους μελετήθηκε με μικροσκοπίες SEM, TEM και AFM και βρέθηκε ότι τα πολυμερή δεσμεύονται ομοιογενώς πάνω στα φύλλα των νανοδίσκων. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε η αντιβακτηριακή μελέτη των νανοϋλικών στα gram (-) *E. coli* βακτήρια και στα gram (+) *S. aureus* βακτήρια. Από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, συμπεραίνεται ότι και τα δύο υβριδικά υλικά, με βέλτιστο το oxCNDs@GPEI5K, εμφανίζουν βελτιωμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες και ιδιαίτερα έναντι των κατά gram (-) *E. coli* βακτηρίων. Τέλος, η μελέτη τοξικότητας των υβριδικών υλικών έδειξε ότι σε συγκεντρώσεις ίσες με τις τιμές EC₅₀ δεν εμφανίζουν καμία τοξικότητα. Συνεπώς, και τα δύο oxCNDs@GPEIs είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές ως ασφαλή, αντιβακτηριακά υλικά εφόσον παρουσιάζουν ταυτόχρονα τόσο χαμηλή κυτταροτοξικότητα όσο και ενισχυμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες.

Συμπερασματικά, ο συνδυασμός νανοδομημένων υλικών άνθρακα με κατάλληλα επιλεγμένα λειτουργικά δενδριτικά πολυμερή οδηγεί στην ανάπτυξη καινοτόμων υβριδικών υλικών που παρουσιάζουν βελτιωμένες ιδιότητες σε σχέση με τα αρχικά υλικά και δυνατότητες εφαρμογής τους είτε ως φορείς φαρμάκων είτε ως αντιβακτηριακά υλικά.

EXTENDED ABSTRACT

The purpose of this dissertation is the development of novel nanostructured carbon-based materials modified with appropriate functional dendritic polymers, targeted towards biomedical applications. It is known that carbon-based nanomaterials have attracted significant scientific and technological interest due to their unique structural characteristics and their excellent electronic, mechanical, and thermal properties. Based on these properties, they have been used in a wide range of applications, from sensors to drug or gene delivery systems and antibacterial agents. However, their poor dispersibility in solvents, especially in water, has prevented their widespread use, and diminished their promising potential. Attempts to overcome this problem have focused on the functionalization of their surface, using a variety of covalent and non-covalent modification strategies.

In this study, hybrid nanomaterials based on dendritic polymer functionalized carbon nanotubes or carbon nanodisks were developed and studied as anticancer drugs nanocarriers or antibacterial agents. To overcome their poor aqueous dispersibility, nanotubes and carbon nanodisks were modified with selected functional dendritic polymers in order to increase their hydrophilicity and thus their compatibility with the aqueous media, and on the other hand, to impart them with the desirable properties, depending on the envisaged application. For this purpose, functional dendritic polymers were synthesized, functionalized with groups that either facilitate transport through the cellular membranes or induce antibacterial properties to the final products.

In more detail, in the first part of this dissertation, emphasis was given on the development of drug delivery systems based on the functionalized carbon nanotubes and carbon nanodisks. Specifically, efficient drug delivery system for doxorubicin with specific toxicity against tumor cells was prepared, based on oxidized multi-walled carbon nanotubes (oxCNTs) functionalized with guanidinylated dendritic molecular transporters through non-covalent interactions. To this end, guanidinylated derivatives of hyperbranched polyethyleneimine with molecular weight 5000 and 25000 Da (GPEI5K and GPEI25K), having analogous chemical structure with known cell membrane molecular transporters such as the guanidinylated poly(propylene imine) dendrimers, were synthesized in order to be used as transporting agents for drug delivery. Subsequently, these guanidinylated PEI derivatives interacted

electrostatically and also through hydrogen bonding and van der Waals attraction forces with oxCNTs, affording hybrid materials (oxCNTs@GPEI5K and oxCNTs@GPEI25K) with GPEI loading of approximately 22 and 27%, respectively. The obtained functionalized CNTs were structurally characterized using elemental analysis, FTIR, Raman, XPS, and NMR, revealing the successful attachment of GPEIs on the surface of oxCNTs, while the homogenous wrapping of GPEIs all over the sidewalls of oxCNTs was microscopically confirmed by SEM and TEM. Moreover, as concluded by visual observation, UV-vis spectroscopy and ζ -potential measurements over time, these hybrid systems can be efficiently dispersed in aqueous media, affording stable aqueous dispersions for at least 6 months. The enhanced dispersion properties are attributed to the presence of guanidinium groups on the surface of the oxCNTs that not only induces hydrophilicity resulting in high aqueous compatibility, but also provides a positive surface charge necessary to cause electrostatic repulsion inhibiting their agglomeration. Subsequently, doxorubicin (DOX), a widely used anticancer drug, was efficiently loaded on the aforementioned hybrid materials to yield DOX-loaded systems. These systems exhibited high DOX loading and encapsulation efficiency (up to 52% loading and 99.5% encapsulation efficiency) due to π - π stacking interactions between the DOX and the CNTs, and also to the already known ability of dendritic polymers to efficiently encapsulate doxorubicin. DOX-loaded oxCNTs@GPEIs systems exhibited pH-triggered release. It was found that DOX can be efficiently released from both systems in acidic environments, with faster release rate from oxCNTs@GPEI25K. *In vitro* experiments employing cancer and non-cancerous cells demonstrated a rapid internalization of loaded DOX on the oxCNTs@GPEI5K nanocarrier system, and specific toxicity against cancer but not against non-cancerous cells. Additionally, this system significantly increased DOX efficiency compared to free drug, resulting in high toxicity in a non-apoptotic, fast and catastrophic manner that cancer cells cannot recover from. Even though loaded DOX was found to be more efficiently internalized and released from the oxCNTs@GPEI25K compared to the oxCNTs@GPEI5K system, this system failed to show specificity against cancer cells. Overall, we conclude that the oxCNTs@GPEI5K nanocarrier is a potent and efficient nanoscale DOX delivery, exhibiting high selectivity against cancerous cells, thus constituting a promising candidate for cancer therapy.

Moreover, a new hybrid material (oxCNDs@FCDs) based on modified carbon nanodisks (oxCNDs), which represent an alternative approach to graphene, decorated with fluorescent carbon dots (FCDs) was developed in order to investigate its ability to be used as “theranostic” agent, i.e. a system that can be simultaneously used for both imaging and therapeutic applications. Chemical characterization of this hybrid material employing a variety of physicochemical techniques such as fluorescence spectroscopy, NMR, FTIR, XPS, XRD, TGA, SEM and TEM microscopies, revealed successful and homogeneous decoration of the oxCNDs surface with FCDs at a loading ratio of 23% w/w, without causing a significant change in their graphene structure. In addition, this hybrid material can be efficiently dispersed in aqueous media as confirmed by the observation of the Tyndall scattering effect, while its very dilute aqueous dispersions exhibited strong blue fluorescence upon excitation in the UV region. DOX was efficiently loaded on the prepared hybrid materials affording a system with high loading and encapsulation efficiency (41% loading and 50% encapsulation efficiency) due to the π - π stacking interactions between the DOX and the oxCNDs. *In vitro* experiments in cancer and non-cancerous cells demonstrated a rapid internalization of DOX-loaded oxCNDs@FCDs system, with specific toxicity against cancer in contrast to normal cells. Additionally, it significantly increased anticancer activity compared to the free drug, resulting in high toxicity in a non-apoptotic, fast and catastrophic manner that cancer cells cannot recover from. Therefore, due to the intrinsic fluorescence properties of the fluorescent carbon dots functionalized carbon nanodisks coupled with their minimal cellular toxicity and their ability to deliver DOX selectively to cancer cells make them suitable to be used as safe and effective “theranostic” agents.

In the second part of this dissertation, emphasis was given on the development of antibacterial agents based on the functionalized carbon nanotubes and carbon nanodisks. Specifically, negatively charged oxidized multi-walled carbon nanotubes (oxCNTs) were modified with positively charged quaternized hyperbranched polyethyleneimine derivatives (QPEIs), through non-covalent functionalization. It is known that polymers bearing positively charged groups, such as quaternary ammonium, guanidinium, arginine, lysine, etc., exhibit significant antibacterial properties. Thus, three quaternized derivatives of hyperbranched PEI, with 30, 50, and 80% substitution degree of the primary amino groups, were synthesized and, subsequently, physically interacted with oxCNTs, yielding three novel hybrid

nanomaterials (oxCNTs@QPEIs). Structural characterization of these hybrid materials using elementary analysis, FTIR, and Raman, revealed the successful and homogenous anchoring of QPEIs on the oxCNTs surface, with QPEI loading ranging between ca. 16–23%. Microscopic techniques (TEM and SEM) revealed the effective wrapping of the QPEI over the oxCNTs. The obtained hybrids can be efficiently dispersed in aqueous media, forming dispersions with excellent stability for over 12 months. To evaluate the antibacterial properties of these hybrids, the gram (–) bacterial strain *Escherichia coli* XL1-blue (*E. coli*) was used. It was found that all materials exhibited enhanced, dose-dependent antibacterial activity against *E. coli*. The obtained EC₅₀ values were much lower compared to that of oxCNTs, revealing that the non-covalent attachment of QPEIs strongly enhances the antibacterial properties of the hybrid materials. These improved properties were attributed to the polycationic character of the oxCNTs@QPEIs, which enables the effective interaction of the hybrids with the bacteria membranes, facilitating their internalization into the cells. Moreover, the excellent aqueous dispersibility and stability of the hybrids, upon increasing the quaternization degree, further enhanced their activity. Indeed, the QPEI derivative containing the highest content of quaternary ammonium groups (80-QPEI) exhibited the best performance, compared to the other QPEI derivatives. Furthermore, cytotoxicity studies on human prostate carcinoma DU145 cell line and the 3T3 mouse fibroblasts were performed, revealing that all hybrids exhibit high cytocompatibility in the concentration range in which they exhibit high antibacterial properties. The results suggest that QPEI-functionalized oxCNTs can be very attractive candidates as antibacterial agents that can be used for potential applications in the disinfection industry.

Subsequently, the antibacterial activity of the GPEI derivatives was assessed against the gram (+) bacterial strain *S. aureus*, and the gram (–) bacterial strain *E. coli*. It was found that both derivatives are more toxic against *S. aureus* bacteria compared to *E. coli*, with GPEI25K being slightly more potent against *E. coli* than GPEI5K, while against *S. aureus* both polymers exhibit similar toxicity. Triggered from these results, the hybrid materials oxCNTs@GPEI5K and oxCNTs@GPEI25K, previously studied as drug delivery systems, were evaluated regarding their antibacterial properties. The antibacterial activity of these hybrid materials was also assessed against *S. aureus* and *E. coli*. From the obtained results, it is evident that both hybrid materials exhibit improved antibacterial properties compared to oxCNTs, with oxCNTs@GPEI5K

exhibiting the highest activity, especially against *E. coli*. Additionally, the cytotoxicity studies of the oxCNTs@GPEI5K and oxCNTs@GPEI25K, at concentrations equal to their EC₅₀ values, revealed that both hybrids exhibit low cell toxicity. Therefore, both oxCNTs@GPEIs are promising systems able to be used as safe, antibacterial agents.

Finally, due to the positive results obtained from the antibacterial study of oxCNTs@GPEIs and realizing that GPEIs play an important role in the antibacterial properties of the nanomaterials, oxCNDs were modified with GPEI5K and GPEI25K through covalent and non-covalent interactions in order to be studied as antibacterial agents. Chemical characterization of this hybrid material employing a variety of physicochemical techniques such as NMR, FTIR, XPS, XRD, TGA, SEM and TEM microscopies, revealed successful and homogeneous attachment of GPEIs on the oxCNDs surface at a loading ratio of approximately 10% w/w, without causing a significant alteration in their graphene structure. In addition, these hybrid materials can be efficiently dispersed in aqueous media as confirmed by the observation of the Tyndall scattering effect. Both hybrid materials exhibit improved antibacterial properties against *S. aureus* and *E. coli* compared to oxCNDs, with oxCNDs@GPEI5K exhibiting the highest activity, especially against *E. coli*. Finally, the cytotoxicity studies of both oxCNDs@GPEI5K and oxCNDs@GPEI25K revealed that minimal cellular toxicity was observed at concentrations equal to their EC₅₀ values. Therefore, both oxCNDs@GPEIs simultaneously exhibited both low cytotoxicity and enhanced antibacterial properties and, thus, can be used as safe, antibacterial agents.

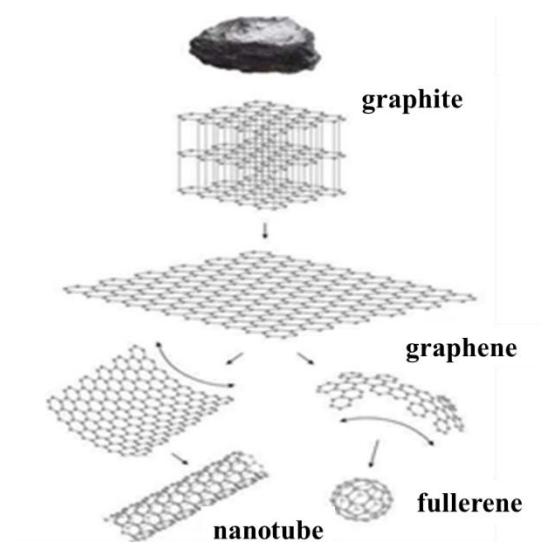
In conclusion, the combination of nanostructured carbon-based materials with appropriately selected functional dendritic polymers affords innovative hybrid nanomaterials with improved properties compared to parent nanomaterials, suitable to be employed either as drug delivery systems or as antibacterial agents.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΥΛΙΚΑ ΑΝΘΡΑΚΑ

1.1 Αλλοτροπικές μορφές άνθρακα

Αλλοτροπία ή πολυμορφισμός ονομάζεται το φαινόμενο όπου, πολλές ενώσεις και στοιχεία, κάτω από διαφορετικές συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας, εμφανίζουν περισσότερες από μια κρυσταλλικές δομές. Οι αλλοτροπικές μορφές συνήθως έχουν ίδιες χημικές ιδιότητες, όμως διαφέρουν στις φυσικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, διαφέρουν στο χρώμα, την σκληρότητα ακόμα και στην μοριακή δομή ή την χημική δραστηριότητα.

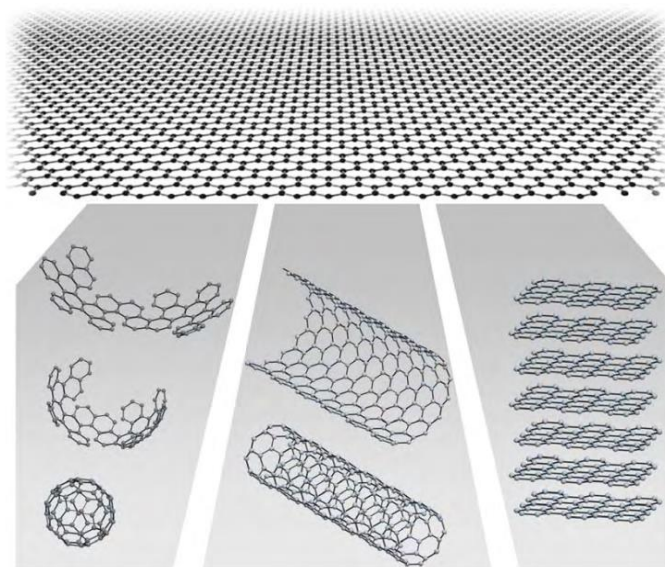
Οι αλλοτροπικές μορφές του άνθρακα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: α) στους άνθρακες όπου οι βασικές δομικές μονάδες είναι όμοιες με αυτές των συμβατικών ενεργών/άμορφων ανθράκων, αλλά η δομή και ο τρόπος επανάληψης των βασικών δομικών μονάδων και διευσθέτησής τους μέσα στη μάζα τους ελέγχεται σε νανομετρική κλίμακα και β) σε αυτούς στους οποίους οι βασικές δομικές μονάδες είναι διακριτές και αυτόνομες νανοδομές. Οι άνθρακες της πρώτης κατηγορίας μπορούν να χαρακτηριστούν νανοδομημένοι άνθρακες, ενώ οι δεύτεροι νανοδομές άνθρακα. Οι βασικές δομικές μονάδες των νανοδομημένων ανθράκων είναι τα γραφένια, ενώ στις νανοδομές άνθρακα ανήκουν τα φουλερένια και οι νανοσωλήνες άνθρακα [1].



Εικόνα 1.1: Γραφιτικές δομές άνθρακα.

1.2 Γραφένιο

Ο όρος γραφένιο επινοήθηκε το 1962 από τον Hans-Peter Boehm, ως ένας συνδυασμός της ονομασίας του γραφίτη (graphite) με κατάληξη -ene, η οποία υποδηλώνει τα μονοστρωματικά φύλλα άνθρακα. Πιο συγκεκριμένα, είναι ένα ενιαίο στρώμα ατόμων άνθρακα που διευθετούνται σε εξαγωνικό πλέγμα, δημιουργώντας ένα πάρα πολύ ισχυρό δισδιάστατο υλικό με αντοχή διακόσιες φορές μεγαλύτερης του χάλυβα. Αυτό το χαρακτηριστικό, καθιστά το γραφένιο ως το ανθεκτικότερο υλικό στη φύση. Το γραφένιο είναι ένα κρυσταλλικό πλέγμα ατόμων άνθρακα σε δισδιάστατη διάταξη, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.2.



Εικόνα 1.2: Η 2D δομή του γραφενίου ως δομικό υλικό όλων των άλλων διαστάσεων του άνθρακα [2].

Το πάχος του φύλλου του γραφενίου είναι 0.34 nm, ενώ το μήκος του δεσμού άνθρακα-άνθρακα είναι ~0.142 nm. Το γραφένιο αποτελείται από δισδιάστατο φύλλο μονοατομικού πάχους sp^2 υβριδισμένων ατόμων άνθρακα. Αποτελεί το βασικό δομικό στοιχείο του γραφίτη (3D), των νανοσωλήνων άνθρακα (1D) και των φουλλερενίων (0D), όπως φαίνεται στην παραπάνω Εικόνα 1.2 [2].

1.2.1 Οξείδιο του γραφενίου

Το οξείδιο του γραφενίου είναι ένα φυλλόμορφο υλικό, το οποίο παράγεται από την οξείδωση του γραφενίου. Περιέχει μεγάλη ποσότητα οξυγόνου σε μορφή λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια των φύλλων του. Οι λειτουργικές αυτές ομάδες: υδρόξυ (OH), καρβόξυ (COOH), επόξυ (C-O-C), προσδίδουν στο οξείδιο του

γραφενίου υδροφιλικότητα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το οξείδιο του γραφενίου να διασπείρεται σε νερό καθώς και σε αρκετούς πολικούς οργανικούς διαλύτες. Εξαιτίας της πολυπλοκότητας του και της μη στοιχειομετρικής του σύστασης σε κάθε δείγμα, δεν έχει βρεθεί ακόμα ένα αδιαμφισβήτητο δομικό μοντέλο. Έχουν προταθεί πολλά μοντέλα όπως είναι το Hofmann [3], το Ruess [4], το Scholz-Boehn [5], το Nakajima-Matsuo [6] και το Lerf-Klinowski [7]. Το επικρατέστερο μοντέλο ήταν το Lerf και Klinowski, στο οποίο οι επόξυ-ομάδες και οι υδρόξυλο-ομάδες βρίσκονται κατά μήκος του κάθε φύλλου, ενώ οι καρβόξυ-ομάδες δημιουργούνται μόνο στην άκρη των φύλλων [8].

1.2.2 Μέθοδοι σύνθεσης και εφαρμογές

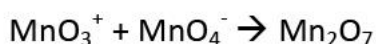
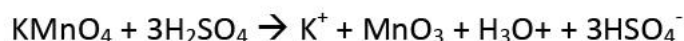
Από το 1840 ήταν γνωστή η οξείδωση του γραφενίου από τον C. Schafhaeut [9] ο οποίος μελετούσε την συμπεριφορά των μετάλλων και κυρίως του χυτοσιδήρου και του σιδήρου. Σε μια μελέτη του αναφέρει πως, όταν ο γραφίτης αντιδράσει με ισχυρόθειικό οξύ αλλάζει χρώμα και από γκριζόμαυρος γίνεται καφέ.

Ο B. C. Brodie το 1859 [10] μελέτησε την συμπεριφορά του γραφίτη, όταν αυτός αντιδρά με ισχυρά οξειδωτικά μέσα (χλωρικό κάλιο, KClO_3) παρουσία ισχυρού οξέος (νιτρικό οξύ, HNO_3). Η αντίδραση διήρκησε 3 με 4 ημέρες σε θερμοκρασία $60\text{ }^\circ\text{C}$. Ο Brodie έπειτα από τέσσερις διαδοχικές χημικές κατεργασίες, προσδιόρισε τις αναλογίες των $\text{C} : \text{H} : \text{O} = 61.04 : 1.85 : 37.11$, πετυχαίνοντας την αύξηση της μάζας του αρχικού γραφίτη. Διαπίστωσε πως το τελικό υλικό έχει την ικανότητα να διασπείρεται σε νερό με ουδέτερο ή βασικό pH, ορίζοντας το ως «γραφιτικό οξύ» [11].

Αργότερα το 1899, ο L. Staudenmaier [12] βελτίωσε την μέθοδο του Brodie. Συγκεκριμένα, χρησιμοποίησε μείγμα θειικού και νιτρικού οξέος ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$) σε αναλογία 2:1 κ.ο.. Έτσι, πέτυχε την οξείδωση του γραφίτη σε ένα μόνο στάδιο και αυτή η αλλαγή στην διαδικασία οδήγησε στην αύξηση του ποσοστού του οξυγόνου στο γραφίτη. Με αυτή τη μέθοδο παράγεται το οξείδιο του γραφενίου, το οποίο διασπείρεται σε πολλούς πολικούς διαλύτες και στο νερό.

Έπειτα από περίπου 60 χρόνια, το 1958 οι Hummers και Offeman [13] πρότειναν έναν νέο τρόπο οξείδωσης του γραφίτη με την χρήση υπερμαγγανικού καλίου (KMnO_4), νιτρικού νατρίου (NaNO_3) και πυκνού θειικού οξέος (H_2SO_4). Η διαδικασία αυτή είναι ασφαλής, αποδοτική και γρήγορη, αφού απαιτεί λιγότερο από 2 ώρες και διεξάγεται σε χαμηλές θερμοκρασίες ($< 35\text{ }^\circ\text{C}$).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η οξειδωση του γραφίτη εξαρτάται από τα οξειδωτικά μέσα που παίρνουν μέρος στις αντιδράσεις, από τις συνθήκες της αντίδρασης καθώς επίσης και από το είδος του γραφίτη που θα χρησιμοποιηθεί. Επιπλέον, οι Brodie και Staudenmaier στις μεθόδους τους χρησιμοποιούν νιτρικό οξύ, το οποίο είναι πολύ διαδεδομένο ως οξειδωτικό μέσο. Συνεπώς, είναι κατάλληλο για την τροποποίηση επιφανειών με αρωματικούς δακτυλίους με την δημιουργία ομάδων, όπως καρβοξυλο-ομάδες, με ταυτόχρονη απελευθέρωση αερίων NO₂/N₂O₄ (διοξείδιο του αζώτου/ τετροξείδιο του αζώτου) [14]. Αντιθέτως, στην μέθοδο Hummers και Offeman (Εικόνα 1.3) το υπερμαγγανικό κάλιο και το θειϊκό οξύ αντιδρούν μεταξύ τους και δημιουργούν το επτοξείδιο του μαγγανίου, σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα, το οποίο πιστεύεται ότι είναι ισχυρό οξειδωτικό όταν έρχεται σε επαφή με οργανικές ενώσεις.



Εικόνα 1.3: Αντίδραση μεθόδου Hummers - Offerman.

Τα τελευταία χρόνια, οι παραπάνω μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί πολύ για την σύνθεση του οξειδίου του γραφενίου από καθαρό γραφίτη. Αναλόγως με το υλικό που απαιτείται σε κάθε μελέτη ή εφαρμογή, επιλέγεται και η ανάλογη μέθοδος για τη σύνθεση του οξειδίου του γραφενίου.

Το οξείδιο του γραφενίου είναι ένα ενδιαφέρον υλικό που μπορεί να φιλοξενεί διάφορα μόρια στον ενδοστρωματικό χώρο. Τα μόρια αυτά μπορεί να είναι ανθρακικές αλυσίδες, υδρόφιλα μόρια, μέταλλα μετάπτωσης και πολυμερή. Έτσι παρασκευάζονται υβριδικά υλικά, με εξαιρετικές ιδιότητες για μετέπειτα χρήση σε πολλαπλές εφαρμογές [15].

Ο σχηματισμός παραγώγων του οξειδίου του γραφενίου είναι πολύ σημαντικός και πραγματοποιείται με την διασπορά του οξειδίου του γραφενίου σε ένα διαλύτη. Ο σχηματισμός των παραγώγων εξαρτάται τόσο από την επιφανειακή τροποποίηση του γραφενίου, όσο και από το είδος του διαλύτη που χρησιμοποιείται κατά την διάρκεια της οξείδωσης.

Το οξείδιο του γραφενίου είναι μονωτής (ηλεκτρική αγωγιμότητα $1 \times 10^{-9} - 5 \times 10^{-3}$ S/cm). Ένας ακόμη τρόπος να παραχθεί γραφένιο είναι κάνοντας αναγωγή του

οξειδίου του γραφενίου. Καθώς γίνεται η αναγωγή του οξειδίου του γραφενίου σε γραφένιο, απομακρύνονται οι υδρόφιλες ομάδες και η ηλεκτρική αγωγιμότητα αυξάνεται από 3 έως 9 τάξεις μεγέθους. Βέβαια, στο πλέγμα του γραφενίου που προκύπτει από την αναγωγή του οξειδίου του γραφενίου υπάρχουν αρκετές ατέλειες σε σχέση με αυτό που προκύπτει από την μηχανική αποφυλλοποίηση και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την υποβάθμιση των ιδιοτήτων του.

Επίσης, πολλές εφαρμογές βρίσκουν τα νανοσύνθετα υλικά, τα οποία προκύπτουν από τη διασπορά του οξειδίου του γραφενίου σε πολυμερικές μήτρες. Τα νανοσύνθετα αυτά παρασκευάστηκαν με διάφορες μεθόδους και διαπιστώθηκε πως βελτιώνεται σε αρκετά καλό βαθμό το μέτρο ελαστικότητας (E) και η αντοχή τους στον εφελκυσμό (σ) [16, 17]. Τέλος, το οξείδιο του γραφενίου χρησιμοποιείται σε βιοαισθητήρες [18] καθώς επίσης και μετά από κατάλληλη τροποποίηση είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς φαρμάκων και γονιδίων [19, 20].

1.3 Νανοσωλήνες άνθρακα

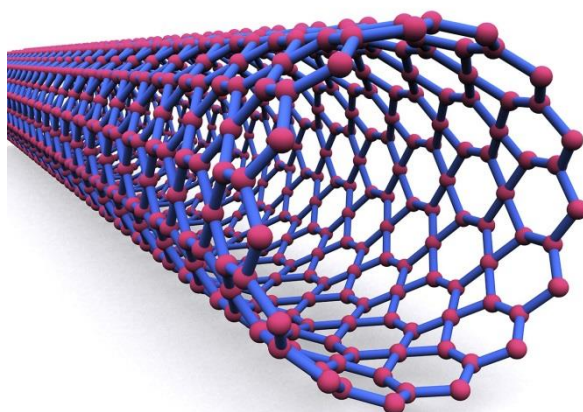
Οι νανοσωλήνες άνθρακα (Carbon Nanotubes, CNTs) ανακαλύφθηκαν το 1991 από τον Sumio Iijima [21] ως παραπροϊόντα της εκκένωσης τόξου στα ηλεκτρόδια γραφίτη. Η τεχνική της εκκένωσης τόξου χρησιμοποιούνταν για την σύνθεση των φουλερενίων. Αναλυτικά, διαπιστώθηκε ότι στα ηλεκτρόδια υπάρχουν ίνες άνθρακα με διάμετρο 4-30 μm και μήκος ~ 1 mm. Οι ίνες αυτές εμφάνιζαν μεγάλη γραφίτοποίηση και η δομή τους αποτελούνταν από κοίλους, διαδοχικούς, ομοαξονικούς γραφιτικούς κυλίνδρους με διαφορετική διάμετρο. Ιδανικά, οι νανοσωλήνες άνθρακα βασίζονται σε ένα sp^2 εξαγωνικό πλέγμα ατόμων άνθρακα, όπως και το γραφένιο. Ο στενότερος γραφιτικός κύλινδρος εμφανίζει διάμετρο μέχρι και 2.2 nm. Η ονομασία της καινούργιας δομής έγινε από τον ίδιο τον Iijima, λόγω της διαμέτρου των υλικών αυτών που ήταν της τάξης των νανομέτρων.

Η δομή των νανοσωλήνων άνθρακα είναι διακριτή σε σχέση με τις μέχρι σήμερα γνωστές μορφές ινών και νημάτων. Οι CNTs μπορεί να θεωρηθεί σαν μακρομοριακό σύστημα και με αρχιτεκτονική παρόμοια με του γραφιτικού φύλλου [22]. Οι νανοσωλήνες άνθρακα δεν διασπείρονται εύκολα σε οργανικούς διαλύτες ή στο νερό λόγω του ότι συνήθως δημιουργούν ισχυρούς δεσμούς van der Waals. Τους νανοσωλήνες άνθρακα μπορούμε να τους συναντήσουμε σε διάφορες μορφές και διαστάσεις, έτσι εμφανίζουν διαφορετικές ιδιότητες αναλόγως την περίπτωση.

Έχοντας ως κριτήριο τον αριθμό των γραφιτικών τοιχώματων των νανοσωλήνων, μπορούμε να τους ταξινομήσουμε σε τρεις κατηγορίες:

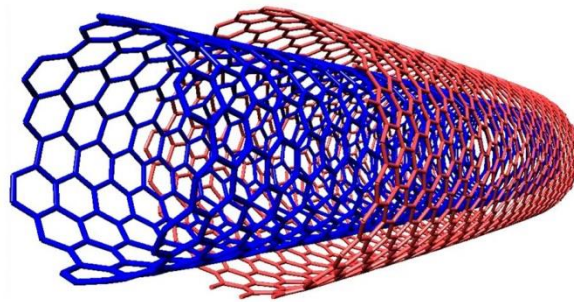
1. Νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος (single-walled carbon nanotubes, SWCNTs),
2. Νανοσωλήνες άνθρακα διπλού τοιχώματος (double-walled carbon nanotubes, DWCNTs) και
3. Νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος (multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs).

Συγκεκριμένα, οι νανοσωλήνες μονού τοιχώματος είναι κοίλοι κύλινδροι με ένα μόνο γραφιτικό πλέγμα και υψηλή κρυσταλλικότητα. Οι SWCNTs ανακαλύφθηκαν το 1993 [23, 24]. Η διάμετρός τους κυμαίνεται από 0.4 – 2 nm. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.4, η δομή των SWCNTs προκύπτει θεωρώντας πως ένα τέλειο γραφιτικό φύλλο περιελίσσεται. Το τέλειο γραφιτικό φύλλο αποτελείται αποκλειστικά από εξάγωνα άνθρακα.



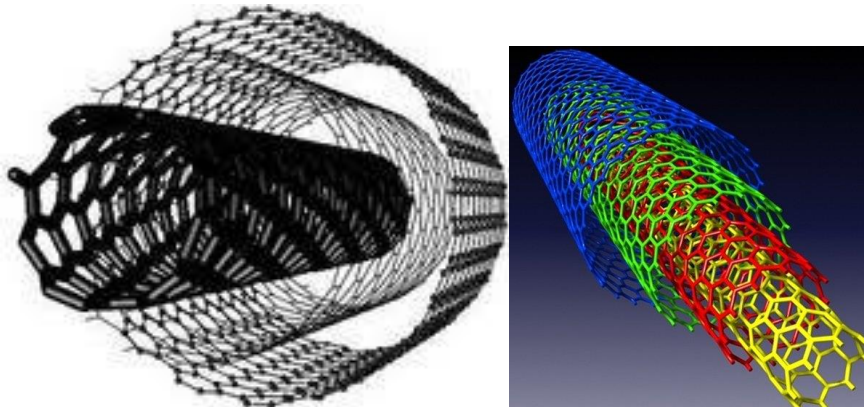
Εικόνα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση των SWCNTs.

Οι νανοσωλήνες διπλού τοιχώματος [25] αποτελούνται από δύο ομοαξονικούς γραφιτικούς κυλίνδρους όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.5. Λόγω του ότι έχουν μικρή εξωτερική διάμετρο, της τάξεως των 2 - 3 nm, παρουσιάζουν ιδιότητες παρόμοιες των SWCNTs. Ο εσωτερικός γραφιτικός κύλινδρος των DWCNTs είναι πιθανό να διατηρήσει τον χαρακτήρα των SWCNTs, ακόμη και μετά από χημική τροποποίηση του εξωτερικού γραφιτικού κυλίνδρου [26]. Γενικά, οι DWCNTs είναι μια εξαιρετική κατηγορία νανοσωλήνων άνθρακα αφού συνδυάζει τη δομική σταθερότητα των MWCNTs και τις ηλεκτρικές και άλλες ιδιότητες των SWCNTs [27].



Εικόνα 1.5: Σχηματική αναπαράσταση των DWCNTs.

Οι νανοσωλήνες πολλαπλού τοιχώματος (MWCNTs) αποτελούνται από ομόκεντρους κοίλους γραφιτικούς κυλίνδρους με διαφορετική διάμετρο, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.6. Οι αποστάσεις μεταξύ των τοιχωμάτων τους είναι από 0.3 μέχρι 0.4 nm, ενώ οι εξωτερικές διαμέτροι τους κυμαίνονται από 5 – 100 nm. Το μήκος των MWCNTs μπορεί να φτάσει μερικά μm.



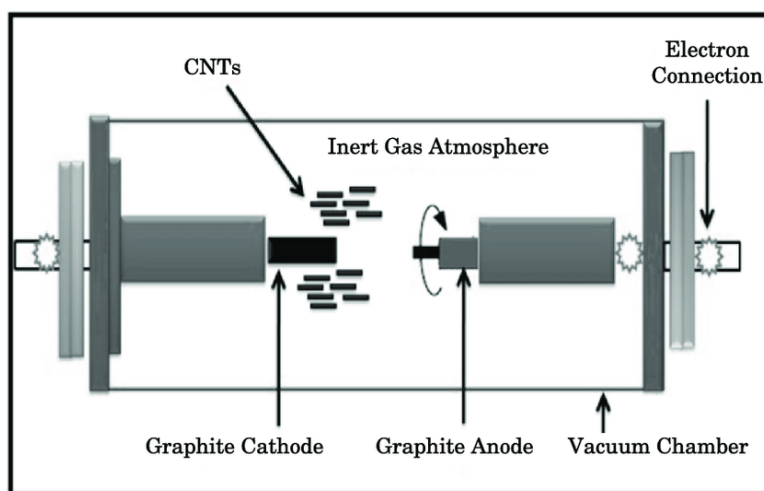
Εικόνα 1.6: Σχηματική αναπαράσταση των MWCNTs.

1.3.1 Μέθοδοι σύνθεσης και εφαρμογές

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι σύνθεσης των νανοσωλήνων άνθρακα, όμως οι πιο διαδεδομένες είναι η ηλεκτρική εκκένωση τόξου, η εξάχνωση μέσω laser και η καταλυτική χημική εναπόθεση ατμών.

Αναλυτικά, η ηλεκτρική εκκένωση τόξου (Electric Arc Discharge) είναι μια τεχνική από την οποία παρήχθησαν για πρώτη φορά οι νανοσωλήνες άνθρακα. Κατά την μαζική παραγωγή των φουλερενίων το 1990 [28] από τον Kratschmer και τους συνεργάτες του, εξάχνωσαν ηλεκτρόδια γραφίτη, τα οποία ήταν σε επαφή εφαρμόζοντας ηλεκτρική τάση υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Με βάση την Εικόνα 1.7 δημιουργείται κενό στον θάλαμο χρησιμοποιώντας μια αντλία και διοχετεύεται

κατάλληλο αδρανές αέριο σε συγκεκριμένη πίεση. Στην συνέχεια, εφαρμόζεται συνεχές ρεύμα ώστε να πραγματοποιηθεί ηλεκτρική εκκένωση μεταξύ δύο ηλεκτροδίων γραφίτη. Χρησιμοποιώντας ηλεκτρόδια καθαρού γραφίτη, η άνοδος εξαχνώνεται και σχηματίζονται φουλερένια [29]. Μια ποσότητα από την άνοδο εναποτίθεται στην κάθοδο και μέρος της ποσότητας αυτής είναι οι νανοσωλήνες άνθρακα [21].

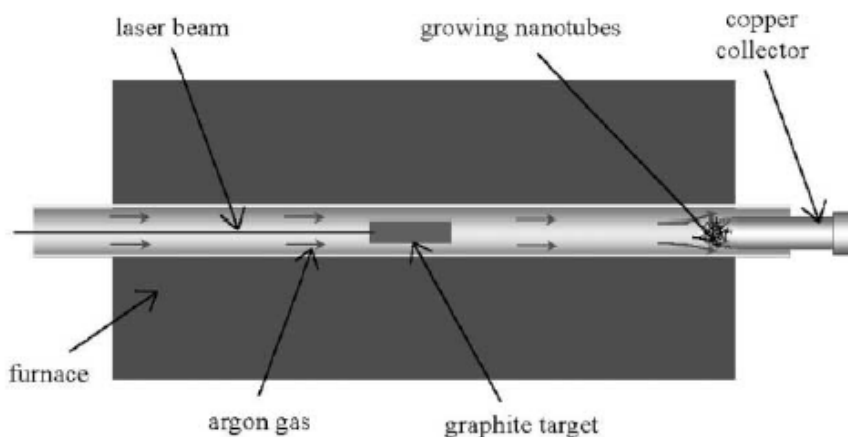


Εικόνα 1.7: Διάταξη εκκένωσης τόξου [30].

Για την παραγωγή των MWCNTs χρησιμοποιείται αέριο He, ενώ η ανάπτυξη των SWCNTs πραγματοποιείται όταν στην κάθοδο υπάρχουν μεταλλικοί καταλύτες, όπως Ni, Co, Pt, Fe κ.α.. Την μεγαλύτερη απόδοση για την παραγωγή SWCNTs δίνουν οι διμεταλλικοί καταλύτες Ni-Co [31]. Επιπλέον, οι νανοσωλήνες μονού τοιχώματος κατά την παραγωγή τους με την συγκεκριμένη μέθοδο δεν συγκεντρώνονται στην κάθοδο, αλλά εντός του θαλάμου. Για την παραγωγή των DWCNTs χρησιμοποιούνται ίδιες συνθήκες με αυτές των SWCNTs [32, 33]. Στη μέθοδο εκκένωσης τόξου η θερμοκρασία ανάπτυξης των νανοσωλήνων άνθρακα είναι μεγαλύτερη σε σχέση με άλλες μεθόδους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την κρυσταλλικότητα και δομική τελειότητα των CNTs. Τέλος, η απόδοση ανά μονάδα χρόνου των νανοσωλήνων που παράγονται μέσω αυτής της μεθόδου είναι υψηλότερη.

Η μέθοδος της εξάχνωσης με Laser χρησιμοποιήθηκε τόσο για την παραγωγή φουλερενίων όσο και για την παραγωγή νανοσωλήνων άνθρακα, από τον Smalley και τους συνεργάτες του [34, 35]. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.8 μια τυπική διάταξη αποτελείται από έναν φούρνο, μια αντλία κενού, έναν σωλήνα από χαλαζία, έναν

στόχο από άνθρακα, μια υδρόψυκτη παγίδα και σύστημα ελέγχου της ροής των αερίων. Αναλυτικά, η δέσμη laser εισέρχεται και εστιάζει στον στόχο άνθρακα, ο οποίος είναι τοποθετημένος στο κέντρο του φούρνου. Η εξάχνωση του στόχου γίνεται σε υψηλές θερμοκρασίες και σε ατμόσφαιρα αργού (Ar) με ροή $1 \text{ cm}^3/\text{s}$ και πίεση 500 torr, ώστε να σχηματιστούν οι νανοσωλήνες άνθρακα. Τέλος, η συλλογή των CNTs που παράγονται με την συγκεκριμένη μέθοδο γίνεται στην παγίδα. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι αρκετά, όπως η υψηλή ποιότητα νανοσωλήνων άνθρακα και ο έλεγχος της διαμέτρου των CNTs. Η διάμετρος των παραγόμενων νανοσωλήνων ελέγχεται μεταβάλλοντας την θερμοκρασία του φούρνου, τους καταλύτες και την ροή του αερίου [36, 37]. Η υψηλή θερμοκρασία του φούρνου συνεπάγεται μεγάλη διάμετρο των νανοσωλήνων [38].

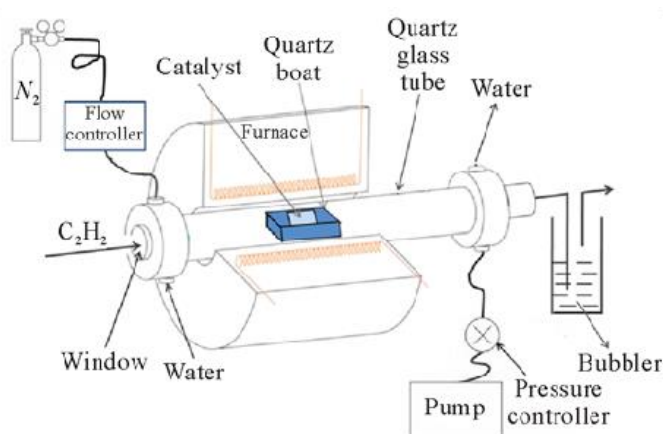


Εικόνα 1.8: Διάταξη εξάχνωσης με laser [35].

Ο τρίτος και πιο διαδεδομένος τρόπος παραγωγής νανοσωλήνων άνθρακα είναι η καταλυτική χημική εναπόθεση ατμών (CCVD). Στην συγκεκριμένη μέθοδο, επιλέγεται ένας αέριος υδρογονάνθρακας ο οποίος αποσυντίθεται καταλυτικά παρουσία κάποιου μεταλλικού καταλύτη. Η μέθοδος αυτή σε σύγκριση με τις παραπάνω είναι πιο απλή και οικονομική, λειτουργώντας σε χαμηλές συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας, προσφέροντας έτσι καλύτερο έλεγχο στις παραμέτρους του πειράματος. Με την μέθοδο αυτή μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικά είδη αερίων και σε διαφορετικές καταστάσεις π.χ. στερεά, υγρά ή αέρια. Με την χημική εναπόθεση ατμών μπορεί να ελεγχθεί το μήκος [39, 40], η διάμετρος [41, 42] και η διευθέτιση [30, 43], των νανοσωλήνων άνθρακα. Αρχικά, ο Endo και οι συνεργάτες του [44] ανέφεραν την ανάπτυξη των νανοσωλήνων άνθρακα από πυρόλυση του

βενζολίου στους 1100 °C. Ο Jose-Yacamán και οι συνεργάτες του [45] συνέθεσαν ελικοειδή MWCNTs στους 700 °C χρησιμοποιώντας ακετυλένιο. Στην συνέχεια, η σύνθεση των MWCNTs πραγματοποιήθηκε με αιθυλένιο [46], μεθάνιο [47] και διάφορους άλλους αέριους υδρογονάνθρακες. Οι SWCNTs συντέθηκαν από τον Dai και τους συνεργάτες του [48] χρησιμοποιώντας μονοξείδιο του άνθρακα ενώ αργότερα η σύνθεση τους επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας ακετυλένιο [49] και μεθάνιο [50].

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.9 για την ανάπτυξη των νανοσωλήνων άνθρακα διέρχεται αέριος υδρογονάνθρακας για 10-60 λεπτά εντός σωληνωτού φούρνου, στον οποίο βρίσκεται καταλύτης σε υψηλή θερμοκρασία (600-1200 °C) ώστε να γίνει η αποσύνθεση καταλυτικά.



Εικόνα 1.9: Διάταξη CCVD.

Οι τρεις κύριες παράμετροι που επηρεάζουν την ανάπτυξη των νανοσωλήνων άνθρακα, με την μέθοδο της χημικής εναπόθεσης ατμών είναι το είδος του υδρογονάνθρακα, ο καταλύτης και η θερμοκρασία πυρόλυσης. Στις χαμηλές θερμοκρασίες (600-900 °C) σχηματίζονται MWCNTs, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες αναπτύσσονται SWCNTs. Αυτό δηλώνει πως οι SWCNTs έχουν υψηλότερη ενέργεια σχηματισμού πιθανόν λόγω της μικρότερης διαμέτρου τους, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την υψηλή καμπυλότητα και την υψηλή ενέργεια παραμόρφωσης. Η μέθοδος αυτή, θεωρείται ιδανική για την σύνθεση προσανατολισμένων νανοσωλήνων άνθρακα πάνω σε συγκεκριμένα υποστρώματα. Ο Li και οι συνεργάτες του [30] δημιούργησαν συστοιχίες νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος πάνω σε πυριτία εμποτισμένη με σίδηρο, ο Terrones και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν CNTs πάνω σε υπόστρωμα χαλαζία το οποίο είχε

καλυφθεί από κοβάλτιο [51] και ο Pan με τους συνεργάτες του μίλησαν για ανάπτυξη προσανατολισμένων νανοσωλήνων άνθρακα πάνω σε μεσοπορώδες [52].

Με βάση τον παραπάνω μηχανισμό, οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι καταλύτες για την ανάπτυξη των CNTs είναι τα στοιχεία μετάβασης (Fe, Co, Ni), διότι σύμφωνα με τα διαγράμματα φάσης των στοιχείων αυτών με τον άνθρακα εμφανίζεται υψηλή διαλυτότητα του άνθρακα στα στοιχεία αυτά σε υψηλές θερμοκρασίες. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στερεές οργανομεταλλικές ενώσεις ως καταλύτες για την ανάπτυξη νανοσωλήνων άνθρακα, καθώς απελευθερώνουν *in situ* μεταλλικά νανοσωματίδια. Η διάμετρος των νανοσωλήνων εξαρτάται από το μέγεθος του καταλυτικού σωματιδίου [53]. Τέλος, η δομή και η μορφολογία του υποστρώματος επηρεάζει σε αρκετό βαθμό τόσο την ποσότητα όσο και την ποιότητα των παραγόμενων νανοσωλήνων [54].

Οι νανοσωλήνες άνθρακα εμφανίζουν πολλές σημαντικές ιδιότητες, όπως φυσικές, χημικές, μηχανικές, ηλεκτρικές και άλλες. Οι ιδιότητες τους καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από την δομή τους, που είναι σχεδόν μονοδιάστατη και από την διεύθυνση του γραφίτικού πλέγματός κατά μήκος του διαμήκη άξονά τους. Οι φυσικές ιδιότητες τους μοιάζουν με εκείνες του γραφενίου, μόνο που αφορά τις δύο διαστάσεις. Ο άνθρακας σαν στοιχείο έχει πόσα? νομίζω συνολικά τρία 3s και 2p τροχιακά ($1s^2, 2s^2, 2p^2$). Η ενεργειακή διαφορά των s και p τροχιακών είναι μικρή σε σχέση με τις ενέργειες σύζευξης των ατόμων και συνεπώς μπορεί να υπάρξει υβριδισμός. Γενικά, ο υβριδισμός s και p τροχιακού έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση και των τριών τύπων υβριδισμού sp, sp^2 και sp^3 . Έτσι η δομή των νανοσωλήνων άνθρακα λόγω του ότι είναι ημιεπίπεδη έχει υβριδισμό sp^2 .

Οι CNTs εμφανίζουν πολύ καλές μηχανικές ιδιότητες και συγκεκριμένα έχουν μεγάλη μηχανική αντοχή αλλά και σκληρότητα. Αυτό συμβαίνει λόγω των δεσμών C-C που έχουν στην δομή τους. Ο δεσμός αυτός είναι ο ισχυρότερος που υπάρχει στη φύση. Στην διεύθυνση του άξονα τους, οι νανοσωλήνες άνθρακα έχουν μεγάλο μέτρο ελαστικότητας με τιμή της τάξεως των TPa. Παράλληλα, εμφανίζουν μεγάλη ολκιμότητα, υψηλή τάση θραύσης και αντοχή 100 φορές μεγαλύτερη από το ατσάλι [55].

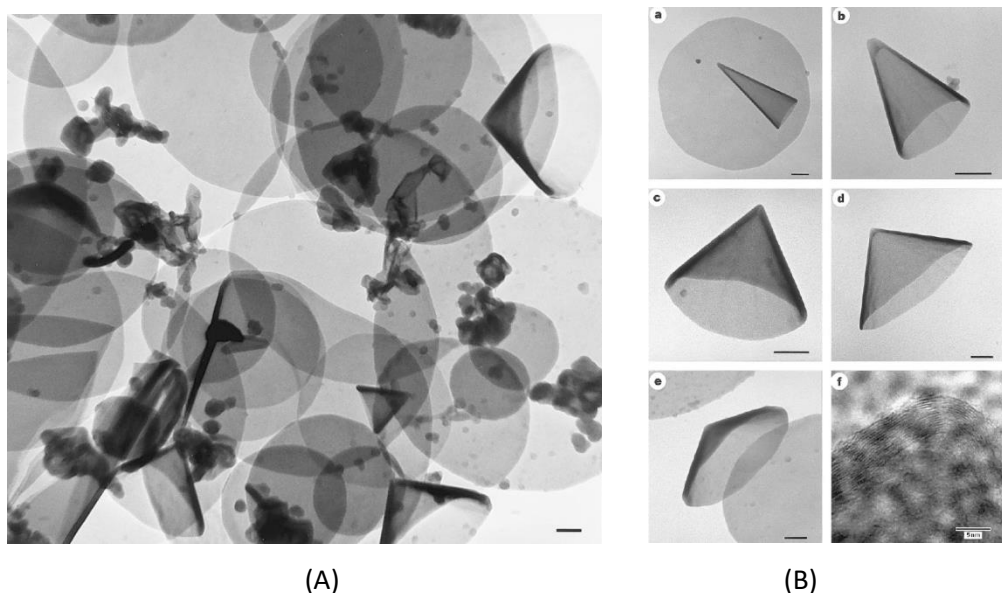
Επιπλέον, οι νανοσωλήνες άνθρακα εμφανίζουν πολύ καλές ηλεκτρονικές ιδιότητες [56]. Λόγω του ότι ο γραφίτης είναι ημιμέταλλο παρουσιάζει χάσμα αγωγιμότητας και στοιβάδα σθένους, τα οποία ενεργειακά υπερκαλύπτονται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία μιας ηλεκτρονικής δομής, από την περιέλιξη του γραφίτη

σε κοίλο κύλινδρο ώστε να σχηματιστούν οι CNTs. Με βάση την κβαντική θεωρία, οι νανοσωλήνες άνθρακα έχουν τοπικά συγκέντρωση ηλεκτρονίων, η οποία προκαλείται κυρίως από τις ατέλειες που εμφανίζουν στην δομή τους. Συνεπώς, οι νανοσωλήνες άνθρακα που εμφανίζουν μεταλλικό χαρακτήρα επιτρέπουν την διέλευση του ρεύματος χωρίς να παραχθεί θερμότητα [57]. Επίσης, οι CNTs έχουν μεγάλη θερμική αγωγιμότητα [58] και μπορούν να λειτουργήσουν σαν εκπομποί πεδίου.

Με βάση τα παραπάνω, οι νανοσωλήνες άνθρακα εμφανίζουν μοναδικές ιδιότητες, οι οποίες τους καθιστούν πολύ καλά υλικά ώστε να χρησιμοποιηθούν σε μια ευρεία γκάμα εφαρμογών. Αναλυτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν νανοανιχνευτές και νανοαισθητήρες [59-62]. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως νανοεκμαγεία [63] με σκοπό την σύνθεση υβριδικών νανοδομών αλλά και ως υλικά για ενεργειακές εφαρμογές όπως για μπαταρίες [64-66]. Τέλος, οι CNTs χρησιμοποιούνται ευρέως ως ενισχυτές πολυμερικών, κεραμικών και μεταλλικών μητρών [66-69] αλλά και για βιοτεχνολογικές εφαρμογές [70, 71].

1.4 Νανοδίσκοι άνθρακα

Μια νέα δομή κυρτού άνθρακα, που αποτελείται αποκλειστικά από γραφιτικές μικροδομές ανακαλύφθηκε το 1997, ως παραπροϊόν της πυρόλυσης Κνærner (Carbon Black & H₂, CB & H) [72]. Η μέθοδος CB & H είναι μια βιομηχανική διεργασία αποσύνθεσης υδρογονανθράκων για την παραγωγή άμορφου άνθρακα, με χρήση αντιδραστήρα πλάσματος (plasma torch). Η θερμοκρασία εισόδου των αερίων κυμαίνεται από 700 °C στην είσοδο έως >2000 °C στο εσωτερικό του αντιδραστήρα. Υπό κατάλληλες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας, εκτός από τον άμορφο άνθρακα (10%) παράγεται και ένα μίγμα από διάφορες μορφές άνθρακα, το οποίο αποτελείται από νανοδίσκους άνθρακα (70%) και νανοκώνους άνθρακα (20%) (Εικόνα 1.10Α). Λόγω δομικών ατελειών στο εξαγωνικό γραφιτικό πλέγμα και συγκεκριμένα λόγω της ύπαρξης πενταμελών δακτυλίων άνθρακα, προέκυψαν οι νανοδομές που περιγράφονται παραπάνω. Έτσι ελήφθησαν διαφορετικές νανοδομές, ανάλογα με τον αριθμό των ατελειών στο πλέγμα. Ουσιαστικά, ανάλογα με τον αριθμό των πενταμελών δακτυλίων, ο οποίος κυμαίνεται από 0-5, ελήφθησαν πέντε διαφορετικά είδη νανοκόνων με γωνία κορυφής μεταξύ 19.2 και 112° (Εικόνα 1.10B) και οι νανοδίσκοι άνθρακα (CNDs) οι οποίοι θεωρούνται νανοκόνιοι με γωνία κορυφής 180° (κανένα πενταμελή δακτύλιο) [72, 73].



Εικόνα 1.10: Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης: (A) νανοδίσκων και νανοκώνων άνθρακα και (B) πέντε διαφορετικών ειδών νανοκώνων με γωνία κορυφής: (a) 19.28°, (b) 38:98°, (c) 60:08°, (d) 84:68° και (e) 112.98°, και (f) υψηλής ανάλυσης εικόνα της κορυφής νανοκώνου (η γραμμή κάτω δεξιά υποδηλώνει 200 nm, εκτός της (f) που υποδηλώνει 5 nm) [72].

Τα CNDs είναι εξαιρετικά λεπτά και δισδιάστατα σωματίδια με διάμετρο 1-4 μm , ενώ συνυπάρχουν με τους νανοκόνους άνθρακα που έχουν παρόμοιο μέγεθος [74]. Έχει αποδειχθεί ότι και τα δύο υλικά άνθρακα παρουσιάζουν πολυστρωματικές δομές με γραφιτικό πυρήνα και εξωτερικά μη κρυσταλλικά στρώματα. Ειδικότερα, έχει προταθεί ότι τα CNDs σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της πυρολυτικής διαδικασίας μέσω της ανάπτυξης ενός λεπτού επίπεδου γραφιτικού κρυστάλλου, στο οποίο στη συνέχεια ενσωματώνονται προοδευτικά μη κρυσταλλικά στρώματα άνθρακα. Αν και διαφορετικός αριθμός στρωμάτων άνθρακα μπορεί να εναποτεθεί ανάλογα με τις τοπικές συνθήκες ανάπτυξης, οι νανοδίσκοι θεωρείται ότι έχουν ομοιογενές πάχος, στην περιοχή των 10-30 nm. Ο βαθμός της γραφιτικοποίησης μπορεί να βελτιωθεί σε μεγάλο βαθμό μετά από θερμική επεξεργασία (ανόπτηση) στους 2700 °C, υπό αργό. Ανάλυση με μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων (AFM) και περίθλασης ακτίνων-X (XRD) των θερμικά επεξεργασμένων νανοδίσκων και κώνων άνθρακα έδειξαν ότι η διαδικασία ανόπτησης υπό αυτές τις συνθήκες, οδηγεί σε υψηλή δομική οργάνωση με ελάχιστες επιφανειακές ατέλειες που δεν επηρεάζουν τη γεωμετρία ή το πάχος των σωματιδίων. Θερμικά επεξεργασμένοι νανοδίσκοι και κώνοι άνθρακα φαίνεται να είναι σχεδόν μονής κρυσταλλικής κατεύθυνσης και να περιλαμβάνουν έναν περιορισμένο αριθμό στρωμάτων γραφενίου (συνήθως <100). Επομένως, τα CNDs θεωρούνται ως η λεπτότερη δομή άνθρακα [15].

Τα CNDs έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά με τα άλλα νανοδομημένα υλικά άνθρακα όπως τα φουλλερένια, τους νανοσωλήνες άνθρακα και το γραφένιο, λόγω της παρουσίας πλήρως συζευγμένων π-ηλεκτρονίων εντοπισμένα στη μηδενική, στη μία ή στις δύο διαστάσεις. Ωστόσο, η δισκοειδής τους δομή διαφοροποιεί σημαντικά ορισμένες από τις ιδιότητες τους, επιτρέποντας την χρήση τους σε νέες εφαρμογές. Στο πλαίσιο αυτό, τα CNDs, τα οποία είναι πιο κοντά στο γραφένιο, διαφέρουν από την κυρτή δομή των φουλλερενίων σε σχήμα και πάχος που στην περίπτωση των CNDs μπορεί να κυμαίνεται από λίγες μέχρι αρκετές δεκάδες στρώσεις γραφενίου. Εξαιτίας της καλά καθορισμένης γραφιτικής δομής των CNDs, η οποία συνδέεται άμεσα με την βελτίωση του ρυθμού μεταφοράς ηλεκτρονίων στις άκρες του πλέγματος τους [75] αναμένεται να εμφανίζει βελτιωμένες ηλεκτροχημικές ιδιότητες σε σχέση με τα άλλα είδη νανοδομημένων ανθράκων [76].

Μέχρι σήμερα, τα CNDs λόγω του μοναδικού συνδυασμού των μορφολογικών και δομικών χαρακτηριστικών τους προτείνονται ως πολύ ελπιδοφόρα νανοϋλικά σε εφαρμογές που σχετίζονται με την ηλεκτροχημεία [15], την βελτίωση ιδιοτήτων, όπως της τριβής [77] και τις μαγνητικές ιδιότητες [78] καθώς και την σύνθεση νανოსύνθετων υλικών [79]. Συγκεκριμένα, το ιδιαίτερο σχήμα και μέγεθος των νανοδίσκων άνθρακα είναι κρίσιμο για τη διατήρηση σημαντικών ιδιοτήτων, όπως είναι η ηλεκτρική αγωγιμότητα, και έτσι τους καθιστούν κατάλληλους για εφαρμογές, όπως στη βιονανοτεχνολογία, τη νανοϊατρική και την μεταφορά φαρμάκων, τη νανοχημεία κ.α.. Όπως συμβαίνει και με τις υπόλοιπες δομές άνθρακα, τα CNDs δεν διασπείρονται σε πολικούς διαλύτες και συνεπώς η βιομηχανική τους εκμετάλλευση έχει σημαντικές δυσκολίες. Ένα επιπρόσθετο μειονέκτημα που εμποδίζει την εφαρμογή τους είναι η μειωμένη συμβατότητα τους με πολλά μέσα διασποράς, λόγω των ισχυρών δεσμών van der Waals και π-π αλληλεπιδράσεων. Ωστόσο, η χημική τροποποίηση της επιφάνειας των CNDs μπορεί να βελτιώσει τη δυνατότητα διασποράς τους τόσο σε οργανικούς διαλύτες όσο και σε υδατικά μέσα, καθιστώντας τα ικανά να χρησιμοποιηθούν ως φορείς φαρμάκων και γονιδίων ή συμβατά με άλλα υλικά όπως πολυμερικές μήτρες για την ανάπτυξη νανοςύνθετων υλικών, κ.α..

Μια τέτοια τροποποίηση είναι η χημική οξείδωση των CNDs, με βάση τη γνωστή μέθοδο Staudenmaier, η οποία έχει εφαρμοστεί με επιτυχία για τη χημική οξείδωση του γραφίτη [80]. Ως αποτέλεσμα αυτής της ισχυρής όξινης επεξεργασίας, είναι ο καθαρισμός των CNDs (απομάκρυνση τυχόν προσμίξεων ή άμορφου άνθρακα), ενώ τροποποιείται η επιφάνεια τους με διάφορες λειτουργικές πολικές ομάδες, όπως

υδροξύλο-, καρβοξύλο-, επόξυ-ομάδες. Κατά συνέπεια, τα πλήρως αδιάλυτα CNDS μετατρέπονται σε ένα υδρόφιλο παράγωγο οξειδωμένων νανοδίσκων (oxCNDS), το οποίο δίνει σταθερές διασπορές σε πολλούς πολικούς διαλύτες συμπεριλαμβανομένου και του νερού [81].

Σε σύγκριση με το οξείδιο του γραφενίου, τα οξειδωμένα CNDS διαθέτουν μια σειρά πλεονεκτημάτων που περιλαμβάνουν: (i) σημαντικά μικρότερο μέγεθος κατανομής μεγεθών, το οποίο συνδυάζεται με το καλά καθορισμένο σχήμα του, (ii) χαμηλότερη αναλογία ατόμων C:O, το οποίο είναι αποτέλεσμα του μεγαλύτερου αριθμού των οξυγονούχων ομάδων (υδροξύλο-, επόξυ-, καρβόνυλο- και καρβόξυ-ομάδων) στην επιφάνειά του και (iii) υψηλότερο πληθυσμό δραστικών ομάδων που βρίσκονται κυρίως τοποθετημένες στα άκρα των δίσκων, οι οποίες έχουν την δυνατότητα να τροποποιηθούν περαιτέρω [82].

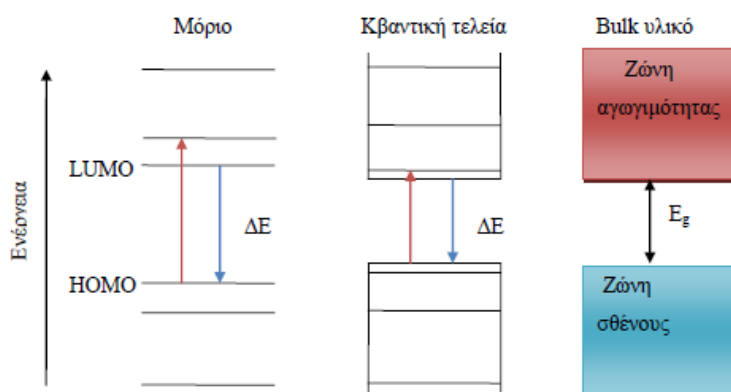
Τα υδρόφιλα οξειδωμένα CNDS μελετήθηκαν ως αποτελεσματικοί φορείς φαρμάκων και συγκεκριμένα του γνωστού αντικαρκινικού φαρμάκου, δοξορουβικίνη (DOX) [81]. Τα oxCNDS αποδείχθηκε, αρχικά, ότι είναι ικανά να δεσμεύσουν την DOX σε υψηλό ποσοστό (45%) λόγω των ισχυρών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του γραφιτικού πλέγματος και των δακτυλίων της DOX. Από τις *in vitro* μελέτες σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα A549, αποδείχθηκε ότι η δραστηριότητα της δεσμευμένης DOX στα oxCNDS εμφανίστηκε σημαντικά αυξημένη σε σχέση με την ελεύθερη DOX, ενώ τα oxCNDS βρέθηκε ότι δεν εμφανίζουν σχεδόν καμία τοξικότητα.

Επιπλέον, τα oxCNDS μελετήθηκαν και ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων [83]. Αναλυτικά, το κυτόχρωμα C (cyt c) χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο πρωτεΐνης και ακινητοποιήθηκε πάνω στα oxCNDS προκειμένου να μελετηθεί η καταλυτική συμπεριφορά της πρωτεΐνης (δραστηριότητα της υπεροξειδάσης και σταθερότητα). Τα oxCNDS βρέθηκε ότι αυξάνουν σημαντικά την θερμική σταθερότητα του cyt c καθώς και την σταθερότητα του έναντι του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα αυτά είναι πολύ καλύτερα σε σχέση με αυτά που λαμβάνονται από αντίστοιχη μελέτη με το οξείδιο του γραφενίου, γεγονός που δηλώνει ότι το μέγεθος αποτελεί σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει την καταλυτική συμπεριφορά της πρωτεΐνης.

1.5 Κβαντικές τελείες άνθρακα

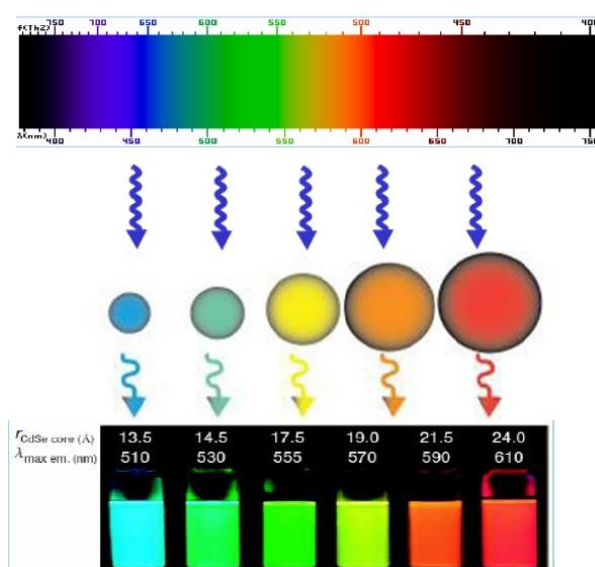
Γενικά, οι κβαντικές τελείες (Quantum Dots/QD) είναι ημιαγώγιμοι νανοκρύσταλλοι από ανόργανα υλικά με μεγεθός που κυμαίνεται από 2-10 nm. Στις κβαντικές τελείες,

η ενέργεια ενός ηλεκτρονίου είναι ισχυρά κβαντισμένη κάτι που φαίνεται στην Εικόνα 1.11.



Εικόνα 1.11: Σχηματική αναπαράσταση της ενεργειακής κατάστασης ενός μορίου, μιας κβαντικής τελείας και ενός bulk υλικού.

Τα πιο σύνηθες σχήμα των κβαντικών τελειών είναι το σφαιρικό, στο οποίο ο υπολογισμός της λύσης της εξίσωσης του Schrödinger είναι ευκολότερος. Γενικά, οι κβαντικές τελείες έχουν πολύ καλές οπτικές [84] και φωτοφυσικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, εκπέμπουν σε διάφορα χρώματα και ο φθορισμός τους οφείλεται στο μέγεθος τους [85, 86]. Όσο πιο μικρές είναι οι τελείες, ο φθορισμός είναι στο μπλε χρώμα, όπως φαίνεται στην παρακάτω Εικόνα 1.12.

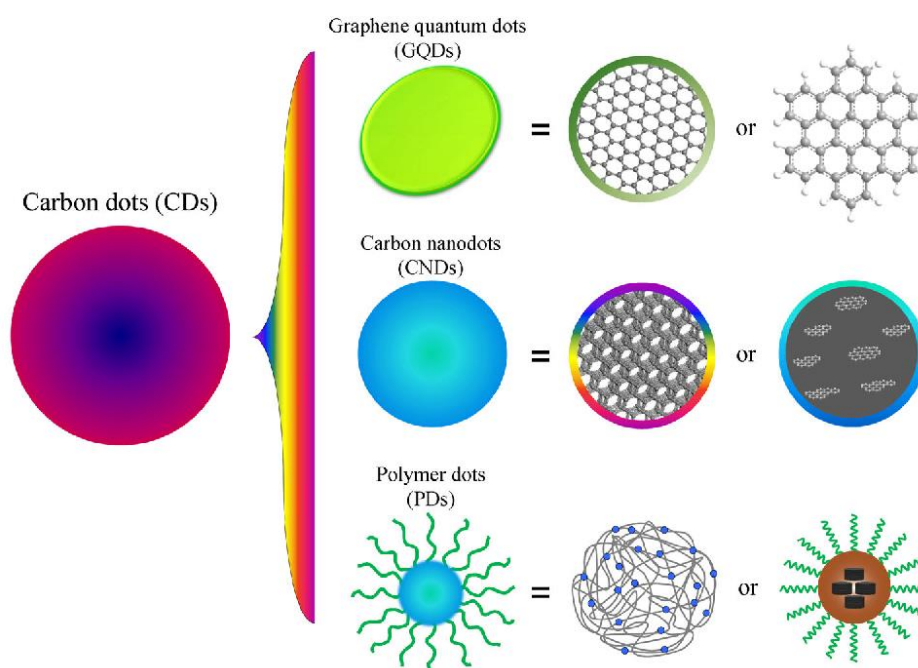


Εικόνα 1.12 : Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου φθορισμού των κβαντικών τελειών [87].

Το 2004 έγινε η πρώτη αναφορά σε κβαντικές τελείες άνθρακα (Carbon Dots/CDs) από τον Xu και τους συνεργάτες του [88]. Πιο συγκεκριμένα, κατά την διάρκεια καθαρισμού νανοσωλήνων άνθρακα σχηματίστηκαν τυχαία φθορίζοντα

νανοσωματίδια ως παραπροϊόν. Μέσα από την μελέτη της νέας αυτής ανακάλυψης, διαπιστώθηκε η απουσία κατάλοιπων από τους καταλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση των νανοσωλήνων άνθρακα. Επιπλέον, οι κβαντικές τελείες άνθρακα εμφανίζουν σημαντική περιεκτικότητα σε άνθρακα, οξυγόνο, υδρογόνο και άζωτο. Σε σύγκριση με τις κβαντικές τελείες, οι CDs εμφανίζουν καλύτερες ιδιότητες, όπως βιοσυμβατότητα, φωτοσταθερότητα, διαλυτότητα και χαμηλού κόστους σύνθεση [89]. Ένα ακόμα μεγάλο πλεονέκτημα των νανοτελειών άνθρακα είναι η δυνατότητα ελέγχου του σχήματος, των διαστάσεων, της δομής των ενεργειακών σταθμών, αλλά και τον αριθμό των εντοπισμένων ηλεκτρονίων τους [90, 91].

Οι κβαντικές τελείες άνθρακα ταξινομούνται με βάση την δομή τους σε τρεις κατηγορίες, τις κβαντικές τελείες γραφενίου (GQDs), τις νανοτελείες άνθρακα (CNDs) και τις νανοτελείες πολυμερούς (PDs), όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.13 [92, 93].



Εικόνα 1.13: Σχηματική αναπαράσταση των τριών κατηγοριών που χωρίζονται οι κβαντικές τελείες άνθρακα [93].

Οι παραπάνω κατηγορίες των νανοτελειών άνθρακα έχουν παρόμοιες ιδιότητες φωταύγειας (PL) παρά τη διαφορετικότητά τους ως προς τη δομή, το μέγεθος και τις επιφανειακές λειτουργικές ομάδες τους. Αναλυτικά, οι κβαντικές τελείες γραφενίου αποτελούνται από λίγα φύλλα γραφενίου, τα οποία έχουν χημικές ομάδες στις άκρες τους, κυρίως με βάση τον άνθρακα. Τα CNDs έχουν σφαιρικό σχήμα και εμφανίζουν κρυσταλλικό πλέγμα, όπως του γραφίτη ή άμορφη δομή, όπως στα νανοσωματίδια

άνθρακα. Οι νανοτελείες πολυμερών, έχουν έναν σφαιρικό πυρήνα από άνθρακα και γύρω του είτε υπάρχουν συσσωματωμένα γραμμικά πολυμερή είτε συσσωματώματα από πολυμερικές αλυσίδες. Με βάση τα παραπάνω διαπιστώνεται ότι οι νανοτελείες άνθρακα εμφανίζουν διαφορές στη δομή τους, στο μέγεθός τους και στις ομάδες που έχουν στην επιφάνειά τους. Αυτή η διαφορετικότητα των νανοτελειών άνθρακα μεταξύ τους επηρεάζει τη φωταύγεια τους, καθώς έχουν διαφορετικό χρόνο ζωής, ένταση, αλλά και μήκος κύματος εκπομπής [94]. Γενικά, οι κβαντικές τελείες άνθρακα έχουν στην επιφάνειά τους πολλές λειτουργικές ομάδες, όπως είναι οι αμινομάδες και οι καρβόξυλο-ομάδες, οι οποίες συμβάλουν στην εύκολη χημική τροποποίηση τους.

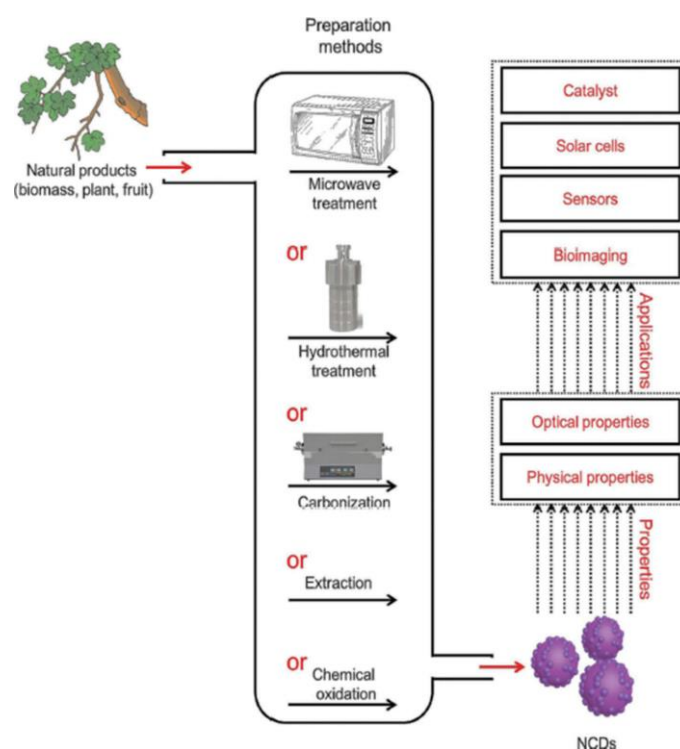
Επιπλέον, οι κβαντικές τελείες άνθρακα εμφανίζουν οπτικές και φωτοφυσικές ιδιότητες όπως και οι κβαντικές τελείες. Αναλυτικά, η φωταύγεια των τελειών άνθρακα προέρχεται από τις επιφανειακές ομάδες στις άκρες τους και όχι από το μέγεθος τους όπως συμβαίνει στις κβαντικές τελείες [95]. Οι κβαντικές τελείες άνθρακα συνήθως παρουσιάζουν οπτική απορρόφηση στην περιοχή του υπεριώδους φάσματος με μία ουρά που εκτείνεται έως και την περιοχή του ορατού φάσματος. Η απορρόφηση των τελειών άνθρακα στο UV-vis δίνει μια κορυφή στα 230-280 nm, η οποία αποδίδεται στην π-π μετάβαση των αρωματικών δεσμών άνθρακα (sp^2 C-C). Ο ώμος που εμφανίζεται στα 300-550 nm αποδίδεται στην n-p μετάβαση των δεσμών C=O/C=N και C-O/C-N, σύμφωνα με τον Zheng και τους συνεργάτες του [92]. Παράλληλα, οι τελείες άνθρακα εμφανίζουν φωταύγεια, η οποία μπορεί να οφείλεται στην οπτική επιλεκτικότητά τους [96, 97], στις ατέλειες και γενικά στις ενεργειακές καταστάσεις πάνω στην επιφάνειά τους [98]. Μια ακόμη ιδιότητα των τελειών άνθρακα που βρίσκονται σε μήτρα πολυβινυλικής αλκοόλης (PVA) είναι ο φωσφορισμός, όπου διαλύοντας της τελείες άνθρακα σε νερό προκύπτει φθορίζον υλικό, με χρόνο ζωής φθορισμού 380 ms [99].

1.5.1 Μέθοδοι σύνθεσης και εφαρμογές

Υπάρχουν πολλοί τρόποι σύνθεσης των κβαντικών τελειών άνθρακα [100]. Ο τρόπος σύνθεσης τους χωρίζονται σε δύο μεθόδους, τις top-down και τις bottom-up. Γενικά, οι top-down μέθοδοι σύνθεσης, αναφέρονται σε υλικά διαστάσεων της μακροκλίμακας, τα οποία περιορίζονται και οδηγούνται σε μικρότερες διαστάσεις της νανοκλίμακας. Ενώ οι bottom-up μέθοδοι σύνθεσης, αφορούν οργανικά μόρια, τα οποία έπειτα από επεξεργασία, αυξάνεται το μέγεθός τους δημιουργώντας νανοδομές

[93]. Οι top-down μέθοδοι σύνθεσης των κβαντικών τελειών πραγματοποιούνται με χρήση ακτινοβολίας laser, ηλεκτρικής εκκένωσης και ηλεκτροχημικής ανθρακοποίησης. Στις bottom-up μεθόδους συγκαταλέγονται η πυρόλυση, η σύνθεση μέσα σε πορώδη μήτρα, τα μικροκύματα, η χημική οξείδωση και η μέθοδος του ανάστροφου μικκυλίου [48].

Στην Εικόνα 1.14 παρουσιάζονται κάποιες σημαντικές μέθοδοι σύνθεσης των CDs, οι οποίες οδηγούν σε πληθώρα εφαρμογών [101], αποδεικνύοντας την χρησιμότητα των κβαντικών τελειών άνθρακα.



Εικόνα 1.14: Σχηματική απεικόνιση των μεθόδων σύνθεσης και των εφαρμογών των κβαντικών τελειών άνθρακα [101].

Αναλυτικά, στη μέθοδο με χρήση ακτινοβολίας με laser, το laser προσπίπτει σε έναν στόχο άνθρακα με αποτέλεσμα τη δημιουργία νανοδομών άνθρακα. Πρώτος ο Sun και οι συνεργάτες του [102] έφτιαξαν έναν στόχο άνθρακα και έπειτα με χρήση ακτινοβολίας laser προέκυψαν νανοσωματίδια άνθρακα. Τα σωματίδια αυτά, ύστερα από κατάλληλη επεξεργασία διαπιστώθηκε ότι έχουν μέγεθος 5 nm και ισχυρή φωταύγεια. Επιπλέον, ο Goncalves και οι συνεργάτες του [103] δημιούργησαν με την παραπάνω τεχνική νανοσωματίδια άνθρακα, τα οποία όμως δεν φθόριζαν. Έπειτα, από επεξεργασία με νιτρικό οξύ, πολυ(αιθυλενογλυκόλη) και μερκαπτο-ηλεκτρικό οξύ προέκυψαν φθορίζουσες τελείες άνθρακα.

Ο Bottini και οι συνεργάτες του [104] απομόνωσαν από διαφορετικούς νανοσωλήνες άνθρακα, νανοσωματίδια που φθόριζαν με την μέθοδο της ηλεκτρικής εκκένωσης. Τα παραγόμενα φθορίζοντα σωματίδια ήταν υδρόφοβα με στενή κατανομή. Η απόδοση της τεχνικής αυτής στην σύνθεση των κβαντικών τελειών άνθρακα ήταν πολύ χαμηλή και οι τελείες άνθρακα που προέκυπταν ήταν χαμηλής καθαρότητας.

Ο Lu και οι συνεργάτες του [105] χρησιμοποίησαν ράβδους γραφίτη μεγάλης καθαρότητας και προσανατολισμένο πυρολιτικό γραφίτη ως άνοδο, τα οποία εμβάπτισαν σε ιοντικό διάλυμα και εφάρμοζαν ηλεκτρικό δυναμικό με σκοπό τη διέγερση της απολέπισης του γραφίτη. Έτσι, δημιούργησαν κβαντικές τελείες άνθρακα μικρού μεγέθους και με κβαντική απόδοση φθορισμού 2-6 %. Ακολουθώντας την ίδια μέθοδο, ο Yao και οι συνεργάτες του [106] χρησιμοποίησαν μια άνοδο γραφίτη, μια κάθοδο από τιτάνιο και εφάρμοσαν ηλεκτρολυτική τάση μαζί με υπερήχους παράγοντας νανοτελείες άνθρακα. Οι παραγόμενες νανοτελείες άνθρακα είχαν φθορισμό, το μέγεθός τους ήταν μικρό (2-3 nm) και η κβαντική τους απόδοση ήταν ~9 %.

Η μέθοδος της πυρόλυσης χρησιμοποιείται συχνά για την παραγωγή νανοσωματιδίων άνθρακα, μέσω πυρόλυσης πρόδρομων ενώσεων άνθρακα κάτω από συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας. Οι πηγές άνθρακα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πυρόλυση ποικίλουν. Για παράδειγμα μπορεί να είναι μια φλούδα από καρπούζι μέχρι η χιτοζάνη ή το ασκορβικό οξύ. Ο Wang και οι συνεργάτες του [107] με την μέθοδο της πυρόλυσης, έλαβαν νανοτελείες άνθρακα διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες. Ως πρόδρομες ενώσεις χρησιμοποίησαν εξαδεκυλαμίνη ως παράγοντα παθητικοποίησης της επιφάνειας, κιτρικό οξύ ως πηγή άνθρακα και ως διαλύτη το οκταδεκένιο. Την μεγαλύτερη κβαντική απόδοση 53 %, έδωσαν οι τελείες άνθρακα διαλυτές σε έλαιο. Επιπλέον, ο Zhang και η ομάδα του [108] ανέφεραν φθορίζουσες νανοτελείες άνθρακα με διάμετρο 2 nm και μέγιστη απόδοση φθορισμού ~67 %. Ως πρόδρομες ενώσεις χρησιμοποίησαν το ασκορβικό οξύ ως πηγή άνθρακα και ως διαλύτες απιονισμένο νερό και αιθανόλη. Με την μέθοδο της πυρόλυσης, ο Zhuo και οι συνεργάτες [109] του συνέθεσαν νανοτελείες άνθρακα, αναμιγνύοντας κιτρικό οξύ με γλουταθειόνη ως πρόδρομες ενώσεις, πετυχαίνοντας την υψηλότερη κβαντική απόδοση ~80 %. Οι νανοτελείες αυτές είχαν μέγεθος 2.5-3 nm και μπλε φθορισμό.

Για την σύνθεση των κβαντικών τελειών άνθρακα έχει χρησιμοποιηθεί και η σύνθεση μέσα σε μήτρες, η οποίες επιβάλλουν χωρικό περιορισμό. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει δύο στάδια την σύνθεση νανοσωματιδίων άνθρακα με πυρόλυση μέσα

σε μεσοπορώδες εκμαγείο και έπειτα τη χρήση της μεθόδου εμποτισμού ώστε να απομακρυνθεί η μήτρα και να δημιουργηθούν τελείες άνθρακα. Παρόμοια μέθοδο χρησιμοποίησε, ο Zong και οι συνεργάτες του [110], όπου ανέφεραν την σύνθεση τελειών άνθρακα χρησιμοποιώντας ως μήτρα μεσοπορώδεις σφαίρες πυριτίας, οι οποίες ήταν φωτοσταθερές και εμφάνισαν εξαιρετικές ιδιότητες φωταύγειας (23 %).

Η μέθοδος της χημικής οξειδωσης χρησιμοποιείται για την σύνθεση σωματιδίων άνθρακα, τα οποία δημιουργούνται με την οξειδωση πρόδρομων ενώσεων άνθρακα με κάποιο ισχυρό οξειδωτικό μέσο. Ο Sun και οι συνεργάτες του [111] με την μέθοδο αυτή συνέθεσαν κβαντικές τελείες άνθρακα με χρήση ινών άνθρακα ως πηγή και οξειδωτικό μέσο το θειϊκό οξύ. Επίσης, ο Fang και οι συνεργάτες του [112] με απλή ανάμιξη οξικού οξέος, νερού και πεντοξειδίου του φωσφόρου συνέθεσαν σταθερές κβαντικές τελείες άνθρακα. Την ίδια διαδικασία ακολούθησε ο Zuo και οι συνεργάτες του [113] με την μόνη αλλαγή την προσθήκη γλυκόζης, δημιουργώντας τελείες άνθρακα μεγέθους 120 nm.

Με την χρήση της μεθόδου του ανάστροφου μικκυλίου, ο Kwon και οι συνεργάτες του [114] ανέπτυξαν μεγάλης φωτεινότητας κβαντικές τελείες άνθρακα. Ουσιαστικά, γίνεται υδρολυτικός πολυμερισμός, έπειτα ανθρακοποίηση της γλυκόζης και τέλος *in situ* παθητικοποίηση (passivation). Ο Linehan και οι συνεργάτες του [115], κάνοντας χημική αναγωγή των πρόδρομων μορίων άνθρακα σε ανάστροφα μικκύλια σε θερμοκρασία δωματίου, παρήγαγαν κβαντικές τελείες άνθρακα. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποίησαν τετραχλωράνθρακα, ενώ τα ανάστροφα μικκύλια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν με βάση το βρωμιούχο τετραοκτυλαμμώνιο.

Η μέθοδος των μικροκυμάτων, η οποία είναι η συνηθέστερη μέθοδος παρασκευής κβαντικών τελειών άνθρακα, εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις υπόλοιπες μεθόδους σύνθεσης των κβαντικών τελειών. Η μέθοδος αυτή, είναι απλή καθώς η θέρμανση των πρόδρομων ενώσεων γίνεται πολύ γρήγορα και το τελικό φθορίζον προϊόν λαμβάνεται μέσα σε λίγα λεπτά χωρίς να περιέχει καθόλου πρόσθετες χημικές ουσίες. Ο Guan και οι συνεργάτες του [116] δημιούργησαν φθορίζουσες νανοτελείες άνθρακα έχοντας ως πηγή άνθρακα μόρια φυλλικού οξέος, οι οποίες είχαν κβαντική απόδοση ~19 %. Επίσης, ο Wang και οι συνεργάτες του [117] συνέθεσαν υδατοδιαλυτές τελείες άνθρακα, οι οποίες περιέχουν φώσφορο. Ουσιαστικά, έκανε απλή ανάμιξη της εξαφωσφορικής ινσιτόλης (ενός φυτικού οξέος) με αιθυλενοδιαμίνη σε διαλύτη υπερκάθαρο νερό. Ο φθορισμός των τελειών

που προέκυψαν ήταν στο πράσινο και η μεγαλύτερη κβαντική απόδοση που έδωσαν ήταν ~21 %.

Οι καλές ιδιότητες των κβαντικών τελειών άνθρακα όπως είναι η εύκολη σύνθεση, τα ψηλά επίπεδα φωταύγειας, η χημική σταθερότητα, η μικρή τοξικότητα και η ποικιλία λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια τους για περαιτέρω τροποποίηση, τις καθιστούν ελπιδοφόρα υλικά για πληθώρα εφαρμογών [100, 118], κυρίως στην οπτοηλεκτρονική, στη βιολογία και στην ιατρική [84, 119].

Το 2006, ο Sun και οι συνεργάτες του [102] χρησιμοποίησαν παθητικοποιημένες κβαντικές τελείες άνθρακα αντί ημιαγωγικές κβαντικές τελείες για βιοαπεικόνιση σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα. Οι παράγοντες παθητικοποίησης που χρησιμοποίησαν ήταν η πολύ(αιθυλενογλυκόλη) και πολύ(προπιονυλο αιθυλενιμίνη)-*co*-αιθυλενιμίνη, τα οποία δεν εκπέμπουν στο ορατό μήκος κύματος. Κατέληξαν πως η φωταύγεια των τελειών άνθρακα οφείλονταν στην παθητικοποίηση της επιφάνειάς τους. Γενικά, η επιφανειακή παθητικοποίηση των τελειών άνθρακα [120] στην πλειοψηφία των περιπτώσεων οδηγεί σε καλύτερα αποτελέσματα από εκείνα των μη παθητικοποιημένων CDs [121]. Μελέτες έδειξαν ότι μετά από την χρήση αυτών των τελειών άνθρακα τα ποσοστά βιωσιμότητας των κυττάρων ήταν υψηλά, πράγμα που τις καθιστά ικανά υλικά για βιοαπεικόνιση και ως βιοαισθητήρες [92].

Τέλος, οι κβαντικές τελείες άνθρακα βρίσκουν εφαρμογή στην ανίχνευση βακτηρίων αλλά και στον εντοπισμό μόλυνσης στα τρόφιμα, προκειμένου να αποφευχθούν πανδημίες και επιδημίες [122]. Το 2015 υπήρξε η πρώτη δημοσίευση από τον Zhong και τους συνεργάτες του, όπου χρησιμοποιούσε τροποποιημένες νανοτελείες άνθρακα για την ανίχνευση του σταφυλόκοκκου (*S. aureus*) [123]. Συγκεκριμένα, τροποποίησαν τις νανοτελείες με ένα γνωστό αντιβιοτικό φάρμακο, την βανκομυκίνη. Η μελέτη απέδειξε πως το εύρος ανίχνευσης του βακτηρίου ήταν γραμμικό και κυμαινόταν από 3.18×10^5 μέχρι 1.59×10^8 cfu/mL, με όριο ανίχνευσης του *S. aureus* 9.4×10^4 cfu/mL. Τα ίδια CDs χρησιμοποιήθηκαν και για την ανίχνευση θετικών κατά gram βακτηρίων, όπως το *E. coli*. Σε αυτήν την κατηγορία των βακτηρίων το όριο ανίχνευσης βελτιώθηκε από τον Lavkush και τους συνεργάτες του [124], οι οποίοι χρησιμοποίησαν μαγνητικά CDs τροποποιημένα με χιτοζάνη. Παρατήρησαν πως το όριο ανίχνευσης ήταν 3×10^2 και 3.5×10^2 cfu/mL για το *S. aureus* και το *E. coli*, αντίστοιχα.

Βιβλιογραφία 1^ο Κεφαλαίου

- [1] J. Delgado, N. Herranz, N. Martin, «The nano-forms of carbon», *Journal of Materials Chemistry* 18 (2008).
- [2] A.K. Geim, K.S. Novoselov, «The rise of graphene», *Nanoscience and Technology*, pp. 11-19.
- [3] U. Hofmann, R. Holst, «Über die Säurenatur und die methylierung von graphitoxyd», 72(4) (1939) 754-771.
- [4] G. Ruess, «Über das graphitoxhydroxyd (graphitoxyd)», *Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften*, 76(3) (1947) 381-417.
- [5] W. Scholz, H.P. Boehm, «Untersuchungen am graphitoxid. VI. betrachtungen zur struktur des graphitoxids», *Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie*, 369(3-6) (1969) 327-340.
- [6] T. Nakajima, Y. Matsuo, «Formation process and structure of graphite oxide», *Carbon*, 32(3) (1994) 469-475.
- [7] A. Lerf, H. He, M. Forster, J. Klinowski, «Structure of graphite oxide revisited», *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(23) (1998) 4477-4482.
- [8] D.R. Dreyer, S. Park, C.W. Bielawski, R.S. Ruoff, «The chemistry of graphene oxide», *Chemical Society Reviews*, 39(1) (2010) 228-240.
- [9] C. Schafhaeutl, «On the combination of carbon with silicon and iron and other metals forming the different species of cast iron, steel, and malleable iron», *Philosophical Magazine*, 16 (1840) 570-590.
- [10] B.C. Brodie, XIII. «On the atomic weight of graphite», 149 (1859) 249-259.
- [11] M.J. McAllister, «Single sheet functionalized graphene by oxidation and thermal expansion of graphite», *Chemistry of Materials*, 19 (2007) 4396-4404.
- [12] L. Staudenmaier, «Verfahren zur darstellung der graphitsäure», *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 31 (1898) 1481.
- [13] W. Hummers, R. Offeman, «Preparation of graphitic oxide», *Journal of the American Chemical Society*, 80 (1958) 1339.
- [14] P.V. Lakshminarayanan, H. Toghiani, C.U. Pittman Jr, «Nitric acid oxidation of vapor grown carbon nanofibers», *Carbon*, 42(12-13) (2004) 2433-2442.
- [15] W. Zhang, M. Dubois, K. Guérin, P. Bonnet, E. Petit, N. Delpuech, D. Albertini, F. Masin, A. Hamwi, «Effect of graphitization on fluorination of carbon nanocones and nanodiscs», *Carbon*, 47 (2009) 2763-2775.
- [16] J. Liang, Y. Huang, L. Zhang, Y. Wang, Y. Ma, T. Guo, Y. Chen, «Molecular-level dispersion of graphene into poly(vinyl alcohol) and effective reinforcement of their nanocomposites», *Advanced Functional Materials*, 19 (2009) 2297-2302.
- [17] H. Kim, A.A. Abdala, C.W. Macosko, «Graphene/polymer nanocomposites», *Macromolecules*, 43(16) (2010) 6515-6530.
- [18] J. Lee, J. Kim, S. Kim, D.H. Min, «Biosensors based on graphene oxide and its biomedical application», *Advanced Drug Delivery Reviews*, 105(Pt B) (2016) 275-287.
- [19] V.T. George, B. Panayiotis, S. Georgios, «Polymer functionalized graphene oxide: A versatile nanoplatform for drug/gene delivery», *Current Organic Chemistry*, 19(18) (2015) 1828-1837.
- [20] L. Zhang, J. Xia, Q. Zhao, L. Liu, Z. Zhang, «Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs», *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 6(4) (2010) 537-544.
- [21] S. Iijima, «Helical microtubules of graphitic carbon», *Nature*, 354(6348) (1991) 56-58.

- [22] P. Ajayan, J.-C. Charlier, A.G. Rinzler, «Carbon nanotubes: from macromolecules to nanotechnology», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (2000) 14199-14200.
- [23] S. Iijima, T. Ichihashi, «Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter», *Nature*, 363(6430) (1993) 603-605.
- [24] D.S. Bethune, C.H. Kiang, M.S. de Vries, G. Gorman, R. Savoy, J. Vazquez, R. Beyers, «Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls», *Nature*, 363(6430) (1993) 605-607.
- [25] M. Kociak, K. Suenaga, K. Hirahara, Y. Saito, T. Nakahira, S. Iijima, «Linking chiral indices and transport properties of double-walled carbon nanotubes», *Physical Review Letters*, 89(15) (2002) 155501.
- [26] R. Saito, R. Matsuo, T. Kimura, G. Dresselhaus, M.S. Dresselhaus, «Anomalous potential barrier of double-wall carbon nanotube», *Chemical Physics Letters*, 348(3) (2001) 187-193.
- [27] C.Q. Ru, «Effect of van der Waals forces on axial buckling of a double-walled carbon nanotube», *Journal of Applied Physics*, 87(10) (2000) 7227-7231.
- [28] W. Krätschmer, L.D. Lamb, K. Fostiropoulos, D.R. Huffman, «Solid C₆₀: a new form of carbon», *Nature*, 347(6291) (1990) 354-358.
- [29] Y. Saito, M. Inagaki, H. Shinohara, H. Nagashima, M. Ohkohchi, Y. Ando, «Yield of fullerenes generated by contact arc method under He and Ar: dependence on gas pressure», *Chemical Physics Letters*, 200(6) (1992) 643-648.
- [30] W.Z. Li, S.S. Xie, L.X. Qian, B.H. Chang, B.S. Zou, W.Y. Zhou, R.A. Zhao, G. Wang, «Large-scale synthesis of aligned carbon nanotubes», *Science*, 274(5293) (1996) 1701-1703.
- [31] M. Yudasaka, Y. Kasuya, F. Kokai, K. Takahashi, M. Takizawa, S. Bandow, S. Iijima, «Causes of different catalytic activities of metals in formation of single-wall carbon nanotubes», *Applied Physics A*, 74(3) (2002) 377-385.
- [32] J. Hutchison, N. Kiselev, E.P. Krinichnaya, A.V. Krestinin, R. Loutfy, A.P. Morawsky, V.E. Muradyan, E. Obraztsova, J. Sloan, S.V. Terekhov, D.J.C. Zakharov, «Double-walled carbon nanotubes fabricated by a hydrogen arc discharge method», *Nanoscale*, 39 (2001) 761-770.
- [33] T. Sugai, H. Yoshida, T. Shimada, T. Okazaki, H. Shinohara, S. Bandow, «New synthesis of high-quality double-walled carbon nanotubes by high-temperature pulsed arc discharge», *Nano Letters*, 3(6) (2003) 769-773.
- [34] T. Guo, M.D. Diener, Y. Chai, M.J. Alford, R.E. Haufler, S.M. McClure, T. Ohno, J.H. Weaver, G.E. Scuseria, R.E. Smalley, «Uranium stabilization of C₂₈: a tetravalent fullerene», *Science*, 257(5077) (1992) 1661-1664.
- [35] A. Thess, R. Lee, P. Nikolaev, H. Dai, P. Petit, J. Robert, C. Xu, Y.H. Lee, S.G. Kim, A.G. Rinzler, D.T. Colbert, G.E. Scuseria, D. Tománek, J.E. Fischer, R.E. Smalley, «Crystalline ropes of metallic carbon nanotubes», *Science*, 273(5274) (1996) 483-487.
- [36] R. Sen, Y. Ohtsuka, T. Ishigaki, D. Kasuya, S. Suzuki, H. Kataura, Y. Achiba, «Time period for the growth of single-wall carbon nanotubes in the laser ablation process: evidence from gas dynamic studies and time resolved imaging», *Chemical Physics Letters*, 332(5) (2000) 467-473.
- [37] H. Kataura, Y. Kumazawa, Y. Maniwa, Y. Ohtsuka, R. Sen, S. Suzuki, Y. Achiba, «Diameter control of single-walled carbon nanotubes», *Carbon*, 38(11) (2000) 1691-1697.

- [38] S. Bandow, S. Asaka, Y. Saito, A.M. Rao, L. Grigorian, E. Richter, P.C. Eklund, «Effect of the growth temperature on the diameter distribution and chirality of single-wall carbon nanotubes», *Physical Review Letters*, 80(17) (1998) 3779-3782.
- [39] N. Zhao, C. He, Z. Jiang, J. Li, Y. Li, «Fabrication and growth mechanism of carbon nanotubes by catalytic chemical vapor deposition», *Materials Letters*, 60(2) (2006) 159-163.
- [40] Y. Li, W. Kim, Y. Zhang, M. Rolandi, D. Wang, H. Dai, «Growth of Single-Walled Carbon Nanotubes from Discrete Catalytic Nanoparticles of Various Sizes», *The Journal of Physical Chemistry B* 105(46) (2001) 11424-11431.
- [41] Y. Li, X. Zhang, L. Shen, J. Luo, X. Tao, F. Liu, G. Xu, Y. Wang, H.J. Geise, G.V. Tendeloo, Controlling the diameters in large-scale synthesis of single-walled carbon nanotubes by catalytic decomposition of CH₄», *Chemical Physics Letters*, 398(1) (2004) 276-282.
- [42] C.L. Cheung, A. Kurtz, H. Park, C.M. Lieber, «Diameter-controlled synthesis of carbon nanotubes», *Journal of Physical Chemistry B*, 106(10) (2002) 2429-2433.
- [43] C.J. Lee, J. Park, «Growth model for bamboolike structured carbon nanotubes synthesized using thermal chemical vapor deposition», *Journal of Physical Chemistry B*, 105(12) (2001) 2365-2368.
- [44] M. Endo, K. Takeuchi, S. Igarashi, K. Kobori, M. Shiraishi, H.W. Kroto, «The production and structure of pyrolytic carbon nanotubes (PCNTs)», *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 54(12) (1993) 1841-1848.
- [45] M. José-Yacamán, M. Miki-Yoshida, L. Rendón, J.G. Santiesteban, «Catalytic growth of carbon microtubules with fullerene structure», *Applied Physics Letters*, 62(6) (1993) 657-659.
- [46] B.C. Satishkumar, A. Govindaraj, C.N.R. Rao, «Bundles of aligned carbon nanotubes obtained by the pyrolysis of ferrocene–hydrocarbon mixtures: role of the metal nanoparticles produced in situ», *Chemical Physics Letters*, 307(3) (1999) 158-162.
- [47] K. Hernadi, A. Fonseca, J.B. Nagy, D. Bernaerts, A.A. Lucas, «Fe-catalyzed carbon nanotube formation», *Carbon*, 34(10) (1996) 1249-1257.
- [48] H. Dai, A.G. Rinzler, P. Nikolaev, A. Thess, D.T. Colbert, R.E. Smalley, «Single-wall nanotubes produced by metal-catalyzed disproportionation of carbon monoxide», *Chemical Physics Letters*, 260(3) (1996) 471-475.
- [49] B.C. Satishkumar, A. Govindaraj, R. Sen, C.N.R. Rao, «Single-walled nanotubes by the pyrolysis of acetylene-organometallic mixtures», *Chemical Physics Letters*, 293(1) (1998) 47-52.
- [50] J. Kong, A.M. Cassell, H. Dai, «Chemical vapor deposition of methane for single-walled carbon nanotubes», *Chemical Physics Letters*, 292(4) (1998) 567-574.
- [51] M. Terrones, N. Grobert, J. Olivares, J.P. Zhang, H. Terrones, K. Kordatos, W.K. Hsu, J.P. Hare, P.D. Townsend, K. Prassides, A.K. Cheetham, H.W. Kroto, D.R.M. Walton, «Controlled production of aligned-nanotube bundles», *Nature*, 388(6637) (1997) 52-55.
- [52] Z.W. Pan, S.S. Xie, B.H. Chang, C.Y. Wang, L. Lu, W. Liu, W.Y. Zhou, W.Z. Li, L.X. Qian, «Very long carbon nanotubes», *Nature*, 394(6694) (1998) 631-632.
- [53] H. Ago, T. Komatsu, S. Ohshima, Y. Kuriki, M. Yumura, «Dispersion of metal nanoparticles for aligned carbon nanotube arrays», *Applied Physics Letters*, 77(1) (2000) 79-81.
- [54] K. Hernadi, A. Fonseca, J.B. Nagy, D. Bemaerts, A. Fudala, A.A. Lucas, «Catalytic synthesis of carbon nanotubes using zeolite support», *Zeolites*, 17(5) (1996) 416-423.

- [55] J.P. Salvetat, J.M. Bonard, N.H. Thomson, A.J. Kulik, L. Forró, W. Benoit, L. Zuppiroli, «Mechanical properties of carbon nanotubes», *Applied Physics A*, 69(3) (1999) 255-260.
- [56] J. Hu, T.W. Odom, C.M. Lieber, «Chemistry and physics in one dimension: synthesis and properties of nanowires and nanotubes», *Accounts of Chemical Research*, 32(5) (1999) 435-445.
- [57] S. Frank, P. Poncharal, Z.L. Wang, W.A.d. Heer, «Carbon nanotube quantum resistors», *Science*, 280(5370) (1998) 1744-1746.
- [58] J. Hone, B. Batlogg, Z. Benes, A.T. Johnson, J.E. Fischer, «Quantized phonon spectrum of single-wall carbon nanotubes», *Science*, 289(5485) (2000) 1730-1733.
- [59] B. Bourlon, J. Wong, C. Mikó, L. Forró, M. Bockrath, «A nanoscale probe for fluidic and ionic transport», *Nature Nanotechnology*, 2(2) (2007) 104-107.
- [60] A. Cusano, M. Pisco, M. Consales, A. Cutolo, M. Giordano, M. Penza, P. Aversa, L. Capodiecici, S. Campopiano, «Novel optochemical sensors based on hollow fibers and single walled carbon nanotubes», *Photonics Technology Letters, IEEE* 18 (2006) 2431-2433.
- [61] X. Tang, S. Bansaruntip, N. Nakayama, E. Yenilmez, Y.L. Chang, Q. Wang, «Carbon nanotube DNA sensor and sensing mechanism», *Nano Letter*, 6(8) (2006) 1632-1636.
- [62] A. Winkler, T. Mühl, S. Menzel, R. Kozhuharova-Koseva, S. Hampel, A. Leonhardt, B. Büchner, «Magnetic force microscopy sensors using iron-filled carbon nanotubes», *Journal of Applied Physics*, 99(10) (2006) 104905.
- [63] S. Liao, G. Xu, W. Wang, F. Watari, F. Cui, S. Ramakrishna, C.K. Chan, «Self-assembly of nano-hydroxyapatite on multi-walled carbon nanotubes», *Acta Biomaterialia*, 3(5) (2007) 669-675.
- [64] J. Chen, Y. Liu, A.I. Minett, C. Lynam, J. Wang, G.G. Wallace, «Flexible, aligned carbon nanotube/conducting polymer electrodes for a lithium-ion battery», *Chemistry of Materials*, 19(15) (2007) 3595-3597.
- [65] M. Becher, M. Haluska, M. Hirscher, A. Quintel, V. Skákalová, U. Dettlaff-Weglikowska, X. Chen, M. Hulman, Y. Choi, S. Roth, V. Meregalli, M. Parrinello, R. Ströbel, L. Jörissen, M.M. Kappes, J. Fink, A. Züttel, I. Stepanek, P. Bernier, «Hydrogen storage in carbon nanotubes», *Comptes Rendus Physique*, v.4, 1055-1062 (2003) 4 (2003).
- [66] Y. Liang, H. Zhang, B. Yi, Z. Zhang, Z. Tan, «Preparation and characterization of multi-walled carbon nanotubes supported PtRu catalysts for proton exchange membrane fuel cells», *Carbon*, 43(15) (2005) 3144-3152.
- [67] S.I. Cha, K.T. Kim, S.N. Arshad, C.B. Mo, S.H. Hong, «Extraordinary strengthening effect of carbon nanotubes in metal-matrix nanocomposites processed by molecular-level mixing», *Advanced Materials*, 17(11) (2005) 1377-1381.
- [68] K.T. Kim, S.I. Cha, S.H. Hong, S.H. Hong, «Microstructures and tensile behavior of carbon nanotube reinforced Cu matrix nanocomposites», *Materials Science and Engineering: A*, 430(1) (2006) 27-33.
- [69] G. Yamamoto, K. Yokomizo, M. Omori, Y. Sato, B. Jeyadevan, K. Motomiya, T. Hashida, T. Takahashi, A. Okubo, K. Tohji, «Polycarbosilane-derived SiC/single-walled carbon nanotube nanocomposites», *Nanotechnology*, 18 (2007) 145614.
- [70] A. Bianco, K. Kostarelos, M. Prato, «Applications of carbon nanotubes in drug delivery», *Current Opinion in Chemical Biology*, 9(6) (2005) 674-679.
- [71] A. Bianco, K. Kostarelos, C.D. Partidos, M. Prato, «Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes», *Chemical Communications*, (Cambridge, England) (5) (2005) 571-577.

- [72] A. Krishnan, E. Dujardin, M.M.J. Treacy, J. Hugdahl, S. Lynum, T.W. Ebbesen, «Graphitic cones and the nucleation of curved carbon surfaces», *Nature*, 388(6641) (1997) 451-454.
- [73] S.N. Naess, A. Elgsaeter, G. Helgesen, K.D. Knudsen, «Carbon nanocones: wall structure and morphology», *Science and Technology of Advanced Materials*, 10(6) (2009) 065002.
- [74] M.R. Esfahani, S.A. Aktij, Z. Dabaghian, M.D. Firouzjaei, A. Rahimpour, J. Eke, I.C. Escobar, M. Abolhassani, L.F. Greenlee, A.R. Esfahani, A. Sadmani, N. Koutahzadeh, «Nanocomposite membranes for water separation and purification: Fabrication, modification, and applications», *Separation and Purification Technology*, 213 (2019) 465-499.
- [75] T.J. Davies, M.E. Hyde, R.G. Compton, Nanotrench arrays reveal insight into graphite electrochemistry, *Angew Chem Int Ed Engl* 44(32) (2005) 5121-5126.
- [76] J.G.S. Moo, M. Pumera, «Electrochemical properties of carbon nanodiscs», *RSC Advances*, 2(4) (2012) 1565-1568.
- [77] P. Thomas, D. Himmel, J.L. Mansot, W. Zhang, M. Dubois, K. Guérin, A. Hamwi, «Friction properties of fluorinated carbon nanodiscs and nanocones», *Tribology Letters*, 41(2) (2011) 353-362.
- [78] J. Cernak, G. Helgesen, E. Cizmar, J. Kovac, Z. Jurasekova, J. Voltr, «Magnetic properties of graphene nanodisk and nanocone powders at low temperatures», *Physical Review B*, 92 (2015).
- [79] Z. Osváth, Z. Vértesy, J. Lábár, P. Nemes-Incze, Z.E. Horváth, L.P. Biró, «Substrate-induced strain in carbon nanodisks», *Thin Solid Films*, 565 (2014) 111-115.
- [80] R. Qiao, P.C. Ke, «Lipid-carbon nanotube self-assembly in aqueous solution», *Journal of the American Chemical Society*, 128(42) (2006) 13656-13657.
- [81] P. Zygouri, T. Tsoufis, A. Kouloumpis, M. Patila, G. Potsi, A.A. Sevastos, Z. Sideratou, F. Katsaros, G. Charalambopoulou, H. Stamatis, P. Rudolf, T.A. Steriotis, D. Gournis, «Synthesis, characterization and assessment of hydrophilic oxidized carbon nanodiscs in bio-related applications», *RSC Advances*, 8(1) (2018) 122-131.
- [82] Y. Ahmad, E. Disa, M. Dubois, K. Guérin, V. Dubois, W. Zhang, P. Bonnet, F. Masin, L. Vidal, D.A. Ivanov, A. Hamwi, «The synthesis of multilayer graphene materials by the fluorination of carbon nanodiscs/nanocones», *Carbon*, 50(10) (2012) 3897-3908.
- [83] M.A. Momodu, C. Anyakora, «Heavy metal contamination of ground water: the surulere case study», *Red J Environmental Earth Sciences*, 2 (2010) 39-43.
- [84] C.J. Reckmeier, J. Schneider, A.S. Susa, A.L. Rogach, «Luminescent colloidal carbon dots: optical properties and effects of doping [Invited]», *Optical Society of America*, 24(2) (2016) A312-A340.
- [85] X. Wang, K. Qu, B. Xu, J. Ren, X. Qu, «Microwave assisted one-step green synthesis of cell-permeable multicolor photoluminescent carbon dots without surface passivation reagents», *Journal of Materials Chemistry*, 21(8) (2011) 2445-2450.
- [86] C. Sun, Y. Zhang, K. Sun, C. Reckmeier, T. Zhang, X. Zhang, J. Zhao, C. Wu, W.W. Yu, A.L. Rogach, «Combination of carbon dot and polymer dot phosphors for white light-emitting diodes», *Nanoscale*, 7(28) (2015) 12045-12050.
- [87] Φ. Κωνσταντή, «Οπτικές ιδιότητες κβαντικών τελειών», Τμήμα Φυσικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 2012.
- [88] X. Xu, R. Ray, Y. Gu, H.J. Ploehn, L. Gearheart, K. Raker, W.A. Scrivens, «Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon

- nanotube fragments», *Journal of the American Chemical Society*, 126(40) (2004) 12736-12737.
- [89] H. Li, Z. Kang, Y. Liu, S.-T. Lee, «Carbon nanodots: synthesis, properties and applications», *Journal of Materials Chemistry*, 22(46) (2012) 24230-24253.
- [90] H.S. Mansur, «Quantum dots and nanocomposites», *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2(2) (2010) 113-129.
- [91] D. Loss, D.P. DiVincenzo, «Quantum computation with quantum dots», *Physical Review A*, 57(1) (1998) 120-126.
- [92] X.T. Zheng, A. Ananthanarayanan, K.Q. Luo, P. Chen, «Glowing graphene quantum dots and carbon dots: properties, syntheses, and biological applications», *Small*, 11(14) (2015) 1620-1636.
- [93] S. Zhu, Y. Song, X. Zhao, J. Shao, J. Zhang, B. Yang, «The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): current state and future perspective», *Nano Research*, 8(2) (2015) 355-381.
- [94] M.A. Sk, A. Ananthanarayanan, L. Huang, K.H. Lim, P. Chen, «Revealing the tunable photoluminescence properties of graphene quantum dots», *Journal of Materials Chemistry C*, 2(34) (2014) 6954-6960.
- [95] C. Ding, A. Zhu, Y. Tian, «Functional surface engineering of C-dots for fluorescent biosensing and in vivo bioimaging», *Accounts of Chemical Research*, 47(1) (2014) 20-30.
- [96] S.N. Baker, G.A. Baker, «Luminescent carbon nanodots: emergent Nnanolights», *Angewandte Chemie International Edition*, 49(38) (2010) 6726-6744.
- [97] H. Li, X. He, Z. Kang, H. Huang, Y. Liu, J. Liu, S. Lian, C.H. Tsang, X. Yang, S.T. Lee, «Water-soluble fluorescent carbon quantum dots and photocatalyst design», *Angewandte Chemie International Edition*, 49(26) (2010) 4430-4434.
- [98] S.-L. Hu, K.-Y. Niu, J. Sun, J. Yang, N.-Q. Zhao, X.-W. Du, «One-step synthesis of fluorescent carbon nanoparticles by laser irradiation», *Journal of Materials Chemistry*, 19(4) (2009) 484-488.
- [99] Y. Deng, D. Zhao, X. Chen, F. Wang, H. Song, D. Shen, «Long lifetime pure organic phosphorescence based on water soluble carbon dots», *Chemical Communications*, 49(51) (2013) 5751-5753.
- [100] Y. Wang, A. Hu, «Carbon quantum dots: synthesis, properties and applications», *Journal of Materials Chemistry C*, 2(34) (2014) 6921-6939.
- [101] X. Zhang, M. Jiang, N. Niu, Z. Chen, S. Li, S. Liu, J. Li, «Natural-product-derived carbon dots: from natural products to functional materials», *ChemSusChem*, 11(1) (2018) 11-24.
- [102] Y.-P. Sun, B. Zhou, Y. Lin, W. Wang, K.A.S. Fernando, P. Pathak, M.J. Meziani, B.A. Harruff, X. Wang, H. Wang, P.G. Luo, H. Yang, M.E. Kose, B. Chen, L.M. Veca, S.-Y. Xie, «Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence», *Journal of the American Chemical Society*, 128(24) (2006) 7756-7757.
- [103] H. Gonçalves, J.C. Esteves da Silva, «Fluorescent carbon dots capped with PEG200 and mercaptosuccinic acid», *Journal of Fluorescence*, 20(5) (2010) 1023-1028.
- [104] M. Bottini, C. Balasubramanian, M.I. Dawson, A. Bergamaschi, S. Bellucci, T. Mustelin, «Isolation and characterization of fluorescent nanoparticles from pristine and oxidized electric arc-produced single-walled carbon nanotubes», *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(2) (2006) 831-836.

- [105] J. Lu, J.-x. Yang, J. Wang, A. Lim, S. Wang, K.P. Loh, «One-pot synthesis of fluorescent carbon nanoribbons, nanoparticles, and graphene by the exfoliation of graphite in ionic liquids», *ACS nano*, 3(8) (2009) 2367-2375.
- [106] S. Yao, Y. Hu, G. Li, «A one-step sonoelectrochemical preparation method of pure blue fluorescent carbon nanoparticles under a high intensity electric field», *Carbon*, 66 (2014) 77-83.
- [107] F. Wang, S. Pang, L. Wang, Q. Li, M. Kreiter, C.-y. Liu, «One-step synthesis of highly luminescent carbon dots in noncoordinating solvents», *Chemistry of Materials*, 22(16) (2010) 4528-4530.
- [108] B. Zhang, C.-y. Liu, Y. Liu, «A novel one-step approach to synthesize fluorescent carbon nanoparticles», *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2010(28) (2010) 4411-4414.
- [109] Y. Zhuo, H. Miao, D. Zhong, S. Zhu, X. Yang, «One-step synthesis of high quantum-yield and excitation-independent emission carbon dots for cell imaging», *Materials Letters*, 139 (2015) 197-200.
- [110] J. Zong, Y. Zhu, X. Yang, J. Shen, C. Li, «Synthesis of photoluminescent carbogenic dots using mesoporous silica spheres as nanoreactors», *Chemical Communications*, 47(2) (2011) 764-766.
- [111] D. Sun, R. Ban, P.-H. Zhang, G.-H. Wu, J.-R. Zhang, J.-J. Zhu, «Hair fiber as a precursor for synthesizing of sulfur- and nitrogen-co-doped carbon dots with tunable luminescence properties», *Carbon*, 64 (2013) 424-434.
- [112] Y. Fang, S. Guo, D. Li, C. Zhu, W. Ren, S. Dong, E. Wang, «Easy synthesis and imaging applications of cross-linked green fluorescent hollow carbon nanoparticles», *ACS nano*, 6(1) (2012) 400-409.
- [113] P. Zuo, D. Xiao, M. Gao, J. Peng, R. Pan, Y. Xia, H. He, «Single-step preparation of fluorescent carbon nanoparticles, and their application as a fluorometric probe for quercetin», *Microchimica Acta*, 181(11) (2014) 1309-1316.
- [114] W. Kwon, S.-W. Rhee, «Facile synthesis of graphitic carbon quantum dots with size tunability and uniformity using reverse micelles», *Chemical Communications*, 48(43) (2012) 5256-5258.
- [115] K. Linehan, H. Doyle, «Efficient one-pot synthesis of highly monodisperse carbon quantum dots», *RSC Advances*, 4(1) (2014) 18-21.
- [116] W. Guan, W. Gu, L. ye, C. Guo, S. Su, P. Xu, M. Xue, «Microwave-assisted polyol synthesis of carbon nitride dots from folic acid for cell imaging», *International Journal of Nanomedicine*, 9 (2014) 5071-5078.
- [117] W. Wang, Y. Li, L. Cheng, Z. Cao, W. Liu, «Water-soluble and phosphorus-containing carbon dots with strong green fluorescence for cell labeling», *Journal of Materials Chemistry B*, 2(1) (2014) 46-48.
- [118] V. Georgakilas, J.A. Perman, J. Tucek, R. Zboril, «Broad family of carbon nanoallotropes: classification, chemistry, and applications of fullerenes, carbon dots, nanotubes, graphene, nanodiamonds, and combined superstructures», *Chemical Reviews*, 115(11) (2015) 4744-4822.
- [119] P. Koutsogiannis, E. Thomou, H. Stamatis, D. Gournis, P. Rudolf, «Advances in fluorescent carbon dots for biomedical applications», *Advances in Physics: X*, 5(1) (2020) 1758592.
- [120] X. Li, W. Wang, Q. Li, H. Lin, Y. Xu, L. Zhuang, «Design of Fe₃O₄@SiO₂@mSiO₂-organosilane carbon dots nanoparticles: Synthesis and fluorescence red-shift properties with concentration dependence», *Materials & Design*, 151 (2018) 89-101.

- [121] X.-W. Hua, Y.-W. Bao, F.-G. Wu, «Fluorescent carbon quantum dots with intrinsic nucleolus-targeting capability for nucleolus imaging and enhanced cytosolic and nuclear drug delivery», *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(13) (2018) 10664-10677.
- [122] H. Safardoust-Hojaghan, M. Salavati-Niasari, O. Amiri, M. Hassanpour, «Preparation of highly luminescent nitrogen doped graphene quantum dots and their application as a probe for detection of *staphylococcus aureus* and *e. coli* », *Journal of Molecular Liquids*, 241 (2017) 1114-1119.
- [123] D. Zhong, Y. Zhuo, Y. Feng, X. Yang, «Employing carbon dots modified with vancomycin for assaying Gram-positive bacteria like *staphylococcus aureus*», *Biosensors & Bioelectronics*, 74 (2015) 546-553.
- [124] M.L. Bhaisare, G. Gedda, M.S. Khan, H.-F. Wu, «Fluorimetric detection of pathogenic bacteria using magnetic carbon dots», *Analytica Chimica Acta*, 920 (2016) 63-71.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ ΚΑΙ ΟΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥΣ

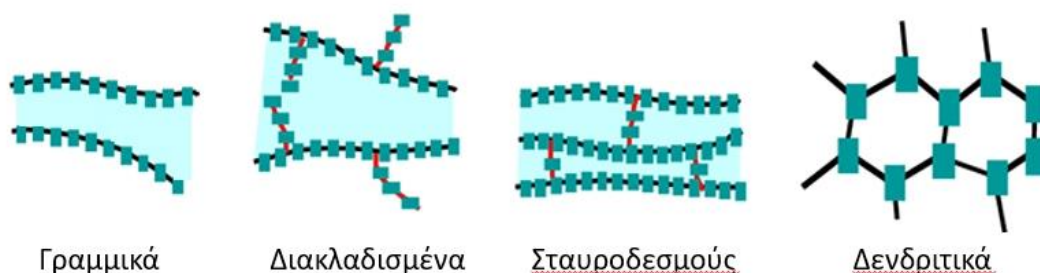
2.1 Δενδριτικά πολυμερή

Η δενδριτική δομή είναι ιδιαίτερα οικεία στον άνθρωπο, αφού την συναντά κανείς σε έμβια και σε αβιοτικά συστήματα, όπως είναι μια νιφάδα χιονιού, τα κλαδιά και οι ρίζες των δέντρων, αλλά και το αγγειακό σύστημα του ανθρώπου. Συγκεκριμένα, στα βιολογικά συστήματα υπάρχουν παραδείγματα τέτοιας δομής που κυμαίνονται από την κλίμακα του μέτρου μέχρι του μικρομέτρου. Μπορεί κανείς να υποθέσει ότι η εξέλιξη των συστημάτων αυτών οδήγησε στη δενδριτική αρχιτεκτονική, έτσι ώστε να μεγιστοποιηθεί η επιφάνεια επαφής τους με το περιβάλλον και έτσι να προκύψουν οι βέλτιστες συνθήκες επιβίωσης. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα των παραπάνω είναι η πρόσληψη θρεπτικών συστατικών από τις ρίζες των δέντρων (Εικόνα 2.1). Η μίμηση της τοπολογίας αυτής σε μοριακό επίπεδο οδήγησε στη σύνθεση των δενδριτικών πολυμερών.



Εικόνα 2.1: Δενδριτική αρχιτεκτονική.

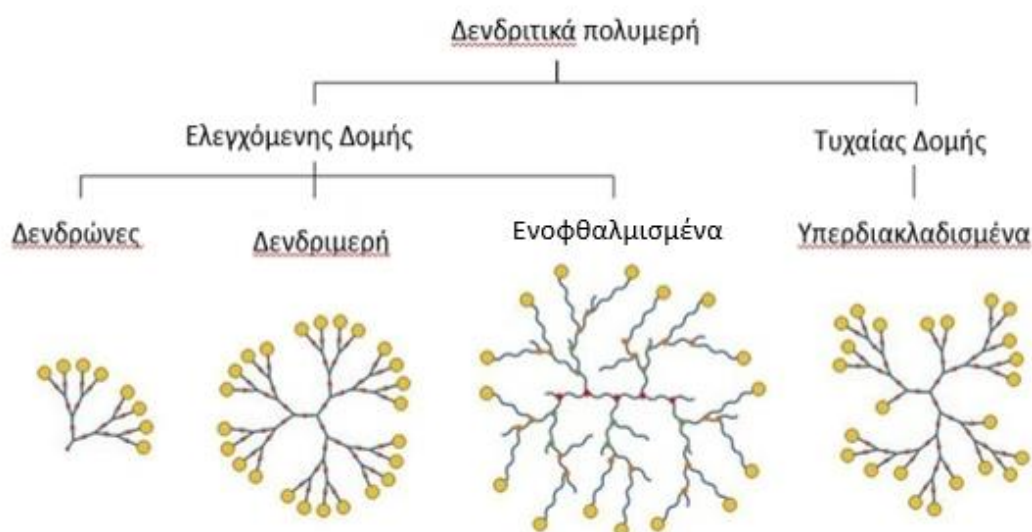
Στις μέρες μας, η επιστήμη των πολυμερών αναγνωρίζει τα δενδριτικά πολυμερή ως την τέταρτη κατηγορία μακρομορίων μετά τα γραμμικά πολυμερή, τα πολυμερή με σταυροδεσμούς (πολυμερή πλέγματος) και τα διακλαδισμένα (ή διακλαδωμένα) πολυμερή (Εικόνα 2.2) [1, 2].



Εικόνα 2.2: Κατηγορίες πολυμερών.

Τα δενδριτικά πολυμερή είναι μακρομόρια με ανοιχτή δομή που έχει τη χαρακτηριστική μορφή δέντρου, συνιστώνται, ουσιαστικά, από έναν συνδυασμό κλάδων. Η κατηγορία των δενδριτικών πολυμερών περιλαμβάνει τις ακόλουθες υποκατηγορίες (Εικόνα 2.3) [3]:

- τα τυχαίως υπερδιακλαδισμένα πολυμερή (random hyperbranched polymers),
- τα δενδριτικά ενοφθαλισμένα πολυμερή (dendrigrafts),
- τους δενδρώνες (dendrons) και
- τα δενδριμερή (dendrimers).



Εικόνα 2.3: Σχηματική αναπαράσταση των υποκατηγοριών της οικογένειας των δενδριτικών πολυμερών.

Ανάλογα με τον τρόπο σύνθεσης των παραπάνω δενδριτικών ομάδων, τα πολυμερή εμφανίζουν διαφορετικό έλεγχο στη δομή και άρα, διαφορετικό συντελεστή πολυδιασποράς. Συγκεκριμένα, στα τυχαίως υπερδιακλαδισμένα πολυμερή υπάρχει στατιστική κατανομή μοριακών βαρών και μοριακών διατάξεων, το οποίο και συναντάται στα περισσότερα γραμμικά και τα διακλαδισμένα πολυμερή. Αντιθέτως, τα δενδριμερή εμφανίζουν μονοδιασπορά, καθώς ο έλεγχος της χημικής τους δομής είναι πλήρης. Συγκεκριμένα, η ταξινόμηση ενός δενδριτικού πολυμερούς σε μία από τις παραπάνω υποκατηγορίες και ο βαθμός ελέγχου της δομής του, καθορίζονται από τη μέθοδο παρασκευής που ακολουθείται, αλλά και από τις παραμέτρους σύνθεσης των επαναλαμβανόμενων δομικών μονάδων του. Οι παράμετροι αυτές, εξαρτώνται από τη χημική σύσταση των μονομερών και τη φύση της επίδρασης του αποκλειόμενου όγκου των δομικών μονάδων. Ο όγκος των δομικών μονάδων

προσδιορίζεται από το μήκος των κλάδων, τη συμμετρία, την ευκαμψία και τις γωνίες στροφής στο εσωτερικό τους.

Η σύνδεση των δομικών μονάδων γίνεται ομοιοπολικά αποδίδοντας μια δενδριτική διάταξη γύρω από έναν πυρήνα. Έτσι, είναι δυνατόν να είναι μη ιδανική με πολυδιασπορά ($M_n/M_w=1.5-10$), όπως συμβαίνει στα τυχαίως υπερδιακλαδισμένα πολυμερή, ή να είναι ιδανικά οργανωμένη αποδίδοντας μια αυστηρά ελεγχόμενη δομή πυρήνα-κελύφους, όπως στην περίπτωση των δενδρώνων και των δενδριμερών ($M_n/M_w= 1.00-1.05$). Τα ενοφθαλμισμένα δενδριτικά πολυμερή, σε ότι αφορά τον έλεγχο της δομής, τοποθετούνται μεταξύ των δύο παραπάνω ακραίων περιπτώσεων και συνήθως παρουσιάζουν στενό εύρος διασποράς ($M_n/M_w= 1.1-1.5$), ανάλογα με τη διαδικασία σύνθεσής τους [3].

2.2 Υπερδιακλαδισμένα πολυμερή

Μια κατηγορία δενδριτικών μακρομορίων είναι τα υπερδιακλαδισμένα πολυμερή [4-6], όπως προαναφέρθηκε, τα οποία έχουν πολλές διακλαδώσεις, νανοκοιλότητες και μεγάλο αριθμό τελικών ομάδων. Πολλές φορές τα πολυμερή αυτά χαρακτηρίζονται και ως «δενδριτικοί μίμοι», λόγω του ότι η δομή τους μιμείται τη δενδριτική τοπολογία. Ωστόσο, η τυχαία φύση των αντιδράσεων σύνθεσης τους οδηγεί σε σύνθεση πολυμερών μεγάλου μοριακού βάρους με πολλές δομικές ατέλειες. Για τον λόγο αυτό, τα πολυμερή εμφανίζουν δείκτη πολυδιασποράς μεγαλύτερο της μονάδας και ανομοιομορφία διακλαδώσεων και δομής. Σε αντίθεση με τα δενδριμερή, τα υπερδιακλαδισμένα πολυμερή είναι μη-συμμετρικά μακρομόρια με μεγάλη πολυδιασπορά. Οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες είναι ενδιάμεσες με αυτές των δενδριμερών και των γραμμικών πολυμερών [7]. Τέτοια είδη πολυμερικών δομών είναι κυρίως οι πολυσακχαρίτες όπως το γλυκογόνο, οι δεξτράνες και η αμυλοπηκτίνη, οι οποίοι είναι γνωστοί από το 1930 [8].

2.2.1 Σύνθεση και χαρακτηρισμός υπερδιακλαδισμένων πολυμερών

Τα υπερδιακλαδισμένα πολυμερή και τα δενδριμερή εμφανίζουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά, όπως είναι η παρασκευή τους με πρόδρομα μόρια, τα οποία είναι πολυδραστικά. Αυτή η διαδικασία, οδηγεί σε μακρομόρια με μεγάλο βαθμό διακλάδωσης και πολυάριθμες τελικές λειτουργικές ομάδες. Παρ' όλ' αυτά, οι συνθετικές προσεγγίσεις για τα υπερδιακλαδισμένα πολυμερή και τα δενδριμερή

διαφέρουν σημαντικά και συνεπώς είναι σημαντικές οι διαφορές στο σχήμα του μορίου, στην αρχιτεκτονική και, κάποιες φορές, στις ιδιότητες [8].

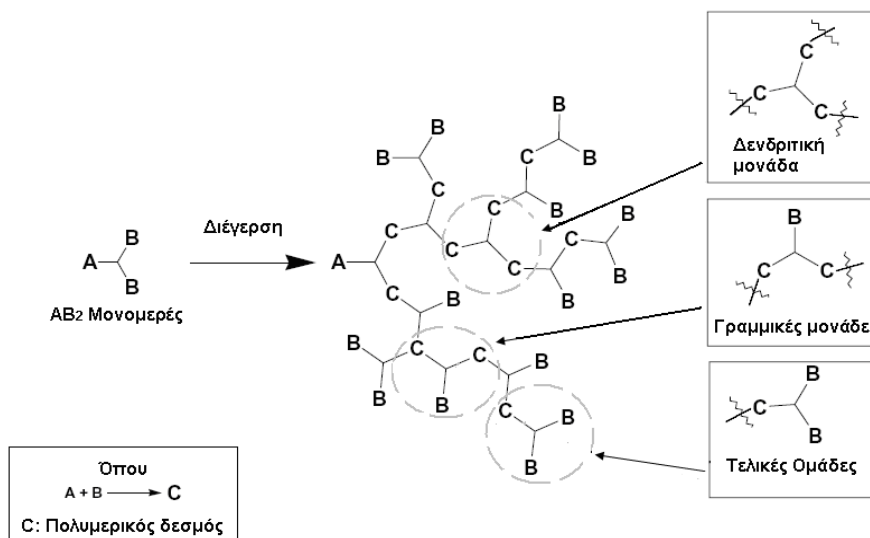
Λόγω της δύσκολης, με πολλά στάδια, πορείας σύνθεσης των δενδριμερών έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων με περιορισμένη διαθεσιμότητα και υψηλό κόστος. Σε αντίθεση με τα δενδριμερή, τα υπερδιακλαδισμένα πολυμερή είναι πιο εύκολο να συντεθούν και έτσι έχουν πολύ χαμηλό κόστος παραγωγής. Για το λόγο αυτό, θεωρούνται ως εναλλακτική πρόταση αντί των δενδριμερών [9, 10] και κερδίζουν συνεχώς το επιστημονικό ενδιαφέρον [11-13].

Από τη δεκαετία του 1940 και συγκεκριμένα από τους Flory και Stockmayer, ξεκίνησαν οι πρώτες απόπειρες για τη σύνθεση υπερδιακλαδισμένων πολυμερών [14]. Αν και οι συνθετικές τους προσπάθειες απέτυχαν, ο Flory προέβλεψε την πιθανότητα δημιουργίας τέτοιων πολυμερών το 1952, προτείνοντας ότι είναι πιθανό να αντιδράσουν μονομερή του τύπου AB_x , όπου $x \geq 2$, και να δημιουργήσουν υπερδιακλαδισμένα πολυμερή μεγάλου μοριακού βάρους.

Δυστυχώς, η έρευνα στον τομέα αυτό δεν απέδωσε έως το 1990 όπου οι Kim και Webster [15] παρουσίασαν τη σύνθεση πλήρως αρωματικών πολυφαινυλίων με τον όρο «υπερδιακλαδισμένα μόρια». Ακολούθησαν την ίδια χρονιά, ο Fréchet και οι συνεργάτες του [16] με τη σύνθεση υπερδιακλαδισμένων πολυαρυλοεστέρων, βασιζόμενοι στο μόριο 3,5-δισ (τριμεθυλοσιλοξυ)-βενζοϋλοχλωρίδιο. Μέχρι σήμερα, υπάρχει πληθώρα δημοσιευμένων άρθρων ανασκόπησης που περιγράφουν τις συνθετικές προσεγγίσεις για την ανάπτυξη υπερδιακλαδισμένων πολυμερών και στα οποία αναφέρονται αναλυτικά οι αντίστοιχες μεθοδολογίες και ο μηχανισμός των αντιδράσεων παρασκευής [8, 17]. Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν συντεθεί πλήθος και ποικιλία μακρομορίων με υπερδιακλαδισμένη τοπολογία, όπως πολυαμίδια [18], πολυαμίνες [19], πολυεστέρες [20], πολυαιθέρες [21], πολυουρεθάνες [22], κ.α.

Αναλυτικά, τα υπερδιακλαδισμένα πολυμερή παρασκευάζονται με αντίδραση ενός σταδίου, κυρίως από την πολυσυμπύκνωση μονομερών τύπου AB_x , ($x \geq 2$), ή μονομερών τύπου (A_2+B_3) . Οι διαδικασίες ενός σταδίου που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή υπερδιακλαδισμένων πολυμερών οδηγούν σε μη ελεγχόμενη στατιστική ανάπτυξη. Ως εκ τούτου, οι δομές που προκύπτουν δεν είναι τέλειες δομικά και έχουν δείκτη πολυδιασποράς μεγαλύτερο της μονάδας. Επίσης, σε αντίθεση με τα δενδριμερή, ο έλεγχος του μοριακού βάρους, είναι δύσκολος. Λόγω της στατιστικής φύσης των σταδίων σύζευξης, της στερεοχημικής παρεμπόδισης των

αναπτυσσόμενων αλυσίδων και της δραστηρότητας των λειτουργικών ομάδων, η ανάπτυξη του μακρομορίου οδηγεί στο σχηματισμό δύο ειδών επαναλαμβανόμενων μονάδων (repeating units), των δενδριτικών και των γραμμικών (Εικόνα 2.4) [8, 17].



Εικόνα 2.4: Υπερδιακλαδισμένο πολυμερές που προέκυψε από τον πολυμερισμό μονομερών τύπου AB_2 , όπου σημειώνονται τα διαφορετικά είδη επαναλαμβανόμενων μονάδων [17].

Οι γραμμικές μονάδες που καλούνται «ελαττώματα» (defects) έχουν μια δραστική ομάδα B, η οποία δεν έχει αντιδράσει περαιτέρω, ενώ οι τελικές μονάδες έχουν δύο ομάδες B. Όπως και στα δενδριμερή, τα δενδριτικά τμήματα στα υπερδιακλαδισμένα μακρομόρια είναι μονομερή που έχουν αντιδράσει πλήρως και συνεπώς, δεν έχουν δραστικές ομάδες. Έτσι, σημαντικό χαρακτηριστικό των υπερδιακλαδισμένων πολυμερών είναι ο βαθμός διακλάδωσης ή συντελεστής διακλάδωσης (degree of branching, DB), που ορίζεται από την αναλογία δενδριτικών, τελικών και γραμμικών μονάδων στη δενδριτική δομή. Ο βαθμός διακλάδωσης ενός τέλει δενδριμερούς ισούται με 1 και αποτελεί κριτήριο της «τελειότητας» του [23], ενώ ένα γραμμικό πολυμερές έχει βαθμό διακλάδωσης 0 [8]. Τα υπερδιακλαδισμένα πολυμερή έχουν βαθμούς που κυμαίνεται ανάμεσα στο 0.50 και το 0.85, ανάλογα με το είδος του μονομερούς που χρησιμοποιείται.

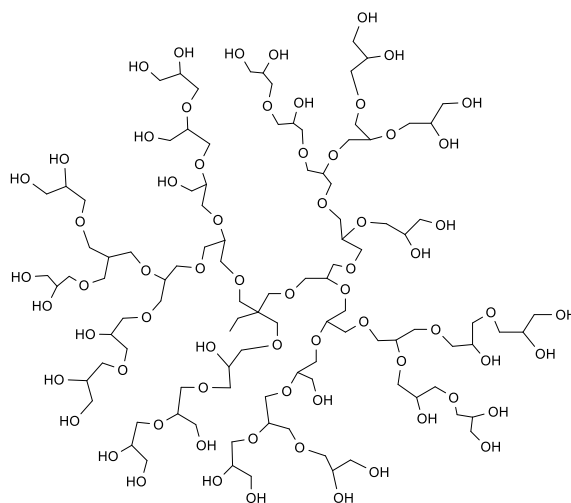
Έχουν προταθεί δύο ορισμοί για το μέσο βαθμό διακλάδωσης [8]. Ο πρώτος [24] προκύπτει ως ο λόγος του αθροίσματος των δενδριτικών (D) και τελικών (T) επαναλαμβανόμενων τμημάτων προς το άθροισμα όλων των επαναλαμβανόμενων τμημάτων της δομής:

$$DB = \frac{I_T + I_D}{I_T + I_D + I_L}$$

όπου D, T και L είναι ο αριθμός των δενδριτικών, τελικών και γραμμικών τμημάτων ανά μόριο. Ο δεύτερος ορισμός [25] δεν περιλαμβάνει τις τελικές επαναλαμβανόμενες μονάδες και θεωρείται πιο ακριβής σε σχέση με τον πρώτο για μακρομόρια με χαμηλό μοριακό βάρος [8]:

$$DB = \frac{2D}{2D + L}, \text{ αφού } D_{\max} = D + (1/2)L$$

Κάποιες από τις πλέον διαδεδομένες δενδριτικές δομές που σήμερα μελετώνται εκτενώς από την ερευνητική κοινότητα είναι οι υπερδιακλαδισμένες πολυαιθυλενιμίνες (PEI) και οι υπερδιακλαδισμένες πολυγλυκερόλες (PG) που διαθέτουν ένα πολυαιθερικό σκελετό όπως φαίνονται στην ακόλουθη Εικόνα 2.5.

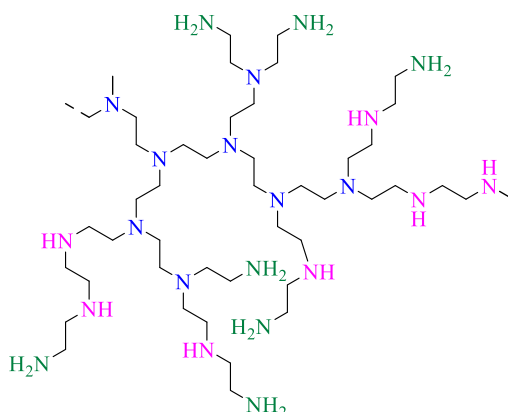


Εικόνα 2.5: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της υπερδιακλαδισμένης πολυγλυκερόλης.

2.3 Υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη

Η υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη (PEI) αποτελεί ένα τυπικό παράδειγμα δενδριτικών πολυμερών. Το συγκεκριμένο πολυμερές είναι μια αλειφατική πολυαμίνη με πολλές τελικές λειτουργικές ομάδες (Εικόνα 2.6). Η PEI είναι ένα

κατιονικό πολυμερές που παρουσιάζει τη μέγιστη πυκνότητα θετικού φορτίου όταν πρωτονιωθεί σε υδατικό διάλυμα.

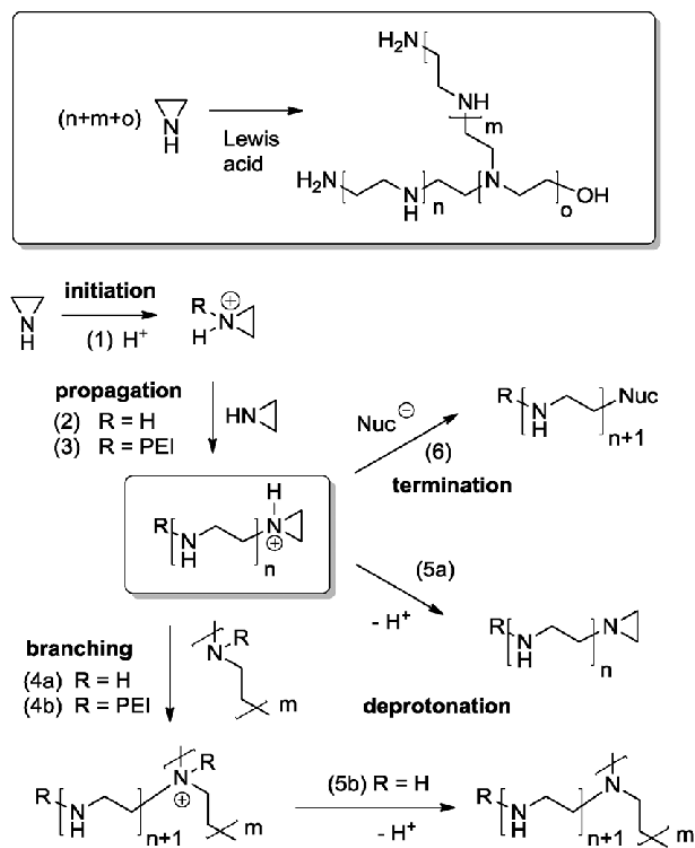


Εικόνα 2.6: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης.

Η εμπορικά διαθέσιμη υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη (PEI) είναι ένα χαμηλού κόστους, μη συμμετρικό και υψηλά διακλαδισμένο πολυμερές, διαθέσιμο σε πολλά μοριακά βάρη (MB:600-750.000). Χαρακτηρίζεται από την παρουσία πρώτο-, δεύτερο- και τρίτο-ταγών αμινών στις πολυμερικές αλυσίδες με περίπου αντίστοιχη μεταξύ τους αναλογία (1:1.2:1) (Εικόνα 2.6) [26, 27]. Έχει βαθμό διακλάδωσης ~65% και μια σχετικώς στενή πολυδιασπορά (polydispersity) της τάξης του 1.3 για την PEI με MB=5.000 και του 2.5 για την PEI με MB=25.000.

Η υπερδιακλαδισμένη PEI λαμβάνεται από τον κατιονικό πολυμερισμό της αζιριδίνης, είτε σε υδατικό ή αλκοολικό διάλυμα με θέρμανση, είτε απουσία διαλυτών σε χαμηλή θερμοκρασία, ακολουθώντας την πορεία αντιδράσεων έναρξης, προόδου και δημιουργίας διακλαδώσεων, όπως απεικονίζονται στην Εικόνα 2.7. Ο βαθμός διακλάδωσης και το μοριακό βάρος καθορίζονται από την διάρκεια της σύνθεσης [28-30]. Αναλυτικότερα, όταν ο πολυμερισμός λαμβάνει χώρα απουσία διαλυτών, σε πρώτο στάδιο ξεκινά, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.7, με ηλεκτρονιόφιλη προσβολή ενός κατά Lewis οξέος (ή πρωτονίων) στην αζιριδίνη (1). Το παραγόμενο ιόν του αζιριδινίου εύκολα προσβάλλεται από μια νουκλεόφιλη ομάδα με αποτέλεσμα το άνοιγμα του δακτυλίου του. Στην περίπτωση που ως νουκλεόφιλο είναι η αζιριδίνη το προκύπτον προϊόν περιέχει μια δευτεροταγή αμινομάδα και μια νέα ομάδα αζιριδινίου στο άλλο άκρο (2). Η πολλαπλή διαδοχική προσβολή της αζιριδίνης έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας γραμμικής μονάδας (3). Ωστόσο, οι δευτεροταγείς (και τριτοταγείς) αμινομάδες που παράγονται κατά τον πολυμερισμό

μπορούν να αντιδράσουν και δώσουν τις διακλαδισμένες δομές (4 α,β). Επίσης, πρωτόνια που παράγονται κατά την αποπρωτονίωση (5 α,β) είναι δυνατόν να ξαναπροσβάλλουν ένα νέο μόριο αζιριδίνης και να ξεκινήσει ένας νέος κύκλος πολυμερισμού. Τέλος, ο πολυμερισμός τερματίζεται με την προσβολή από μια νουκλεόφιλη ένωση, π.χ. με την προσθήκη νερού ή μεθανόλης (6).



Εικόνα 2.7: Σχηματική αναπαράσταση του πολυμερισμού της αζιριδίνης (πάνω μέρος) και του μηχανισμού του κατιονικού πολυμερισμού της αζιριδίνης (κάτω μέρος) [30].

Η ύπαρξη των αμινομάδων στο μόριο της PEI εκτός από τον έντονα βασικό χαρακτήρα που της προσδίδει, την καθιστά και ιδιαίτερα υδρόφιλο μόριο. Επίσης, εξαιτίας του μεγάλου αριθμού δραστικών ομάδων στις άκρες του μορίου (end groups), ένα σε κάθε άκρη μιας διακλάδωσης, τα υλικά αυτά εμφανίζουν εξαιρετική δραστηριότητα (functionality). Ένα άλλο πλεονέκτημα που έχουν τα υλικά αυτά είναι ότι εμφανίζουν μεγάλη διαλυτότητα όχι μόνο στο νερό, αλλά και σε ένα μεγάλο αριθμό οργανικών διαλυτών. Συνεπώς, λόγω των παραπάνω ιδιοτήτων, αλλά και της σταθερότητας που επιδεικνύει, η πολυαιθυλενιμίνη χρησιμοποιείται σε πολλές εφαρμογές. Για παράδειγμα, η PEI και τα παράγωγα της έχουν χρησιμοποιηθεί όχι μόνο για διάφορους βιομηχανικούς σκοπούς, π.χ., ως παράγοντες διασποράς [31],

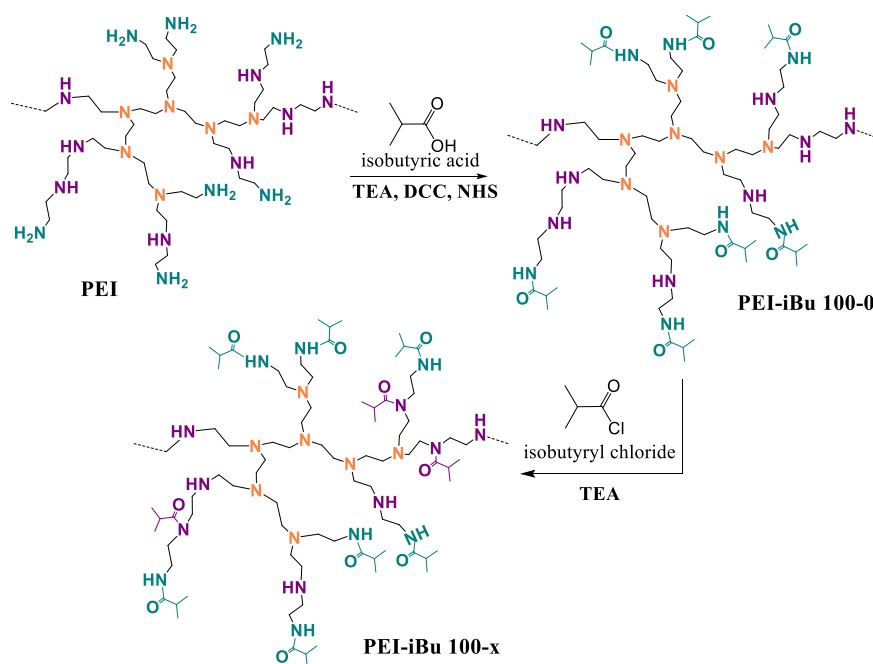
σταθεροποιητές διασποράς [32, 33], ροφητές διοξειδίου του άνθρακα [34], στην παραγωγή μεμβρανών για καθαρισμό νερού [35, 36] κα., αλλά και σε διάφορες εφαρμογές της βιοϊατρικής και της βιοτεχνολογίας [37-39], όπως ως φορείς φαρμάκων [40-42] και γονιδιακού υλικού [43-47], υλικά για βιο-απεικόνιση [48], αντιβακτηριακά υλικά [49, 50], κ.α.. Επιπλέον, τα παράγωγα της PEI έχουν χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη πολλών συστημάτων, όπως κβαντικών τελειών [51], νανοτελειών άνθρακα [52], καταλυτών [53, 54], νανοσωματίδια τύπου πυρήνα-κελύφους [55] κ.α..

2.3.1 Παράγωγα υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης ως φορείς φαρμάκων

Όπως προαναφέρθηκε, τα τελευταία χρόνια η υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη (PEI) έχει μελετηθεί ως φορέας μεταφοράς φαρμάκων κυρίως λόγω των δομικών της χαρακτηριστικών, εκ των οποίων τα κυριότερα είναι η ύπαρξη νανοκοιλοτήτων στο μόριο της και η παρουσία πολλών λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια του μορίου της. Γενικά, οι νανοκοιλότητες των υπερδιακλαδισμένων πολυμερών μπορούν να εγκλείσουν ποικιλία μορίων, συμπεριλαμβανομένων δραστικών ενώσεων, ενώ οι επιφανειακές ομάδες μπορεί να τροποποιηθούν κατάλληλα προδίνοντας τους πολυλειτουργικό χαρακτήρα [56-60]. Έτσι η PEI είναι δυνατόν να εγκλείσει αδιάλυτες ή ελάχιστα διαλυτές ουσίες π.χ. φάρμακα, στον εσωτερικό της και να δώσει δένδριτικούς νανοφορείς που να εμφανίζουν την ικανότητα βελτιωμένης βιοδιαθεσιμότητας δυσδιάλυτων φαρμάκων. Επιπλέον, η PEI έχει τη δυνατότητα πολλαπλής τροποποίησης με κατάλληλες λειτουργικές ομάδες, δίνοντας νανοφορείς με ικανότητα στόχευσης, σταθερότητας στο βιολογικό περιβάλλον, ικανότητα διελεύσεως δια μέσου των κυτταρικών μεμβρανών καθώς και ικανότητα εντοπισμού εντός του κυττάρου.

Θερμοευαίσθητα παράγωγα της PEI με ισοβουτυλαμιδικές ομάδες παρασκευάστηκαν (Εικόνα 2.8) με διάφορους βαθμούς υποκατάστασης με θερμοκρασίας μετάβασης T_c στους 38-39 °C [61]. Στα παράγωγα αυτά εγκλείστηκε το αντικαρκινικό φάρμακο δοξορουβικίνη (DOX) και μελετήθηκε τόσο η πρόσληψη όσο και η αντικαρκινική δράση του εγκλεισμένου φαρμάκου από τα καρκινικά κύτταρα της κυτταρικής σειράς MCF-7 σε θερμοκρασία αντίστοιχη με αυτή που χρησιμοποιείται για θεραπεία καρκινικών ιστών με τοπική ήπια υπερθερμία (40–41 °C). Βρέθηκε ότι ενώ τα θερμοευαίσθητα παράγωγα της PEI δεν έδειξαν αξιοσημείωτη τοξικότητα κάτω και

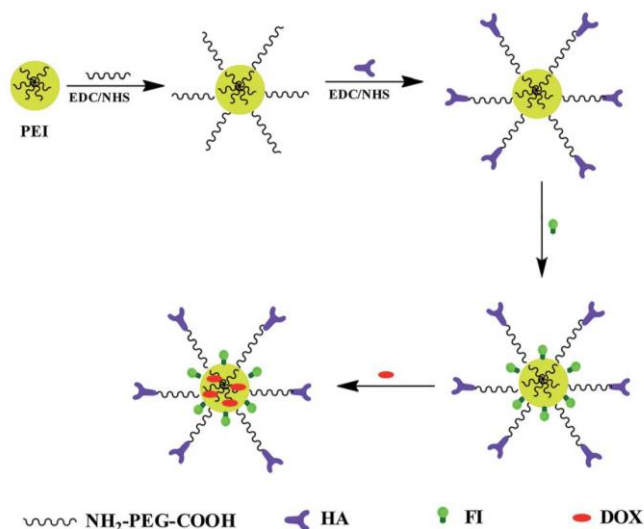
πάνω από τη θερμοκρασία μετάβασης (40 °C), η εγκλεισμένη DOX παρουσίασε αυξημένη κυτταρική απορρόφηση, καθώς και καλύτερη αντικαρκινική δράση στους 40 °C. Έτσι, τα θερμοευαίσθητα αυτά παράγωγα βρέθηκε ότι είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν ως ελπιδοφόροι φορείς φαρμάκων, ικανών να εφαρμοστούν ως χημειοθεραπευτική αγωγή συνδυαζόμενη με ήπια υπερθερμία για την αντιμετώπιση του καρκίνου.



Εικόνα 2.8: Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας των παραγώγων της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης που φέρουν ισοβουτυλαμιδικές ομάδες με διάφορους βαθμούς υποκατάστασης [61].

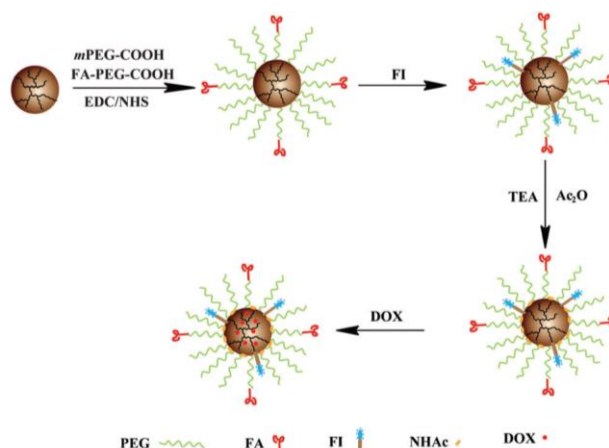
Ο Chen και οι συνεργάτες του [62] συνέθεσαν ένα υλικό με βάση την PEI έχοντας σκοπό την δημιουργία ενός νανοϋλικού, το οποίο να βελτιώνει την υδατοδιαλυτότητα του αντικαρκινικού φαρμάκου και να επιτρέπει τη στοχευμένη αποδέσμευση του φαρμάκου σε καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιώντας υποδοχείς. Αναλυτικά, τροποποίησαν την PEI με αλυσίδες πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG), υαλουρονικό οξύ (HA) και ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FI). Στην συνέχεια, στο παραπάνω νανοϋλικό PEI-FI-(PEG-HA) εγκλείστηκε η DOX, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.9 και διαπίστωσαν πως το υλικό αυτό μπορεί να εγκλείσει ~19 μόρια DOX. Παράλληλα, φάνηκε ότι από το σύστημα PEI-FI-(PEG-HA)/DOX απελευθερώνεται το φάρμακο με τρόπο εξαρτώμενο του pH και συγκεκριμένα παρατήρησαν υψηλότερο ρυθμό απελευθέρωσης της DOX σε όξινο pH από ότι σε φυσιολογικού pH. Επιπλέον, το PEI-FI-(PEG-HA)/DOX είναι σε θέση να στοχεύει καρκινικά

κύτταρα, τα οποία υπερεκφράζουν τους CD44 υποδοχείς, εμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη τους.



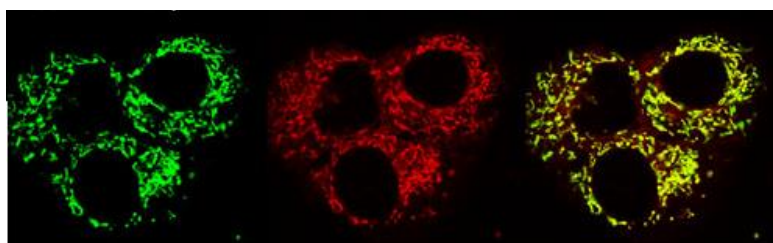
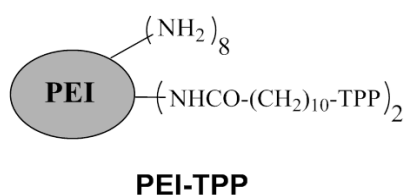
Εικόνα 2.9: Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας του συστήματος PEI-FI-(PEG-HA)/DOX [62].

Αντίστοιχη μελέτη πραγματοποιήσε και ο Zhou με τους συνεργάτες του [41], όπου ανέπτυξαν ένα νανοφορέα με βάση την PEI με σκοπό να εγκλείσει το αντικαρκινικό φάρμακο DOX για *in vitro* και *in vivo* στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.10, συνέθεσαν ένα διακλαδισμένο παράγωγο της PEI, το οποίο διαδοχικά τροποποιείται με αλυσίδες πολυαιθυλενογλυκόλης (mPEG), φυλλικό οξύ (FA) και ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FI). Ακολούθησε ακετυλίωση των αμινών, που δεν είχαν αντιδράσει, στην επιφάνεια της PEI, δίνοντας το τελικό προϊόν PEI (FA-mPEI), στο οποίο στη συνέχεια εγκλείστηκε η δοξορουβικίνη. Βρέθηκε ότι το παράγωγο της PEI μπορεί να εγκλείσει 6.9 μόρια DOX. Επιπλέον, διαπίστωσαν πως το σύστημα FA-mPEI/DOX διασπείρεται καλά στο νερό και μπορεί να αποδεσμεύσει το φάρμακο με τρόπο εξαρτώμενο του pH. Συγκεκριμένα, σε όξινο pH παρατήρησαν την μεγαλύτερη αποδέσμευση του φαρμάκου. Τέλος απέδειξαν ότι λόγω της καλής θεραπευτικής ικανότητας τόσο σε καρκινικά κύτταρα όσο και σε όγκους, αλλά και λόγω της βιοσυμβατότητας του παραπάνω συστήματος, το καθιστά ικανό να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω για στοχευμένη χημειοθεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου.



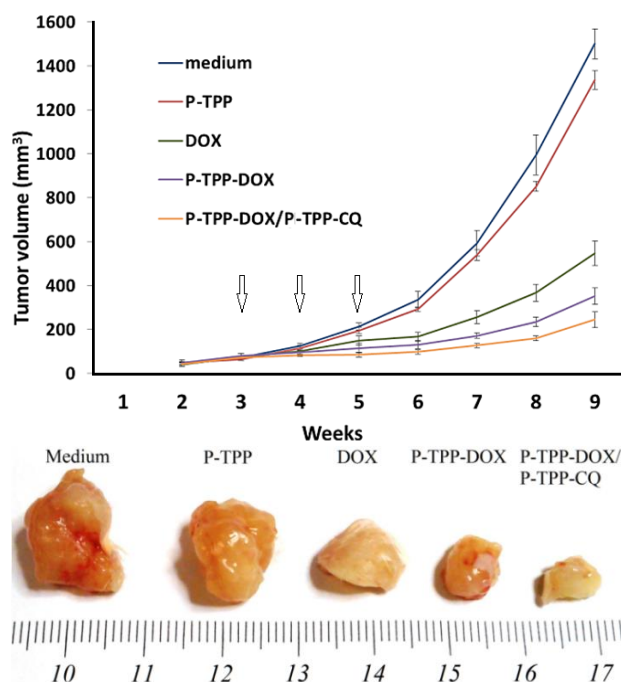
Εικόνα 2.10: Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας του συστήματος FA-mPEI/DOX [41].

Σε μια άλλη μελέτη, στις πρωτοταγείς τελικές αμινομάδες της PEI με μοριακό βάρος 1300 Da εισήχθηκαν τριφαινυλοφωσφονικές ομάδες (TPP) μέσω λιπόφιλης αλυσίδας [63] (Εικόνα 2.11). Το προκύπτον παράγωγο PEI-TPP ήταν αδιάλυτο στο νερό, αλλά είχε την ιδιότητα να σχηματίζει σταθερές διασπορές κολλοειδών διαστάσεων μέσα σε υδατικό μέσο, όπως π.χ. ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Στα νανοσωματίδια αυτά, εγκλείστηκε το αντικαρκινικό φάρμακο δοξορουβικίνη (DOX) και χορηγήθηκαν σε καρκινικά κύτταρα DU145. Με μικροσκοπία φθορισμού γίνεται φανερό ότι η εγκλεισμένη DOX συσσωρεύεται στα μιτοχόνδρια (Εικόνα 2.11), ενώ ταυτόχρονα επάγει κυτταρικό θάνατο αν και χορηγείται σε συγκεντρώσεις στις οποίες η μη εγκλεισμένη DOX είναι ελάχιστα μόνο κυτταροτοξική.



Εικόνα 2.11: Ενδοκυττάριος εντοπισμός των PEI-TPP που περιείχαν εγκλεισμένη DOX (PEI-TPP-DOX) με συνεστιακή μικροσκοπία σε καρκινικά κύτταρα DU145, τα οποία έχουν επωαστεί με 200 nM MitoTracker® Green FM για 15 min (αριστερά) και 250 nM PEI-TPP-DOX (μεσαία εικόνα) για 3 h, καθώς και ο συνδυασμός των δύο εικόνων που δείχνουν τον συνεντοπισμό των δύο χρώσεων [63].

Γενικά, τα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων που στοχεύουν τα υποκυτταρικά οργανίδια, όπως είναι τα μιτοχόνδρια, θεωρείται ότι έχουν μεγαλύτερη ικανότητα στην θεραπεία διαταραχών που σχετίζονται με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία ή τον καρκίνο κ.α.. Ο Τσιούρβας και οι συνεργάτες του [64], ανέπτυξαν ένα νέο υπερδιακλαδισμένο νανοφορέα που στοχεύει τα μιτοχόνδρια με σκοπό την αποτελεσματική μεταφορά δύο διαφορετικών βιοδραστικών ενώσεων. Συγκεκριμένα, ο νανοφορέας PEI(1300)-TPP(C10) βασίζεται στην υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη (PEI) που φέρει ομάδες τριφαινυλοφωσφονίου (TPP), ο οποίος σχηματίζει νανοσωματίδια διαμέτρου ~100 nm σε υδατικά μέσα. Ο νανοφορέας αυτός μπορεί να συνεγκλείσει το αντικαρκινικό φάρμακο της DOX αλλά και την χλωροκίνη (CQ), ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται ως χημειο-ευαισθητοποιητής. Αξιολόγησαν την αντικαρκινική δράση του παραγώγου σε δύο ανθρώπινες κυτταρικές σειρές αδενοκαρκινώματος προστάτη, οι οποίες είναι ανθεκτικές στην DOX και έκαναν *in vivo* μελέτη σε SCID (severe combined immunodeficiency mice) μύες ηλικίας έξι εβδομάδων, τα οποία είχαν εμβολιαστεί με καρκινικά κύτταρα DU145 του προστάτη. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.12, απέδειξαν ότι η συγχορήγηση της DOX και της CQ αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις DOX (0.25 μ M) λόγω του ότι η εγκλεισμένη DOX εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων, ενώ η εγκλεισμένη CQ δεν παρεμποδίζει την πορεία της. Η συγχορήγηση των εγκλεισμένων φαρμάκων DOX και CQ έδειξαν να έχουν την σημαντικότερη επίδραση στην ανάπτυξη του όγκου σε σχέση με την ελεύθερη και την εγκλεισμένη DOX. Συγκεκριμένα, οι όγκοι σε ζώα που δεν έλαβαν αγωγή και σε ζώα που υποβλήθηκαν σε αγωγή με τα νανοσωματίδια έφτασαν στο μέγιστο εκθετικής ανάπτυξης (Εικόνα 2.12, άνω τμήμα). Συγκριτικά, η ανάπτυξη των όγκων σε ζώα που υποβλήθηκαν σε αγωγή με DOX ήταν μειωμένη, ενώ τα ζώα που υποβλήθηκαν σε αγωγή με PEI(1300)-TPP(C10)-DOX και PEI(1300)-TPP(C10)-DOX/PEI(1300)-TPP(C10)-CQ παρουσίασαν τη μεγαλύτερη μείωση στην ανάπτυξη του όγκου (Εικόνα 2.12, κάτω τμήμα). Ειδικότερα, κατά τη διάρκεια της περιόδου χορήγησης της αγωγής τριών εβδομάδων, παρατηρήθηκε πλήρης διακοπή της ανάπτυξης του όγκου για τους μύες, στους οποίους χορηγήθηκαν PEI-TPP-DOX/PEI-TPP-CQ (Εικόνα 2.12, κάτω τμήμα).



Εικόνα 2.12: Διαγραμματική απεικόνιση της ανάπτυξης του καρκινικού όγκου των καρκινικών κυττάρων DU145 σε SCID μύες με χορήγηση ελεύθερης DOX, νανοσωματιδίων PEI(1300)-TPP(C10), εγκλεισμένης DOX στα νανοσωματίδια PEI(1300)-TPP(C10) και του συγχρηγομένου συστήματος PEI(1300)-TPP(C10)-DOX/PEI(1300)-TPP(C10)-CQ [64].

Σε συνέχεια της ανωτέρω εργασίας, η Stagni και οι συνεργάτες της [65], μελέτησαν την επίδραση τόσο των νανοσωματιδίων PEI(1300)-TPP(C10) όσο και της εγκλεισμένης CQ στα νανοσωματίδια, σε καρκινικά κύτταρα μαστού, τα οποία καλλιεργήθηκαν είτε σε 1D καλλιέργεια ως προσφυόμενα είτε σε 3D καλλιέργεια σε μορφή σφαιριδίων (mammospheres) ως προσομοίωση των καρκινικών βλαστοκυττάρων του μαστού. Είναι γνωστό ότι η αυτοφαγία παίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση και επιβίωση των καρκινικών βλαστοκυττάρων. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η ικανότητα της εγκλεισμένης χλωροκίνης, η οποία είναι γνωστός αναστολέας της αυτοφαγίας, στην αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών βλαστοκυττάρων του μαστού. Βρέθηκε ότι τόσο τα νανοσωματίδια όσο και η χλωροκίνη μετά από τον εγκλεισμό της σε αυτά εμφάνισε σημαντική κυτταροτοξικότητα, η οποία πιθανότατα οφείλεται στην μεταβολή της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Σημαντικό είναι ότι οι mammospheres ήταν επιλεκτικά ευαίσθητες στην εγκλεισμένη χλωροκίνη και η ευαισθησία αυτή βρέθηκε ότι εξαρτάται από την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την ATM κινάση, ενός ενζύμου το οποίο λειτουργεί ως βασικός διαμεσολαβητής επιτρέποντας την ανάπτυξη των καρκινικών βλαστοκυττάρων μέσω της ρύθμισης της αυτοφαγίας. Επιπλέον,

παρατηρήθηκε ότι αυτή η ATM-εξαρτώμενη ευαισθησία των mammospheres στην εγκλεισμένη χλωροκίνη ήταν ανεξάρτητη από το γονίδιο καταστολής όγκων p53. Με βάση τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι η σημαντική αυτή ευπάθεια των ATM-ενεργών καρκινικών βλαστοκυττάρων του μαστού, τα οποία είναι κατά τα άλλα ανθεκτικά σε εξαιρετικά ενεργούς βιολογικούς αναστολείς, ανοίγει μια νέα οδό για παρεμβολή στη βιωσιμότητα των καρκινικών βλαστοκυττάρων του μαστού χωρίς να παρεμβαίνει στους βασικούς μηχανισμούς συντήρησης του ανθρώπινου γονιδιώματος. Επιπλέον, η ATM χαρακτηρίζεται ως υποψήφιος βιοδείκτης για τη θεραπεία αδρανών όγκων μαστού με εγκλεισμένη χλωροκίνη στα νανοσωματίδια PEI(1300)-TPP(C10).

2.3.2 Παράγωγα υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης ως αντιβακτηριακά υλικά

Ακόμα μια σημαντική εφαρμογή των δενδριτικών πολυμερών αποτελεί η χρήση τους ως αντιβακτηριδιακά υλικά. Η υψηλή συγκέντρωση λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια τους, οι οποίες μπορούν κατάλληλα να τροποποιηθούν, είναι δυνατόν να δώσουν υλικά με αντιβακτηριδιακές ιδιότητες. Επίσης, τα δενδριτικά πολυμερή, τα οποία έχουν υψηλή πυκνότητα θετικού φορτίου, αλληλεπιδρούν ισχυρά με τη μεμβράνη των βακτηρίων, που είναι αρνητικά φορτισμένη, μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και άλλων δυνάμεων, καθιστώντας τα πολύ αποτελεσματικά. Η αντιβακτηριδιακή δράση του δενδριτικού πολυμερούς μπορεί να οφείλεται είτε στην πρόσδεση κάποιας αντιβακτηριδιακής ουσίας είτε μπορεί το ίδιο το πολυμερές να έχει αντιβακτηριδιακές ιδιότητες λόγω των δραστικών ομάδων του [66].

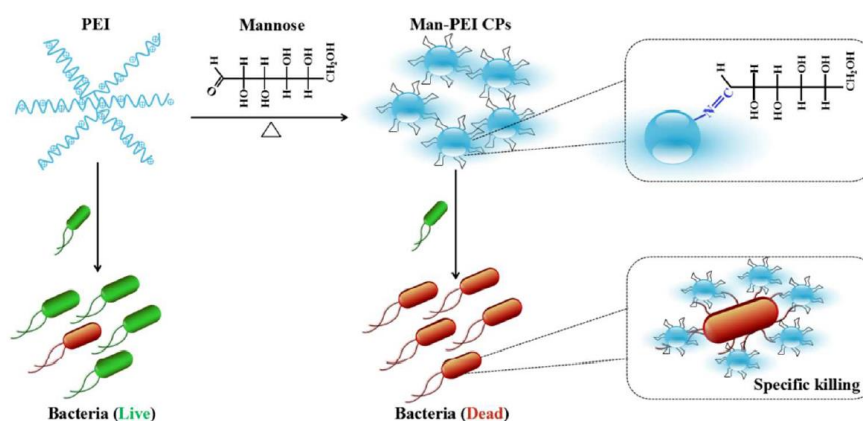
Ειδικά, μεγάλο ενδιαφέρον έχει δοθεί στη μελέτη παραγώγων πολυαιθυλενιμίνης (PEI) ως αντιβακτηριδιακά υλικά. Έτσι, μελετήθηκε η επίδραση του πολυκατιοντικού μορίου της PEI στη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης των αρνητικών κατά gram βακτηρίων χρησιμοποιώντας διάφορα βακτήρια όπως *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Salmonella typhimurium* [67]. Σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από 20 $\mu\text{g/mL}$, η PEI μπόρεσε να κάνει πιο περατή την εξωτερική κυτταρική μεμβράνη και να αυξάνει τη βακτηριακή πρόσληψη της N-φαινυλοναφθυλαμίνης, η οποία είναι μια υδρόφοβη φθορίζουσα ουσία, η οποία σε υδρόφοβο περιβάλλον έχει μεγάλη κβαντική απόδοση. Η δράση της PEI ήταν συγκρίσιμη με αυτή του αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA), το οποίο είναι γνωστό για την ιδιότητά του να διαπερνά τις μεμβράνες των βακτηρίων. Επιπλέον,

βρέθηκε ότι παρουσία της PEI αυξάνεται σημαντικά η ευαισθησία όλων των υπό δοκιμή βακτηρίων σε σχέση με τα υδρόφοβα αντιβιοτικά, όπως είναι η κλινδαμυκίνη, ερυθρομυκίνη, φουσιδικό οξύ, νοβομπιοκίνη και ριφαμικίνη, τα οποία δεν είναι άμεσα βακτηριοκτόνα. Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι παρουσία του απορρυπαντικού δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο (SDS) αυξήθηκε η ικανότητα λύσης των κυττάρων των βακτηρίων, τα οποία αρχικά επώαστηκαν παρουσία της PEI. Επομένως, η PEI μπορεί να προκαλέσει αύξηση της διαπερατότητας των μεμβρανών στα αρνητικά κατά gram βακτήρια [67].

Σε μια άλλη μελέτη, εκτιμήθηκαν οι αντιβακτηριδιακές ιδιότητες παραγώγων της πολυαιθυλενιμίνης που έχει τροποποιηθεί με τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα (QA-PEI). Συντέθηκαν νανοσωματίδια του QA-PEI με δύο συνθετικές μεθόδους, την αναγωγική αμίνωση και τη N-αλκυλίωση. Παρατηρήθηκε πως τα νανοσωματίδια του QA-PEI αναστέλλουν τη βακτηριακή ανάπτυξη (10^6 βακτηριακά κύτταρα) τόσο των θετικών κατά gram βακτηρίων (*Staphylococcus aureus* στα 80 $\mu\text{g/mL}$ QA-PEI) όσο και των αρνητικών κατά gram βακτηρίων (*Escherichia coli* στα 360 $\mu\text{g/mL}$ QA-PEI). Συνεπώς τα πολυκατιοντικά δένδριτικά πολυμερή που φέρουν τεταρτοταγείς ομάδες αμμωνίου είναι ικανά να αναστείλουν τη βακτηριακή ανάπτυξη και έτσι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ιατρικά προϊόντα, που απαιτείται να έχουν αντιβακτηριδιακές ιδιότητες [68].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η πολυαιθυλενιμίνη (PEI) παρουσιάζει σημαντική αντιβακτηριακή δράση, κατά των βακτηρίων *S. aureus* (gram (+)) και *E. coli* (gram (-)), αλλά όμως είναι γνωστό ότι εμφανίζει σημαντική τοξικότητα έναντι των ευκαρυωτικών κύτταρων. Έτσι, ο Liu και οι συνεργάτες της [69], θέλοντας να μειώσουν την τοξικότητα που εμφανίζει η PEI αλλά και να βελτιώσουν την δραστηριότητά της ως προς τα βακτήρια *E. coli* τροποποίησαν την PEI με ομάδες D-μαννόζης. Συγκεκριμένα οι πρωτοταγές αμίνες του πολυμερούς αντέδρασαν με την αλδεϋδομάδα της μαννόζης μέσω μιας πυρηνόφιλης υποκατάστασης, δίνοντας το παράγωγο Man-PEI CP, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.13. Η ομάδα της D-μαννόζης χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να βελτιώσει τη πρόσληψη της PEI από τα βακτήρια, αλλά και να μειώσει την τοξικότητά της. Απέδειξαν λοιπόν ότι, το παράγωγο Man-PEI CP εμφάνισε ισχυρότερη αντιβακτηριακή δράση έναντι των βακτηρίων *E. coli* (ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση ίση με 10 $\mu\text{g/mL}$) σε σχέση με την αρχική PEI (ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση ίση με 220 $\mu\text{g/mL}$). Μελετώντας τον αντιβακτηριακό μηχανισμό απέδειξαν πως, η ενίσχυση της αντιβακτηριακής δράσης

του Man-PEI CP, οφείλεται στη παρουσία της μαννόζης, η οποία είναι γνωστό ότι δεσμεύεται από την λεκτίνη FimH, μια γλυκοπρωτεΐνη που βρίσκεται στην άκρη των κροσσών, δηλαδή των πρωτεϊνικών τριχοειδών εξαρτημάτων της επιφάνειας των βακτηρίων *E. coli*. Αποτέλεσμα αυτού είναι η PEI να προσκολλάται αποτελεσματικότερα στα βακτήρια και λόγω της αλληλεπίδρασης των θετικά φορτισμένων ομάδων της με τις αρνητικές ομάδες του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων, να προκαλείται καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος, διαρροή των συστατικών του κυτταροπλάσματος και ως εκ τούτου να οδηγούνται τα βακτήρια στο θάνατο. Επιπλέον, βρέθηκε ότι το παράγωγο Man-PEI CP εμφανίζει μειωμένη τοξικότητα και εξαιρετική βιοσυμβατότητα. Συνεπώς, με βάση τα παραπάνω, το παράγωγο Man-PEI CP είναι ένα νέο ελπιδοφόρο αντιμικροβιακό νανοϋλικό ικανό να χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη βακτηριακών λοιμώξεων και ειδικότερα κατά των βακτηρίων *E. coli*.



Εικόνα 2.13: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης του παραγώγου και η επίδραση του στα *E. coli* βακτήρια [69].

2.4 Διαμεμβρανικοί μεταφορείς

Είναι γνωστό ότι οι βιολογικές μεμβράνες είναι ικανές να εμποδίζουν την είσοδο ανεπιθύμητων ουσιών στο κύτταρο μέσω μηχανισμών διάχυσης. Ωστόσο αρκετοί οργανισμοί, όπως οι ιοί, έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που επιτρέπουν την είσοδό τους στο κύτταρο, παρακάμπτοντας έτσι το βιολογικό αυτό φράγμα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα της κατηγορίας αυτής αποτελούν το πεπτιδίο Tat₄₉₋₅₇ του ιού HIV-1 και η πρωτεΐνη VP22 του ιού HSV-1. Η μελέτη των πρωτεϊνών αυτών απέδειξε την ικανότητά τους να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες. Η ανακάλυψη των πεπτιδίων αυτών ήταν ιδιαίτερα σημαντική καθώς θα μπορούσαν να

χρησιμοποιηθούν ως μέσα για την μεταφορά βιοδραστικών ουσιών (π.χ. φαρμακευτικές ουσίες) στο εσωτερικό των κυττάρων [70, 71].

Στα επόμενα χρόνια, ανακαλύφθηκαν πληθώρα πεπτιδίων τα οποία διαπερνούν την μεμβράνη των κυττάρων [72, 73]. Τα πεπτίδια χωρίζονται σε τρεις βασικές κατηγορίες, τα φυσικά, αυτά που προκύπτουν έπειτα από σύνθεση και εκείνα που προέρχονται από συνδυασμό φυσικών πεπτιδίων. Με βάση τον Πίνακα 2.1 και την ακολουθία των αμινοξέων στα πεπτίδια, παρατηρείται ότι τα πεπτίδια αποτελούνται κυρίως από βασικά αμινοξέα και συγκεκριμένα την L-αργινίνη.

Πίνακας 2.1: Τα κυριότερα πεπτίδια που εμφανίζουν την ιδιότητα να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες.

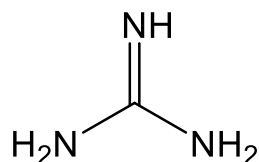
Πεπτίδια που διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες	Ακολουθία αμινοξέων
Tat (49-57)	RKKRRQRRR
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK
Οκταμερές Αργινίνης	RRRRRRRR
VP22	DAATATRGRSAASRPTEPRAPARSASRRVD
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRV

2.4.1 Δενδριτικοί διαμεμβρανικοί μεταφορείς

Η L-αργινίνη είναι ένα αμινοξύ που παίζει ουσιαστικό ρόλο σε αρκετές βιολογικές λειτουργίες. Αποτελεί ένα εκ των ενδιαμέσων προϊόντων του κύκλου του μεταβολισμού των αμινοξέων στα κύτταρα. Επιπλέον, η παρουσία της σε αυτά ενεργοποιεί διάφορα ένζυμα όπως η συνθάση του οξειδίου του αζώτου [74-76] (nitric oxide synthase, NOs), η οποία διασπά την γουανιδική ομάδα της L-αργινίνης παράγοντας οξείδιο του αζώτου, το οποίο εμποδίζει την αρτηριοσκλήρυνση, συμβάλλοντας στην απομάκρυνση της χοληστερόλης [77-79] και παράλληλα προκαλεί και αγγειοδιαστολή.

Η παρουσία ωστόσο της L-αργινίνης στα παραπάνω πεπτίδια σε μεγάλο ποσοστό φαίνεται πως δεν είναι τυχαία. Έτσι μελετήθηκε η συσχέτισης που ενδεχομένως έχει η παρουσία της L-αργινίνης με την έκφραση της συγκεκριμένης ιδιότητας των πεπτιδίων αυτών. Συγκεκριμένα, όταν στο πεπτίδιο Tat αντικαταστάθηκε η αργινίνη από ένα λιγότερο βασικό αμινοξύ, την λυσίνη, τότε το πεπτίδιο εμφάνισε περιορισμένη δραστηριότητα. Αντίθετα, αντικατάσταση όλων των αμινοξέων με αργινίνη οδήγησε σε ένα πεπτίδιο πολύ πιο δραστικό [80]. Επομένως, η δραστηριότητα

των πεπτιδίων αυτών συνδέεται άμεσα με την παρουσία της αργινίνης. Συγκεκριμένα, το φορτίο που φέρει η γουανιδική ομάδα (Εικόνα 2.14) φαίνεται πως παίζει καθοριστικό ρόλο στην έκφραση της ιδιότητας των συγκεκριμένων πεπτιδίων. Όμως δεν είναι ο μόνος παράγοντας που συνεισφέρει στην ιδιότητα αυτή καθώς, όπως αναφέρθηκε, τα ολιγομερή της λυσίνης παρουσίασαν και αυτά αρκετή δραστικότητα.



Εικόνα 2.14: Το μόριο της γουανιδίνης.

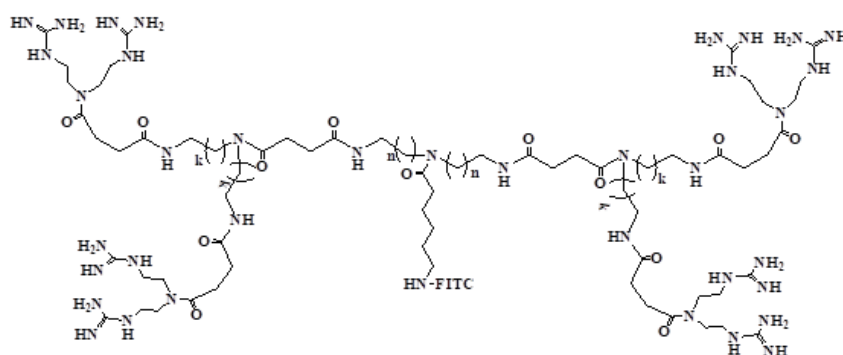
Το επόμενο βήμα στον προσδιορισμό των παραμέτρων που συνεισφέρουν στην ιδιότητα των πεπτιδίων αυτών να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες ήταν η συσχέτιση του αριθμού των αμινοξέων με την δραστικότητά τους. Έτσι η μελέτη μιας σειράς ολιγομερών της αργινίνης αποτελούμενων από 6-15 αμινοξέα έδειξε πως τα ολιγομερή με 7-9 αμινοξέα ήταν και τα πλέον δραστικά [81]. Χαρακτηριστικό στοιχείο των παραπάνω μελετών ήταν πως τα D-ολιγομερή είχαν πολλαπλάσια δραστικότητα από τα αντίστοιχα L-ολιγομερή. Παράλληλα, μελετήθηκε η επίδραση που είχε η απόσταση της γουανιδικής ομάδας από την κύρια αλυσίδα του πεπτιδίου σε παράγωγα με 3, 4 και 6 μεθυλένια μεταξύ κύριας αλυσίδας και γουανιδικής ομάδας. Και σε αυτή την περίπτωση, η μεγαλύτερη απόσταση ενίσχυσε σημαντικά την δραστικότητα των πεπτιδίων [82]. Έτσι λοιπόν, γίνεται προφανές πως πέρα από το φορτίο, ο αριθμός των γουανιδικών ομάδων και η απόσταση αυτών από την κύρια αλυσίδα του ολιγοπεπτιδίου παίζουν σημαντικό ρόλο στις ιδιότητες των πεπτιδίων.

Με βάση τα παραπάνω, η εισαγωγή της γουανιδικής ομάδας σε ολιγομερή μη πεπτιδικής φύσεως θα πρέπει να τους προσδώσει την ιδιότητα να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες. Πράγματι, η γουανιδίωση ολιγοκαρβαμικών [83] ή πεπτοειδών [82] οδήγησε σε παράγωγα με αυξημένη δραστικότητα. Ακόμα και σε αυτήν την περίπτωση, ο αριθμός των μονομερικών ομάδων αλλά και η απόσταση της γουανιδικής ομάδας από την κύρια αλυσίδα καθόρισαν τα παράγωγα εκείνα με την βέλτιστη συμπεριφορά.

Οι μελέτες αυτές περιλαμβάνουν γραμμικά πολυμερικά μόρια. Στη συνέχεια, έγινε σύνθεση δενδριτικών μορίων [84], τα οποία φέρουν αργινίνη στην εξωτερική επιφάνειά τους, προκειμένου να ελεγχθεί η δραστικότητα των πολυμερικών μορίων

και να διαπιστωθεί η επίδραση της μοριακής αρχιτεκτονικής στην ικανότητα των μορίων να διαπερνούν κυτταρικές μεμβράνες [85]. Συγκεκριμένα, τα παραπάνω μόρια αποτελούνταν μόνο από αμινοξέα και ο αριθμός των μορίων αργινίνης δεν ήταν πάνω από 8. Διαπιστώθηκε πως τα μόρια αυτά εμφανίζουν παρόμοια δραστηριότητα με τα γραμμικά ολιγοπεπτίδια και έτσι η μοριακή αρχιτεκτονική των μορίων αυτών δεν επηρεάζει την δραστηριότητα τους.

Επίσης, συντέθηκαν δενδριμερή μη πεπτιδικής βάσης [86] που είχαν στην επιφάνειά τους 8 γουανιδικές ομάδες, όπου μελετήθηκε η επίδραση της υδροφιλικότητας των παραγώγων μεταβάλλοντας το μήκος της υδρογονανθρακικής αλυσίδας των δενδριτικών πολυμερών (Εικόνα 2.15).

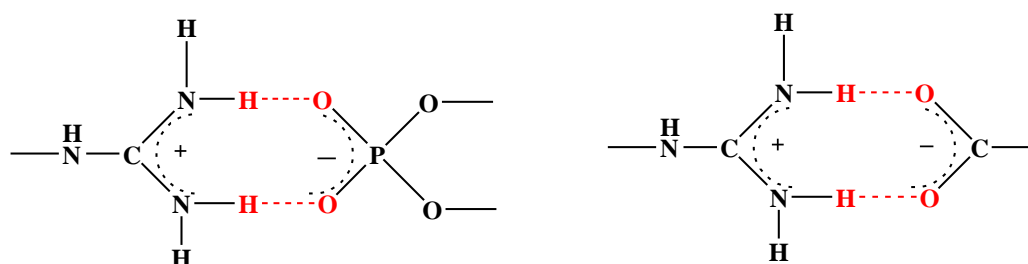


Εικόνα 2.15: Δομή των δενδριτικών μορίων που διαπερνούν κυτταρικές μεμβράνες. Στην εξωτερική επιφάνεια των μορίων υπάρχουν γουανιδικές ομάδες και το εσωτερικό τμήμα φέρει υδρογονανθρακικές αλυσίδες μεταβλητού μήκους με $n, k = 2-6$ [87].

Αποδείχθηκε πως τα μόρια αυτά είναι το ίδιο δραστικά με το οκταμερές της αργινίνης (R8) και διαπιστώθηκε πως η δραστηριότητά τους αυξάνονταν με την αύξηση του μήκους της αλυσίδας στο εσωτερικό του μορίου. Συμπεραίνεται ότι η υδροφοβικότητα των μορίων είναι σημαντική για την είσοδο τους στο εσωτερικό των κυττάρων.

Μελέτες των μορίων αυτών για τον μηχανισμό με τον οποίο διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη απέδειξαν ότι δεν γίνεται με απλή διάχυση. Τα γουανιδιωμένα μόρια εμφανίζουν υδροφιλικότητα, η οποία εμποδίζει την μεταφορά τους στην υδρόφοβη μεμβράνη. Έτσι λοιπόν, είναι σημαντική η εξουδετέρωση του φορτίου της γουανιδίνης και συνεπώς ο σχηματισμός ενός λιγότερου πολικού συμπλόκου, το οποίο τελικά θα καταφέρει να διαπεράσει την λιπιδική μεμβράνη. Καθοριστικό ρόλο παίζει η μοριακή αναγνώριση μέσω δεσμών υδρογόνου [88-92], που ενισχύονται με ηλεκτροστατικής φύσεως δυνάμεις. Συγκεκριμένα, η γουανιδική ομάδα μπορεί να

αλληλεπιδράσει με την φωσφορική [93, 94] ή την καρβοξυλική ομάδα [95] ενός φωσφολιπιδίου ή ενός λιπαρού οξέος, αντίστοιχα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.16. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζει ουδέτερο και λιγότερο πολικό σύμπλοκο, το οποίο μπορεί πλέον να βρεθεί σε ένα υδρόφοβο περιβάλλον [90-92]. Τέλος, διαπιστώθηκε πως το διαμεμβρανικό δυναμικό [88, 89] συμβάλει στην είσοδο των μορίων στο εσωτερικό των κυττάρων, το οποίο καθορίζεται από την διαφορά συγκέντρωσης των ιόντων K^+ .



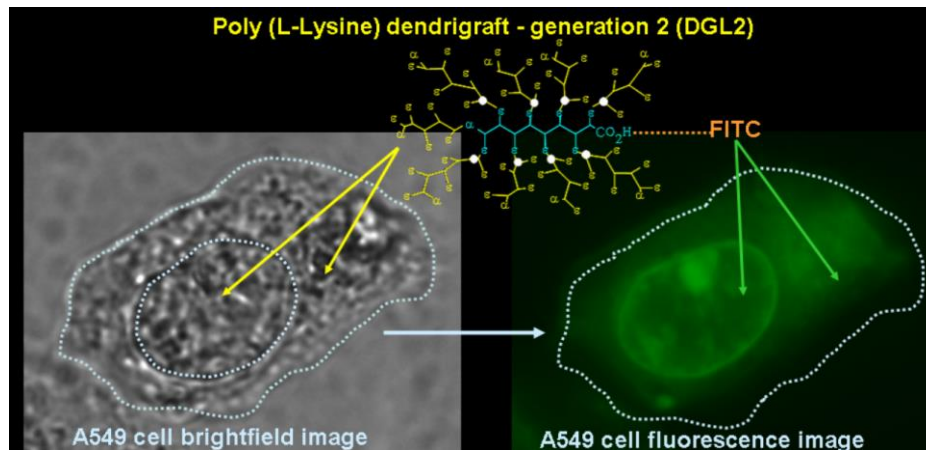
Εικόνα 2.16: Μοριακή αναγνώριση μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ γουανιδικής ομάδας και φωσφορικής ή καρβοξυλικής ομάδας.

2.4.2 Βιολογικές εφαρμογές των διαμεμβρανικών μεταφορέων

Με βάση τα παραπάνω καθίσταται προφανής η σπουδαιότητα των πεπτιδίων αυτών ως φορέων δραστικών ουσιών για την επιτυχημένη μεταφορά τους στο εσωτερικό των κυττάρων [80]. Πράγματι, η ομοιοπολική σύνδεση φαρμακευτικών ουσιών στα πεπτιδία Tat και R8 οδήγησε σε ταχύτατη εισχώρηση των ουσιών αυτών στα κύτταρα [82, 96-99]. Επιπλέον, η προσκόλληση των πεπτιδίων αυτών σε άλλους γνωστούς φορείς δραστικών ουσιών όπως τα λιποσώματα [100], οι νανοσωλήνες άνθρακα ή άλλα νανοσωματίδια ή ακόμα και σε μη βιοσυμβατά πολυμερή, όπως τα πολυακρυλικά [100], είχε σαν αποτέλεσμα την είσοδο των φορέων αυτών στο εσωτερικό των κυττάρων. Έτσι, με βάση τα παραπάνω, δενδριμερή τροποποιήθηκαν με γουανιδικές ομάδες ώστε να τους προσδώσουν την ιδιότητά αυτή και έτσι στη συνέχεια να μπορούν να λειτουργήσουν ως ικανοποιητικοί φορείς φαρμακευτικών ουσιών [101-103].

Το 2007, ο Τσόγκας και οι συνεργάτες του [104] μελέτησαν γουανιδιωμένα παράγωγα δενδριτικών ενοφθαλμισμένων πολυμερών πολυ(λυσίνης) 2^{ης} και 3^{ης} γενιάς (dendrigrafts, DGLs), ως προς την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν και στη συνέχεια να διαπεράσουν δια μέσου λιποσωμικών και των κυτταρικών μεμβρανών. Έτσι, παρασκεύασαν μερικώς γουανιδιωμένα παράγωγα των πολυμερών αυτών και

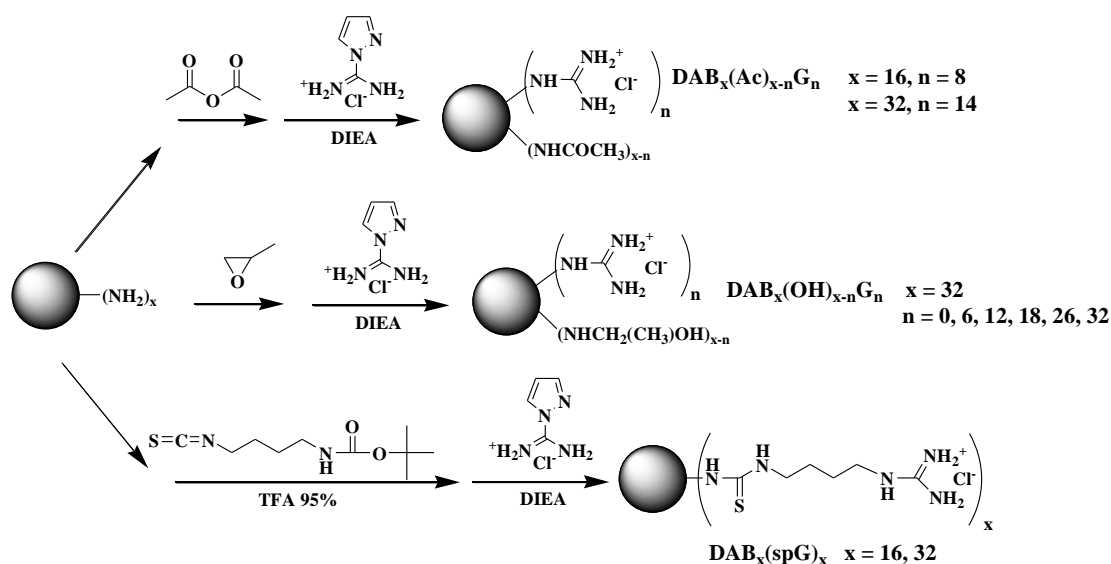
μελέτησαν την ικανότητα τους να διαπερνούν τις μεμβράνες των κυττάρων και των λιποσωμάτων. Ως μοντέλα χρησιμοποιήθηκαν μικτά λιποσώματα, αποτελούμενα από διεξαδέκυλο φωσφορικό νάτριο, φωσφατιδυλοχολίνη και χοληστερόλη, ενώ για τις μελέτες κυτταρικής πρόσληψης χρησιμοποιήθηκαν τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα A549. Αρχικά μελετήθηκαν τα μη τροποποιημένα DGLs και βρέθηκε ότι μόνο σε χαμηλές μοριακές αναλογίες γουανιδίνης/φωσφορικών ομάδων και σε θερμοκρασία πάνω από το T_m των λιποσωμάτων επιτυγχάνεται η διαμεμβρανική μεταφορά των πολυμερών στα λιποσώματα επιτεύχθηκε, με το 3^{ης} γενιάς DGL (DGL3) να παρουσιάζει μικρότερη ικανότητα διαμεμβρανικής μεταφοράς. Από την άλλη πλευρά, βρέθηκε ότι η εισαγωγή των ομάδων γουανιδίνης στο πολυμερές ενισχύει την διαμεμβρανική μεταφορά τους διαμέσου της λιποσωμική μεμβράνη. Παράλληλα, η κυτταρική πρόσληψη των επισημασμένων με φλουορεσκεΐνη παραγώγων από κύτταρα A549 μελετήθηκε έπειτα από 3h επώαση με μικροσκοπία φθορισμού. Βρέθηκε ότι τα γουανιδιωμένα DGLs εντοπίστηκαν τόσο στον πυρήνα όσο και στην πυρηνική μεμβράνη (Εικόνα 2.17) και άρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αποτελεσματικοί διαμεμβρανικοί μεταφορείς.



Εικόνα 2.17: Εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού των κυττάρων A549 μετά από 3 ώρες επώασης με το γουανιδιωμένο παράγωγο DGL 2^{ης} γενιάς [104].

Επίσης, την ίδια χρονιά ο Τσόγκας και οι συνεργάτες του [105] μελέτησαν την ικανότητα γουανιδιωμένων δενδριμερών πολυ(προπυλενιμίνης) να μεταφέρονται διαμέσου μεμβρανών, χρησιμοποιώντας είτε μοντέλο λιποσωμικής διπλοστοιβάδας είτε ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα A549. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε πολυ(προπυλενιμίνη) 3^{ης} και 4^{ης} γενιάς (DAB16 και DAB32, αντίστοιχα) που διέφεραν στον αριθμό των επιφανειακών ομάδων γουανιδίνης

(Εικόνα 2.18). Επίσης, βρέθηκε ότι η επιφανειακή ακετυλίωση των πολυμερών επηρέασε την μοριακή αναγνώριση των ομάδων γουανιδίνης με τις φωσφορικές ομάδες και τελικά την αποτελεσματικότητα στην μεταφορά τους διαμέσου των μεμβρανών. Η μεταφορά των παραγώγων μέσω της λιποσωμικής διπλοστοιβάδας διαπιστώθηκε ότι γίνεται σε χαμηλές μοριακές αναλογίες γουανιδίνης/φωσφορικών και ενισχύθηκε όταν η διπλοστοιβάδα ήταν στην υγρή κρυσταλλική φάση. Για την αποτελεσματική μεταφορά μέσω της λιποσωμικής μεμβράνης βρέθηκε ότι απαιτείται όχι μόνο κατάλληλη αναλογία μοριακή αναλογία γουανιδίνης/φωσφορικών αλλά σημαντικό ρόλο παίζει και η υδροφοβικότητα του πολυμερούς. Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στα κύτταρα *in vitro*, παρατηρήθηκε αποτελεσματική πρόσληψη των πολυμερικών παραγώγων σε υποκυττάρια οργανίδια και στο κυτταρόπλασμα.



Εικόνα 2.18: Σχέδιο της αντίδρασης για την σύνθεση των τροποποιημένων DAB δένδριμερών [105].

Βιβλιογραφία 2^ο Κεφαλαίου

- [1] D.A. Tomalia, J.M.J. Fréchet, «Discovery of dendrimers and dendritic polymers: A brief historical perspective», *Journal of Polymer Science A*, 40(16) (2002) 2719-2728.
- [2] D. Tomalia, «Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic polymer chemistry», *Progress in Polymer Science*, 30 (2005) 294-324.
- [3] D.A. Tomalia, «The dendritic state», *Materials Today*, 8(3) (2005) 34-46.
- [4] K. Inoue, «Functional dendrimers, hyperbranched and star polymers», *Progress in Polymer Science*, 25(4) (2000) 453-571.
- [5] B. Voit, «Hyperbranched polymers: a chance and a challenge», *Comptes Rendus Chimie* 6, (2003) 821-832.
- [6] A. Amin, M. Samy, «Preparation and characterization of some hyperbranched polyesteramides/montmorillonite nanocomposites», *International Journal of Polymer Science*, 2013 (2013) 528468.
- [7] A.W. Bosman, H.M. Janssen, E.W. Meijer, «About dendrimers: structure, physical properties, and applications», *Chemical Reviews*, 99(7) (1999) 1665-1688.
- [8] M. Seiler, «Hyperbranched polymers: phase behavior and new applications in the field of chemical engineering», *Fluid Phase Equilibria*, 241 (2006) 155-174.
- [9] C.M. Paleos, L.-A. Tziveleka, Z. Sideratou, D. Tsiourvas, «Gene delivery using functional dendritic polymers», *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6(1) (2009) 27-38.
- [10] Y. Pang, L. Jinyao, Y. su, J. Wu, L. Zhu, X. Zhu, D. Yan, B. Zhu, «Design and synthesis of thermo-responsive hyperbranched poly(amine-ester)s as acid-sensitive drug carriers», *Polymer Chemistry*, 2 (2011) 1661-1670.
- [11] Z. Jia, H. Chen, X. Zhu, D. Yan, «Backbone-thermoreponsive hyperbranched polyethers», *Journal of the American Chemical Society*, 128(25) (2006) 8144-8145.
- [12] C. Gao, Y. Xu, D. Yan, W. Chen, «Water-soluble degradable hyperbranched polyesters: novel candidates for drug delivery?», *Biomacromolecules*, 4(3) (2003) 704-712.
- [13] G. Jiang, X. Sun, Y. Wang, M. Ding, «Synthesis and fluorescence properties of hyperbranched poly(amidoamine)s with high density tertiary nitrogen», *Polymer Chemistry*, 1(10) (2010) 1644-1649.
- [14] P.J. Flory, «Molecular size distribution in three dimensional polymers. VI. branched polymers containing A—R—Bf-1 type units», *Journal of the American Chemical Society*, 74(11) (1952) 2718-2723.
- [15] Y.H. Kim, O.W. Webster, «Water soluble hyperbranched polyphenylene: "a unimolecular micelle?"», *Journal of the American Chemical Society*, 112(11) (1990) 4592-4593.
- [16] C.J. Hawker, J.M.J. Fréchet, «Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules», *Journal of the American Chemical Society*, 112(21) (1990) 7638-7647.
- [17] C.R. Yates, W. Hayes, «Synthesis and applications of hyperbranched polymers», *European Polymer Journal*, 40(7) (2004) 1257-1281.
- [18] V.R. Reichert, L.J. Mathias, «Tetrahedrally-oriented four-armed star and branched aramids», *Macromolecules*, 27(24) (1994) 7024-7029.
- [19] M. Suzuki, A. Ii, T. Saegusa, «Multibranching polymerization: palladium-catalyzed ring-opening polymerization of cyclic carbamate to produce hyperbranched dendritic polyamine», *Macromolecules*, 25(25) (1992) 7071-7072.

- [20] W.J. Feast, N.M. Stainton, «Synthesis, structure and properties of some hyperbranched polyesters», *Journal of Materials Chemistry*, 5(3) (1995) 405-411.
- [21] A. Barth, «Infrared spectroscopy of proteins», *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1767(9) (2007) 1073-1101.
- [22] S.Y. Venyaminov, N.N. Kalnin, «Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solutions. I. Spectral parameters of amino acid residue absorption bands», *Biopolymers*, 30(13-14) (1990) 1243-1257.
- [23] C.J. Hawker, R. Lee, J.M.J. Frechet, «One-step synthesis of hyperbranched dendritic polyesters», *Journal of the American Chemical Society*, 113(12) (1991) 4583-4588.
- [24] C.J. Hawker, «Dendritic and hyperbranched macromolecules—precisely controlled macromolecular architectures», *Macromolecular Architectures*, 1999, 113-160.
- [25] D. Hölder, A. Burgath, H. Frey, «Degree of branching in hyperbranched polymers», *Acta Polymerica*, 48(1-2) (1997) 30-35.
- [26] E. Roussi, A. Tsetsekou, D. Tsiourvas, A. Karantonis, «Novel hybrid organo-silicate corrosion resistant coatings based on hyperbranched polymers», *Surface and Coatings Technology*, 205(10) (2011) 3235-3244.
- [27] A. von Zelewsky, L. Barbosa, C.W. Schlöpfer, «Poly(ethylenimines) as bronsted bases and as ligands for metal ions», *Coordination Chemistry Reviews*, 123(1) (1993) 229-246.
- [28] C.R. Dick, G.E. Ham, «Characterization of Polyethylenimine», *Journal of Macromolecular Science: Part A – Chemistry*, 4(6) (1970) 1301-1314.
- [29] A.N.L. G. D. Jones, M. M. C. Neuman, and J. L. Zomlefer, «The polymerization of ethylenimine», *Journal of Organic Chemistry*, 9, 125 (1944).
- [30] M. Jäger, S. Schubert, S. Ochrimenko, D. Fischer, U.S. Schubert, «Branched and linear poly(ethylene imine)-based conjugates: synthetic modification, characterization, and application», *Chemical Society Reviews*, 41(13) (2012) 4755-4767.
- [31] M. Iijima, N. Okamura, J. Tatami, «Polyethyleneimine–oleic acid complex as a polymeric dispersant for Si₃N₄ and Si₃N₄-based multicomponent nonaqueous slurries», *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 54(51) (2015) 12847-12854.
- [32] J. Li, B.L. Armstrong, J. Kiggans, C. Daniel, D.L. Wood, «Optimization of LiFePO₄ nanoparticle suspensions with polyethyleneimine for aqueous processing», *Langmuir*, 28(8) (2012) 3783-3790.
- [33] F.S. Mohammed, S.R. Cole, C.L. Kitchens, «Synthesis and enhanced colloidal stability of cationic gold nanoparticles using polyethyleneimine and carbon dioxide», *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 1(7) (2013) 826-832.
- [34] X. Shen, H. Du, R.H. Mullins, R.R. Kommalapati, «Polyethylenimine applications in carbon dioxide capture and separation: from theoretical study to experimental work», *Energy Technology*, 5(6) (2017) 822-833.
- [35] L. Yu, B. Zhang, J. Liu, H. Zhang, C. Song, «Preparation and characterization of HPEI-GO/PES ultrafiltration membrane with antifouling and antibacterial properties», *Journal of Membrane Science*, 447 (2013) 452-462.
- [36] J. Zhu, J. Hou, Y. Zhang, M. Tian, T. He, J. Liu, V. Chen, «Polymeric antimicrobial membranes enabled by nanomaterials for water treatment», *Journal of Membrane Science*, 550 (2018) 173-197.
- [37] J. Ramos, J. Forcada, R. Hidalgo-Alvarez, «Cationic polymer nanoparticles and nanogels: from synthesis to biotechnological applications», *Chemical Reviews*, 114(1) (2014) 367-428.

- [38] P. Vicennati, A. Giuliano, G. Ortaggi, A. Masotti, «Polyethylenimine in medicinal chemistry», *Current medicinal chemistry*, 15(27) (2008) 2826-2839.
- [39] Z. Chen, Z. Lv, Y. Sun, Z. Chi, G. Qing, «Recent advancements in polyethyleneimine-based materials and their biomedical, biotechnology, and biomaterial applications», *Journal of Materials Chemistry B*, 8(15) (2020) 2951-2973.
- [40] S. Wang, J. Zhang, Y. Wang, M. Chen, «Hyaluronic acid-coated PEI-PLGA nanoparticles mediated co-delivery of doxorubicin and miR-542-3p for triple negative breast cancer therapy», *Nanomedicine*, 12(2) (2016) 411-420.
- [41] B. Zhou, L. Zhao, M. Shen, J. Zhao, X. Shi, «A multifunctional polyethylenimine-based nanoplatform for targeted anticancer drug delivery to tumors in vivo», *Journal of Materials Chemistry B*, 5(8) (2017) 1542-1550.
- [42] Y. Zou, D. Li, M. Shen, X. Shi, «Polyethylenimine-based nanogels for biomedical applications», *Macromolecular Bioscience*, 19(11) (2019) 1900272.
- [43] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J.P. Behr, «A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16) (1995) 7297-7301.
- [44] W.T. Godbey, K.K. Wu, A.G. Mikos, «Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(9) (1999) 5177-5181.
- [45] W.T. Godbey, M.A. Barry, P. Saggau, K.K. Wu, A.G. Mikos, «Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery», *Journal of Biomedical Materials Research*, 51(3) (2000) 321-328.
- [46] C. Jiang, J. Chen, Z. Li, Z. Wang, W. Zhang, J. Liu, «Recent advances in the development of polyethylenimine-based gene vectors for safe and efficient gene delivery», *Expert Opinion on Drug Delivery*, 16(4) (2019) 363-376.
- [47] S. Taranejoo, J. Liu, P. Verma, K. Hourigan, «A review of the developments of characteristics of PEI derivatives for gene delivery applications», *Journal of Applied Polymer Science*, 132(25) (2015).
- [48] M.S. Shim, Y.J. Kwon, «Stimuli-responsive polymers and nanomaterials for gene delivery and imaging applications», *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(11) (2012) 1046-1059.
- [49] M.M. Azevedo, P. Ramalho, A.P. Silva, R. Teixeira-Santos, C. Pina-Vaz, A.G. Rodrigues, «Polyethyleneimine and polyethyleneimine-based nanoparticles: novel bacterial and yeast biofilm inhibitors», *Journal of Medical Microbiology*, 63(9) (2014) 1167-1173.
- [50] K.A. Gibney, I. Sovadinova, A.I. Lopez, M. Urban, Z. Ridgway, G.A. Caputo, K. Kuroda, «Poly(ethylene imine)s as antimicrobial agents with selective activity», *Macromolecular Bioscience*, 12(9) (2012) 1279-1289.
- [51] J. Huang, K. Sooklal, C.J. Murphy, H.J. Ploehn, «Polyamine-quantum dot nanocomposites: linear versus starburst stabilizer architectures», *Chemistry of Materials*, 11(12) (1999) 3595-3601.
- [52] Y. Dong, R. Wang, G. Li, C. Chen, Y. Chi, G. Chen, «Polyamine-functionalized carbon quantum dots as fluorescent probes for selective and sensitive detection of copper ions», *Analytical Chemistry*, 84(14) (2012) 6220-6224.
- [53] A. Haimov, H. Cohen, R. Neumann, «Alkylated polyethyleneimine/polyoxometalate synzymes as catalysts for the oxidation of hydrophobic substrates in water with hydrogen peroxide», *Journal of the American Chemical Society*, 126(38) (2004) 11762-11763.

- [54] Z. Shen, Y. Chen, H. Frey, S.-E. Stiriba, «Complex of hyperbranched polyethylenimine with cuprous halide as recoverable homogeneous catalyst for the atom transfer radical polymerization of methyl methacrylate», *Macromolecules*, 39(6) (2006) 2092-2099.
- [55] M. Ho, W. Li, C. Wong, L.Z. Pei, «Amphiphilic polymeric particles with core-shell nanostructures: Emulsion-based syntheses and potential applications», *Colloid and Polymer Science*, 288 (2010) 1503-1523.
- [56] A.R. Maity, D. Stepensky, «Limited efficiency of drug delivery to specific intracellular organelles using subcellularly “targeted” drug delivery systems», *Molecular Pharmaceutics*, 13(1) (2016) 1-7.
- [57] A.R. Maity, D. Stepensky, «Delivery of drugs to intracellular organelles using drug delivery systems: analysis of research trends and targeting efficiencies», *International Journal of Pharmaceutics*, 496(2) (2015) 268-274.
- [58] S.A. Durazo, U.B. Kompella, «Functionalized nanosystems for targeted mitochondrial delivery», *Mitochondrion*, 12(2) (2012) 190-201.
- [59] V. Weissig, «From serendipity to mitochondria-targeted nanocarriers», *Pharmaceutical Research*, 28(11) (2011) 2657.
- [60] S. Biswas, V.P. Torchilin, «Nanopreparations for organelle-specific delivery in cancer», *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66 (2014) 26-41.
- [61] Z. Sideratou, M. Agathokleous, T.A. Theodossiou, D. Tsiourvas, «Functionalized hyperbranched polyethylenimines as thermosensitive drug delivery nanocarriers with controlled transition temperatures», *Biomacromolecules*, 19(2) (2018) 315-328.
- [62] C. Chen, B. Zhou, X. Zhu, M. Shen, X. Shi, «Branched polyethyleneimine modified with hyaluronic acid via a PEG spacer for targeted anticancer drug delivery», *RSC Advances*, 6(11) (2016) 9232-9239.
- [63] T.A. Theodossiou, Z. Sideratou, M.E. Katsarou, D. Tsiourvas, «Mitochondrial delivery of doxorubicin by triphenylphosphonium-functionalized hyperbranched nanocarriers results in rapid and severe cytotoxicity», *Pharmaceutical Research*, 30(11) (2013) 2832-2842.
- [64] K.N. Panagiotaki, Z. Sideratou, S.A. Vlahopoulos, M. Paravatou-Petsotas, M. Zachariadis, N. Khoury, V. Zoumpourlis, D. Tsiourvas, «A triphenylphosphonium-functionalized mitochondriotropic nanocarrier for efficient co-delivery of doxorubicin and chloroquine and enhanced antineoplastic activity», *Pharmaceutics*, 10(4) (2017).
- [65] V. Stagni, A. Kaminari, Z. Sideratou, E. Sakellis, S.A. Vlahopoulos, D. Tsiourvas, «Targeting breast cancer stem-like cells using chloroquine encapsulated by a triphenylphosphonium-functionalized hyperbranched polymer», *International Journal of Pharmaceutics*, 585 (2020) 119465.
- [66] P. Lakshminarayanan, H. Toghiani, C. Pittman, «Nitric acid oxidation of vapor grown carbon nanofibers», *Carbon*, 42 (2004) 2433-2442.
- [67] H.L.A. I. M. Helander, K. Latva-Kala, and P. Koski, «Polyethyleneimine is an effective permeabilizer of Gram-negative bacteria», *Microbiology*, 143(10) 3193-3199 (1997).
- [68] I. Yudovin-Farber, J. Golenser, N. Beyth, E.I. Weiss, A.J. Domb, «Quaternary ammonium polyethyleneimine: antibacterial activity», *Journal of Nanomaterials*, (2010) 826343.
- [69] M. Liu, J. Li, B. Li, «Mannose-modified polyethyleneimine: a specific and effective antibacterial agent against *escherichia coli*», *Langmuir*, 34(4) (2018) 1574-1580.

- [70] J. Temsamani, P. Vidal, «The use of cell-penetrating peptides for drug delivery», *Drug Delivery Today*, 9(23) (2004) 1012-1019.
- [71] H. Brooks, B. Lebleu, E. Vivès, Brooks, H., Lebleu, B. & Vives, «E.tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics», *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 559-577 (2005).
- [72] M. Zorko, U. Langel, «Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery», *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(4) (2005) 529-545.
- [73] P. Lundberg, U. Langel, «A brief introduction to cell-penetrating peptides», *Journal of Molecular Recognition*, 16(5) (2003) 227-233.
- [74] M.J. Martins, M.R. Negrão, C. Hipólito-Reis, I. Azevedo, «Arginine and a polyarginine peptide inhibit alkaline phosphatase activity: possible consequences for cellular transport systems», *Clinical Biochemistry*, 34(5) (2001) 435-437.
- [75] T.A. Hardy, J.M. May, «Coordinate regulation of L-arginine uptake and nitric oxide synthase activity in cultured endothelial cells», *Free Radical Biology and Medicine*, 32(2) (2002) 122-131.
- [76] T. Shibazaki, M. Fujiwara, H. Sato, K. Fujiwara, K. Abe, S. Bannai, «Relevance of the arginine transport activity to the nitric oxide synthesis in mouse peritoneal macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide», *Biochimica et Biophysica Acta*, 1311(3) (1996) 150-154.
- [77] T. Suzuki, M. Hayase, K. Hibi, H. Hosokawa, K. Yokoya, P.J. Fitzgerald, P.G. Yock, J.P. Cooke, T. Suzuki, A.C. Yeung, «Effect of local delivery of l-arginine on in-stent restenosis in humans», *The American Journal of Cardiology*, 89(4) (2002) 363-367.
- [78] Y. Higashi, K. Chayama, «Renal endothelial dysfunction and hypertension», *Journal of Diabetes and its Complications*, 16(1) (2002) 103-107.
- [79] H. Kawano, T. Motoyama, N. Hirai, K. Kugiyama, H. Yasue, H. Ogawa, «Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia is improved by l-arginine administration: possible role of oxidative stress», *Atherosclerosis*, 161(2) (2002) 375-380.
- [80] D.J. Mitchell, L. Steinman, D.T. Kim, C.G. Fathman, J.B. Rothbard, «Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers», *International Journal of Peptide Research*, 56(5) (2000) 318-325.
- [81] J.B. Rothbard, E. Kreider, C.L. VanDeusen, L. Wright, B.L. Wylie, P.A. Wender, «Arginine-rich molecular transporters for drug delivery: role of backbone spacing in cellular uptake», *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(17) (2002) 3612-3618.
- [82] P.A. Wender, D.J. Mitchell, K. Pattabiraman, E.T. Pelkey, L. Steinman, J.B. Rothbard, «The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24), 97(24) (2000) 13003-13008.
- [83] P.A. Wender, J.B. Rothbard, T.C. Jessop, E.L. Kreider, B.L. Wylie, «Oligocarbamate molecular transporters: design, synthesis, and biological evaluation of a new class of transporters for drug delivery», *Journal of the American Chemical Society*, 124(45) (2002) 13382-13383.
- [84] L.-A. Tziveleka, A.-M.G. Psarra, D. Tsiourvas, C.M. Paleos, «Synthesis and characterization of guanidinylated poly(propylene imine) dendrimers as gene transfection agents», *Journal of the Controlled Release Society*, 117(1) (2007) 137-146.
- [85] S. Futaki, I. Nakase, T. Suzuki, Zhang, Y. Sugiura, «Translocation of branched-chain arginine peptides through cell membranes: flexibility in the spatial disposition

- of positive charges in membrane-permeable peptides», *Biochemistry*, 41(25) (2002) 7925-7930.
- [86] P.A. Wender, E. Kreider, E.T. Pelkey, J. Rothbard, C.L. VanDeusen, «Dendrimeric molecular transporters: synthesis and evaluation of tunable polyguanidino dendrimers that facilitate cellular uptake», *Organic Letters*, 7(22) (2005) 4815-4818.
- [87] Τ. Ιωάννης, «Υπερμοριακά συστήματα σχηματιζόμενα από την αλληλεπίδραση λιποσωμάτων με δενδριτικά πολυμερή», Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2007.
- [88] J.B. Rothbard, T.C. Jessop, R.S. Lewis, B.A. Murray, P.A. Wender, «Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells», *Journal of the American Chemical Society*, 126(31) (2004) 9506-9507.
- [89] S. Futaki, «Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms», *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(4) (2005) 547-558.
- [90] N. Sakai, T. Takeuchi, S. Futaki, S. Matile, «Direct observation of anion-mediated translocation of fluorescent oligoarginine carriers into and across bulk liquid and anionic bilayer membranes», *ChemBioChem*, 6(1) (2005) 114-122.
- [91] N. Sakai, S. Matile, «Anion-mediated transfer of polyarginine across liquid and bilayer membranes», *Journal of the American Chemical Society*, 125(47) (2003) 14348-14356.
- [92] J.B. Rothbard, T.C. Jessop, P.A. Wender, «Adaptive translocation: the role of hydrogen bonding and membrane potential in the uptake of guanidinium-rich transporters into cells», *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(4) (2005) 495-504.
- [93] R.P. Dixon, S.J. Geib, A.D. Hamilton, «Molecular recognition: bis-acylguanidiniums provide a simple family of receptors for phosphodiesterases», *Journal of the American Chemical Society*, 114(1) (1992) 365-366.
- [94] T. Schrader, «Strong binding of alkylguanidinium ions by molecular tweezers: an artificial selective arginine receptor molecule with a biomimetic recognition pattern», *Chemistry*, 3(9) (1997) 1537-1541.
- [95] F.P. Schmidtchen, M. Berger, «Artificial organic host molecules for anions», *Chemical Reviews*, 97(5) (1997) 1609-1646.
- [96] T.A. Kirschberg, C.L. VanDeusen, J.B. Rothbard, M. Yang, P.A. Wender, «Arginine-based molecular transporters: the synthesis and chemical evaluation of releasable taxol-transporter conjugates», *Organic Letters*, 5(19) (2003) 3459-3462.
- [97] L.R. Jones, E.A. Goun, R. Shinde, J.B. Rothbard, C.H. Contag, P.A. Wender, «Releasable luciferin-transporter conjugates: tools for the real-time analysis of cellular uptake and release», *Journal of the American Chemical Society*, 128(20) (2006) 6526-6527.
- [98] J.B. Rothbard, S. Garlington, Q. Lin, T. Kirschberg, E. Kreider, P.L. McGrane, P.A. Wender, P.A. Khavari, «Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation», *Nature medicine*, 6(11) (2000) 1253-1257.
- [99] S. Al-Taei, N.A. Penning, J.C. Simpson, S. Futaki, T. Takeuchi, I. Nakase, A.T. Jones, «Intracellular traffic and fate of protein transduction domains HIV-1 TAT peptide and octaarginine. Implications for their utilization as drug delivery vectors», *Bioconjugate Chemistry*, 17(1) (2006) 90-100.
- [100] M. Furuhashi, H. Kawakami, K. Toma, Y. Hattori, Y. Maitani, «Intracellular delivery of proteins in complexes with oligoarginine-modified liposomes and the effect of oligoarginine length», *Bioconjugate Chemistry*, 17(4) (2006) 935-942.

- [101] T.A. Theodossiou, A. Pantos, I. Tsogas, C.M. Paleos, «Guanidinylated dendritic molecular transporters: prospective drug delivery systems and application in cell transfection», *ChemMedChem*, 3(11) (2008) 1635-1643.
- [102] A. Pantos, D. Tsiourvas, G. Nounesis, C.M. Paleos, «Interaction of functional dendrimers with multilamellar liposomes: design of a model system for studying drug delivery», *Langmuir*, 21(16) (2005) 7483-7490.
- [103] A. Pantos, I. Tsogas, C.M. Paleos, «Guanidinium group: a versatile moiety inducing transport and multicompartimentalization in complementary membranes», *Biochimica et Biophysica Acta- Biomembranes*, 1778(4) (2008) 811-823.
- [104] I. Tsogas, T. Theodossiou, Z. Sideratou, C.M. Paleos, H. Collet, J.C. Rossi, B. Romestand, A. Commeyras, «Interaction and transport of poly(l-lysine) dendrigrafts through liposomal and cellular membranes: the role of generation and surface functionalization», *Biomacromolecules*, 8(10) (2007) 3263-3270.
- [105] I. Tsogas, Z. Sideratou, D. Tsiourvas, T.A. Theodossiou, C.M. Paleos, «Interactive transport of guanidinylated poly(propylene imine)-based dendrimers through liposomal and cellular membranes», *American Chemical Society*, 8(15) (2007) 1865-1876.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΒΡΙΔΙΚΑ ΝΑΝΟΔΟΜΗΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ

ΑΝΘΡΑΚΑ

3.1 Υβριδικά νανοϋλικά άνθρακα

Ως υβριδικά υλικά θεωρούνται τα προηγμένα σύνθετα υλικά που αποτελούνται από ένα μίγμα ανόργανων συστατικών, οργανικών συστατικών ή και των δύο τύπων συστατικών και αποτελούν μια νέα κατηγορία υλικών, τα οποία εμφανίζουν βελτιωμένες ιδιότητες σε σχέση με τα αρχικά συστατικά. Τα υβριδικά υλικά διαφέρουν από τα παραδοσιακά διότι βρίσκονται στο μακροσκοπικό επίπεδο, δηλαδή έχουν μικρότερο μέγεθος από χιλιοστό. Όμως όταν τα υλικά αυτά βρεθούν στην μικροσκοπική κλίμακα δημιουργείται ένα αρκετά ομοιογενές υλικό, το οποίο συνδυάζει τις ιδιότητες των φάσεων από τις οποίες αποτελείται ή μπορεί να παρουσιάσει νέες βελτιωμένες ιδιότητες. Συγκεκριμένα, αυτά τα υβριδικά υλικά συνδυάζουν τις μοναδικές ιδιότητες των οργανικών και ανόργανων συστατικών τους σε ένα υλικό και μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως αισθητήρες, φωτοκαταλύτες, αντιβακτηριδιακά υλικά, φορείς φαρμάκων, κ.α. Πρώτη η φύση κατασκεύασε τέτοια υλικά πριν από πεντακόσια εκατομμύρια χρόνια, όπως τα διάτομα κύτταρα που καλύπτονται από ένα πορώδες πυριτικό περίβλημα ντυμένο με οργανική ουσία, π.χ. πηκτίνη [1]. Άλλα παραδείγματα φυσικών οργανικών/ανόργανων σύνθετων υλικών είναι τα κελύφη των οστρακοειδών καθώς και τα οστά και τα δόντια των σπονδυλωτών.

Ανάλογα με το είδος της αλληλεπίδρασης των φάσεων, τα υβριδικά υλικά μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο είδη. Το πρώτο είδος αφορά υβριδικά υλικά που σχηματίζονται μέσω μοριακών αλληλεπιδράσεων, όπως δεσμούς van der Waals ή δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των δύο φάσεων, δηλαδή ασθενείς αλληλεπιδράσεις. Το δεύτερο είδος αφορά υβριδικά υλικά των οποίων οι φάσεις από τις οποίες αποτελούνται αλληλεπιδρούν ισχυρά, π.χ. μέσω ομοιοπολικών δεσμών. Στην περίπτωση που το οργανικό τμήμα του υβριδικού υλικού περιέχει μια μόνο λειτουργική ομάδα, η οποία επιτρέπει την σύνδεση με την ανόργανη φάση, τότε αυτή αποτελεί τον τροποποιητή, αφού είναι η μοναδική ομάδα που είναι ικανή να τροποποιήσει την ανόργανη φάση. Στην αντίθετη περίπτωση που το ανόργανο τμήμα αποτελείται από δύο ή ακόμα και τρεις λειτουργικές ομάδες, οδηγούμαστε σε υλικά όπου το ανόργανο τμήμα είναι αναπόσπαστο κομμάτι του υβριδικού υλικού [2].

Η οργανική φάση του υβριδικού υλικού είναι αυτή που καθορίζει την υδρόφοβη ή υδρόφιλη συμπεριφορά του, τη βιοσυμβατότητα του και άλλες ιδιότητες, όπως οπτικές και ηλεκτρονικές. Επίσης, ορισμένες χημικές λειτουργίες, όπως είναι η διαλυτότητα και η όξινη ή βασική συμπεριφορά, καθορίζονται από το οργανικό τμήμα του υλικού. Επίσης, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η οργανική φάση προσδίδει ευκολία στη διαμόρφωση και την επεξεργασία των υλικών. Από την άλλη πλευρά, η ανόργανη φάση είναι αυτή που παρέχει την μηχανική και θερμική σταθερότητα στο υλικό. Επιπλέον, με βάση τη χημική της σύσταση, τη δομή, το μέγεθος και την κρυσταλλικότητα επηρεάζει κάποιες από τις λειτουργίες του υβριδικού υλικού σχετικές με την μαγνητική, ηλεκτρονική και οξειδοαναγωγική συμπεριφορά του. Η πυκνότητα και ο δείκτης διάθλασης του υλικού επηρεάζονται και αυτά από το ανόργανο τμήμα του.

Όσο αφορά την παραγωγή των υβριδικών υλικών είναι ευρέως γνωστές δύο προσεγγίσεις. Στην πρώτη προσέγγιση υπάρχουν δύο, ήδη προσχηματισμένες, δομές που αντιδρούν και δημιουργούν το υβριδικό υλικό, στο οποίο διατηρούν την ακεραιότητά τους. Ενώ στην δεύτερη προσέγγιση, από τις πρόδρομες δομές δημιουργείται ένα υβριδικό υλικό, του οποίου η δομή διαφέρει από τις αρχικές [3]. Τα υβριδικά υλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλές εφαρμογές καθώς έχουν εξαιρετικές ιδιότητες. Χρησιμοποιούνται, μεταξύ άλλων, για την δημιουργία υλικών με αντιδιαβρωτική προστασία, ως επιβραδυντικό καύσης κυρίως στην βιομηχανία κατασκευών, σε μπαταρίες λιθίου ή υπερπυκνωτές, στην δημιουργία αγωγίμων μεμβρανών για τα κελιά καυσίμου, σε ηλιακά κύτταρα, σε αισθητήρες αερίων, σε φωτοδιόδους, ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, ως αντιβακτηριακά υλικά, κ.α.

Τα τελευταία χρόνια, οι νανοδομημένοι άνθρακες, όπως οι νανοσωλήνες άνθρακα και το γραφένιο λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους χρησιμοποιούνται ως συστατικά για την παρασκευή υβριδικών υλικών. Όμως η χρήση των νανοδομημένων ανθράκων περιορίζεται λόγω της ιδιότητας τους να συσσωματώνονται. Προκειμένου να ξεπεραστεί αυτό το εμπόδιο, νανοδομημένοι άνθρακες έχουν συνδεθεί ομοιοπολικά με διάφορα μόρια όπως πολυμερή, ώστε να αποφευχθεί η συσσωμάτωσή τους και να μειωθεί το εύρος της πολυδιασποράς τους [4-8]. Ωστόσο, η τροποποίηση με ομοιοπολικούς δεσμούς προκαλεί βλάβη του γραφίτικού πλέγματος οδηγώντας σε αλλοίωση των ιδιοτήτων τους. Αντιθέτως, τροποποίηση των ανθράκων με μη-ομοιοπολικούς δεσμούς (π.χ. π-π δεσμούς, ηλεκτροστατικής φύσεως αλληλεπιδράσεις, δεσμούς van der Waals, δεσμούς υδρογόνου, κ.α.) δεν επηρεάζει τη

δομή τους. Τέτοιες τροποποιήσεις έχουν επιτευχθεί χρησιμοποιώντας ένα πλήθος μορίων, όπως επιφανειοδραστικές ενώσεις [9, 10], πολυμερή [11-14], κ.α.. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα προαναφερθέντα μόρια να καταστούν τους νανοδομημένους άνθρακες συμβατούς με το μέσο διασποράς τους. Στο πλαίσιο αυτό, δενδριτικά πολυμερή έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς προκειμένου να αυξήσουν την διαλυτότητα των νανοδομημένων ανθράκων στο νερό [15-17]. Παρόλο που υπάρχουν αρκετές μελέτες πάνω στο συγκεκριμένο θέμα με σημαντικά αποτελέσματα, υπάρχει ακόμα μεγάλο περιθώριο βελτίωσης.

Νανοϋλικά άνθρακα, όπως το οξειδίο του γραφενίου (GO) ή οι νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) που έχουν σημαντικές ιδιότητες συνδυάζοντας τα με δενδριμερή ή υπερδιακλαδισμένα πολυμερή μπορούν να δημιουργήσουν νέα υβριδικά υλικά με βελτιωμένες ιδιότητες για πληθώρα εφαρμογών [5, 11, 18, 19]. Για παράδειγμα σε μια μελέτη οι οξυγονούγες ομάδες (εποξειδικές και καρβοξυλικές ομάδες) του GO αλληλεπιδρούν με τις αμινομάδες της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης (PEI) δίνοντας ένα νέο υβριδικό υλικό με μεγάλο εμβαδόν ενδοστρωματικής επιφάνειας κατάλληλο να χρησιμοποιηθεί ως προσροφητικό υλικό σε εφαρμογές είτε σε αέρια είτε σε υγρή φάση που απαιτούν ελεγχόμενο μέγεθος και χημική επιλεκτικότητα [20]. Σε μια άλλη μελέτη, η επιφάνεια του GO τροποποιήθηκε με την υπερδιακλαδισμένη πολυγλυκερόλη δίνοντας ένα βιοσυμβατό υβριδικό υλικό ικανό να χρησιμοποιηθεί ως φορέας φαρμάκων [21].

3.2 Υβριδικά νανοϋλικά άνθρακα ως φορείς φαρμάκων

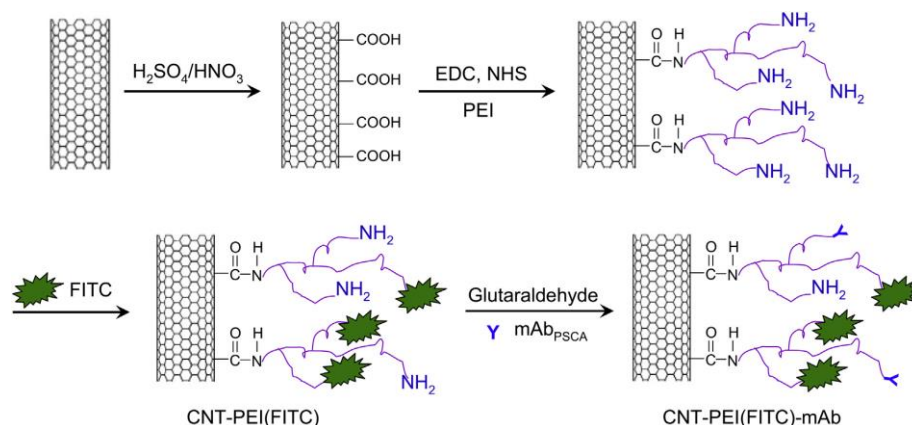
Η τεράστια ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας τις τελευταίες δεκαετίες πυροδότησαν το επιστημονικό ενδιαφέρον για την ανάπτυξη της νανοϊατρικής, η οποία σχετίζεται με τη διάγνωση, την πρόληψη και τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών [22, 23], χρησιμοποιώντας ποικίλα νανοσωματίδια, όπως δενδριμερή και υπερδιακλαδισμένα πολυμερή [24, 25], λιποσώματα [26, 27], πολυμερικά νανοσωματίδια [28, 29] και μικκύλια [30, 31], ανόργανα νανοσωματίδια [32, 33], νανοδομημένα υλικά άνθρακα [34, 35] κ.α. Η νανοθεραπευτική, η χρήση της οποίας αναπτύσσεται με ταχείς ρυθμούς, αξιολογείται για την επίλυση αρκετών προβλημάτων πάνω στη χορήγηση διαφόρων φαρμάκων. Λαμβάνοντας υπόψη τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων και την ικανότητά τους να εγκλείουν ή να δεσμεύουν μέσω ομοιοπολικών δεσμών διάφορες βιοδραστικές ενώσεις, τα καθιστούν ικανά να

χρησιμοποιηθούν ως αποτελεσματικά συστήματα μεταφοράς φαρμάκων προσφέροντας ποικίλα πλεονεκτήματα έναντι των ελεύθερων φαρμάκων. Τα πιο σημαντικά πλεονεκτήματα που μπορεί να προσφέρουν είναι η στοχευμένη μεταφορά των φαρμάκων σε συγκεκριμένους ιστούς, π.χ. καρκινικούς [36, 37], η αύξηση της διαλυτότητας τους, η μείωση της τοξικότητάς τους και η αύξηση της θεραπευτικής τους αποτελεσματικότητας [38, 39], ενώ ταυτόχρονα σε πολλές περιπτώσεις αυξάνουν τον χρόνο ζωής των φαρμάκων [40, 41]. Έτσι η χρήση των συστημάτων αυτών έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη πρόσληψη των φαρμάκων από τους ιστούς και συνεπώς να απαιτείται χαμηλότερη φαρμακευτική δόση για την αντίστοιχη θεραπεία, μειώνοντας ταυτόχρονα και τις ανεπιθύμητες παρενέργειες. Τις τελευταίες δεκαετίες πληθώρα νανοσωματιδίων έχουν αναπτυχθεί και μελετηθεί ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων συμπεριλαμβανομένων και αυτά με βάση τους νανοδομημένους άνθρακες.

Οι νανοδομημένοι άνθρακες εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα, τα οποία τους καθιστούν ελπιδοφόρα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων [42-44]. Τα πιο σημαντικά πλεονεκτήματα είναι η μεγάλη ειδική επιφάνεια τους που ευνοεί τη μεταφορά και την σταδιακή αποδέσμευση φαρμάκων, η εύκολη τροποποίηση της εξωτερικής επιφάνειάς τους με διάφορα μόρια, όπως πολυμερή, πεπτίδια, πρωτεΐνες, κ.α., η εξαιρετική βιοσυμβατότητα και η φυσικοχημική σταθερότητα τους, η ικανότητα τους να συμπλέκονται ισχυρά μέσω π-π δεσμών με αρωματικές ενώσεις, κ.α. [45]. Όμως η χρήση των νανοδομημένων ανθράκων περιορίζεται λόγω της μικρής ικανότητάς τους να διασπαρθούν σε υδατικά μέσα, όπως προαναφέρθηκε πιο πάνω, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη ικανότητα τους να διαπεράσουν τις κυτταρικές μεμβράνες [46-48]. Προκειμένου να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες, οι οποίες εστιάζονται στην τροποποίηση της επιφάνειάς τους λαμβάνοντας υβριδικά υλικά, τα οποία είναι συμβατά με το υδατικό μέσο διασποράς. Για παράδειγμα, ο Leng και οι συνεργάτες του [49] ανέπτυξαν ένα νέο σύστημα μεταφοράς φαρμάκων με βάση τροποποιημένους νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος. Συγκεκριμένα, νανοσωλήνες άνθρακα τροποποιήθηκαν μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών με χαμηλού μοριακού βάρους χιτοζάνη που έφερε το πεπτίδιο TAT με αλληλουχία αμινοξέων YGRKKRRQRRR. Το πεπτίδιο TAT είναι γνωστό ότι δρα ως μεμβρανικός μεταφορέας, δηλαδή παρουσιάζει την ικανότητα να διαπερνά αποτελεσματικά κυτταρικές μεμβράνες. Έτσι, παρασκευάστηκε ένα υβριδικό υλικό, το MWCNTs/TC, το οποίο εμφάνιζε ικανοποιητική ικανότητα να διασπαρθεί σε

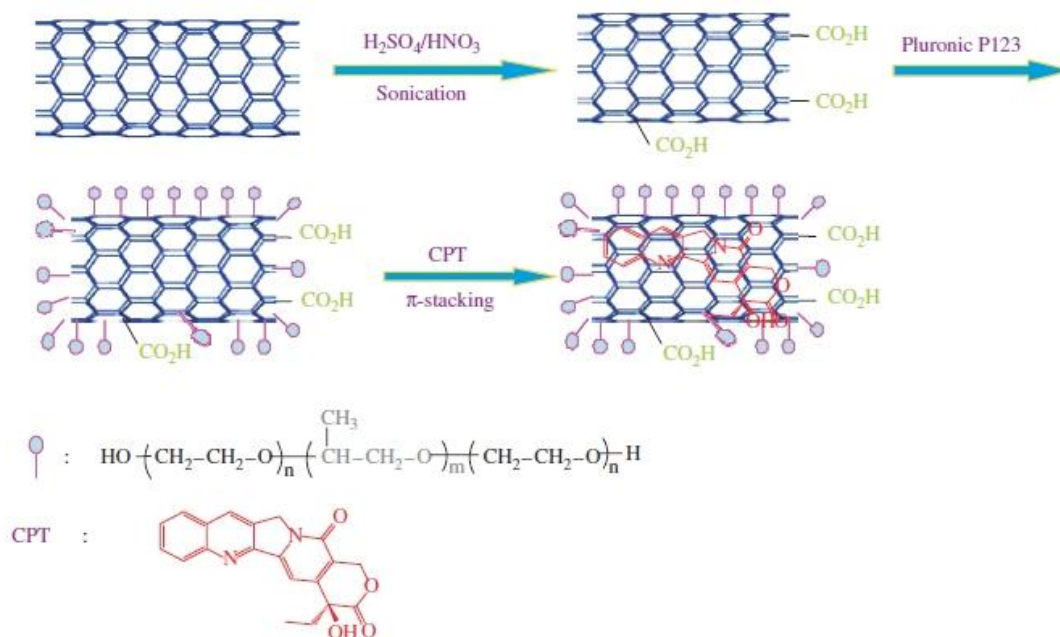
υδατικά μέσα, χαμηλή τοξικότητα και μεγάλη αποτελεσματικότητα να στοχεύει και να εντοπίζεται σε καρκινικούς ιστούς. Το υβριδικό αυτό υλικό, στην συνέχεια, μελετήθηκε ως νανοφορέας της δοξορουβικίνης (DOX), ενός ευρέως χρησιμοποιούμενου αντικαρκινικού φαρμάκου [50]. Βρέθηκε ότι η DOX αποδεσμεύεται σταδιακά και με σταθερό ρυθμό από τους MWCNTs/TC, ενώ ταυτόχρονα οι MWCNTs διατηρούσαν την ιδιότητα τους για υψηλή φωτοθερμική δράση κατά την ακτινοβολή τους με NIR ακτινοβολία. Από *in vitro* και *in vivo* πειράματα αποδείχθηκε ότι η DOX εμφάνισε ενισχυμένη δράση σε σχέση με την ελεύθερη, ενώ περαιτέρω ενίσχυση παρατηρήθηκε όταν το σύστημα εφαρμόστηκε σε συνδυασμό με υπερθερμία που προκαλείται από έκθεση του ιστού σε ακτινοβολία NIR. Συνεπώς, βρέθηκε ότι αυτό το σύστημα μεταφοράς της DOX είναι πολλά υποσχόμενο για να χρησιμοποιηθεί ως χημειο-φωτοθερμική συνδυαστική θεραπεία κατά του καρκίνου.

Σε ένα άλλο παράδειγμα, ο Wu και οι συνεργάτες του [51] συνέθεσαν ένα υβριδικό υλικό με βάση νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος, οι οποίοι είχαν τροποποιηθεί ομοιοπολικά με διακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη. Στην συνέχεια, στο υλικό αυτό εισήχθη το μονοκλωνικό αντίσωμα mAb του αντιγόνου βλαστικών κυττάρων του προστάτη PSCA (prostate stem cell antigen), ενώ επισημάνθηκε με την χρωστική ένωση ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC), δίνοντας το υβριδικό υλικό CNT-PEI(FITC)-mAb (Εικόνα 3.1). Από τα *in vitro* και *in vivo* πειράματα αποδείχθηκε ότι το υβριδικό υλικό CNT-PEI(FITC)-mAb είναι βιοσυμβατό και ικανό να στοχεύσει επιλεκτικά καρκινικά κύτταρα που υπερεκφράζουν το αντιγόνο PSCA. Επίσης, τα αποτελέσματα από την *in vitro* και *in vivo* απεικόνιση με υπερήχους έδειξαν ότι το CNT-PEI(FITC)-mAb έχει μεγάλες δυνατότητες να χρησιμοποιηθεί ως στοχεύουσα σκιαγραφική ουσία. Τέλος, στο CNT-PEI(FITC)-mAb δεσμεύθηκε το αντικαρκινικό φάρμακο DOX προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα του CNT-PEI(FITC)-mAb να χρησιμοποιηθεί ως φορέας φαρμάκων για στοχευμένη θεραπεία κατά του καρκίνου. Από τα *in vitro* και *in vivo* πειράματα βρέθηκε ότι το CNT-PEI(FITC)-mAb μπορεί επιλεκτικά να συσσωρεύεται σε καρκινικά κύτταρα και είναι ικανό να μεταφέρει το φάρμακο με επιτυχία σε καρκινικούς όγκους αναστέλλοντας την ανάπτυξή τους. Συνεπώς, το υβριδικό υλικό CNT-PEI(FITC)-mAb αποτελεί ένα «έξυπνο» πολυλειτουργικό σύστημα, το οποίο μπορεί να βρει εφαρμογές στην ταυτόχρονη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου.



Εικόνα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας του CNT-PEI(FITC)-mAb [51].

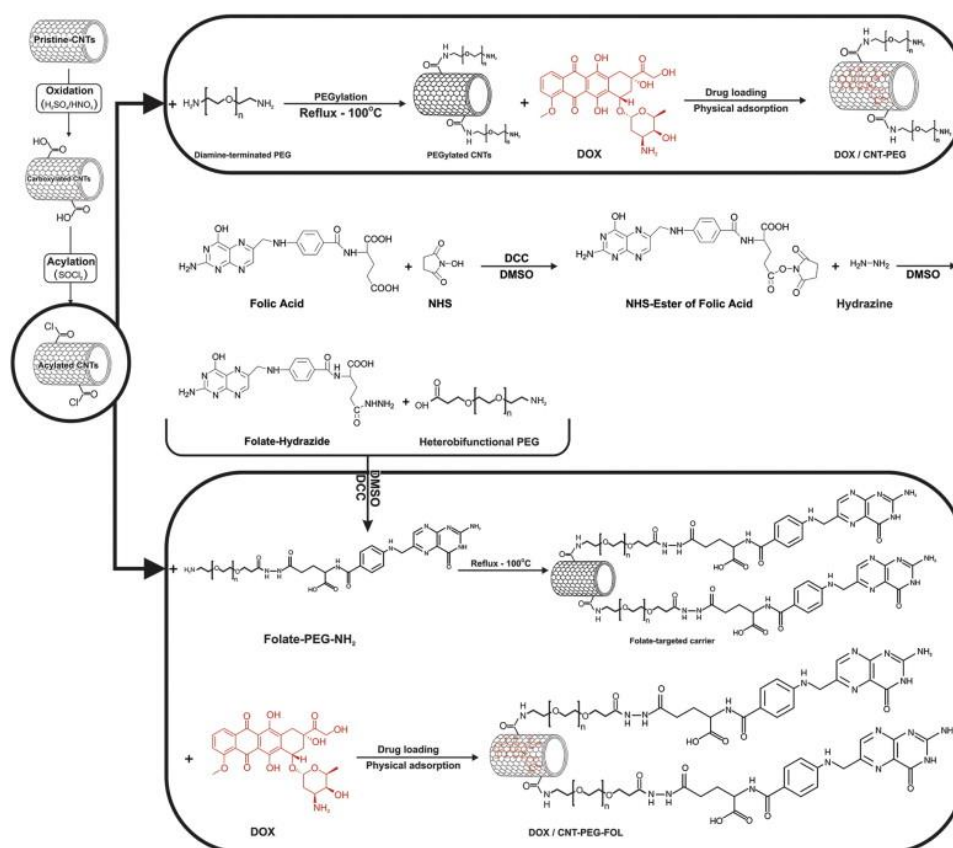
Επιπλέον, ο Zhong με τους συνεργάτες του [52], όπου συνέθεσαν ένα υβριδικό υλικό, το οποίο αποτελούνταν από νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος (MWCNTs) επικαλυμμένους με το εμπορικά διαθέσιμο συμπολυμερές pluronic P123 με σκοπό την βελτίωση της διαλυτότητας τους, αλλά και της αντικαρκινικής δράσης του φαρμάκου καμπτοθεκίνη (camptothecin, CPT) (Εικόνα 3.2). Διαπίστωσαν πως το υλικό που συνέθεσαν δημιουργεί μη ομοιοπολικά υπερμοριακά σύμπλοκα με το φάρμακο (P123-MWNTs-CPT). Από την *in vitro* κυτταροτοξική μελέτη σε κύτταρα HeLa (ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας), απέδειξαν πως τα σύμπλοκα που δημιουργούνται με το CPT βελτιώνουν την αντικαρκινική του δράση, σε σύγκριση με το ελεύθερο φάρμακο. Επιπλέον, τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι τροποποιημένοι MWCNTs, μπορούν να βελτιώσουν την πρόσληψη του αντικαρκινικού φαρμάκου από τα καρκινικά κύτταρα, το οποίο είναι πιθανό να οφείλεται στη μεγάλη επιφάνεια των νανοσωλήνων άνθρακα γενικότερα.



Εικόνα 3.2: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης των P123-MWNTs-CPT υπερμοριακών συμπλόκων [32].

Πολλές μελέτες έχουν γίνει με στόχο την δημιουργία ενός συστήματος στοχευμένης μεταφοράς της δοξορουβικίνης (DOX), εκμεταλλευόμενοι τους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και συγκεκριμένα τους υποδοχείς του φυλλικού οξέος (folate receptor, FR). Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι και η μελέτη του Dinan και των συνεργατών του [53] οι οποίοι τροποποίησαν νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) με αλυσίδες πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) και ομάδες φυλλικού οξέος. Συγκεκριμένα, σε οξειδωμένους CNTs εισήγαγαν αρχικά αλυσίδες PEG σε δύο διαφορετικές αναλογίες λαμβάνοντας τα υβριδικά υλικά CNTs-PEG και στη συνέχεια εισήγαγαν ομάδες φυλλικού οξέος (FOL) λαμβάνοντας τα υλικά CNTs-PEG-FOL (Εικόνα 3.3). Στα υλικά αυτά, δεσμεύτηκε μη-ομοιοπολικά η δοξορουβικίνη, με σκοπό την στοχευμένη μεταφορά του φαρμάκου. Βρέθηκε ότι το ποσοστό δέσμευσης της DOX μειώνεται με την αύξηση του ποσοστού υποκατάστασης των CNTs, λόγω της αύξησης της υδροφιλικότητάς τους. Ωστόσο, στα CNTs-PEG με υψηλό ποσοστό υποκατάστασης παρατηρήθηκε γρηγορότερη αποδέσμευση της DOX, λόγω του μειωμένου ποσοστού δέσμευσης του φαρμάκου. Από τα *in vitro* πειράματα σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας (HeLa) που έχουν υποδοχείς του φυλλικού οξέος βρέθηκε ότι η αντικαρκινική δράση της DOX όταν ήταν δεσμευμένη στα CNTs-PEG-FOL ήταν 3.2 φορές πιο ενισχυμένη από αυτή της DOX που ήταν δεσμευμένη στα CNTs-PEG που δεν περιείχαν ομάδες φυλλικού οξέος. Σε *in vivo* πειράματα μελετήθηκε η βιοκατανομή της DOX όπου βρέθηκε ότι κυρίως

συσσωρεύεται στο ήπαρ. Επίσης μελετήθηκε ο χρόνος που απαιτείται για να αποδεσμευτεί από το ήπαρ και βρέθηκε ότι όταν η DOX ήταν δεσμευμένη στα CNTs-PEG ο χρόνος αυτός ήταν σχεδόν δύο φορές μεγαλύτερος σε σχέση με την ελεύθερη DOX. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παρατηρείται και αύξηση του χρόνου κυκλοφορίας του φαρμάκου στο αίμα και επομένως και της πιθανότητας να προσληφθεί από κάποιο κακοήγη όγκο. Με βάση τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι τα CNTs-PEG-FOL είναι ένα πολλά υποσχόμενο σύστημα για στοχευμένη μεταφορά αντικαρκινικών φαρμάκων.



Εικόνα 3.3: Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας των DOX/CNTs-PEG και DOX/CNTs-PEG-FOL [53].

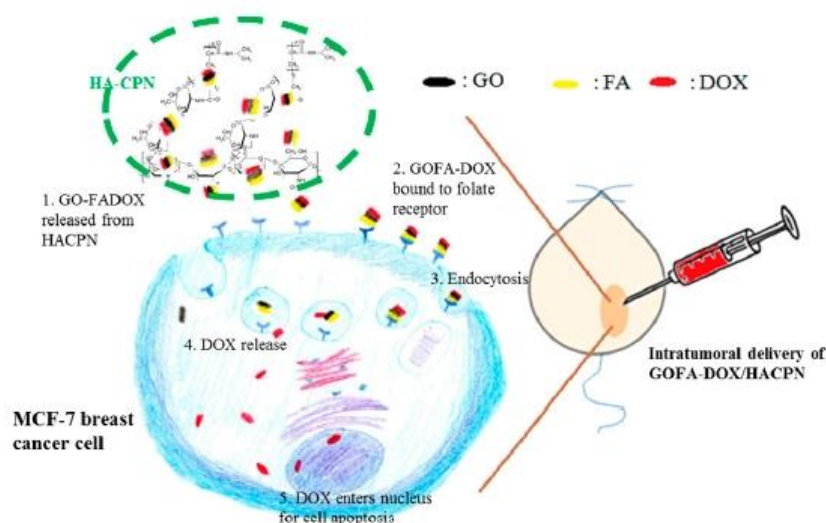
Επιπλέον, ο Sahoo και οι συνεργάτες του [54], χρησιμοποίησαν ένα υδρόφιλο πολυμερές, την πολυ(βυνιλική αλκοόλη) (PVA), για να τροποποιήσουν νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος (MWCNTs) καθώς και το οξείδιο του γραφενίου (GO) με σκοπό την μεταφορά της καμποθεκίνης (CPT), ενός αντικαρκινικού φαρμάκου. Η CPT δεσμεύθηκε, μέσω π-π αλληλεπιδράσεων, με τα υβριδικά υλικά PVA-MWCNTs και PVA-GO και στη συνέχεια μελετήθηκε η τοξικότητα τους σε ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του μαστού (MDA-MB-231) και σε μια κυτταρική

σειρά καρκίνου του δέρματος (A-5RT3). Από τα πειράματα αυτά βρέθηκε ότι η αντικαρκινική δράση της δεσμευμένης CPT είναι μέχρι και 15 φορές μεγαλύτερη από αυτή του ελεύθερου φαρμάκου.

Σε μια άλλη μελέτη ο Αυγουστάκης και οι συνεργάτες του [55] παρασκεύασαν υβριδικά υλικά με βάση το οξείδιο του γραφενίου, το οποίο είχε τροποποιηθεί με συμπολυμερή πολυγαλακτικού οξέος και πολυαιθυλενογλυκόλης, διαφόρων μοριακών βαρών. Τα υλικά αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως συστήματα μεταφοράς και σταδιακής αποδέσμευσης του αντικαρκινικού φαρμάκου πακλιταξέλη. Από τα *in vitro* πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε A549 καρκινικά κύτταρα πνεύμονα βρέθηκε ότι η αντικαρκινική δράση του δεσμευμένου πακλιταξέλη ήταν μεγαλύτερη από αυτή του ελεύθερου λόγω της καλύτερης πρόσληψής του από τα κύτταρα. Επίσης, διαπιστώθηκε ότι η δέσμευση του φαρμάκου είναι δυνατόν να ρυθμιστεί ανάλογα με το μοριακό βάρος του πολυμερούς, αλλά και από το ποσοστό του οξειδίου του γραφενίου που προσδένεται στο πολυμερές.

Ο Fong και οι συνεργάτες του [56], εκμεταλλευόμενοι την ιδιότητα του οξειδίου του γραφενίου (GO) ως προς την αποδέσμευση φαρμάκων συναρτήσει του pH, τροποποίησαν το οξείδιο του γραφενίου με ομάδες φυλλικού οξέος (FA), λαμβάνοντας το υλικό GOFA, με στόχο να χρησιμοποιηθεί για στοχευμένη μεταφορά της δοξορουβικίνης (DOX). Στη συνέχεια, το σύστημα GOFA-DOX εγκλείστηκε σε μία θερμοευαίσθητη, *in-situ* σχηματιζόμενη υδρογέλη (HACPN), αποτελούμενη από υαλουρονικό οξύ (HA), χιτοζάνη (C) και g-πολυ(N-ισοπροπυλο ακριλαμίδιο), με σκοπό τη μεταφορά του φαρμάκου εντός καρκινικών όγκων, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.4. Γνωρίζοντας ότι η αποδόμηση του HACPN μπορούσε να διαρκέσει μέχρι και τρεις εβδομάδες, η μεταφορά του GOFA-DOX/HACPN εντός του όγκου αναμενόταν ότι θα παρείχε ελεγχόμενη και στοχευμένη αποδέσμευση της DOX. Έτσι, αρχικά, μελετήθηκε η αποδέσμευση της DOX από το GOFA σε pH=5.5 και 7.4 και από το σύστημα GOFA-DOX/HACPN σε pH=7.4. Βρέθηκε ότι η DOX αποδεσμεύτηκε από το GOFA-DOX πιο αποτελεσματικά στο pH=5.5 από ότι στο 7.4, ενώ δεν αποδεσμεύτηκε καθόλου από το GOFA-DOX/HACPN σε pH=7.4. Στη συνέχεια, από τα *in vitro* πειράματα σε καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7, τα οποία περιέχουν υποδοχείς φυλλικού οξέος, αποδείχθηκε ότι το GOFA-DOX προσλαμβάνεται με ενδοκύτωση από τα κύτταρα και η αντικαρκινική δράση της DOX εμφανίστηκε πιο ενισχυμένη σε σχέση με την ελεύθερη λόγω της αποτελεσματικότερης πρόσληψης της από τα κύτταρα και της σταδιακής της

αποδέσμευσης μέσα σ' αυτά. Τέλος, από τα *in vivo* πειράματα σε ανοσοκατεσταλμένους μύες BALB/c στους οποίους εμβολίασαν υποδόρια MCF-7 κύτταρα, μετά από χορήγηση 21 ημερών, διαπιστώθηκε ότι οι όγκοι των ζώων που τους είχε χορηγηθεί το GOFA-DOX/HACPN ήταν σημαντικά μειωμένοι σε σχέση με αυτούς των ζώων που είχε χορηγηθεί ελεύθερη DOX ή ισοτονικό αλατούχο διάλυμα. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι το GOFA-DOX/HACPN μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα ασφαλές και αποτελεσματικό χημειοθεραπευτικό σύστημα για την καταπολέμηση του καρκίνου του μαστού ή για πιθανή τοπική θεραπεία άλλων συμπαγών όγκων.



Εικόνα 3.4: Σχηματική απεικόνιση της αντικαρκινικής δράσης της DOX, η οποία μεταφέρθηκε με το σύστημα GOFA-DOX/HACPN σε όγκους ανοσοκατεσταλμένων μύων BALB/c που τους είχαν εμβολιάσει υποδόρια με καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7 [56].

Τα υδρόφιλα οξειδωμένα CNDs μελετήθηκαν ως αποτελεσματικοί φορείς φαρμάκων και συγκεκριμένα του γνωστού αντικαρκινικού φαρμάκου, δοξορουβικίνη (DOX) [57]. Τα oxCNDs αποδείχθηκε, αρχικά, ότι είναι ικανά να δεσμεύσουν την DOX σε υψηλό ποσοστό (45%) λόγω των ισχυρών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του γραφιτικού πλέγματος και των αρωματικών δακτυλίων της DOX. Από τις *in vitro* μελέτες σε προστατικά κύτταρα A549 αποδείχθηκε ότι η δραστηριότητα της δεσμευμένης DOX στα oxCNDs εμφανίστηκε σημαντικά αυξημένη σε σχέση με την ελεύθερη DOX, ενώ τα oxCNDs βρέθηκε ότι δεν εμφανίζουν σχεδόν καμία τοξικότητα.

3.3 Υβριδικά νανοϋλικά άνθρακα ως αντιβακτηριακά υλικά

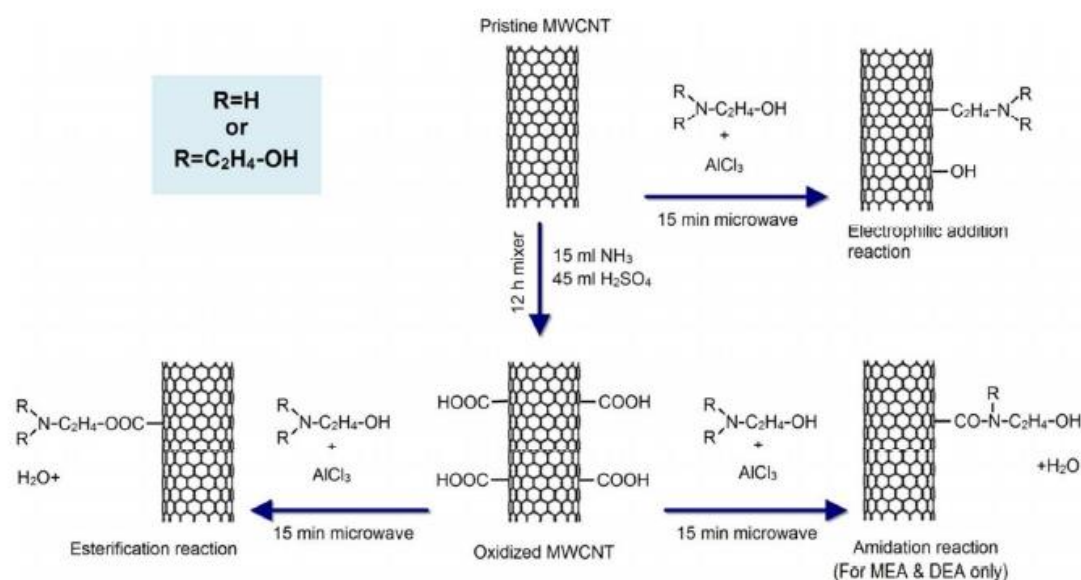
Με βάση τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, η πολλαπλή ανθεκτικότητα μιας βακτηριακής λοίμωξης στα αντιβιοτικά αποτελεί μια από τις κορυφαίες απειλές για την ανθρώπινη υγεία. Είναι δεδομένο, ότι τα βακτήρια εξελίσσονται για να αντιστέκονται στα αντιβιοτικά γρηγορότερα από ότι μπορούν οι επιστήμονες να αναπτύξουν νέα εξελιγμένα φάρμακα. Επομένως είναι εμφανή η ανάγκη για την ανάπτυξη νέων υλικών, ικανών να χρησιμοποιηθούν για την αντιμετώπιση παθογόνων μικροοργανισμών που είναι ανθεκτικοί στα αντιβιοτικά. Έτσι τα τελευταία χρόνια πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν ασχοληθεί με την ανάπτυξη νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα, τα οποία εμφανίζουν αντιβακτηριακές ιδιότητες [48, 58]. Μελέτες με τροποποιημένους νανοσωλήνες άνθρακα τόσο μονού (SWCNTs) όσο και πολλαπλού τοιχώματος (MWCNTs) που φέρουν διάφορες λειτουργικές ομάδες στην επιφάνειά τους έδειξαν αξιοσημείωτη αντιβακτηριακή δράση κατά των gram (+) και gram (-) βακτηρίων [25, 59-61]. Συγκεκριμένα, οξειδωμένοι SWCNTs που φέρουν οξυγονούχες ομάδες στην επιφάνειά τους εμφάνισαν βελτιωμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες έναντι τόσο gram (+) όσο και gram (-) βακτηρίων. Αντιθέτως, οξειδωμένοι MWCNTs που έφεραν τις ίδιες λειτουργικές ομάδες δεν εμφάνισαν σημαντική αντιβακτηριακή δράση [62]. Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι οι ιδιότητες των CNTs, όπως η διάμετρος τους [63], το μήκος τους [64], η ικανότητα τους να συσσωματώνονται [60], η συγκέντρωσή τους [65], η τροποποίηση της επιφάνειάς τους [62, 66, 67], κ.λπ., επηρεάζουν την αντιβακτηριακή τους δράση. Από αυτή την άποψη, η ικανότητά τους να διασπαρθούν σε υδατικά μέσα μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την αντιβακτηριακή αποτελεσματικότητά τους, καθώς τροποποιημένα CNTs που δίνουν σταθερές υδατικές διασπορές, μπορούν να αλληλεπιδράσουν αποτελεσματικά με τα βακτήρια, εμφανίζοντας έτσι εξαιρετικές αντιβακτηριακές ιδιότητες. Πράγματι, βρέθηκε [10] ότι τροποποιημένοι MWCNTs με την τασιενεργή ένωση διόκτυλο σουλφοηλεκτρικό νάτριο έχουν την ικανότητα να δίνουν εξαιρετικά σταθερές υδατικές διασπορές και να εμφανίζονται πιο τοξικοί για τα βακτήρια *Streptococcus mutans* σε σχέση με τους μη τροποποιημένους MWCNTs, οι οποίοι είναι γνωστό ότι δεν διασπείρονται αποτελεσματικά στο νερό. Αυτό οφείλεται στην ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν ισχυρά με τα βακτήρια μέσω ηλεκτροστατικών ή/και van der Waals δυνάμεων, σχηματίζοντας συσσωματώματα κυττάρων-MWCNTs με αποτέλεσμα να τα οδηγούν στο θάνατο, λόγω είτε αναστολής

της μεταφοράς των διαμεμβρανικών ηλεκτρονίων, είτε λόγω διείσδυσης τους μέσω των κυτταρικών τοιχωμάτων και μεμβρανών, η οποία οδηγεί είτε σε ρήξη είτε σε παραμόρφωση τους μεταβάλλοντας έτσι το μεταβολισμό τους [68].

Ο Zardini και οι συνεργάτες του [69], τροποποίησαν νανοσωλήνες πολλαπλού τοιχώματος (MWCNTs) με θετικώς φορτισμένα αμινοξέα, όπως αργινίνη (MWCNTs-Arg) και λυσίνη (MWCNTs-Lys), ακολουθώντας μια φθηνή και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο με τη χρήση ακτινοβολίας μικροκυμάτων (microwave irradiation). Από τις ποιοτικές και ποσοτικές βακτηριακές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν διαπιστώθηκε ότι μετά την τροποποίηση των νανοσωλήνων, η αντιβακτηριακή τους δράση αυξήθηκε σημαντικά σε σχέση με τα μη τροποποιημένα MWCNTs έναντι διαφόρων τύπων βακτηρίων, όπως των gram (-) βακτηρίων *Escherichia coli* και *Salmonella typhimurium*, καθώς και του ανθεκτικού στελέχους των gram (+) βακτηρίων *Staphylococcus aureus*. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι τα MWCNTs-Arg εμφανίζουν τις πιο ενισχυμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες έναντι των κατά gram (-) βακτηρίων, ακολουθούμενων από τα MWCNTs-Lys και τα μη τροποποιημένα MWCNTs. Αυτό αποδόθηκε στην παρουσία των θετικά φορτισμένων ομάδων των αμινοξέων στην επιφάνεια των MWCNTs, οι οποίες αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με τις μεμβράνες των βακτηρίων, οδηγώντας τα στο θάνατο. Συνεπώς, τα MWCNTs τροποποιημένα με κατιονικά αμινοξέα μπορεί να θεωρηθούν οικονομικότερα, λιγότερα τοξικά αντιβακτηριακά υλικά ικανά να αντικαταστήσουν τους νανοσωλήνες μονού τοιχώματος ή τα μεταλλικά νανοσωματίδια για εφαρμογές στην βιομηχανία.

Ένα χρόνο μετά, ο Zardini με τους συνεργάτες του [70], μελέτησαν τις αντιβακτηριακές ιδιότητες των MWCNTs, τροποποιημένων με ομάδες αιθανολαμίνης (EA). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.5, τροποποίησαν τους νανοσωλήνες πολλαπλού τοιχώματος με μονο-, δι- και τρι- αιθανολαμίνη (MEA, DEA, TEA) χρησιμοποιώντας την μέθοδο των μικροκυμάτων. Στην συνέχεια, μελέτησαν τις αντιβακτηριακές ιδιότητες των παρασκευασθέντων υλικών (MWCNT-MEA, MWCNT-DEA και MWCNT-TEA) σε τέσσερα gram (-) βακτήρια (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium*) και σε τέσσερα gram (+) βακτήρια (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Streptococcus pneumonia*). Με βάση τις αντιβακτηριακές μελέτες που πραγματοποίησαν, απέδειξαν ότι η αντιβακτηριακή δράση του MWCNT-TEA ήταν καλύτερη από το MWCNT-DEA και το MWCNT-MEA, αλλά και από τους σκέτους

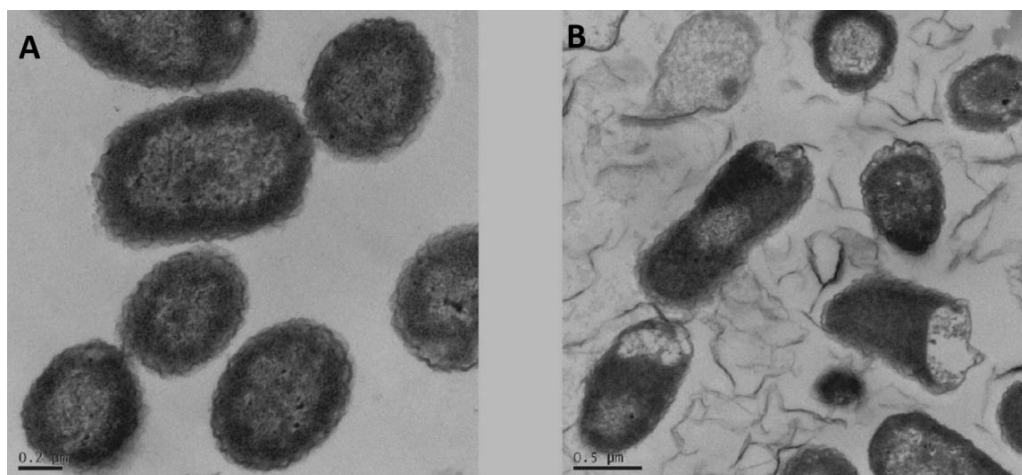
νανοσωλήνες πολλαπλού τοιχώματος. Επιπλέον, βρήκαν ότι η δράση όλων των υλικών ήταν πιο ενισχυμένη στα gram (-) βακτήρια από ότι στα gram (+) βακτήρια. Αυτό αποδόθηκε στην παρουσία των θετικά φορτισμένων αμινομάδων στην επιφάνεια των MWCNTs, οι οποίες αλληλεπιδρούν με τα αρνητικά φορτισμένα κυτταρικά τοιχώματα, μεταβάλλοντας έτσι τον φυσιολογικό μεταβολισμό των βακτηρίων, οδηγώντας τα τελικά στο θάνατο.



Εικόνα 3.5: Σχηματική αναπαράσταση της χημικής τροποποίησης των MWCNTs με MEA, DEA και TEA [70].

Ο Qi και οι συνεργάτες του [71] παρασκεύασαν ένα υβριδικό υλικό με βάση MWCNTs, οι οποίοι είχαν τροποποιηθεί ομοιοπολικά με την νισίνη (nisin), ένα πολυκυκλικό αντιβακτηριακό πεπτίδιο, μέσω μιας αλυσίδας πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) μοριακού βάρους 1000 Da. Το νανοϋλικό αυτό εμφάνισε επτά φορές υψηλότερη αντιβακτηριακή δράση έναντι των βακτηρίων *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* και *Bacillus subtilis* σε σχέση με τους μη τροποποιημένους νανοσωλήνες. Επιπλέον, το νανοϋλικό αυτό ακινητοποιήθηκε πάνω σε μεμβράνες PTFE και αποδείχθηκε ότι είναι ικανό να εμποδίσει αποτελεσματικά την μόλυνση της μεμβράνης από βιολογικές επικαθίσεις. Αντίστοιχα με τους νανοσωλήνες άνθρακα, το 2010 από την ομάδα των Huang και των συνεργατών του [72] βρέθηκε ότι το οξείδιο του γραφενίου (GO) εμφανίζει αντιβακτηριακές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, μελέτησαν την αλληλεπίδραση του GO με τα gram (-) βακτήρια *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5a και βρήκαν ότι σε συγκέντρωση 85 µg/mL αναστέλλει σημαντικά την ανάπτυξη τους μετά από επώαση στους 37 °C

για 2 h με ρυθμό αναστολής πάνω από 90%, ενώ παρουσιάζει μειωμένη τοξικότητα έναντι των ευκαρυωτικών κυττάρων. Μελέτη των βακτηρίων με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης έδειξε ότι οι αντιβακτηριακές ιδιότητες του GO αποδίδονται σε βλάβη της κυτταρικής τους μεμβράνης που οδηγεί σε διαρροή του κυτταροπλάσματος τους (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6: Εικόνες TEM βακτηρίων *E. coli* επωασμένων: (A) με τροφικό μέσο και (B) με 85 µg/mL GO για 2 h στους 37 °C [72].

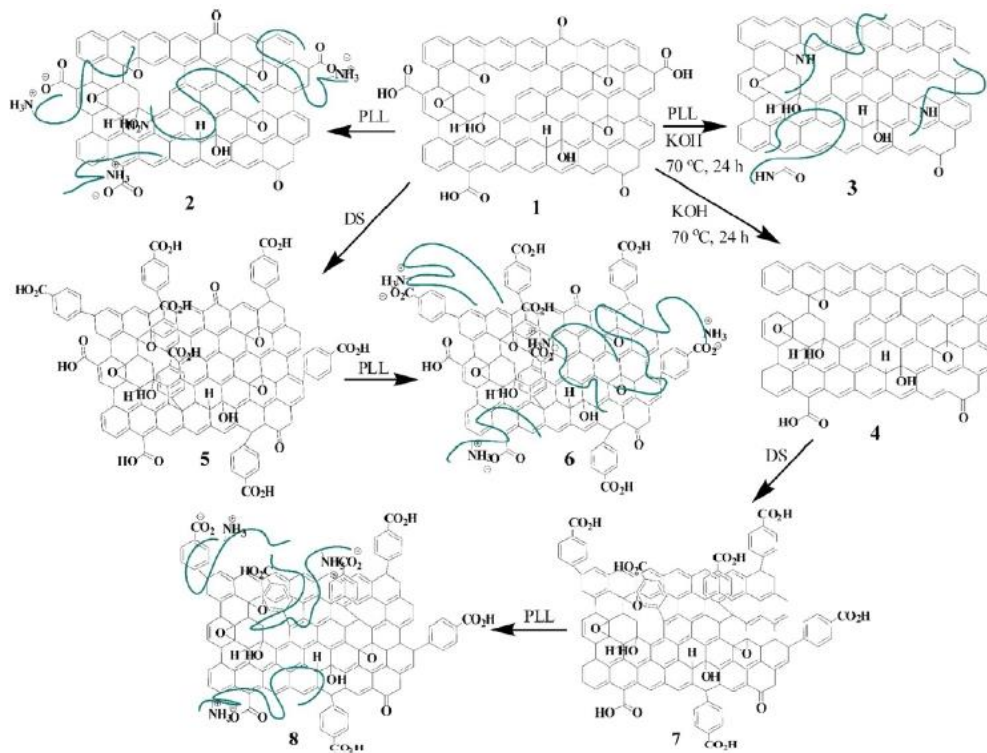
Στη συνέχεια ο Liu και οι συνεργάτες του [58] μελέτησαν τις αντιβακτηριακές ιδιότητες τεσσάρων υλικών με βάση το γραφένιο (το γραφίτη (Gt), το οξείδιο του γραφίτη (GtO), το οξείδιο του γραφενίου (GO) και την ανοιγμένη μορφή του οξειδίου του γραφενίου (rGO)) σε βακτήρια *E. coli* προκειμένου να διερευνήσουν τον μηχανισμό δράσης του γραφενίου. Βρήκαν ότι το GO εμφάνισε την ισχυρότερη αντιβακτηριακή δράση έναντι των υπολοίπων υλικών ακολουθούμενο από το rGO, το Gt, και το GtO. Επιπλέον, πρότειναν ένα μηχανισμό δράσης τριών σταδίων όπου αρχικά τα βακτήρια εναποτίθενται πάνω στα υλικά με βάση το γραφένιο, ειδικότερα σε αυτά που περιέχουν περισσότερες λειτουργικές ομάδες και είναι μικρότερα σε μέγεθος, ενώ στη συνέχεια τα υλικά αυτά προκαλούν μεμβρανικό στρες λόγω της διαταραχής και καταστροφής των κυτταρικών μεμβρανών καθώς και οξειδωτικό στρες, οδηγώντας τελικά σε κυτταρικό θάνατο.

Τα ανωτέρω αποτελέσματα φαίνεται να υποστηρίζουν την ιδέα ότι το γραφένιο και τα παράγωγα του μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αποτελεσματικά αντιβακτηριακά υλικά με χαμηλή τοξικότητα έναντι των ευκαρυωτικών κυττάρων. Ωστόσο, άλλες μελέτες έδειξαν ότι το GO μπορεί να μην έχει αντιβακτηριακή δράση [73]. Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι το GO δεν εμφανίζει καμία αισθητή αντιμικροβιακή

δράση κατά των βακτηρίων *E. coli* ή *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Αντίθετα, αν αυτό τροποποιηθεί με νανοσωματίδια αργύρου Ag τότε μόνο είναι ικανό να εμποδίσει αποτελεσματικά την ανάπτυξη βακτηρίων. Είναι ενδιαφέρουσα, μια άλλη εργασία του Ruiz και των συνεργατών του [74], στην οποία βρέθηκε ότι το GO δεν παρουσίασε καμία σημαντική αντιβακτηριακή δράση ούτε καμία τοξικότητα έναντι ευκαρυωτικών κυττάρων, αλλά αντιθέτως βελτίωσε το ρυθμό της κυτταρικής ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, βρήκαν ότι το GO προκάλεσε δραματική αύξηση της μικροβιακής ανάπτυξης ενισχύοντας τον πολλαπλασιασμό τους και το σχηματισμό βιο-υμενίων λόγω της εναπόθεση των βακτηρίων πάνω στο γραφитικό πλέγμα, αντί να αναστέλλει την ανάπτυξή τους. Αντίστοιχα αποτελέσματα βρέθηκαν και σε άλλες εργασίες όπου το GO εμφάνισε εξαιρετικές αντιβακτηριακές ιδιότητες έναντι βακτηρίων *E. coli* μόνο όταν ήταν τροποποιημένο π.χ. με νανοσωματίδια αργύρου [75-77].

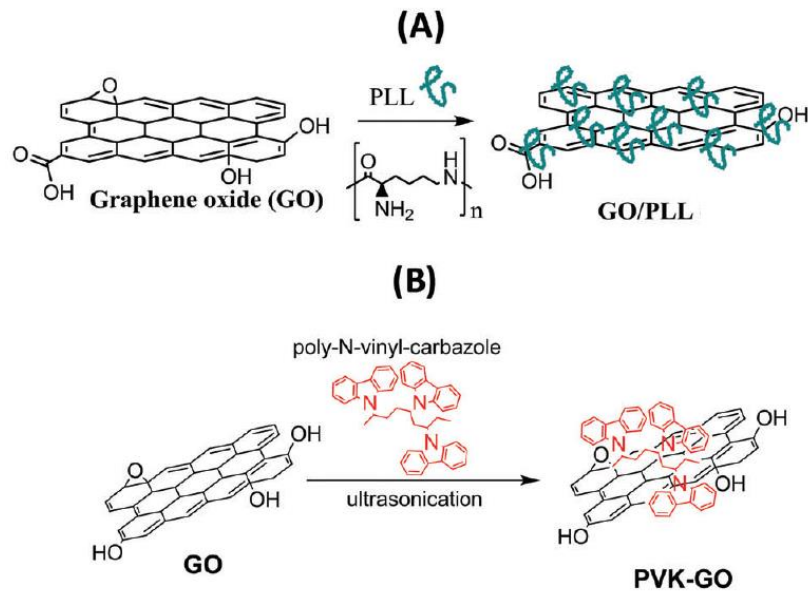
Αυτά τα αμφιλεγόμενα αποτελέσματα σχετικά με την αντιβακτηριακή δράση του GO οφείλονται στις διαφορετικές συνθετικές μεθόδους, στο μέγεθος των γραφитικών πλεγμάτων, στη δομή του, και στην κατεργασία της επιφάνειάς του. Παρόλα αυτά πολλές εργασίες έχουν δημοσιευτεί όπου το GO τροποποιημένο ή μη έχει ενσωματωθεί σε πολυμερικές μήτρες δίνοντας πληθώρα νανοςύνθετων υλικών με εξαιρετικές αντιβακτηριακές ιδιότητες [78-80], ικανών να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες βιομηχανικές εφαρμογές, όπως για τον καθαρισμό του νερού [81-84].

Επίσης, σε άλλες εργασίες το GO τροποποιήθηκε με διάφορα πολυμερή δίνοντας υβριδικά υλικά με εξαιρετικές αντιβακτηριακές ιδιότητες ικανά να χρησιμοποιηθούν για διάφορες εφαρμογές. Είναι γνωστό ότι η παρουσία αμινομάδων και ομάδων τεταρτοταγών αμμωνίου ενισχύει τις αντιβακτηριακές ιδιότητες των νανοδομών. Για παράδειγμα ο Lee και οι συνεργάτες του τροποποίησαν το GO και το rGO με το πολυμερές της πολυ(L-λυσίνης) (PLL) [85] μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ή ομοιοπολικών δεσμών λαμβάνοντας μια σειρά υβριδικών υλικών (Εικόνα 3.7). Όλα τα υλικά εμφάνισαν βελτιωμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες σε σχέση με τα αρχικά GO και rGO, ενώ ταυτόχρονα βρέθηκε ότι είναι βιοσυμβατά με τα ανθρώπινα κύτταρα και ενισχύουν την ανάπτυξη τους.



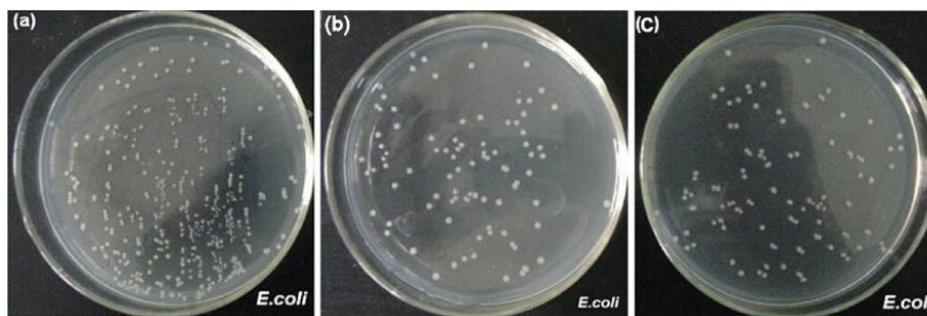
Εικόνα 3.7: Σχηματική αναπαράσταση της παρασκευής νανοσύνθετων υλικών με βάση το οξείδιο του γραφενίου. 1:GO, 2:GO-PLL, 3:rGO-PLL, 4:rGO, 5:GO-DS, 6:GO-DS-PLL, 7:rGO-DS, 8:rGO-DS-PLL [85].

Σε μια άλλη εργασία του Rodrigues [86] και των συνεργατών του, το GO τροποποιήθηκε με το πολυμερές πολυβινυλο-*N*-καρβαζόλη (PVK) δίνοντας το υβριδικό υλικό PVK-GO (Εικόνα 3.8B). Η τοξικότητα του υλικού αυτού μελετήθηκε τόσο σε gram (+) και gram (-) βακτήρια όσο και σε ινοβλάστες. Βρέθηκε ότι το PVK-GO έχει πολύ καλές αντιβακτηριακές ιδιότητες εφόσον μειώνει τη μεταβολική δραστηριότητα των βακτηρίων, οδηγώντας τα τελικά σε θάνατο, ενώ ταυτόχρονα εμφάνισε χαμηλή τοξικότητα στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Επιπλέον, το PVK-GO χρησιμοποιήθηκε ως επίστρωση σε επιφάνεια οξειδίου ινδίου-κασσίτερου (ITO) και μελετήθηκε η ικανότητα του να εμποδίσει το σχηματισμό βιο-υμενίου. Από τα πειράματα αυτά βρέθηκε ότι οι τροποποιημένες επιφάνειες ITO εμφάνισαν εξαιρετική αντιβακτηριακή δράση λόγω της παρουσίας του PVK-GO προκαλώντας μέγιστη αναστολή της ανάπτυξης βιο-υμενίου. Συνεπώς, το PVK-GO προτάθηκε ως ένα ελπιδοφόρο υλικό, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πιθανές εφαρμογές σε βιοϊατρικούς και βιομηχανικούς τομείς.



Εικόνα 3.8: Χημική τροποποίηση του GO: (A) με την πολύ(L-λυσίνη) (PLL) και (B) με πολυβινυλο-N-καρβαζόλη (PVK) [86].

Η ακινητοποίηση των ενζύμων σε διάφορα υλικά αποσκοπεί στο να αντιμετωπίσει προβλήματα των ενζύμων, όπως η χαμηλή δραστηριότητά τους, η αστάθεια τους και η δυσκολία διατήρησης της δομής τους. Έτσι, ο Duan και οι συνεργάτες του [87], ακινητοποίησαν το ένζυμο λυσοζύμη (Ly) πάνω στο γραφικό πλέγμα του οξειδίου του γραφενίου (GO) και της ανοιγμένης μορφής του οξειδίου του γραφενίου (CRGO), μέσω ηλεκτροστατικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Γενικά, η λυσοζύμη είναι γνωστή για την εξαιρετική αντιβακτηριακή δράση της, ενώ τα προϊόντα κατάλυσης της έχουν βρεθεί ότι είναι μη τοξικά. Από την αντιβακτηριακή μελέτη των υλικών αυτών σε βακτήρια *E. coli* βρέθηκε ότι το CRGO-Ly εμφάνισε καλύτερες ιδιότητες σε σχέση με το GO-Ly. Αυτό αποδόθηκε στο γεγονός ότι η υδρόφοβη αλληλεπίδραση μεταξύ του CRGO και της Ly έχει μικρή επίδραση στη δραστηριότητα της LY, σε αντίθεση με την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση που λαμβάνει χώρα μεταξύ του GO και της Ly, η οποία έχει μεγάλη επίδραση στη διαμόρφωση της λυσοζύμης, μειώνοντας έτσι τη δραστηριότητά της. Στην συνέχεια, τα υλικά GO-Ly και CRGO-Ly ενσωματώθηκαν σε μήτρα πολυαιθεροσουλφόνης (PES) με σκοπό την παρασκευή μεμβρανών υπερδιήθησης μέσω της μεθόδου ανάστροφης φάσης. Μελετήθηκαν οι αντιβακτηριακές ιδιότητες των νανοσύνθετων μεμβρανών έναντι των βακτηρίων *Escherichia coli* και βρέθηκε ότι και τα δύο είδη μεμβρανών ήταν πολύ αποτελεσματικά στην μείωση της ανάπτυξης των βακτηρίων, με αποτελεσματικότερη τη μεμβράνη που περιείχε CRGO-Ly (Εικόνα 3.9).



Εικόνα 3.9: Αντιβακτηριακή δράση (a) της μεμβράνης PES και των νανοσύνθετων μεμβρανών με (b) 1.5% GO-Ly και με (c) 1.5% CRGO-Ly έναντι των βακτηρίων *Escherichia coli* [87].

Σε μια άλλη εργασία, ο Kanchanapally με τους συνεργάτες του [88], τροποποίησαν μέσω ομοιοπολικού δεσμού το οξείδιο του γραφενίου με ένα αντιμικροβιακό πεπτίδιο, τη νισίνη, και ανέπτυξαν για πρώτη φορά μια τρισδιάστατη πορώδη μεμβράνη με το παράγωγο αυτό, με σκοπό τον αποτελεσματικό διαχωρισμό και τον πλήρη θάνατο των ανθεκτικών στην μεθικιλίνη παθογόνων βακτηρίων *Staphylococcus aureus* (MRSA) που υπάρχουν στο νερό. Απέδειξαν πως τα MRSA παγιδεύονται από την πορώδη μεμβράνη επιτρέποντας να περάσει μόνο καθαρό νερό, μια που οι πόροι της μεμβράνης ήταν κατά πολύ μικρότεροι (~300 nm) από το μέγεθος των MRSA (~1000 nm). Στη συνέχεια, ξεπλένοντας την μεμβράνη μετά τη χρήση και λαμβάνοντας τους MRSA που είχαν παρακρατηθεί από αυτή, διαπίστωσαν πως σχεδόν το 100% των MRSA είχε σκοτωθεί, προτείνοντας τον εξής μηχανισμό: Αρχικά, η 3D δομή της μεμβράνης παγιδεύει τα MRSA βακτήρια, ενώ το GO τους προκαλεί μεμβρανικό στρες, στη συνέχεια, λόγω της αυξημένης τοπικής συγκέντρωσης της νισίνης, διευκολύνεται η αλληλεπίδραση της νισίνης με τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων, προκαλώντας τελικά το θάνατό τους. Τέλος, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των αντιβακτηριακών μελετών όταν χρησιμοποιήθηκε ελεύθερη νισίνη, μεμβράνη οξειδίου του γραφενίου καθώς και η μεμβράνη οξειδίου του γραφενίου τροποποιημένου με τη νισίνη αποδείχθηκε ότι η τελευταία ήταν η αποτελεσματικότερη. Επομένως, η μεμβράνη αυτή έχει πολλές πιθανότητες να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή νερού απαλλαγμένου από βακτήρια MRSA και ίσως και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών.

Βιβλιογραφία 3^{ου} Κεφαλαίου

- [1] C. Sanchez, H. Arribart, M.M. Giraud Guille, «Biomimetism and bioinspiration as tools for the design of innovative materials and systems», *Nature Materials*, 4(4) (2005) 277-288.
- [2] T. S. Srivatsan, «A review of: hybrid materials: synthesis, characterization, and application», *Materials and Manufacturing Processes*, 24, 10–11, 1231–1231 (2009).
- [3] X.W. C. Xu, J. Zhu, X. Yang, and L. Lu, «Deposition of Co₃O₄ nanoparticles onto exfoliated graphite oxide sheets», *Journal of Materials Chemistry A*, 18, 46, 5625–5629 (2008).
- [4] L. Li, C. He, W. He, C. Wu, «Formation kinetics and scaling of “defect-free” hyperbranched polystyrene chains with uniform subchains prepared from seesaw-type macromonomers», *Macromolecules*, 44(20) (2011) 8195-8206.
- [5] J.-T. Sun, C.-Y. Hong, C.-Y. Pan, «Surface modification of carbon nanotubes with dendrimers or hyperbranched polymers», *Polymer Chemistry*, 2(5) (2011) 998-1007.
- [6] Q.-P. Feng, X.-M. Xie, Y.-T. Liu, W. Zhao, Y.-F. Gao, «Synthesis of hyperbranched aromatic polyamide-imide and its grafting onto multiwalled carbon nanotubes», *Journal of Applied Polymer Science*, 106(4) (2007) 2413-2421.
- [7] S. Campidelli, C. Sooambar, E. Lozano Diz, C. Ehli, D.M. Guldi, M. Prato, «Dendrimer-functionalized single-wall carbon nanotubes: synthesis, characterization, and photoinduced electron transfer», *Journal of the American Chemical Society*, 128(38) (2006) 12544-12552.
- [8] Y.-Z. You, C.-Y. Hong, C.-Y. Pan, «Covalently immobilizing a biological molecule onto a carbon nanotube via a stimuli-sensitive bond», *Journal of Physical Chemistry C*, 111(44) (2007) 16161-16166.
- [9] R. Qiao, P.C. Ke, «Lipid-carbon nanotube self-assembly in aqueous solution», *Journal of the American Chemical Society*, 128(42) (2006) 13656-13657.
- [10] Y. Bai, I.S. Park, S. Lee, P. Wen, T. Bae, M.H. Lee, «Effect of AOT-assisted multi-walled carbon nanotubes on antibacterial activity», *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 89 (2011) 101-107.
- [11] D. Tuncel, «Non-covalent interactions between carbon nanotubes and conjugated polymers», *Nanoscale*, 3(9) (2011) 3545-3554.
- [12] G.A. Rivas, M.D. Rubianes, M.C. Rodriguez, N.F. Ferreyra, G.L. Luque, M.L. Pedano, S.A. Miscoria, C. Parrado, «Carbon nanotubes for electrochemical biosensing», *Talanta*, 74(3) (2007) 291-307.
- [13] C. Tang, T. Zhou, J. Yang, Q. Zhang, F. Chen, Q. Fu, L. Yang, «Wet-grinding assisted ultrasonic dispersion of pristine multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) in chitosan solution», *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86(1) (2011) 189-197.
- [14] A. Arribas, M. Chicharro, A. Zapardiel, G.L. Luque, N.E. Ferreyra, G.A. Rivas, «Flow injection amperometric determination of phenol and chlorophenols at single wall carbon nanotube modified glassy carbon electrode», *Analytica Chimica Acta*, 596 (2007) 183–194.
- [15] V. Vasumathi, D. Pramanik, A.K. Sood, P.K. Maiti, «Structure of a carbon nanotube-dendrimer composite», *Soft Matter Journal*, 9(4) (2013) 1372-1380.
- [16] A.-M. Caminade, J.-P. Majoral, «Dendrimers and nanotubes: a fruitful association», *Chemical Society Reviews*, 39(6) (2010) 2034-2047.
- [17] S. Svenson, D.A. Tomalia, «Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field», *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 102–115 (2012).

- [18] P. Bilalis, D. Katsigiannopoulos, A. Avgeropoulos, G. Sakellariou, «Non-covalent functionalization of carbon nanotubes with polymers», *RSC Advances*, 4(6) (2014) 2911-2934.
- [19] Y. Seyoung, I. Insik, «Solubilization of reduced graphene in water through noncovalent interaction with dendrimers», *Chemistry Letters*, 39(11) (2010) 1160-1161.
- [20] T. Tsoufis, F. Katsaros, Z. Sideratou, B.J. Kooi, M.A. Karakassides, A. Siozios, «Intercalation study of low-molecular-weight hyperbranched polyethyleneimine into graphite oxide», *Chemistry*, 20(26) (2014) 8129-8137.
- [21] S. Mu, G. Li, Y. Liang, T. Wu, D. Ma, «Hyperbranched polyglycerol-modified graphene oxide as an efficient drug carrier with good biocompatibility», *Materials Science & Engineering C*, 78 (2017) 639-646.
- [22] L.Y. Rizzo, B. Theek, G. Storm, F. Kiessling, T. Lammers, «Recent progress in nanomedicine: therapeutic, diagnostic and theranostic applications», *Current Opinion in Biotechnology*, 24(6) (2013) 1159-1166.
- [23] A.P.Nikalje, «Nanotechnology and its applications in medicine», *Medicinal chemistry*, 5 (2015) 1-9.
- [24] J. Khandare, M. Calderón, N.M. Dagia, R. Haag, «Multifunctional dendritic polymers in nanomedicine: opportunities and challenges», *Chemical Society Reviews*, 41(7) (2012) 2824-2848.
- [25] C.M. Paleos, D. Tsiourvas, Z. Sideratou, L.-A. Tziveleka, «Drug delivery using multifunctional dendrimers and hyperbranched polymers», *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7(12) (2010) 1387-1398.
- [26] T.M. Allen, P.R. Cullis, «Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications», *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(1) (2013) 36-48.
- [27] B.S. Pattni, V.V. Chupin, V.P. Torchilin, «New Developments in liposomal drug delivery», *Chemical Reviews*, 115(19) (2015) 10938-10966.
- [28] S.A. Galindo-Rodriguez, E. Allemann, H. Fessi, E. Doelker, «Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation of in vivo studies», *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 22(5) (2005) 419-464.
- [29] A. Kumari, S.K. Yadav, S.C. Yadav, «Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems», *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1) (2010) 1-18.
- [30] H.M. Aliabadi, A. Lavasanifar, «Polymeric micelles for drug delivery», *Expert Opinion on Drug Delivery*, 3(1) (2006) 139-162.
- [31] G.A. Hussein, W.G. Pitt, «Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery», *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(10) (2008) 1137-1152.
- [32] F. Chen, G. Hableel, E.R. Zhao, J.V. Jokerst, «Multifunctional nanomedicine with silica: Role of silica in nanoparticles for theranostic, imaging, and drug monitoring», *Journal of Colloid and Interface Science*, 521 (2018) 261-279.
- [33] I.I. Slowing, J.L. Vivero-Escoto, C.-W. Wu, V.S.Y. Lin, «Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers», *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11) (2008) 1278-1288.
- [34] T.A. Hilder, J.M. Hill, «Carbon nanotubes as drug delivery nanocapsules», *Current Applied Physics*, 8(3) (2008) 258-261.
- [35] R. Soleyman, S. Hirbod, M. Adeli, «Advances in the biomedical application of polymer-functionalized carbon nanotubes», *Biomaterials Science*, 3(5) (2015) 695-711.

- [36] K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z.G. Chen, D.M. Shin, «Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer», *Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(5) (2008) 1310-1316.
- [37] T.M. Allen, P.R. Cullis, «Drug delivery systems: entering the mainstream», *Science*, 303(5665) (2004) 1818-1822.
- [38] W.J. Gradishar, S. Tjulandin, N. Davidson, H. Shaw, N. Desai, P. Bhar, M. Hawkins, J. O'Shaughnessy, «Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer», *Journal of Clinical Oncology*, 23(31) (2005) 7794-7803.
- [39] Y. Matsumura, H. Maeda, «A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumor-tropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs», *Cancer Research*, 46(12 Pt 1) (1986) 6387-6392.
- [40] M. Saraswathy, S. Gong, «Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer», *Biotechnology Advances*, 31(8) (2013) 1397-1407.
- [41] D. Peer, J.M. Karp, S. Hong, O.C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, «Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy», *Nature Nanotechnology*, 2(12) (2007) 751-760.
- [42] W. Miao, G. Shim, G. Kim, S. Lee, H.J. Lee, Y.B. Kim, Y. Byun, Y.K. Oh, «Image-guided synergistic photothermal therapy using photoresponsive imaging agent-loaded graphene-based nanosheets», *Journal of the Controlled Release Society*, 211 (2015) 28-36.
- [43] H. Kim, W.J. Kim, «Photothermally controlled gene delivery by reduced graphene oxide-polyethylenimine nanocomposite», *Small*, 10(1) (2014) 117-126.
- [44] S. Augustine, J. Singh, M. Srivastava, M. Sharma, A. Das, B.D. Malhotra, «Recent advances in carbon based nanosystems for cancer theranostics», *Biomaterials Science*, 5(5) (2017) 901-952.
- [45] Q. Zhao, Y. Lin, N. Han, X. Li, H. Geng, X. Wang, Y. Cui, S. Wang, «Mesoporous carbon nanomaterials in drug delivery and biomedical application», *Drug Delivery*, 24(sup1) (2017) 94-107.
- [46] G. Shim, M.G. Kim, J.Y. Park, Y.K. Oh, «Graphene-based nanosheets for delivery of chemotherapeutics and biological drugs», *Advanced Drug Delivery Reviews*, 105(Pt B) (2016) 205-227.
- [47] A. Bianco, K. Kostarelos, M. Prato, «Applications of carbon nanotubes in drug delivery», *Chemical Biology*, 9(6) (2005) 674-679.
- [48] S. Maleki Dizaj, A. Mennati, S. Jafari, K. Khezri, K. Adibkia, «Antimicrobial activity of carbon-based nanoparticles», *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(1) (2015) 19-23.
- [49] X. Dong, L. Liu, D. Zhu, H. Zhang, X. Leng, «Transactivator of transcription (TAT) peptide- chitosan functionalized multiwalled carbon nanotubes as a potential drug delivery vehicle for cancer therapy», *International Journal of Nanomedicine*, 10 (2015) 3829-3840.
- [50] X. Dong, Z. Sun, X. Wang, X. Leng, «An innovative MWCNTs/DOX/TC nanosystem for chemo-photothermal combination therapy of cancer», *Nanomedicine*, 13(7) (2017) 2271-2280.
- [51] H. Wu, H. Shi, H. Zhang, X. Wang, Y. Yang, C. Yu, C. Hao, J. Du, H. Hu, S. Yang, «Prostate stem cell antigen antibody-conjugated multiwalled carbon nanotubes for targeted ultrasound imaging and drug delivery», *Biomaterials*, 35(20) (2014) 5369-5380.

- [52] Z. Tian, M. Yin, H. Ma, L. Zhu, H. Shen, N. Jia, «Supramolecular assembly and antitumor activity of multiwalled carbon nanotube-camptothecin complexes», *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 11(2) (2011) 953-958.
- [53] N.M. Dinan, F. Atyabi, M.R. Rouini, M. Amini, A.A. Golabchifar, R. Dinarvand, «Doxorubicin loaded folate-targeted carbon nanotubes: preparation, cellular internalization, in vitro cytotoxicity and disposition kinetic study in the isolated perfused rat liver», *Materials Science & Engineering C*, 39 (2014) 47-55.
- [54] N.G. Sahoo, H. Bao, Y. Pan, M. Pal, M. Kakran, H.K.F. Cheng, L. Li, L.P. Tan, «Functionalized carbon nanomaterials as nanocarriers for loading and delivery of a poorly water-soluble anticancer drug: a comparative study», *Chemical Communications*, 47(18) (2011) 5235-5237.
- [55] A. Angelopoulou, E. Voulgari, E.K. Diamanti, D. Gournis, K. Avgoustakis, «Graphene oxide stabilized by PLA-PEG copolymers for the controlled delivery of paclitaxel», *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93 (2015) 18-26.
- [56] Y.T. Fong, C.H. Chen, J.P. Chen, «Intratumoral delivery of doxorubicin on folate-conjugated graphene oxide by in-situ forming thermo-sensitive hydrogel for breast cancer therapy», *Nanomaterials*, 7(11) (2017).
- [57] P. Zygouri, T. Tsoufis, A. Kouloumpis, M. Patila, G. Potsi, A.A. Sevastos, Z. Sideratou, F. Katsaros, G. Charalambopoulou, H. Stamatis, P. Rudolf, T.A. Steriotis, D. Gournis, «Synthesis, characterization and assessment of hydrophilic oxidized carbon nanodiscs in bio-related applications», *RSC Advances*, 8(1) (2018) 122-131.
- [58] S. Liu, T.H. Zeng, M. Hofmann, E. Burcombe, J. Wei, R. Jiang, J. Kong, Y. Chen, «Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: membrane and oxidative stress», *ACS Nano*, 5(9) (2011) 6971-6680.
- [59] S. Liu, L. Wei, L. Hao, N. Fang, M.W. Chang, R. Xu, Y. Yang, Y. Chen, «Sharper and faster "nano darts" kill more bacteria: a study of antibacterial activity of individually dispersed pristine single-walled carbon nanotube», *ACS Nano*, 3(12) (2009) 3891-902.
- [60] S. Kang, M.S. Mauter, M. Elimelech, «Physicochemical determinants of multiwalled carbon nanotube bacterial cytotoxicity», *Environmental Science & Technology*, 42(19) (2008) 7528-7534.
- [61] L.M. Kaminskas, V.M. McLeod, C.J.H. Porter, B.J. Boyd, «Association of chemotherapeutic drugs with dendrimer nanocarriers: an assessment of the merits of covalent conjugation compared to noncovalent encapsulation», *Molecular Pharmaceutics*, 9(3) (2012) 355-373.
- [62] S. Baek, S.H. Joo, C. Su, M. Toborek, «Antibacterial effects of graphene- and carbon-nanotube-based nanohybrids on *escherichia coli*: Implications for treating multidrug-resistant bacteria», *Journal of Environmental Management*, 247 (2019) 214-223.
- [63] S. Kang, M. Herzberg, D.F. Rodrigues, M. Elimelech, «Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter!», *Langmuir*, 24(13) (2008) 6409-6413.
- [64] C. Yang, J. Mamouni, Y. Tang, L. Yang, «Antimicrobial activity of single-walled carbon nanotubes: length effect», *Langmuir*, 26(20) (2010) 16013-9.
- [65] L.R. Arias, L. Yang, «Inactivation of bacterial pathogens by carbon nanotubes in suspensions», *Langmuir*, 25(5) (2009) 3003-3012.
- [66] L. Xia, M. Xu, G. Cheng, L. Yang, Y. Guo, D. Li, D. Fang, Q. Zhang, H. Liu, «Facile construction of Ag nanoparticles encapsulated into carbon nanotubes with robust antibacterial activity», *Carbon*, 130 (2018) 775-781.

- [67] A.A. Atiyah, A.J. Haider, R.M. Dhahi, «Cytotoxicity properties of functionalised carbon nanotubes on pathogenic bacteria», *IET Nanobiotechnology*, 13(6) (2019) 597-601.
- [68] D. Liu, Y. Mao, L. Ding, «Carbon nanotubes as antimicrobial agents for water disinfection and pathogen control», *Journal of Water and Health*, 16(2) (2018) 171-180.
- [69] H.Z. Zardini, A. Amiri, M. Shanbedi, M. Maghrebi, M. Baniadam, «Enhanced antibacterial activity of amino acids-functionalized multi walled carbon nanotubes by a simple method», *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 92 (2012) 196-202.
- [70] H.Z. Zardini, M. Davarpanah, M. Shanbedi, A. Amiri, M. Maghrebi, L. Ebrahimi, «Microbial toxicity of ethanalamines—multiwalled carbon nanotubes», *Journal of Biomedical Materials Research*, 102(6) (2014) 1774-1781.
- [71] X. Qi, G. Poernomo, K. Wang, Y. Chen, M.B. Chan-Park, R. Xu, M.W. Chang, «Covalent immobilization of nisin on multi-walled carbon nanotubes: superior antimicrobial and anti-biofilm properties», *Nanoscale*, 3(4) (2011) 1874-1880.
- [72] W. Hu, C. Peng, W. Luo, M. Lv, X. Li, D. Li, Q. Huang, C. Fan, «Graphene-based antibacterial paper», *ACS Nano*, 4(7) (2010) 4317-4323.
- [73] M.R. Das, R.K. Sarma, R. Saikia, V.S. Kale, M.V. Shelke, P. Sengupta, «Synthesis of silver nanoparticles in an aqueous suspension of graphene oxide sheets and its antimicrobial activity», *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 83(1) (2011) 16-22.
- [74] O.N. Ruiz, K.A. Fernando, B. Wang, N.A. Brown, P.G. Luo, N.D. McNamara, M. Vangsness, Y.P. Sun, C.E. Bunker, «Graphene oxide: a nonspecific enhancer of cellular growth», *ACS Nano*, 5(10) (2011) 8100-8107.
- [75] W.-P. Xu, L.-C. Zhang, J.-P. Li, Y. Lu, H.-H. Li, Y.-N. Ma, W.-D. Wang, S.-H. Yu, «Facile synthesis of silver@graphene oxide nanocomposites and their enhanced antibacterial properties», *Journal of Materials Chemistry*, 21(12) (2011) 4593-4597.
- [76] L. Liu, J. Liu, Y. Wang, X. Yan, D.D. Sun, «Facile synthesis of monodispersed silver nanoparticles on graphene oxide sheets with enhanced antibacterial activity», *New Journal of Chemistry*, 35(7) (2011) 1418-1423.
- [77] S.W. Chook, C.H. Chia, Z. Sarani, M.K. Ayob, K.L. Chee, H.M. Neoh, N.M. Huang, «Silver nanoparticles - graphene oxide nanocomposite for antibacterial purpose», *Advanced Materials Research*, 364 (2012) 439-443.
- [78] I.-G. Athanasoulia, K. Giachalis, D. Korres, N. Todorova, T. Giannakopoulou, P.A. Tarantili, C. Trapalis, «Study of thermomechanical, structural and antibacterial properties of poly(lactic acid) reinforced with graphene oxide nanoparticles via melt mixing», *Polymer International*, 69(10) (2020) 995-1007.
- [79] G. Mittal, V. Dhand, K.Y. Rhee, S.-J. Park, W.R. Lee, «A review on carbon nanotubes and graphene as fillers in reinforced polymer nanocomposites», *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21 (2015) 11-25.
- [80] D. Ege, A.R. Kamali, A.R. Boccaccini, «Graphene oxide/polymer-based biomaterials», *Advanced Engineering Materials* 19(12) (2017) 1700627.
- [81] L. Yu, B. Zhang, J. Liu, H. Zhang, C. Song, «Preparation and characterization of HPEI-GO/PES ultrafiltration membrane with antifouling and antibacterial properties», *Journal of Membrane Science*, 447 (2013) 452-462.
- [82] X. Huang, K.L. Marsh, B.T. McVerry, E.M.V. Hoek, R.B. Kaner, «Low-fouling antibacterial reverse osmosis membranes via surface grafting of graphene oxide», *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(23) (2016) 14334-14338.

- [83] Y. Wen, J. Yuan, X. Ma, S. Wang, Y. Liu, «Polymeric nanocomposite membranes for water treatment: a review», *Environmental Chemistry Letters*, 17(4) (2019) 1539-1551.
- [84] T. Naseem, Z. Abdin, M. Waseem, H. Muhammad, S. Din, S. Haq, R. Mahfozur, «Reduced graphene oxide/zinc oxide nanocomposite: from synthesis to its application for wastewater purification and antibacterial activity», *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 30 (2020).
- [85] S. Some, S.-M. Ho, P. Dua, E. Hwang, Y.H. Shin, H. Yoo, J.-S. Kang, D.-k. Lee, H. Lee, «Dual functions of highly potent graphene derivative–poly-l-lysine composites to inhibit bacteria and support human cells», *ACS Nano*, 6(8) (2012) 7151-7161.
- [86] C.M. Santos, M.C.R. Tria, R.V. Vergara, F. Ahmed, R.C. Advincula and D.F. Rodrigues, «Antimicrobial graphenepolymer (PVK-GO) nanocomposite films», *Chemical Communications*, 47 (2011) 8892-8894.
- [87] L. Duan, Y. Wang, Y. Zhang, J. Liu, «Graphene immobilized enzyme/polyethersulfone mixed matrix membrane: Enhanced antibacterial, permeable and mechanical properties», *Applied Surface Science*, 355 (2015) 436-445.
- [88] R. Kanchanapally, B.P. Viraka Nellore, S.S. Sinha, F. Pedraza, S.J. Jones, A. Pramanik, S.R. Chavva, C. Tchounwou, Y. Shi, A. Vangara, D. Sardar, P.C. Ray, «Antimicrobial peptide-conjugated graphene oxide membrane for efficient removal and effective killing of multiple drug resistant bacteria», *RSC Advances*, 5(24) (2015) 18881-18887.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Υλικά και Πειραματικές Μέθοδοι

4.1 Αντιδραστήρια και διαλύτες

Για τη σύνθεση των πολυμερικών παραγώγων QPEI και GPEI χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια του Πίνακα 4.1.

Πίνακας 4.1: Αντιδραστήρια των πολυμερικών παραγώγων QPEI και GPEI.

Αντιδραστήριο	Χαρακτηριστικά	Εταιρεία
Υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη (PEI)	μοριακών βαρών 5000 (Lupasol® G 100) και 25000 Da (Lupasol® WF, άνυδρη, 99%)	BASF GmbH
Υδροχλωρική 1 <i>H</i> -πυραζολο-1-καρβοξαμίδινη	μοριακού βάρους 146.58, καθαρότητας 99%	Sigma-Aldrich
<i>N,N</i> -δι(ισοπροπυλο)αιθυλαμίνη (DIPEA)	μοριακού βάρους 129.24, καθαρότητας 99.5%	Sigma-Aldrich
Μεμβράνη διαπίδωσης	μοριακό βάρος αποκοπής 1200	Sigma-Aldrich
Χλωριούχο (2,3 εποξυπροπυλο)τριμεθυλοαμμώνιο	μοριακού βάρους 151.63, καθαρότητας 90%	Sigma-Aldrich
Τριαθυλαμίνη	μοριακού βάρους 101.19, καθαρότητας 99%	Sigma-Aldrich

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των πολυμερικών παραγώγων QPEI και GPEI παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2: Διαλύτες των πολυμερικών παραγώγων QPEI και GPEI.

Διαλύτες	Χαρακτηριστικά	Εταιρεία
Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF)	μοριακού βάρους 73.09	Merck
Διαιθυλαιθέρας	μοριακού βάρους 129.24	Merck
Υπερκάθαρο νερό (H ₂ O)	Συσκευή Milipore αγωγιμότητας 4 μS/cm	-
Μεθανόλη	μοριακού βάρους 32.04, καθαρότητας 99%	Merck

Οι παραπάνω διαλύτες ήταν υψηλής καθαρότητας και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω κατεργασία εκτός από το DMF, το οποίο αποστάζεται παρουσία ΒαΟ και φυλάσσεται παρουσία ζεόλιθου 4Α (μοριακά κόσκινα).

Για την οξείδωση των νανοσωλήνων άνθρακα (CNTs) και των νανοδίσκων άνθρακα (CNDs) χρησιμοποιήθηκαν τα υλικά του Πίνακα 4.3.

Πίνακας 4.3: Υλικά για τις οξειδώσεις των CNTs και CNDs.

Υλικά	Χαρακτηριστικά	Εταιρεία
Νανοδίσκοι άνθρακα	-	Strem Chemicals, Inc. (Γαλλία)
Νανοςωλήνες άνθρακα	πολλαπλού τοιχώματος, με μέση διάμετρο × μέσο μήκος: 9.5 nm × 1.5 μm	Sigma-Aldrich
Χλωρικό κάλιο (KClO ₃)	μοριακού βάρους 122.55, καθαρότητας ≥99%	Merck
Θειικό οξύ (H ₂ SO ₄)	μοριακού βάρους 98.08, καθαρότητας 95-98%	Merck
Νιτρικό οξύ (HNO ₃)	μοριακού βάρους 63.01, καθαρότητας 65-67%	Merck

Στη σύνθεση των φθοριζουσών νανοτελειών άνθρακα (FCDs) χρησιμοποιούμε τα αντιδραστήρια του Πίνακα 4.4.

Πίνακας 4.4: Υλικά για την σύνθεση των FCDs.

Υλικά	Χαρακτηριστικά	Εταιρεία
Υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη (PEI)	μοριακού βάρους 1300 (Lupasol® G 100)	BASF GmbH
Γλυκερόλη	μοριακού βάρους 92.09, καθαρότητας ≥99%	Merck
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών	PBS	Biochrom

Στην μελέτη των καρκινικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν τα υλικά του Πίνακα 4.5.

Πίνακας 4.5: Υλικά για την μελέτη των καρκινικών και ευκαρυωτικών κυττάρων.

Υλικά	Χαρακτηριστικά	Εταιρεία
D-MEM	Χαμηλού ποσοστού γλυκόζης	Biochrom AG
Ορός εμβρύου μόσχου (FBS)		Biochrom AG
Διάλυμα θρυψίνης- EDTA	0.05 % και 0.02 % (w/v), αντίστοιχα	Biochrom AG
Πενικιλίνη-Στρεπτομυκίνη	10 U/mL και 10 µg/mL, αντίστοιχα	Biochrom AG
L-γλουταμίνη		Biochrom AG
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)		Biochrom AG
Βρωμιούχο άλας του 3-(4,5 διμέθυλοτριαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλο τετραζόλιου (MTT)		Sigma-Aldrich
Πολύ(L-λυσίνη)	μοριακού βάρους 70.000-150.000 Da	Sigma-Aldrich
Αννεξίνη V-FITC/7-αμινο-ακτινομυκίνη (Annexin V-FITC/7AAD)		Sigma-Aldrich
Παραφολμαδεΰδη (PFA)		Sigma-Aldrich
Υδροχλωρική δοξορουβικίνη (DOX)	μοριακού βάρους 579.02	Ευγενική χορηγία της Regulon SA
2-Προπανόλη	μοριακού βάρους 60.10, καθαρότητας $\geq 99.5\%$	Merck
4',6-Διαμινο-2-φαινυλινδόλη διϋδροχλωρική (DAPI)	μοριακού βάρους 350.25	Sigma-Aldrich
Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)	μοριακού βάρους 78.13, καθαρότητας $\geq 99.7\%$	Sigma-Aldrich

Τέλος, για την αντιβακτηριακή μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα υλικά του Πίνακα 4.6.

Πίνακας 4.6: Υλικά για την αντιβακτηριακή μελέτη.

Υλικά	Χαρακτηριστικά	Εταιρεία
Τριπτόνη	σκόνη	Fermentech
Άγαρ	σκόνη	MP
Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)	χρήση για βακτήρια <i>Escherichia coli</i>	MP
Σόγια	χρήση για βακτήρια <i>Staphylococcus aureus</i>	Sigma-Aldrich
Χλωριούχο νάτριο (NaCl)	μοριακού βάρους 58.44	Sigma-Aldrich
Γλυκερόλη	μοριακού βάρους 92.09, καθαρότητας $\geq 99\%$	Merck
Ρεσαζουρίνη	μοριακού βάρους 251.17	Sigma-Aldrich
Γλουταραλδεϋδη	διάλυμα 25%	Sigma-Aldrich
Κακοδυλικό νάτριο	μοριακού βάρους 214.03, καθαρότητας $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich
Αιθανόλη (EtOH)	μοριακού βάρους 46.07	Merck

Για τη ρύθμιση του pH χρησιμοποιούνται διαλύματα 0.5 N ή 1 N υδροξειδίου του νατρίου (NaOH). Το υδροξείδιο του νατρίου (μοριακού βάρους 40 g/mol) είναι της εταιρείας Merck KGaA (Calbiochem®, Darmstadt, Γερμανία).

4.2 Σύνθεση γουανιδιωμένων παραγώγων της πολυαιθυλενιμίνης

Για τη σύνθεση των γουανιδιωμένων παραγώγων της πολυαιθυλενιμίνης χρησιμοποιήθηκε η εμπορικά διαθέσιμη υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη μοριακού βάρους 5000 Da (PEI5K) και 25000 Da (PEI25K). Η αναλογία πρωτοταγών προς δευτεροταγών προς τριτοταγών αμινών για το PEI5K είναι 1.06:1.26:1.00 και αντίστοιχα για το PEI25K είναι 1.00:1.18:1.00. Έτσι, 1 mol PEI με $M_w = 5000$ ή 25000 ισοδυναμεί με 37 ή 183 mol αμινομάδων, αντίστοιχα, όταν αναφερόμαστε στις πρωτοταγείς αμινομάδες, με 44 ή 215 mol αμινομάδων, αντίστοιχα, όταν αναφερόμαστε στις δευτεροταγείς αμινομάδες και με 35 ή 183 mol αμινομάδων, αντίστοιχα, όταν αναφερόμαστε στις τριτοταγείς αμινομάδες του μορίου.

Η παρασκευή των γουανιδιωμένων παραγώγων της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης πραγματοποιήθηκε με βάση τη βιβλιογραφία [1]. Αναλυτικά, 0.01 mmol υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης μοριακού βάρους 5000 Da ή 25000 Da, διαλύονται σε διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), προστίθενται σε ένα διάλυμα διμεθυλοφορμαμιδίου, όπου περιέχει 0.2 mmol υδροχλωρικού άλατος της 1*H*-πυραζολο-καρβοξαμιδίνης και 0.04 mmol δισοπροπυλοαιθυλαμίνης (DIPEA), αντίστοιχα. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 24 h σε αδρανή ατμόσφαιρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το διάλυμα συμπυκνώνεται, κάνοντας απόσταξη του διαλύτη υπό κενό και μετά από καταβύθιση σε διαιθυλαιθέρα λαμβάνεται ένα ίζημα, το οποίο διαλύεται σε νερό. Στη συνέχεια, το υδατικό διάλυμα τοποθετείται σε μεμβράνη διαπίδυσης με μοριακό βάρος αποκοπής 1200 προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν παραπροϊόντα της αντίδρασης. Τέλος, τα τελικά προϊόντα GPEI5K και GPEI25K παραλαμβάνονται μετά από ψυχοεξάχνωση. Ο χαρακτηρισμός της χημικής δομής πραγματοποιήθηκε με χρήση φασματοσκοπιών FTIR, ¹H και ¹³C NMR.

¹HNMR: (500 MHz, D₂O): δ (ppm) = 3.25 (m, NCH₂CH₂NH-G), 2.70–2.50 (m, CH₂ του σκελετού της PEI).

¹³CNMR (125.1 MHz, D₂O): δ (ppm) = 157.0 (NH \underline{C} (NH₂)NH₂⁺), 54.0–50.0 (C₃₋₃, C₃₋₂ και C₃₋₁), 48.0–44.0 (C₂₋₁, C₂₋₃, C₂₋₂), 40.5 και 39.4 (\underline{C} H₂NHC(NH₂)NH₂⁺, C₁₋₃, C₁₋₂).

4.3 Σύνθεση οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος τροποποιημένων με γουανιδιωμένα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης

4.3.1 Οξείδωση νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος

Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιήθηκαν νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος, ενώ η οξείδωσή τους πραγματοποιήθηκε με την πλέον διαδεδομένη μέθοδο Staudenmaier [2]. Αναλυτικά, 300 mg CNTs προστίθενται σε διάλυμα 12 mL H₂SO₄ και 6 mL HNO₃, που είναι τοποθετημένο σε λουτρό πάγου. Το μείγμα, αφήνεται για ανάδευση 30 min και έπειτα σε αυτό προστίθεται σταδιακά 6 g σκόνης χλωρικού καλίου (KClO₃). Μετά από 18 h, ολοκληρώνεται η αντίδραση, απενεργοποιώντας το μείγμα προσθέτοντας 200 mL νερού. Οι οξειδωμένοι νανοσωλήνες άνθρακα,

oxCNTs, παραλαμβάνονται έπειτα από φυγοκέντρηση, έκπλυση με νερό, μέχρι η τιμή του pH του υπερκείμενου διαλύματος τους να φτάσει το 6.5-7 (ουδέτερο pH) και ψυχροεξάχνωση. Η χημική δομή των oxCNTs χαρακτηρίζεται με πληθώρα τεχνικών, όπως φασματοσκοπίες FTIR, XPS και Raman, περίθλαση ακτίνων-X και μικροσκοπίες SEM, AFM και TEM.

4.3.2 Σύνθεση οξειδωμένων νανოსωλήνων άνθρακα τροποποιημένων με γουανιδιωμένα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης

Σε ένα τυπικό πείραμα, διασπείρονται 150 mg oxCNTs σε 50 mL H₂O με τη βοήθεια υπερήχων, ρυθμίζεται το pH μέχρι την τιμή ~9, προσθέτοντας διάλυμα NaOH (0.5 M) και αφήνεται υπό ανάδευση για 24 h. Στη συνέχεια, 300 mg GPEI5K ή GPEI25K διαλυμένα σε 10 mL H₂O, προστίθενται στάγδην στην αρχική διασπορά των oxCNTs και αφήνονται υπό ανάδευση για 48 h. Τα τελικά, προϊόντα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K παραλαμβάνονται ύστερα από υπερφυγοκέντρηση (50.000 g), έκπλυση με νερό μέχρι το υπερκείμενο διάλυμα να έχει pH≈6.5-7 και ψυχροεξάχνωση [3]. Οι χημικές δομές που προκύπτουν χαρακτηρίζονται με πλήθος τεχνικών, όπως φασματοσκοπίες FTIR, ¹H NMR, XPS και Raman, TGA, στοιχειακή ανάλυση και μικροσκοπίες SEM, AFM και TEM.

4.4 Επισήμανση με ροδαμίνη των οξειδωμένων νανοςωλήνων άνθρακα τροποποιημένων με γουανιδιωμένα πολυμερή

Τα επισημασμένα με ροδαμίνη υβριδικά υλικά (oxCNTs@GPEI5K•Rh και oxCNTs@GPEI25K•Rh) παρασκευάστηκαν με αντίδραση των υβριδικών υλικών με την ισοθειοκυανική ροδαμίνη B (Rh). Συγκεκριμένα, σε 15 mg ισοθειοκυανικής ροδαμίνης διαλυμένα σε μεθανόλη (2 mL), προστέθηκαν σε 10 mg oxCNTs@GPEIs, τα οποία είναι διεσπαρμένα στον ίδιο διαλύτη (5 mL). Το μίγμα αφέθηκε σε λουτρό υπερήχων για 30 min και έπειτα αφήνεται για ανάδευση στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h. Τα τελικά προϊόντα, oxCNTs@GPEI5K•Rh και oxCNTs@GPEI25K•Rh παραλαμβάνονται μετά από φυγοκέντρηση στα 25.000 g, έκπλυση με μεθανόλη αρκετές φορές για να απομακρυνθεί η Rh που δεν έχει αντιδράσει και ξήρανση υπό κενό. Ο λόγος βάρους oxCNTs@GPEIs/ροδαμίνη στα

τελικά επισημασμένα υβριδικά υλικά προσδιορίστηκε με φασματοσκοπία UV-vis και βρέθηκε ότι είναι 5:1. Εν συντομία, η περιεκτικότητα σε Rh, σε υδατικό διάλυμα oxCNTs@GPEIs•Rh αγνώστου συγκεντρώσεως, υπολογίστηκε καταγράφοντας την απορρόφηση των ομάδων ροδαμίνης χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο Cary 100 Conc UV-visible (Varian Inc.) στα 544 nm. Για τους υπολογισμούς, χρησιμοποιήθηκε καμπύλη βαθμονόμησης της ροδαμίνης, η οποία κατασκευάζεται με βάση τυπικά διαλύματα συγκέντρωσης Rh (0.1–10 µg/mL).

4.5 Σύνθεση οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος τροποποιημένων με παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης που φέρουν ομάδες τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων

4.5.1 Σύνθεση παραγώγων της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης που φέρουν ομάδες τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων

Παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης μοριακού βάρους 25000 Da που φέρουν ομάδες αμμωνιακών τεταρτοταγών αλάτων με βαθμό υποκατάστασης 30%, 50% και 80% ως προς τις πρωτοταγείς αμινομάδες της PEI συντέθηκαν ως εξής: Σε υδατικό διάλυμα (20 mL) PEI25K (5 mM) προστίθεται υδατικό μίγμα (10 mL) το οποίο περιείχε 8, 12 ή 18 mmol χλωριούχο (2,3 εποξυπροπυλο)τριμεθυλοαμμώνιο και 16, 24 ή 36 mmol τριαιθυλαμίνη [3, 4]. Το μίγμα αφήνεται υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για δύο ημέρες. Στη συνέχεια, τα υδατικά διαλύματα τοποθετούνται σε μεμβράνη διαπίδυσης με μοριακό βάρος αποκοπής 1200 προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν παραπροϊόντα της αντίδρασης. Τέλος, τα τελικά προϊόντα 30% (30-QPEI), 50% (50-QPEI) και 80% (80-QPEI) παραλαμβάνονται μετά από ψυχοεξάχνωση. Ο χαρακτηρισμός της χημικής δομής τους πραγματοποιήθηκε με χρήση φασματοσκοπιών FTIR, ¹H και ¹³C NMR.

¹H NMR: (500 MHz, D₂O) δ (ppm) = 4.25 (broad s, CH–OH), 3.45 (m, CH₂N⁺(CH₃)₃), 3.25 (s, CH₃), 2.70–2.50 (m, CH₂ του σκελετού της PEI).

¹³C NMR (125.1 MHz, D₂O): δ (ppm) = 71.5 (CH₂N⁺CH₃)₃), 67.1 (CH–OH), 58.3 (C_{3,1}), 56.6 (CH₃), 55.5 (C_{3,2}), 54.8 (CH₂NHCH₂-Q), 53.5 (C_{3,3}), 53.0 (C_{2,1}), 50.2 (C_{2,2}), 48.0 (C_{2,3}), 42.3 (C₁₋₂) και 40.2 (C₁₋₃).

4.5.2 Σύνθεση οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος τροποποιημένων με παράγωγα υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης που φέρουν ομάδες τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων

Ακολουθήθηκε μια τυπική διαδικασία για τη σύνθεση των τροποποιημένων oxCNTs με τα παράγωγα QPEIs [3]. Συγκεκριμένα, 50 mg oxCNTs διασπείρονται σε 50 mL υδατικού διαλύματος, που περιέχει 150 mg QPEIs με τη βοήθεια υπερήχων (Hielscher UP200S), ενώ στη συνέχεια, οι διασπορές αφήνονται υπό ανάδευση για 12 h. Τα τελικά υβριδικά υλικά, oxCNTs@30-QPEI, oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI παραλαμβάνονται έπειτα από υπερφυγοκέντρηση στα 60.000 g, έκπλυση με νερό μέχρι το υπερκείμενο διάλυμα να έχει pH≈6.5-7 και ψυχοεξάχνωση. Οι χημικές δομές που προκύπτουν χαρακτηρίζονται με πλήθος τεχνικών, όπως φασματοσκοπίες FTIR και Raman, TGA, στοιχειακή ανάλυση και μικροσκοπίες SEM, AFM και TEM.

4.6 Σύνθεση οξειδωμένων νανοδίσκων άνθρακα τροποποιημένων με γουανιδιωμένα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης

4.6.1 Οξείδωση νανοδίσκων άνθρακα

Ως αρχικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν νανοδίσκοι άνθρακα, οι οποίοι λαμβάνονται μέσω της διαδικασίας Pyrolytic Kvaerner Carbon Black&H₂ (CB&H) [5]. Η οξείδωση των CNDs πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας γνωστή από τη βιβλιογραφία μέθοδο [6]. Σε μια τυπική διαδικασία, 300 mg CNDs προστίθενται σε 12 mL διαλύματος πυκνού H₂SO₄ και 6 mL διαλύματος πυκνού HNO₃, το οποίο είναι τοποθετημένο σε λουτρό πάγου. Το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση 30 min και στη συνέχεια προστίθεται τμηματικά 6 g KClO₃. Η αντίδραση ολοκληρώνεται έπειτα από 18 h, όπου το μείγμα απενεργοποιείται με προσθήκη 200 mL νερού. Οι οξειδωμένοι νανοδίσκοι, oxCNDs, παραλαμβάνονται μετά από φυγοκέντρηση (10.000 g), έκπλυση με νερό μέχρι το υπερκείμενο διάλυμα να έχει pH≈6.5-7 και ψυχοεξάχνωση. Η χημική δομή χαρακτηρίζεται με πληθώρα τεχνικών, όπως φασματοσκοπίες FTIR, XPS και Raman, περίθλαση ακτίνων-X και μικροσκοπίες SEM και TEM.

4.6.2 Σύνθεση οξειδωμένων νανοδίσκων άνθρακα με γουανιδιωμένα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης

Σε ένα τυπικό πείραμα, 150 mg oxCNDS διασπείρονται με την βοήθεια υπερήχων σε 50 mL H₂O και ρυθμίζεται το pH στην τιμή ~9 με προσθήκη διαλύματος NaOH (0.5 M). Το προκύπτον εναιώρημα αφήνεται υπό ανάδευση για 24 h. Στην συνέχεια, 300 mg GPEI5K ή GPEI25K διαλυμένα σε 50 mL H₂O, προστίθενται στη διασπορά των oxCNDS και αφήνονται υπό ανάδευση για 48 h. Τα τελικά προϊόντα oxCNDS@GPEI5K και oxCNDS@GPEI25K, παραλαμβάνονται ύστερα από φυγοκέντρηση, έκπλυση με H₂O, μέχρι το υπερκείμενο διάλυμα έχει pH≈6.5-7 και ψυχοεξάχνωση [3]. Οι χημικές δομές τους χαρακτηρίζονται με πλήθος τεχνικών, όπως φασματοσκοπίες FTIR, ¹H NMR, XPS, TGA, Raman, περίθλαση ακτίνων-X και μικροσκοπίες SEM και TEM.

4.7 Σύνθεση οξειδωμένων νανοδίσκων άνθρακα τροποποιημένων με φοριζουσες νανοτελείες άνθρακα

4.7.1 Σύνθεση φοριζουσών νανοτελειών άνθρακα

Οι νανοτελείες άνθρακα συντίθενται, με τη διαδικασία της πυρόλυσης, παρουσία μικροκυμάτων, ακολουθώντας πορεία ανάλογη με αυτή της βιβλιογραφίας [7]. Συγκεκριμένα, 0.7 g PEI (1300 Da) διαλυμένα σε 2.4 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (20 mM) pH=7, αναμειγνύονται με 8 mL γλυκερόλης. Το προκύπτον μείγμα τοποθετείται σε οικιακό φούρνο μικροκυμάτων στα 640 W για 5 min. Στη συνέχεια, το υπόλειμμα που προκύπτει, παραμένει στο φούρνο στους 60 °C μέχρι την επόμενη ημέρα. Έπειτα, διασπείρεται σε 20 mL H₂O και φιλτράρεται. Το τελικό προϊόν, FCDs συλλέγεται μετά από καθαρισμό με μεμβράνες διαπίδυσης μοριακού βάρους αποκοπής 1200 και ψυχοεξάχνωση. Η χημική δομή των FCDs μελετήθηκε με φασματοσκοπίες FTIR, XPS, ¹H NMR και ¹³C NMR. Οι οπτικές τους ιδιότητες μελετήθηκαν με φασματοσκοπία UV-vis (Cary 100 Conc spectrophotometer, Varian Inc.) και φθορισμού (Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer, Varian Inc.), ενώ πραγματοποιήθηκαν πειράματα περίθλασης ακτίνων-X (Rigaku rotating anode X-ray generator, R-AXIS IV image plate) και TGA για τη μελέτη της δομής των FCDs. Η μορφολογία τους μελετήθηκε με μικροσκοπία SEM και TEM.

4.7.2 Σύνθεση οξειδωμένων νανοδίσκων άνθρακα τροποποιημένων με φθορίζουσες νανοτελείες άνθρακα

Σε ένα τυπικό πείραμα, 150 mg oxCNDs διασπείρονται με τη βοήθεια υπερήχων σε 50 mL H₂O, ρυθμίζεται το pH μέχρι την τιμή ~9 με προσθήκη διαλύματος NaOH (1 M) και αφήνονται υπό ανάδευση για 24 h. Ακολούθως, 150 mg FCDs διασπαρμένα σε 300 mL H₂O προστίθενται στη διασπορά των oxCNDs και αφήνονται υπό ανάδευση για 48 h. Το τελικό προϊόν, oxCNDs@FCDs, παραλαμβάνεται μετά από φυγοκέντρηση, έκλυση με νερό μέχρι το υπερκείμενο διάλυμα να φτάσει την τιμή του pH≈6.5-7 και ψυχροεξάχνωση. Οι χημικές δομές τους χαρακτηρίζονται με πλήθος τεχνικών, όπως φασματοσκοπίες FTIR, XPS, ¹H NMR και Raman, περίθλαση ακτίνων-X, TGA και μικροσκοπίες SEM και TEM.

4.8 Τεχνικές χαρακτηρισμού των υβριδικών υλικών

4.8.1 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

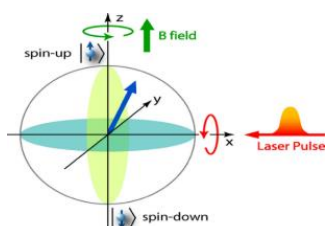
4.8.1.1 Αρχή της μεθόδου

Για την ταυτοποίηση μιας ένωσης, η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) παρέχει σημαντικές δομικές πληροφορίες, με διακριτική ικανότητα σε επίπεδο ατόμου. Ουσιαστικά, η φασματοσκοπία NMR βασίζεται στις μαγνητικές ιδιότητες των πυρήνων των ατόμων. Οι πυρήνες που έχουν περιττό αριθμό πρωτονίων ή νετρονίων διαθέτουν αυτοστροφορμή (spin) και λόγω του θετικού τους φορτίου συμπεριφέρονται ως μικροί μαγνήτες. Αυτό οφείλεται στο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο που δημιουργείται κατά την περιστροφική κίνηση των θετικά φορτισμένων πρωτονίων [8]. Οι πυρήνες με αυτοστροφορμή που συνήθως παρατηρούνται στη φασματοσκοπία NMR είναι ο πυρήνας του υδρογόνου ¹H που αποτελείται από ένα μόνο πρωτόνιο, ο πυρήνας του άνθρακα 13 (¹³C), το άζωτο 15 (¹⁵N) και ο φώσφορος 31 (³¹P).

Τα πρωτόνια που είναι προσανατολισμένα στην κατεύθυνση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου βρίσκονται σε κατάσταση μικρότερης ενέργειας σε αντίθεση με αυτά που είναι προσανατολισμένα αντιπαράλληλα. Αν τα προσανατολισμένα πρωτόνια ακτινοβοληθούν με ενέργεια κατάλληλης συχνότητας, αυτά που είναι χαμηλότερης ενέργειας μεταπίπτουν σε κατάσταση υψηλότερης ενέργειας. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται αναστροφή spin. Η συχνότητα μπορεί να προκαλέσει αναστροφή spin ονομάζεται συχνότητα συντονισμού. Στο τελικό φάσμα εμφανίζονται

διάφορες κορυφές, κάθε μία από τις οποίες αντιστοιχεί σε ένα ή περισσότερα πρωτόνια της υπό μελέτη χημικής ένωσης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.1. Από τις κορυφές αυτές μπορούμε να αντλήσουμε πληροφορίες σχετικά με τη στερεοδιάταξη της ένωσης.

Η θέση κάθε κορυφής που αντιστοιχεί στη συχνότητα απορρόφησης ενός πρωτονίου, ονομάζεται χημική μετατόπιση. Επιπλέον, η θέση αποτελεί ένα πολύ ακριβές μέτρο του χημικού περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται το πρωτόνιο. Τα πρωτόνια μίας χημικής ένωσης που βρίσκονται στο ίδιο περιβάλλον και έχουν την ίδια χημική μετατόπιση ονομάζονται ισοδύναμα.



Εικόνα 4.1: Σχηματική αναπαράσταση φασματοσκοπίας NMR.

Ο πιο απλός τύπος φασματοφωτομέτρου NMR αποτελείται από τέσσερα μέρη:

1. ένα σταθερό μαγνήτη, με ευαίσθητο ελεγκτή, για την παραγωγή μαγνητικού πεδίου ακρίβειας,
2. μία γεννήτρια ραδιοσυχνοτήτων (RF), η οποία εκπέμπει σε σταθερή συχνότητα και
3. έναν ανιχνευτή, για τη σχεδίαση του γραφήματος των ευρημάτων του ανιχνευτή συναρτήσει του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου.

Η δεξιά πλευρά ενός φάσματος είναι η πλευρά υψηλού πεδίου και στην οποία εμφανίζονται οι μεγαλύτερες τιμές του μαγνητικού πεδίου. Αντίστοιχα, οι μικρότερες τιμές του μαγνητικού πεδίου εντοπίζονται προς την αριστερή πλευρά ενός φάσματος, προς την πλευρά χαμηλού πεδίου. Οι απορροφήσεις των περισσότερο προστατευμένων πρωτονίων εμφανίζονται προς υψηλότερα πεδία, ενώ των περισσότερο αποπροστατευμένων πρωτονίων εμφανίζονται προς χαμηλότερα πεδία.

Οι διαφορές στις θέσεις απορρόφησης σε ένα φάσμα NMR, ονομάζονται χημικές μετατοπίσεις και οφείλονται στην ηλεκτρονική προστασία και αποπροστασία. Για να προσδιοριστεί με ακρίβεια η χημική μετατόπιση ενός μορίου χρησιμοποιείται μια ένωση αναφοράς. Η διαφορά στην ισχύ του μαγνητικού πεδίου μεταξύ των

συντονισμένων πρωτονίων του δείγματος και των πρωτονίων της ένωσης αναφοράς, μπορεί να μετρηθεί με πολύ μεγάλη ακρίβεια.

Οι χημικές μετατοπίσεις μετρώνται σε μέρη ανά εκατομμύριο (ppm), ένα αδιάστατο κλάσμα του συνολικά εφαρμοζόμενου πεδίου. Η διαφορά στο πεδίο (χημική μετατόπιση) μεταξύ του σήματος NMR ενός πρωτονίου και της ένωσης αναφοράς, μετράται σε μονάδες συχνότητας (hertz, Hz). Η χημική μετατόπιση (σε ppm) ορισμένου πρωτονίου, είναι η ίδια άσχετα με το εφαρμοζόμενο πεδίο και τη συχνότητα του φασματοφωτομέτρου. Η χρήση αδιάστατων χημικών μετατοπίσεων για τον εντοπισμό των απορροφήσεων, τυποποιεί τις τιμές σε όλα τα φασματόμετρα NMR.

Η πιο συνηθισμένη κλίμακα χημικών μετατοπίσεων είναι η κλίμακα δ (δέλτα). Στην κλίμακα δ , το σήμα της ένωσης αναφοράς ορίζεται ως 0.00 ppm και η κλίμακα δ αυξάνει προς το χαμηλότερο πεδίο. Το φάσμα βαθμονομείται τόσο ως προς τη συχνότητα (Hz) όσο και ως προς δ (ppm) [9].

4.8.1.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, ο χαρακτηρισμός των παραγώγων της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης, όσο και η καθαρότητά τους και το ποσοστό υποκατάστασης τους, πραγματοποιείται με φασματοσκοπία ^1H και ^{13}C NMR σε διαλύτη D_2O . Χρησιμοποιείται το φασματόμετρο NMR BRUKER AVANCE DRX, το οποίο λειτουργεί στα 500 MHz για το πρωτόνιο και στα 125.1 MHz για τον άνθρακα. Με τη φασματοσκοπία NMR είναι δυνατή η ταυτοποίηση της δομής οργανικών ενώσεων καθώς και το «χημικό περιβάλλον» των πυρήνων στα μόρια των χημικών ενώσεων. Οι χημικές μετατοπίσεις δίνονται σε ppm. Σε μια τυπική μέτρηση, διαλύουμε περίπου 10-30 mg πολυμερούς σε 0.5 mL D_2O . Επίσης, το ποσοστό των γουανιδιωμένων παραγώγων της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης που δεσμεύτηκε στους νανοσωλήνες και στους νανοδίσκους άνθρακα καθώς και το ποσοστό των FCDs που δεσμεύτηκε στους νανοδίσκους άνθρακα, προσδιορίζεται με φασματοσκοπία ^1H NMR σε διαλύτη D_2O , χρησιμοποιώντας ως εσωτερικό πρότυπο το μηλεϊνικό οξύ.

4.8.2 Φασματοσκοπία υπέρυθρου (FTIR)

4.8.2.1 Αρχή της μεθόδου

Οι συχνότητες κάτω από τις ορατές και πάνω από τις υψηλότερες συχνότητες μικροκυμάτων και ραντάρ αντιπροσωπεύουν την υπέρυθη περιοχή ενός φάσματος.

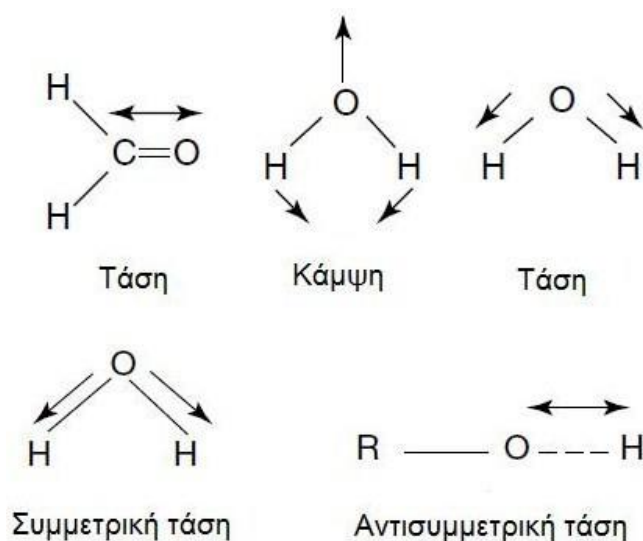
Στην περιοχή αυτή οι συχνότητες αντιστοιχούν σε μήκη κύματος περίπου από $8 \cdot 10^{-5}$ cm έως $1 \cdot 10^{-2}$ cm. Ένα σύνθετος φασματομέτρο υπέρυθρου λειτουργεί στο μέσο της περιοχής αυτής και συγκεκριμένα για μήκη κύματος μεταξύ 2.5 μm και 25 μm , τα οποία αντιστοιχούν σε ενέργειες από ~ 4.6 έως 46 kJ/mol. Τα υπέρυθρα φωτόνια δεν διαθέτουν αρκετή ενέργεια ώστε να προκαλέσουν μεταπτώσεις ηλεκτρονίων, μπορούν όμως να προκαλέσουν δόνηση ομάδων ατόμων γύρω από τους δεσμούς που τις συνδέουν. Οι δονητικές μεταπτώσεις αντιπροσωπεύουν διακριτές ενέργειες, ενώ τα μόρια απορροφούν υπέρυθρη ακτινοβολία μόνο σε συγκεκριμένα μήκη κύματος και συγκεκριμένες συχνότητες.

Η θέση μιας υπέρυθρης ζώνης μπορεί να καθοριστεί από το μήκος κύματος της (λ), μετρημένο σε μικρόμετρα ($\mu = 10^{-4}$ cm). Η πιο συνηθισμένη μονάδα είναι ο κυματαριθμός, ο οποίος αντιστοιχεί στον αριθμό των κύκλων (μήκη κύματος) ανά εκατοστό. Ο κυματαριθμός είναι το αντίστροφο του μήκους κύματος (σε εκατοστά), είναι ανάλογος προς τη συχνότητα (ν) του κύματος και επομένως και προς την ενέργεια του φωτονίου της συγκεκριμένης συχνότητας.

Ουσιαστικά, η φασματοσκοπία υπέρυθρου (FTIR) παρέχει πληροφορίες για τις μοριακές ταλαντώσεις που συμβαίνουν σε μια χημική ένωση. Η ενέργεια των περισσότερων μοριακών ταλαντώσεων αντιστοιχεί στην υπέρυθρη ακτινοβολία του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και συνεπώς μπορούν να ανιχνευθούν από ένα φάσμα FTIR. Όταν η υπέρυθρη ακτινοβολία προσπίπτει σε ένα υλικό, μπορεί να το διαπεράσει, να σκεδαστεί ή να απορροφηθεί από αυτό. Η υπέρυθρη ακτινοβολία που απορροφάται τις περισσότερες φορές διεγείρει μόρια σε υψηλότερες στάθμες δόνησης, οι οποίες είναι κβαντισμένες. Αυτό συμβαίνει όταν η ενέργεια της ακτινοβολίας είναι ίση με την διαφορά δύο δονητικών σταθμών.

Στην υπέρυθρη περιοχή, οι απορροφήσεις οφείλονται σε διεγέρσεις δόνησης ή παραμόρφωσης-κάμψης των δεσμών ή περιστροφής του μορίου. Οι κυριότερες διεγέρσεις παραμόρφωσης-δόνησης γίνονται στην περιοχή $4000-625 \text{ cm}^{-1}$. Στην περιοχή $1400-4000 \text{ cm}^{-1}$ ενός FTIR φάσματος, δίνεται η πλειοψηφία των πληροφοριών καθώς εκεί εμφανίζονται απορροφήσεις που οφείλονται σε χαρακτηριστικές ομάδες όπως π.χ. καρβονύλια, αμίδια, υδροξύλια κ.α. Παράλληλα, η περιοχή $600-1400 \text{ cm}^{-1}$ περιέχει πολλές ταινίες απορροφήσεων οι οποίες προέρχονται κυρίως από τον ανθρακικό σκελετό μιας ένωσης, π.χ. αρωματικός σκελετός [10].

Εκτός από τις δονήσεις και τις κάμψεις υπάρχουν και άλλα είδη παραμόρφωσης της δομής των μορίων, όπως όταν αυτό σείεται (wagging), αιωρείται (rocking), στρεβλώνεται (twisting), έχει ψαλιδωτή κίνηση (scissoring) κ.α.



Εικόνα 4.2: Μερικές μορφές δόνησης και κάμψης.

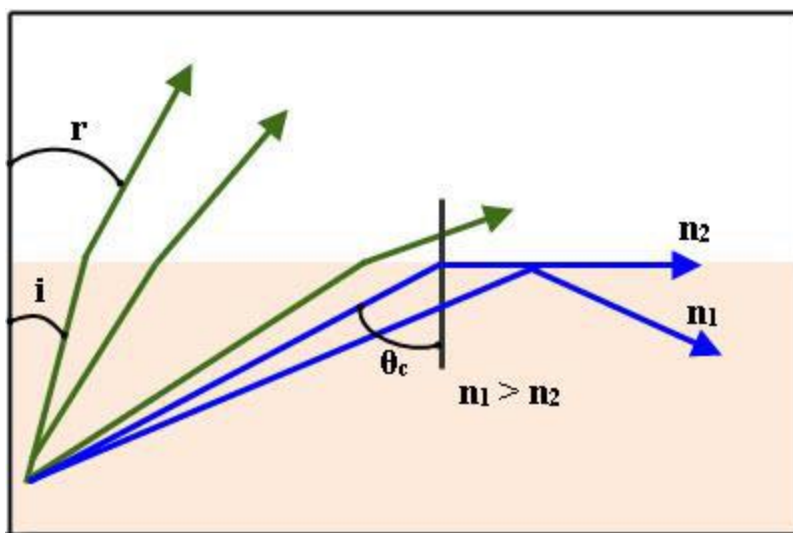
Η φασματοσκοπία υπερύθρου Fourier χρησιμοποιεί το μετασχηματισμό Fourier με την βοήθεια του οποίου μελετάται ολόκληρο το φάσμα στην περιοχή του υπερύθρου, με μια μόνο σάρωση. Η ανάλυση Fourier είναι μια διεργασία κατά την οποία κάθε καμπύλη διαιρείται σε ένα άθροισμα σειρών ημιτόνων και συνημιτόνων, που ονομάζονται σειρές Fourier. Συγκεκριμένα, στο φασματόμετρο μετασχηματισμού Fourier το δείγμα τοποθετείται ανάμεσα στον ανιχνευτή και την έξοδο του ιντερφερομέτρου. Το ιντερφερόμετρο περιέχει το φάσμα της πηγής μείον το φάσμα του δείγματος [11].

Μία από τις σημαντικότερες τεχνικές ανάκλασης που έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιείται ευρέως από τα φασματοφωτόμετρα FTIR κυρίως για επιφανειακές αναλύσεις είναι η τεχνική της αποσβένουσας ολικής ανάκλασης (attenuated total reflectance, ATR), η οποία είναι κατάλληλη για τη μελέτη δειγμάτων μεγάλου πάχους ή υψηλά απορροφητικών και αδιαφανών στερεών ή υγρών υλικών που περιλαμβάνουν λεπτά φιλμ και επικαλύψεις, κονιοποιημένα υλικά (σκόνες), νήματα, πάστες, κόλλες, λεπτά υμένα πολυμερών και υδατικά διαλύματα. Η τεχνική αυτή είναι από τις σημαντικότερες μη καταστρεπτικές και πιο ευέλικτες μεθόδους, η οποία παρέχει φάσματα πολύ υψηλής ποιότητας για μία πολύ μεγάλη ποικιλία υλικών. Το βασικό πλεονέκτημα της ATR μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι δεν απαιτεί

οποιαδήποτε επεξεργασία του δείγματος ή ομογενοποίησή του, παρά μόνο μία απειροελάχιστη ποσότητα δείγματος που τοποθετείται σε επαφή με τον κρύσταλλο ως έχει. Για την επίτευξη καλής επαφής, που παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ακρίβεια των ληφθέντων φασμάτων, χρησιμοποιείται κατάλληλος εξοπλισμός που πιέζει το δείγμα πάνω στον κρύσταλλο. Η λειτουργία της τεχνικής ATR βασίζεται στο φαινόμενο της ολικής εσωτερικής ανάκλασης (total internal reflection) το οποίο συμβαίνει όταν μία δέσμη ακτινοβολίας εισάγεται από ένα μέσο υψηλής πυκνότητας (με υψηλότερο δείκτη διάθλασης, n_1) σε ένα μέσο χαμηλότερης πυκνότητας (με χαμηλότερο δείκτη διάθλασης, n_2). Το κλάσμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που ανακλάται αυξάνεται όσο μεγαλώνει η γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας. Όταν η γωνία πρόσπτωσης θ είναι μεγαλύτερη από την κρίσιμη γωνία θ_c , η οποία αποτελεί συνάρτηση των δεικτών διάθλασης των δύο μέσων και ορίζεται ως:

$$\theta_c = \sin^{-1} (n_2 / n_1)$$

τότε όλες οι προσπίπτουσες ακτινοβολίες ανακλώνται πλήρως στη διεπιφάνεια των δύο μέσων με αποτέλεσμα να συμβαίνει ολική εσωτερική ανάκλαση, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.3.



Εικόνα 4.3: Σχηματική αναπαράσταση του φαινομένου της εσωτερικής ολικής ανάκλασης.

Στα εξαρτήματα που χρησιμοποιούνται για την τεχνική ATR, ως στοιχείο εσωτερικής ανάκλασης (internal reflection element, IRE) υπάρχει ένας διαφανής κρύσταλλος στην υπέρυθη ακτινοβολία με υψηλό δείκτη διάθλασης πάνω στον οποίο τοποθετείται το δείγμα. Η δέσμη της υπέρυθρης ακτινοβολίας που προσπίπτει στον

κρύσταλλο (συνήθως υπό γωνία 45°) υφίσταται πολλαπλές ολικές ανακλάσεις στον κρύσταλλο, με αποτέλεσμα να διέρχεται από το δείγμα πολλές φορές, από το οποίο και απορροφάτε. Επιπλέον, τα τυπικά βάθη διείσδυσης στην τεχνική ATR είναι της τάξης των μερικών μm (συνήθως μέχρι 10 μm) και ως εκ τούτου είναι προφανές ότι ένα φάσμα μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με την επιφάνεια ενός δείγματος. Τέλος, οι κρύσταλλοι στο ATR, κατασκευάζονται από υλικά που έχουν πολύ υψηλό δείκτη διάθλασης και χαμηλή διαλυτότητα στο νερό. Μερικά από τα πιο διαδεδομένα υλικά που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στους ATR κρυστάλλους είναι το διαμάντι, ο σεληνιούχος ψευδάργυρος (ZnSe), το γερμάνιο (Ge) και το ιωδιούχο θάλλιο/βρωμιούχο θάλλιο (TiI₂/TiBr₂, κρύσταλλος KRS-5), του οποίου η χρήση όμως έχει περιοριστεί λόγω της τοξικότητάς του. Επίσης το μήκος του ATR κρυστάλλου καθορίζει την ευαισθησία της τεχνικής. Για μια δεδομένη γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας, η αύξηση του λόγου του μήκους προς το πάχος του κρυστάλλου παρέχει μεγαλύτερο αριθμό ανακλάσεων [12, 13].

4.8.2.2 Πειραματική διαδικασία

Τα παράγωγα που συντέθηκαν, χαρακτηρίστηκαν με τη λήψη φασμάτων FTIR σε φασματοόμετρο Thermo Nicolet 6700 εξοπλισμένο με κρύσταλλο διαμαντιού (Smart Orbit™, Thermo Electron Corporation), με την τεχνική αποσβεσμένης ολικής ανάκλασης (attenuated total reflection, ATR). Το εκάστοτε δείγμα διασπείρεται σε αιθανόλη και μερικές σταγόνες από το διάλυμα τοποθετούνται πάνω στον κρύσταλλο. Μετά από ελάχιστα δευτερόλεπτα η αιθανόλη εξατμίζεται και λαμβάνεται το φάσμα. Με τη φασματοσκοπία υπερόυθρου είναι δυνατή η ταυτοποίηση της δομής μιας ένωσης μέσω του δακτυλικού αποτυπώματος. Το κάθε δείγμα σαρώνεται τουλάχιστον 128 φορές στη περιοχή 500-4000 cm⁻¹ και το τελικό φάσμα προκύπτει από το μέσο όρο τους, σαν μεταβολή της % διαπερατότητας. Η διαχωριστική ικανότητα είναι 4 cm⁻¹.

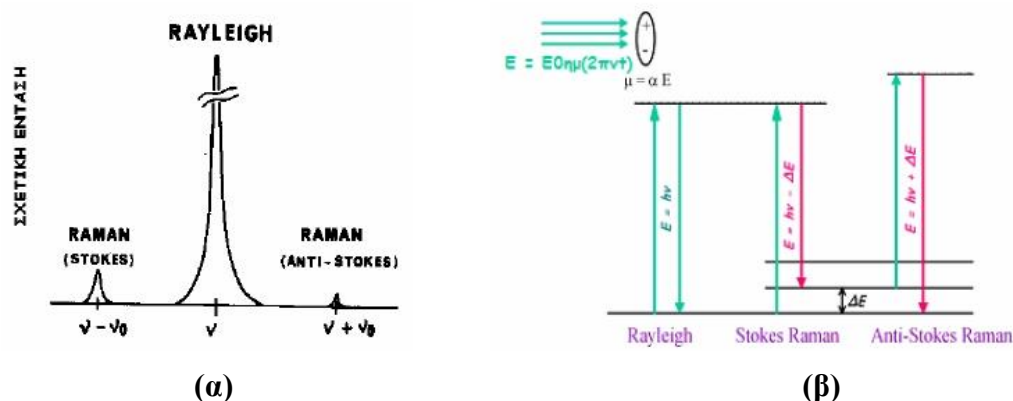
4.8.3 Φασματοσκοπία Raman

4.8.3.1 Αρχή της μεθόδου

Η Φασματοσκοπία Raman προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες για τη δομή των χημικών μορίων και συγκαταλέγεται σε μία από τις πιο σημαντικές φασματοσκοπικές τεχνικές. Στηρίζεται στη μελέτη της αλληλεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής

ακτινοβολίας με την ύλη και συγκεκριμένα, στο φαινόμενο σκέδασης της ακτινοβολίας από την ύλη.

Στη φασματοσκοπία Raman, χρησιμοποιείται μια ισχυρή πηγή λέιζερ ορατής ή εγγύς υπερύθρου μονοχρωματικής ακτινοβολίας. Αυτή η ακτινοβολία όταν περάσει μέσα από το δείγμα υπόκειται εκτός των άλλων (απορρόφηση, ανάκλαση κτλ), και σε άλλα δύο είδη σκέδασης, τη σκέδαση Rayleigh και τη σκέδαση Raman. Η ενέργεια που σκεδάζεται αποτελείται σχεδόν εξ' ολοκλήρου (98%) από ακτινοβολία συχνότητας παρόμοιας με αυτή της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (σκέδαση Rayleigh), αλλά ένα μέρος της έχει μεγαλύτερες ή μικρότερες συχνότητες από την συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (σκέδαση Raman) [14]. Η σκέδαση Raman, που παρατηρήθηκε από τον Ινδό φυσικό C. V. Raman το 1928, διακρίνεται στη σκέδαση Stokes και τη σκέδαση anti-Stokes. Το μήκος κύματος της σκέδασης Rayleigh είναι το μήκος κύματος της πηγής κι επομένως είναι σημαντικά πιο ισχυρή από τα άλλα δύο είδη (Εικόνα 4.4).



Εικόνα 4.4: (α) Στο σχήμα φαίνεται ότι η σκέδαση Rayleigh είναι ισχυρότερη από τις σκεδάσεις Raman, (β) προέλευση της σκέδασης Rayleigh και Raman.

Με βάση την κβαντομηχανική, όταν ακτινοβολία (φωτόνια) συχνότητας ν και ενέργειας $h\nu$ (h είναι σταθερά Planck) προσπέσει πάνω σε μόρια μιας ένωσης αυτά διεγείρονται σε ενεργειακές καταστάσεις υψηλότερης ενέργειας από την αρχική τους κατά $h\nu$. Κατά την αποδιέγερσή τους, αν συμβεί να επανέλθουν στην αρχική τους ενεργειακή κατάσταση εκπέμποντας ενέργεια $h\nu$ (ίδια με την ενέργεια της πηγής), οι συγκρούσεις μεταξύ φωτονίου και μορίων χαρακτηρίζονται ως ελαστικές (χωρίς απώλεια ενέργειας) και πρόκειται για τη σκέδαση Rayleigh. Σε αντίθετη περίπτωση, οι συγκρούσεις χαρακτηρίζονται ανελαστικές και πρόκειται για τη σκέδαση Raman.

Υπάρχουν δύο γενικοί κανόνες για τις δονήσεις Raman:

(α) οι συμμετρικές δονήσεις, οι οποίες εμφανίζουν έντονες φασματικές γραμμές, ενώ οι μη συμμετρικές δίνουν συνήθως ασθενείς και ορισμένες φορές πολύ ασθενείς φασματικές γραμμές και

(β) ο κανόνας του αμοιβαίου αποκλεισμού, όπου εάν ένα μόριο έχει κέντρο συμμετρίας τότε οι δονήσεις του είναι ενεργές στο φάσμα Raman, ενώ είναι ανενεργές στο φάσμα IR, και εκείνες που είναι ενεργές στο IR είναι ανενεργές στο φάσμα Raman.

Εάν το μόριο δεν έχει κέντρο συμμετρίας, τότε μερικές δονήσεις μπορεί να είναι ενεργές στα φάσματα Raman και IR. Η σύγκριση φασμάτων IR και Raman μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες για τη συμμετρία ή μη ενός μορίου.

4.8.3.2 Πειραματική διαδικασία

Παράλληλα, χαρακτηρισμός των υβριδικών υλικών πραγματοποιήθηκε με τη λήψη φασμάτων Raman. Χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο Micro-Raman (visible Raman microspectroscopy) με τη χρήση πηγών ακτινών λέιζερ (ένταση 1%), τα οποία δίνουν μια στενή, υψηλής ακρίβειας μονοχρωματική ακτίνα φωτός. Αυτή η ακτίνα, μπορεί να συγκεντρωθεί σε ένα μικρό τμήμα και περιέχει σχετικά μεγάλη ενέργεια, μέσα σε πολύ μικρή περιοχή συχνοτήτων ($0-3500\text{ cm}^{-1}$).

4.8.4 Φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-vis)

4.8.4.1 Αρχή της μεθόδου

Οι απορροφήσεις ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, στην περιοχή του υπεριώδους (Ultraviolet, UV) και του ορατού (visible, vis) τμήματος του φάσματος είναι αποτέλεσμα των ενεργειακών μεταβολών στην ηλεκτρονική δομή των μορίων. Τα εξωτερικά ηλεκτρόνια μεταπίπτοντας από τη μια τροχιά στην άλλη προκαλούν απορρόφηση ενέργειας σε διακεκριμένες και κβαντισμένες ποσότητες [15]. Όταν αλλάζει η ηλεκτρομαγνητική ενέργεια του μορίου μιας χημικής ένωσης προκαλούνται μεταβολές της διπολικής ροπής του. Αυτή η μεταβολή είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση του χημικού μορίου με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία.

Η θέση και η ένταση των ευρύτερων ταινιών απορρόφησης που οφείλονται στις ηλεκτρονικές μεταβάσεις από τη μία ενεργειακή στάθμη σε μία άλλη είναι χαρακτηριστικές των διαφόρων ομάδων των οργανικών ενώσεων. Αυτό συμβαίνει γιατί η συχνότητα δόνησης των διαφόρων ομάδων, ατόμων στο μόριο των οργανικών ενώσεων είναι σχεδόν ανεξάρτητη από τη φύση του υπόλοιπου μορίου (π.χ. μήκος

και ενέργεια διάστασης δεσμών) αλλά εξαρτάται από την ηλεκτρονική δομή των δεσμών.

Το φάσμα χωρίζεται σε 3 περιοχές: (α) την ορατή περιοχή (Vis) με μήκος κύματος 400-750 nm, (β) την κυρίως υπεριώδη περιοχή (near UV) με μήκος κύματος 200-400 nm και (γ) την άπω υπεριώδη περιοχή (far UV) κάτω των 200 nm. Η ένταση των ηλεκτρονικών απορροφήσεων δίνεται από την κλασική εξίσωση των Beer-Lambert-Bouguer [16]:

$$A = \log I_0 / I = \epsilon bc$$

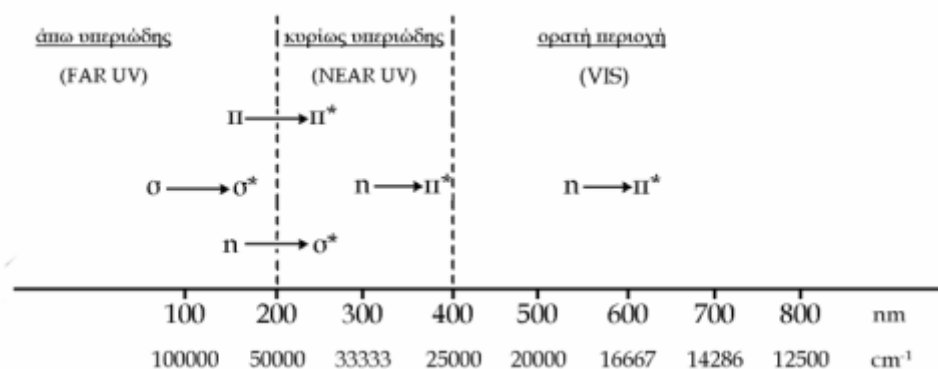
όπου c είναι η συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα, b είναι το πάχος της κυψελίδας στην οποία τοποθετούμε το δείγμα, I_0 είναι η ένταση του προσπίπτοντος φωτός που διαπερνά το δείγμα (ένα μέρος της ακτινοβολίας απορροφάται) και ϵ είναι ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας (extinction coefficient) που κυμαίνεται από $5 \cdot 10^5$ για ισχυρές ταινίες απορρόφησης μέχρι 1 για τις πιο ασθενείς [17].

Τα ηλεκτρόνια των οργανικών μορίων χωρίζονται σε 3 κατηγορίες:

1. τα σ -ηλεκτρόνια,
2. τα π -ηλεκτρόνια και
3. τα n - ή μη δεσμικά ηλεκτρόνια (non bonding), τα οποία δεν παίρνουν μέρος σε δεσμούς και συγκρατούνται ασθενέστερα, ώστε να μπορούν να υποστούν μεταβάσεις.

Αναλυτικά, τα σ -ηλεκτρόνια είναι σταθερά προσκολλημένα στους πυρήνες και απαιτούν μεγαλύτερη ενέργεια για να μεταβούν σε άλλα ενεργειακά επίπεδα, ενώ τα π - και τα n -ηλεκτρόνια απαιτούν μικρότερη ενέργεια. Συνήθως, αλλά όχι πάντοτε, τα n -ηλεκτρόνια απαιτούν μικρότερη ενέργεια από τα π -ηλεκτρόνια. Η ποσότητα ενέργειας που απαιτείται για τη διέγερση των ηλεκτρονίων αντιστοιχεί στην εμφάνιση απορροφήσεων στην περιοχή UV και vis.

Έτσι, η μετάβαση $\sigma \rightarrow \sigma^*$ (από ένα δεσμικό σ -ηλεκτρόνιο σε ένα μη δεσμικό σ -ηλεκτρόνιο) απαιτεί ενέργεια της οποίας το μήκος κύματος πέφτει στην άπω υπεριώδη περιοχή. Οι μεταβάσεις $\pi \rightarrow \pi^*$ και $n \rightarrow n^*$ εμφανίζονται στη διαχωριστική γραμμή της άπω UV και κυρίως UV, ενώ η μετάβαση $n \rightarrow \pi^*$ στην υπεριώδη και ορατή περιοχή, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.5.



Εικόνα 4.5: Ηλεκτρονικές μεταβάσεις που παρατηρούνται με φασματοσκοπία UV-vis.

Τα φάσματα αναπαρίστανται ως μεταβολές της μοριακής απορροφητικότητας (ϵ) ή της απορροφήσεως (A) συναρτήσει του μήκους κύματος (λ). Όταν το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας αντιστοιχεί στο ενεργειακό επίπεδο που απαιτείται για τη διέγερση ενός ηλεκτρονίου, απορροφάται ενέργεια. Η απορρόφηση αυτή ανιχνεύεται και απεικονίζεται σε ένα γράφημα, το οποίο συσχετίζει το μήκος κύματος με την % απορρόφηση ακτινοβολίας.

4.8.4.2 Πειραματική διαδικασία

Για τη μελέτη σταθερότητας των νανοϋλικών χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία UV-Vis και συγκεκριμένα το φασματοφωτόμετρο Cary 100 Conc UV-visible spectrophotometer (Varian Inc., Mulgrave, Australia). Αρχικά, το προς μελέτη υλικό διασπείρεται σε νερό, δημιουργώντας μια διασπορά συγκέντρωσης 1 mg/mL και τοποθετείται σε λουτρό υπερίχων για λίγα λεπτά, ώστε να επιτευχθεί καλύτερη διασπορά. Τα διαλύματα αυτά αφήνονται σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου. Για την κάθε μέτρηση, 50 μ L από το διάλυμα διασπείρονται σε 950 μ L H₂O και μετράται η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων (OD). Το φάσμα που προκύπτει έχει εύρος μηκών κύματος από 220 nm έως 650 nm.

4.8.5 Περίθλαση ακτίνων-X (XRD)

4.8.5.1 Αρχή της μεθόδου

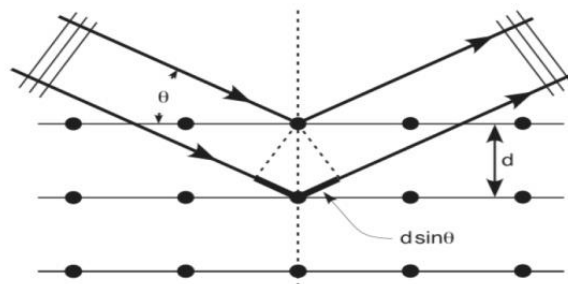
Από την τεχνική της περίθλασης ακτίνων-X (X-ray Diffraction) λαμβάνουμε πληροφορίες για την κρυσταλλογραφική δομή των υλικών, χωρίς να τα καταστρέφουμε [18]. Παράλληλα, μπορεί να πραγματοποιηθεί ποιοτική και ποσοτική ταυτοποίηση των κρυσταλλικών φάσεων αλλά και να προσδιοριστεί το μέγεθος των σωματιδίων (κρυσταλλιτών). Η ποιοτική ανάλυση (προσδιορισμός των στοιχείων του

παρόντος) συνεπάγεται την καταγραφή του φάσματος μέσω ενός φασματομέτρου ακτίνων- X , σε εκείνο το εύρος μηκών κύματος ή ενέργειας, εντός του οποίου οι σχετικές γραμμές μπορούν να είναι παρούσες. Οι γραμμές ταυτοποιούνται με τη βοήθεια βάσεων δεδομένων. Στην ποσοτική ανάλυση οι εντάσεις των γραμμών των ακτίνων- X από το δείγμα συγκρίνονται με εκείνες των πρότυπων, των οποίων η σύνθεση είναι γνωστή.

Οι ακτίνες- X είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με μήκος κύματος της τάξεως 10^{-10} m και παράγεται κατά την πρόσπτωση δέσμης ηλεκτρονίων πάνω σε μεταλλική επιφάνεια. Ο συνηθέστερος τρόπος παραγωγής ακτίνων- X είναι η πρόσκρουση ηλεκτρονίων υψηλής ενεργείας στην επιφάνεια ενός μετάλλου (στόχο) με μεγάλο ατομικό αριθμό. Τα ηλεκτρόνια αυτά προσπίπτοντας στο στόχο διεγείρουν τα ηλεκτρόνια των εσωτερικών στοιβάδων του μετάλλου προκαλώντας την απόσπασή τους. Το «κενό» αυτό στην εσωτερική στοιβάδα του ατόμου καλύπτεται από ηλεκτρόνια ενεργειακά υψηλότερων εξωτερικών στοιβάδων. Η ενεργειακή διαφορά των δύο στοιβάδων, ελευθερώνεται με την εκπομπή φωτονίων (ακτίνες- X).

Οι γραμμές εκπομπής ακτίνων- X παράγονται κατά τη μετάβαση ηλεκτρονίων μεταξύ εσωτερικών ατομικών ενεργειακών επιπέδων. Από μία λυχνία εξέρχεται μια δέσμη ηλεκτρονίων η οποία επιταχύνεται εντός ηλεκτρικού πεδίου και προσκρούει σε μεταλλικό στόχο, την άνοδο, που συνήθως είναι χαλκός. Από την άνοδο παράγεται ένα συνεχές φάσμα, και η ακτινοβολία που αντιστοιχεί στις μεταπτώσεις K_{α} και K_{β} . Τα μήκη κύματος είναι διαφορετικά ανάλογα με το υλικό (μέταλλο) της ανόδου. Ακολουθώντας οι ακτίνες διέρχονται από ένα διάφραγμα και μια σχισμή εστίασης και καταλήγουν στο δείγμα. Η δέσμη περιθλάται από το δείγμα και περνάει από δύο σχισμές και ένα λεπτό έλασμα, απομακρύνοντας τις ακτινοβολίες K_{α} και K_{β} πριν φτάσουν στον ανιχνευτή.

Ο ανιχνευτής κινείται σε τόξο γωνιών (2θ) συλλέγοντας ανακλώμενες ακτίνες- X , οι οποίες περιθλώνονται από τα κρυσταλλογραφικά επίπεδα Miller. Ταυτόχρονα, ο ανιχνευτής μετατρέπει τα φωτόνια σε ηλεκτρικούς παλμούς, οι οποίοι αναλύονται και μετρούνται. Έτσι παράγεται ένα διάγραμμα έντασης σαν συνάρτηση της γωνίας (2θ). Ο νόμος Bragg θεωρεί ότι ένας κρύσταλλος είναι μια διάταξη κρυσταλλογραφικών επιπέδων τα οποία περιέχουν τα περιοδικά διατεταγμένα άτομα (επίπεδα Miller). Οι κρύσταλλοι δρουν σα φράγμα περίθλασης για τις ακτίνες- X , αφού τα μήκη κύματος είναι ίδιας τάξης με τις αποστάσεις των ατόμων στα κρυσταλλικά υλικά.



Εικόνα 4.6: Περίθλαση ακτίνων-X από τον κρύσταλλο.

Στην Εικόνα 4.6 φαίνεται πως η δέσμη ακτίνων-X πέφτει στην επιφάνεια του κρυστάλλου και σκεδάζεται μερικώς από τα άτομα στο πρώτο στρώμα. Αυτή η διαδικασία συνεχίζεται και στα επόμενα επίπεδα. Έτσι, πραγματοποιείται το φαινόμενο της συμβολής. Η μαθηματική έκφραση του νόμου του Bragg δίνεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$n\lambda = 2d \sin(\theta)$$

όπου, n : ακέραιος αριθμός για την ενισχυτική συμβολή, d : η απόσταση μεταξύ δύο κρυσταλλογραφικών επιπέδων, θ : η γωνία πρόσπτωσης ακτίνων-X στο επίπεδο με μέγιστη ανάκλαση και λ : το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

4.8.5.2 Πειραματική διαδικασία

Η λήψη των δεδομένων της περίθλασης ακτίνων-X λαμβάνεται χρησιμοποιώντας μία μονοχρωματική ακτινοβολία $\text{CuK}_{\alpha 1}$ μήκους κύματος $\lambda=1.54 \text{ \AA}$, η οποία προέρχεται από μία περιστρεφόμενη άνοδο Rigaku (50 kV, 100 mA) και ένα R-AXIS IV image plate. Τα δείγματα μετρήθηκαν σε μορφή σκόνης όπου τοποθετήθηκαν με συμπαγές τρόπο σε τριχοειδείς σωλήνες Lindenmann πάχους 1 mm.

4.8.6 Θερμοβαρυστρική ανάλυση (TGA)

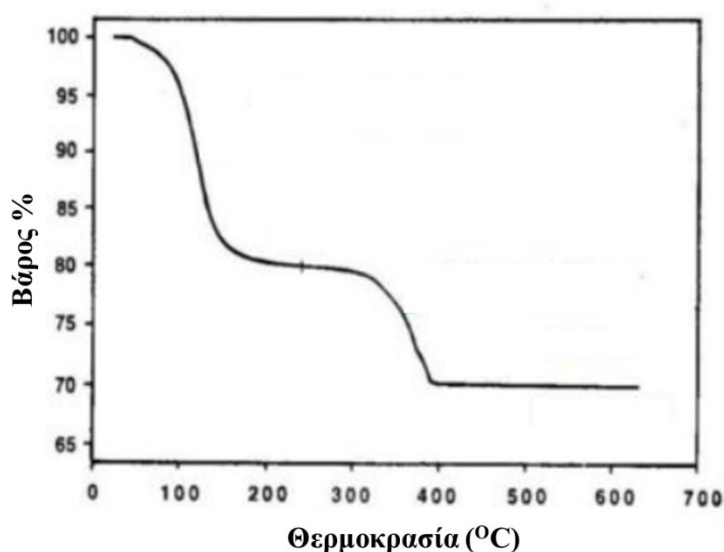
4.8.6.1 Αρχή της μεθόδου

Όταν θερμαίνεται μια ουσία μπορούν να συμβούν χημικές διαδικασίες όπως θερμική διάσπαση ή οξείδωση αλλά και φυσικές όπως εκρόφιση, εξάτμιση, εξάχνωση κ.α. Οι χημικές και φυσικές αλλαγές μιας ουσίας κατά τη θέρμανση μπορούν να μεταβάλλουν το βάρος του δείγματος. Κατά τη διάρκεια της θέρμανσης, η μέτρηση του βάρους δείχνει τα συστατικά που έχει η μετρούμενη ουσία, τη θερμική σταθερότητα του υλικού αλλά και την ύπαρξη πτητικών συστατικών και υγρασίας. Ουσιαστικά, η θερμοβαρυστρική ανάλυση είναι μια τεχνική που δείχνει την

μεταβολή του βάρους, στο υπό μέτρηση υλικό, σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία, η οποία αυξάνεται γραμμικά με τον χρόνο.

Το βασικότερο στοιχείο στο οποίο βασίζεται η θερμοβαρυμετρική ανάλυση είναι ο θερμοζυγός, ο οποίος βρίσκεται κλεισμένος σε κλίβανο και μπορεί να μετρήσει διαφορές βάρους της τάξεως των μg . Ο θερμοζυγός λειτουργεί με βάση την αρχή της επαγωγής ή την αρχή των μετασχηματιστών ώστε να υπολογιστεί το βάρος του υπό εξέταση δείγματος. Συνεπώς, ένας μαγνήτης ο οποίος είναι συνδεδεμένος με τον ζυγό κινείται μέσω ενός πηνίου παράγοντας ρεύμα και μεταβάλλοντας έτσι την ένδειξη στο όργανο.

Χρησιμοποιείται αδρανής ατμόσφαιρα (συνήθως αζώτου) εντός του κλιβάνου κατά τη θέρμανση του δείγματος, ώστε να αποφευχθούν φαινόμενα διάβρωσης ή οξειδωσης του μετρούμενου υλικού. Σημαντικό ρόλο παίζει και η ροή του αερίου καθώς μπορεί να επηρεάσει τη ζύγιση του δείγματος αλλά απομακρύνει και τα αέρια που προκύπτουν κατά τη θέρμανση του κάθε υλικού. Στη νεότερη εκδοχή του ένα TGA αποτελείται από θερμοζυγό, σύστημα ψύξης/θέρμανσης και ηλεκτρονικό υπολογιστή. Συνήθως, ο κλίβανος θερμαίνεται από μια ηλεκτρική αντίσταση αλλά υπάρχουν και κλίβανοι μικροκυμάτων ή υπέρυθρης ακτινοβολίας. Η θέρμανση του κλιβάνου γίνεται ομοιόμορφα χωρίς να επηρεάζει τον μηχανισμό του ζυγού και παράλληλα τα τοιχώματά του να είναι αδρανής σε υψηλές θερμοκρασίες. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από μια θερμοβαρυμετρική ανάλυση λέγονται θερμοσταθμικές καμπύλες με μορφή όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.7.



Εικόνα 4.7: Παράδειγμα καμπύλης TGA [19].

Γενικά, από τις θερμοσταθμικές καμπύλες μπορεί να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός απώλειας βάρους αλλά και να δώσει πληροφορίες όπως είναι η θερμοκρασία διάσπασης μιας ουσίας, η πορεία διάσπασης της, ο σχηματισμός ενδιάμεσου προϊόντος, η θερμοκρασία στο τέλος της αντίδρασης, το βάρος των υπολειμμάτων αν υπάρχουν αλλά και τα πτητικά συστατικά.

4.8.6.2 Πειραματική διαδικασία

Η θερμοβαρυμετρική ανάλυση είναι μια καταστρεπτική μέθοδος και χρησιμοποιείται για την ανάλυση της δομής των υπό μελέτη υλικών. Συγκεκριμένα, τα υλικά σε μορφή σκόνης (~10 mg) τοποθετούνται σε αλουμινένια δοχεία. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αναλυτή Setaram SETSYS Evolution 17 και ρυθμό σάρωσης 5 °C/min υπό ατμόσφαιρα αέρα.

4.8.7 Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων-X (XPS)

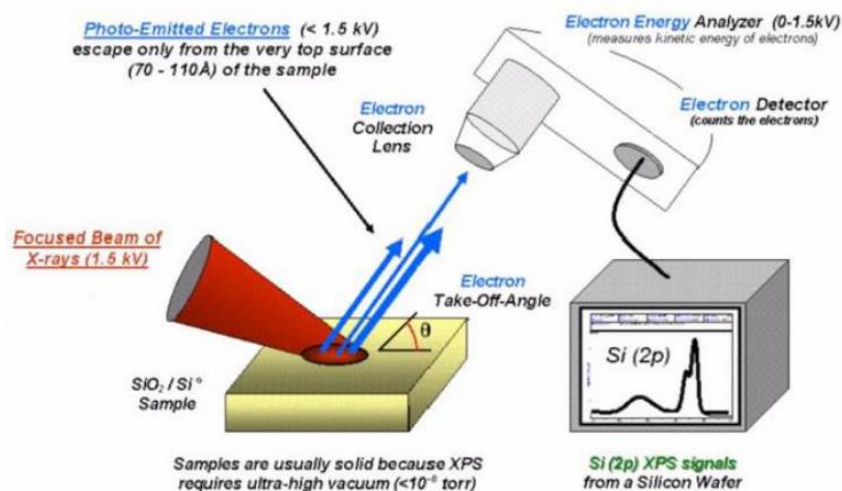
4.8.7.1 Αρχή της μεθόδου

Η Φασματοσκοπία Φωτοηλεκτρονίων ακτίνων-X (XPS) είναι μια μη καταστρεπτική τεχνική και χρησιμοποιείται για τη χημική ανάλυση και την ταυτοποίηση της χημικής κατάστασης των στοιχείων στην επιφάνεια ενός υλικού.

Το δείγμα, στη φασματοσκοπία XPS εκτίθεται, κάτω από συνθήκες υπερυψηλού κενού, σε μία μονοχρωματική δέσμη ακτίνων-X (ενέργειας $h\nu$) που προκαλεί φωτοϊονισμό και εκπομπή φωτοηλεκτρονίων [20]. Η κινητική ενέργεια E_k των εκπεμπόμενων φωτοηλεκτρονίων υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$E_k = h\nu - E_b + \Delta\Phi$$

όπου, $h=6.62 \times 10^{-23}$ Js η σταθερά του Planck, $\Delta\Phi$ η διαφορά του έργου εξόδου ανάμεσα στο στερεό και τον ανιχνευτή και E_b η ενέργεια δέσμευσης του φωτοηλεκτρονίου, η οποία προέρχεται από εσωτερική στοιβάδα (core electron). Η γεωμετρία ενός συστήματος XPS παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.8.



Εικόνα 4.8: Σχηματική αναπαράσταση ενός συστήματος XPS.

Ένα χαρακτηριστικό φάσμα XPS απεικονίζει το ενεργειακό φάσμα των εκπεμπόμενων φωτοηλεκτρονίων. Επίσης, αποτελείται από μία σειρά διακριτών ταινιών, οι οποίες ανταποκρίνονται στις χαρακτηριστικές στοιβάδες της ηλεκτρονικής δομής του. Συγκεκριμένα, όταν η επιφάνεια ενός στερεού εκτεθεί σε ακτίνες-X κατάλληλης ενέργειας, το υλικό απορροφά διακριτά κβάντα ενέργειας με επακόλουθο την εκπομπή φωτοηλεκτρονίων. Η κατανομή του πλήθους των εκπεμπόμενων φωτοηλεκτρονίων σε συνάρτηση της E_k , δίνει πληροφορίες για το νανοδομημένο στερεό. Αναλυτικά, η εκπομπή των φωτοηλεκτρονίων γίνεται σε 3 στάδια:

- i. απορρόφηση των ακτίνων-χ και διέγερση του ηλεκτρονίου από την βασική στην τελική κατάσταση, που βρίσκεται επάνω από τη στάθμη Fermi,
- ii. μεταφορά του ηλεκτρονίου στην επιφάνεια και
- iii. διαφυγή του ηλεκτρονίου στο κενό.

Το XPS μπορεί να διαθέτει ως πηγή διέγερσης μια πηγή ακτίνων-X. Από τις σχετικές εντάσεις των κορυφών σε ένα φάσμα XPS, μπορεί να προσδιοριστεί η χημική σύσταση της επιφάνειας του υλικού. Οι θέσεις και το σχήμα των γραμμών δίνουν πληροφορίες για τη χημική κατάσταση των στοιχείων που ανιχνεύονται. Ειδικότερα, η ακριβής τιμή της ενέργειας σύνδεσης ενός ηλεκτρονίου εξαρτάται από την κατάσταση οξείδωσης του ατόμου και το τοπικό φυσικό και χημικό περιβάλλον γύρω από το άτομο.

Η τεχνική της φασματοσκοπίας XPS εμφανίζει αρκετά πλεονεκτήματα όπως είναι η γρήγορη συλλογή δεδομένων και ότι η πρωτεύουσα δέσμη δεν καταστρέφει το δείγμα ώστε να μπορούν να μελετηθούν και ευαίσθητα υλικά. Επιπλέον, δεν προκαλείται

φόρτιση στο δείγμα κατά τη μέτρηση και τα αποτελέσματα είναι επαναλήψιμα. Τέλος, η τεχνική αυτή εμφανίζει δύο μειονεκτήματα αφού έχει μικρό βάθος διείσδυσης και δεν έχει υψηλή χωρική διακριτική ικανότητα [21-23].

4.8.7.2 Πειραματική διαδικασία

Η φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων από ακτίνες-X είναι μια μη καταστρεπτική τεχνική και χρησιμοποιείται για τη χημική ανάλυση και την ταυτοποίηση της χημικής κατάστασης των στοιχείων στην επιφάνεια των νανοϋλικών. Μπορεί να γίνει προσδιορισμός της χημικής σύστασης της επιφάνειας, των υπό μελέτη δειγμάτων, από τις σχετικές εντάσεις των κορυφών του φάσματος του XPS.

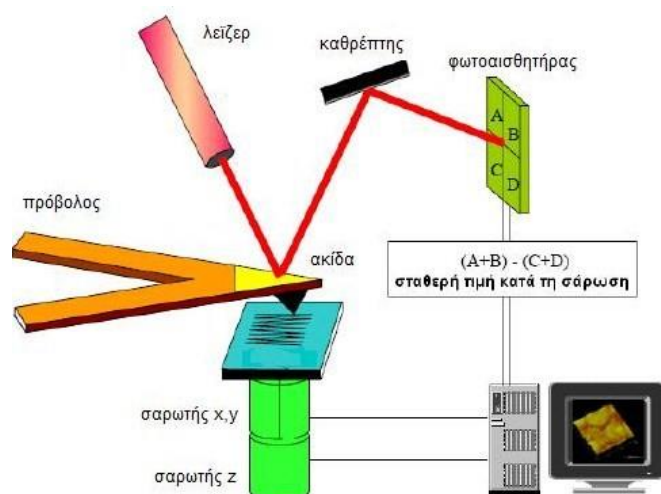
Για μια τυπική μέτρηση στο XPS, τα δείγματα διασπείρονται σε αιθανόλη και τοποθετούνται σε λουτρό υπερήχων για λίγα λεπτά. Σε ένα επιχρυσωμένο φυλλόμορφο (mica) υπόστρωμα, ρίχνουμε μια σταγόνα από το παραπάνω διάλυμα και αφήνουμε το δείγμα να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, τα δείγματα εισέρχονται σε θάλαμο υψηλού κενού, όπου αφήνονται για τουλάχιστον 12 h πριν την μέτρηση ώστε να απομακρυνθούν τυχόν διαλύτες. Σε κάθε δείγμα μετρώνται τέσσερα σημεία, ώστε να διασφαλιστεί η επαναληψιμότητα του αποτελέσματος. Για την απλούστευση της επεξεργασίας των φασμάτων που λαμβάνονται από το XPS οι εντάσεις των κορυφών κάθε στοιχείου, οι οποίες χρησιμοποιούνται για να ποσοτικοποιηθούν όλα τα στοιχεία στην επιφάνεια του κάθε δείγματος, κανονικοποιούνται με συντελεστές ευαισθησίας ξεχωριστό για το κάθε στοιχείο που καταγράφεται στο φασματομέτρο.

4.8.8 Μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM)

4.8.8.1 Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης αναπτύχθηκε από τον Δρ. Gerd Binnig, στην προσπάθειά του να μελετήσει την μορφολογία ενός υλικού εκμεταλλευόμενος δυνάμεις αλληλεπίδρασης, όπως ηλεκτροστατικές, μαγνητικές, van der Waals ή άλλες, είτε αυτό ήταν αγωγίμο, είτε όχι. Έτσι το 1981, οι G. Binnig και H. Rohrer, οι οποίοι τιμήθηκαν βραβείο Nobel φυσικής 1986, ανακάλυψαν στα εργαστήρια της IBM της Ζυρίχης, ένα νέο μικροσκόπιο, το Μικροσκόπιο Σάρωσης, που βασίζεται στο φαινόμενο σήραγγας, με ικανότητα μεγέθυνσης πάνω από 100 εκατομμύρια φορές.

Η αρχή λειτουργίας του μοιάζει με αυτή ενός φωνογράφου. Μια αιχμηρή ακίδα στερεωμένη στην άκρη ενός μικρού προβόλου, λεπτού και εύκαμπτου ώστε να προσομοιάζει με ελατήριο, σαρώνει το δείγμα, το οποίο βρίσκεται από κάτω της. Η σχετική κίνηση του δείγματος ως προς την ακίδα, στο επίπεδο xy αλλά και στον κατακόρυφο άξονα, ελέγχεται μέσω ενός πιεζοκρυστάλλου (Εικόνα 4.9). Συγκεκριμένα, το μικροσκόπιο ατομικής δύναμης μετρά την αλληλεπίδραση δυνάμεων που αναπτύσσονται μεταξύ μιας ακίδας και της επιφάνειας του εξεταζόμενου δείγματος, κάνοντας χρήση ειδικών ανιχνευτών, οι οποίοι αποτελούνται από ένα ελαστικό μοχλοβραχίονα και μία οξεία ακίδα στην άκρη του. Μέσω της δύναμης που εφαρμόζεται από την επιφάνεια στην ακίδα, πραγματοποιείται κάμψη του μοχλοβραχίονα. Από τον υπολογισμό της μετατόπισης που υπέστη ο μοχλοβραχίονας, είναι δυνατόν να υπολογιστεί η δύναμη αλληλεπίδρασης της ακίδας με την επιφάνεια του δείγματος.



Εικόνα 4.9: Σχηματική αναπαράσταση διάταξης AFM. Η δέσμη λέιζερ ανακλάται από την πίσω πλευρά του προβόλου της ακίδας πάνω στο φωτοαισθητήρα, ο οποίος τροφοδοτεί το κύκλωμα ανάδρασης με ένα σήμα τάσης. Από το σύστημα ελέγχου το διορθωτικό σήμα καταλήγει στο σαρωτή για τη ρύθμιση του ύψους του και τη διατήρηση σταθερής δύναμης, δηλαδή σταθερής απόστασης ακίδας-επιφάνειας, κατά τη σάρωση.

Οι ανιχνευτές του μικροσκοπίου ατομικής δύναμης, είναι κατασκευασμένοι με φωτολιθογραφία και εγχάραξη στρωμάτων πυριτίου (SiO_2 ή Si_3NA), που εναποτίθενται σε δίσκους πυριτίου. Στη βάση πυριτίου είναι μόνιμα στερεωμένη η μία άκρη του μοχλοβραχίονα και η ακίδα είναι τοποθετημένη στην ελεύθερη άκρη του. Χρησιμοποιούνται δύο τύποι ανιχνευτών:

1. Μοχλοβραχίονες ορθογώνιου σχήματος
2. Μοχλοβραχίονες τριγωνικού σχήματος

Επιπλέον, στο AFM χρησιμοποιείται οπτικό σύστημα, έτσι ώστε να λαμβάνεται η επιφανειακή τοπογραφία του δείγματος, μέσω της καταγραφής των μικρών μετατοπίσεων του ελαστικού μοχλοβραχίονα. Το σύστημα αυτό, είναι ευθυγραμμισμένο κατά τέτοιο τρόπο, ώστε η εκπεμπόμενη ακτίνα από το laser της διόδου να επικεντρώνεται στο μοχλοβραχίονα, του οποίου η πάνω επιφάνεια είναι ανακλαστική και η ανακλώμενη ακτίνα χτυπά το φωτοανιχνευτή στο κέντρο (Εικόνα 4.9). Με τον τρόπο αυτό μπορούν να μετρηθούν δύο ποσότητες:

- η κάμψη του μοχλοβραχίονα, λόγω των ελκτικών ή απωστικών δυνάμεων και
- η στρέψη του μοχλοβραχίονα, λόγω των πλευρικών συνιστωσών των δυνάμεων αλληλεπίδρασης ακίδας-επιφάνειας.

Η λήψη εικόνων μπορεί να γίνει με τρεις μεθόδους:

- I. **Ημιστατικής Επαφής (Contact Mode)**, όπου η αιχμή της ακίδας βρίσκεται τοποθετημένη σε λιγότερα από μερικά Angstrom (10^{-10} m) από την επιφάνεια του δείγματος. Οι δυνάμεις που αναπτύσσονται είναι απωστικές. Οι μοχλοβραχίονες που χρησιμοποιούνται είναι εύκαμπτοι, λόγω της συνεχούς επαφής τους με το δείγμα και παρέχουν υψηλή ευαισθησία, αποφεύγοντας υπερβολικές επιδράσεις της ακίδας στην επιφάνεια του δείγματος.
- II. **Ταλαντούμενης Επαφής (non-Contact Mode)**, ο μοχλοβραχίονας είναι δύσκαμπτος και πραγματοποιεί εξαναγκασμένη ταλάντωση, λόγω των ελκτικών δυνάμεων που αναπτύσσονται. Η ακίδα βρίσκεται κοντά στο δείγμα, αλλά δεν έρχεται σε επαφή. Οι δυνάμεις που αναπτύσσονται είναι της τάξεως των pN (10^{-12} N) και παρατηρούνται οι αλλαγές στο εύρος ή στην συχνότητα, με την οποία ταλαντώνεται ο μοχλοβραχίονας. Στη μέθοδο αυτή απαιτείται μεγάλη ακρίβεια και σταθερότητα του συστήματος.
- III. **Διακοπτόμενης Επαφής (Tapping Mode)**, ο μοχλοβραχίονας είναι δύσκαμπτος. Η εξαναγκασμένη ταλάντωση διεγείρεται κοντά ή ακριβώς στη συχνότητα συντονισμού του και έχει πλάτος 10-100 nm. Το μεγαλύτερο εύρος ταλάντωσης πραγματοποιείται στην περιοχή, όπου η δύναμη είναι απωστική και η ακίδα αγγίζει διακοπτόμενα το δείγμα. Η μέθοδος αυτή, είναι κατάλληλη για μαλακά δείγματα [24].

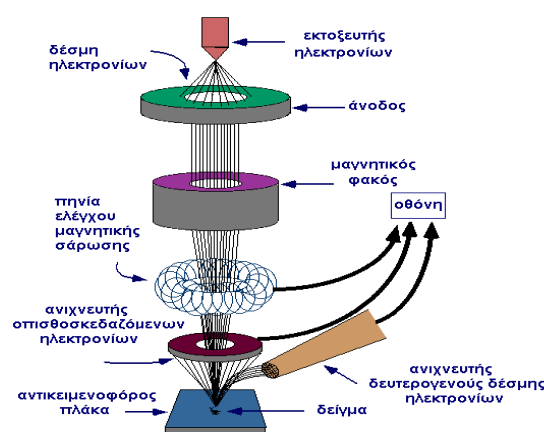
4.8.8.2 Πειραματική διαδικασία

Οι εικόνες AFM λήφθηκαν με την τεχνική της διακοπτόμενης επαφής (tapping mode) χρησιμοποιώντας ένα 3D Multimode Nanoscope και υποστρώματα (cantilevers) πυριτίου Tap-300G, με ακίδα ακτίνας <10 nm και σταθερή δύναμη $\sim 20\text{--}75$ Nm⁻¹. Τα προς μελέτη νανοϋλικά διασπείρονται σε διάλυμα αιθανόλης και μια σταγόνα από αυτό (drop casting) τοποθετούνται σε υπόστρωμα πυριτίου (silicon wafer P/Bor, στιλβωμένο από τη μία πλευρά).

4.8.9 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

4.8.9.1 Αρχή της μεθόδου

Με τη χρήση της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης λαμβάνονται πληροφορίες για τη μορφολογία και τοπογραφία της επιφάνειας των στερεών. Πρόκειται για μια τεχνική μικροσκοπίας με πολύ καλή διακριτική ικανότητα σε σύγκριση με την οπτική μικροσκοπία, γιατί χρησιμοποιεί δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας. Η μεγέθυνση του SEM κυμαίνεται από 100 έως 100000 φορές ανάλογα με το δείγμα. Επίσης, το μικροσκόπιο συνήθως είναι εφοδιασμένο με ένα σύστημα ποσοτικής ανάλυσης (EDX) μιας περιορισμένης περιοχής του δείγματος. Με αυτόν τον τρόπο, υπάρχει η δυνατότητα προσδιορισμού της ετερογένειας των δειγμάτων. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σε ευρύ πεδίο εφαρμογών, όπως είναι η βιοϊατρική έρευνα και η μελέτη υλικών.



Εικόνα 4.10: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου λειτουργίας του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.

Στην Εικόνα 4.10 παρουσιάζεται σχηματικά ο τρόπος λειτουργίας του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης. Η διάταξη βρίσκεται σε ένα θάλαμο κενού. Αρχικά, παράγεται δέσμη ηλεκτρονίων, από έναν εκτοξευτή ηλεκτρονίων. Στη συνέχεια, η

δέσμη, επιταχύνεται μέσω μιας ανόδου κι έπειτα συγκεντρώνεται και κατευθύνεται προς το δείγμα με τη βοήθεια φακών και μαγνητικών πεδίων. Τα δευτερογενή και οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια που προκύπτουν ανιχνεύονται με τη βοήθεια ανιχνευτών, μετατρέπονται σε σήματα και στέλνονται σε οθόνη όπου παράγεται η εικόνα.

Η βασική αρχή του SEM είναι ότι όταν μια δέσμη ηλεκτρονίων προσπίπτει σε ένα δείγμα, οι αλληλεπιδράσεις οδηγούν στο να εκπέμπονται και στη συνέχεια ν' ανιχνεύονται διάφοροι τύποι ηλεκτρονίων και φωτονίων από το δείγμα. Ο πρώτος τύπος ηλεκτρονίων είναι τα δευτερογενή ηλεκτρόνια. Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια δημιουργούνται, όταν ένα ηλεκτρόνιο της ακτίνας περνάει κοντά από ένα άτομο του δείγματός και το ιονίζει. Αυτό σημαίνει ότι ένα ηλεκτρόνιο από μια ενεργειακή στοιβάδα του δείγματος χρησιμοποιεί κάποια από την ενέργεια του ηλεκτρονίου της δέσμης για να απομακρυνθεί από τη θέση του. Η ενέργεια είναι συνήθως μικρή εξαιτίας του μικρού έργου εξαγωγής, δηλαδή της ποσότητας ενέργειας που ένα ηλεκτρόνιο χρειάζεται για να φύγει από την κατάσταση που βρίσκεται προς το κενό. Έτσι τα δευτερογενή ηλεκτρόνια, τα οποία έχουν αρκετά χαμηλή ενέργεια (~ 50 eV), παράγονται κοντά στην επιφάνεια, μέσα σε ένα πάχος περίπου 10nm, δίνοντας πληροφορίες για την επιφανειακή τοπογραφία του δείγματός. Οι φωτεινές περιοχές αντιστοιχούν σε προεξοχές, ενώ οι σκοτεινές σε εσοχές της επιφάνειας.

Ένας άλλος τύπος ηλεκτρονίων, είναι τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια. Δημιουργούνται από την πρόσπτωση ηλεκτρονίου της δέσμης σε κάποιο πυρήνα ατόμου στο δείγμα, που έτσι σκεδαζείται προς τα πίσω. Λόγω του ότι δεν υπάρχει μεταφορά ενέργειας, τα σκεδαζόμενα ηλεκτρόνια έχουν ίση ενέργεια με τα ηλεκτρόνια της δέσμης και έτσι μπορούν να αποδράσουν από το δείγμα σε μεγαλύτερη απόσταση. Τα άτομα με υψηλότερο ατομικό αριθμό έχουν μεγαλύτερους πυρήνες και μπορούν να οπισθοσκεδάσουν ηλεκτρόνια πιο αποτελεσματικά. Τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια παράγονται περισσότερο από άτομα με μεγαλύτερο πυρήνα, το οποίο μας επιτρέπει να λαμβάνουμε μια πιο συγκροτημένη εικόνα σε σχέση με την εικόνα που παίρνουμε από τα σκεδαζόμενα ηλεκτρόνια. Τέλος, όσο πιο φωτεινό είναι ένα σημείο του δείγματός, τόσο πιο βαριά άτομα υπάρχουν σε αυτό και άρα μπορούμε να συμπεράνουμε το είδος των ατόμων που υπάρχουν στη συγκεκριμένη περιοχή [25].

4.8.9.2 Πειραματική διαδικασία

Οι εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας ένα Jeol JSM 7401F Field Emission ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης εξοπλισμένο με λειτουργία ήπιας δέσμης (Gentle Beam mode). Η τεχνολογία Gentle Beam βελτιώνει την ανάλυση, σήμα-προς-θόρυβο, και τη φωτεινότητα της δέσμης, ειδικά σε τάσεις χαμηλής δέσμης (μέχρι 0.1 kV). Στην παρούσα εργασία η εφαρμοζόμενη τάση επιτάχυνσης ήταν 1 kV. Τα υπό μελέτη δείγματα τοποθετήθηκαν σε μεταλλικά (ορείχαλκο) υποστρώματα χρησιμοποιώντας μια διπλής όψεως αγωγίμη ταινία άνθρακα.

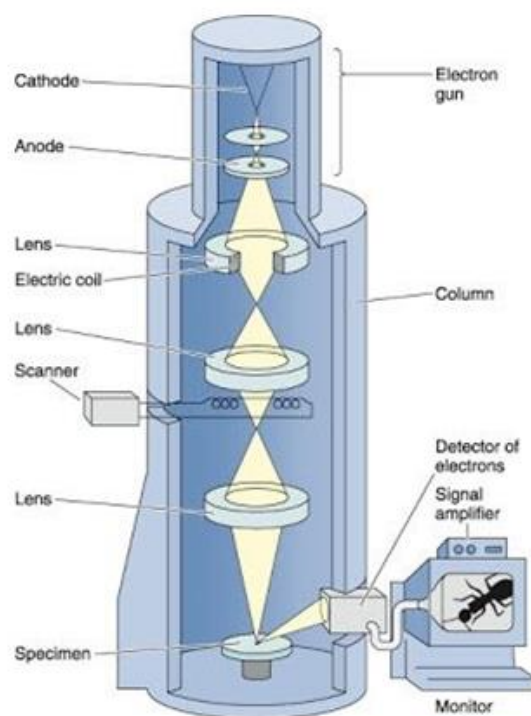
4.8.10 Ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM)

4.8.10.1 Αρχή της μεθόδου

Αντίθετα από την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, στην ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (Transmission Electron Microscopy – TEM) η δέσμη ηλεκτρονίων διέρχεται από το δείγμα και η προβολή της αντιστοιχεί στο είδωλό του. Τα ηλεκτρόνια της δέσμης συνήθως παράγονται με θερμιονική εκπομπή ενός νήματος (συνήθως βολφραμίου) και επιταχύνονται από μια διαφορά δυναμικού (10^5 Volt). Η δέσμη εστιάζεται πάνω στο δείγμα με την βοήθεια δύο συγκεντρωτικών φακών. Έπειτα τα ηλεκτρόνια εστιάζονται στον αντικειμενικό φακό όπου σχηματίζεται η εικόνα περίθλασης του δείγματος.

Στη συνέχεια ένα σύστημα ενδιάμεσων και προβολικών φακών μεγεθύνει ακόμα περισσότερο την εικόνα περίθλασης ώστε η τελική μεγέθυνση να είναι έως και 750000 φορές. Όπως συμβαίνει και στη περίθλαση ακτίνων-X αντίστοιχα και στην ηλεκτρονική μικροσκοπία θεωρείται ότι τα ηλεκτρόνια περιθλώνται από τα κρυσταλλογραφικά επίπεδα του κρυστάλλου έτσι ώστε να ισχύει ο νόμος του Bragg. Η σκέδαση είναι πιο ισχυρή όσο πιο μεγάλο το ατομικό βάρος των ατόμων το πάχος και η πυκνότητα του. Το βάθος του πεδίου αποτελεί σημαντικό παράγοντα επεξεργασίας της τελικής εικόνας. Η ιδιότητα αυτή διέπεται από τους φακούς του μικροσκοπίου. Στους φακούς του TEM χρησιμοποιούνται πολύ μικρά περιοριστικά ανοίγματα, μειώνοντας τη δέσμη σε ένα λεπτό "μολύβι" ηλεκτρονίων το οποίο έχει μέγεθος μερικών μικρομέτρων. Αυτά τα ανοίγματα μειώνουν την ένταση της δέσμης ηλεκτρονίων, αλλά επίσης αυξάνουν το βάθος της εστίασης των εικόνων που παράγονται. Το "βάθος πεδίου" αναφέρεται στο δείγμα, ενώ το "βάθος εστίασης" αναφέρεται στην εικόνα. Από τις εικόνες TEM μπορεί να ληφθούν πληροφορίες για

την κρυσταλλική δομή, την επανάληψη πλέγματος, την απόσταση καθώς και το σχήμα του δείγματος [26].



Εικόνα 4.11: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου λειτουργίας του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης.

Επιπλέον, είναι εφικτή και η δημιουργία ειδώλου από ηλεκτρόνια με συγκεκριμένες κινητικές ενέργειες (Energy-Filtered Transmission Electron Microscopy-EFTEM). Με την τεχνική αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί στοιχειακή ανάλυση του δείγματος. Συγκεκριμένα, ανάλογα με το στοιχείο πάνω στο οποίο σκεδάζονται, τα ηλεκτρόνια χάνουν διαφορετική ποσότητα ενέργειας. Αποκλείοντας ή επιτρέποντας, στα ηλεκτρόνια με συγκεκριμένο εύρος ενεργειών να συνεισφέρουν στην εικόνα, απεικονίζεται κάθε φορά διαφορετικό στοιχείο του εξεταζόμενου υλικού.

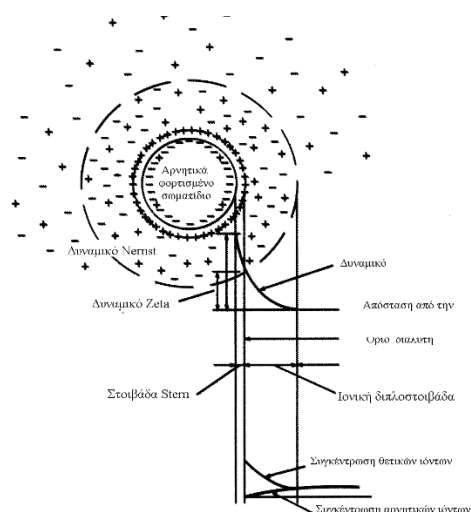
4.8.10.2 Πειραματική διαδικασία

Οι εικόνες TEM λήφθηκαν σε όργανο Philips C20 TEM, που λειτουργεί σε τάση επιτάχυνσης 200 kV. Για την προετοιμασία των υπό μελέτη δειγμάτων, μια σταγόνα υδατικού διαλύματος των υβριδικών υλικών (0.1 mg/mL) τοποθετήθηκε σε πλέγμα PELCO® Formvar και αφέθηκε να εξατμιστεί.

4.8.11 Προσδιορισμός ζ-δυναμικού

4.8.11.1 Αρχή της μεθόδου

Με τον προσδιορισμό του ζ-δυναμικού μπορούμε να έχουμε ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των φορτίων στην εξωτερική επιφάνεια σφαιρικών σωματιδίων καθώς και της ηλεκτροφορητικής κινητικότητάς τους (electrophoretic mobility) υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου [27]. Ένα φορτισμένο σωματίδιο σε υδατικό διάλυμα συγκεντρώνει γύρω του μόρια νερού και ιόντα με αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο αρκετά καλά καθορισμένων ιοντικών στοιβάδων (Εικόνα 4.12).



Εικόνα 4.12: Σχηματική αναπαράσταση της στοιβάδας Stern και της ιοντικής διπλοστοιβάδας.

Η πρώτη στοιβάδα, η οποία ονομάζεται στοιβάδα Stern, αποτελείται από ιόντα που έχουν αντίθετο φορτίο από τα σωματίδια και είναι δεσμευμένα με ισχυρές ηλεκτροστατικές δυνάμεις πολύ κοντά στην επιφάνεια του σωματιδίου. Η τοπική συγκέντρωση των ιόντων αυτών είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή του διαλύματος. Αντιθέτως, η τοπική συγκέντρωση των ιόντων που έχουν το ίδιο φορτίο με το σωματίδιο είναι σχεδόν μηδενική. Η δεύτερη στοιβάδα, η οποία ονομάζεται ιοντική διπλοστοιβάδα, εκτείνεται γύρω από τη στοιβάδα Stern και αποτελείται κυρίως από ιόντα τα οποία έχουν αντίθετο φορτίο από το σωματίδιο και από ιόντα τα οποία έχουν ίδιο φορτίο με το σωματίδιο. Τα ιόντα με αντίθετο φορτίο, έχουν συγκέντρωση αρκετά μικρότερη από αυτή της στοιβάδας Stern, η οποία μειώνεται σε συνάρτηση με την απόσταση από την επιφάνεια του σωματιδίου προς την τιμή που επικρατεί στο διάλυμα. Τα ιόντα που έχουν ίδιο φορτίο με το σωματίδιο, έχουν συγκέντρωση η

οποία αυξάνεται σε συνάρτηση με την απόσταση από την επιφάνεια του σωματιδίου προς την τιμή που επικρατεί στο διάλυμα.

Η κατανομή των ιόντων είναι αποτέλεσμα ηλεκτροστατικών δυνάμεων μεταξύ του σωματιδίου και των ιόντων, των ιόντων μεταξύ τους και του φαινομένου της διάχυσης των ιόντων, η ισχύς της οποίας αυξάνεται όσο αυξάνει η απόσταση από την επιφάνεια του σωματιδίου. Σε κάποια συγκεκριμένη απόσταση από το σωματίδιο οι τοπικές συγκεντρώσεις των ιόντων εξισώνονται με αυτές του διαλύματος και αυτή είναι το όριο της ιοντικής διπλοστοιβάδας. Αυτό έχει ως συνέπεια, τη δημιουργία ηλεκτρικού δυναμικού η τιμή του οποίου μεταβάλλεται σε συνάρτηση με την απόσταση από την επιφάνεια του σωματιδίου. Η κατανομή του δυναμικού εξαρτάται άμεσα από το φορτίο του σωματιδίου και το πάχος των στοιβάδων.

Η επίδραση ενός εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου θα αναγκάσει το σωματίδιο να κινηθεί με συγκεκριμένη ταχύτητα. Η ταχύτητα αυτή, συνδέεται άμεσα με την τιμή της διαφοράς του ηλεκτρικού δυναμικού που επικρατεί ανάμεσα στα δύο όρια της ιοντικής διπλοστοιβάδας (ζ – δυναμικό), αφού η στοιβάδα αυτή σε αντίθεση με τη στοιβάδα Stern, δεν είναι ακίνητη πάνω στο σωματίδιο. Από τον προσδιορισμό της ευκινησίας των σωματιδίων με την επίδραση εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου, μπορούμε να προσδιορίσουμε το ζ -δυναμικό από την παρακάτω εξίσωση Smolukofski:

$$\frac{U}{X} = \frac{\varepsilon\zeta}{4\pi n}$$

όπου, U: η ταχύτητα του φορτισμένου σωματιδίου υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου, X: η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (U/X: η ευκινησία του σωματιδίου), ε : διηλεκτρική σταθερά του μέσου και n: το ιξώδες του μέσου.

4.8.11.2 Πειραματική διαδικασία

Από τη μέτρηση του ζ -δυναμικού, μπορεί να προσδιοριστεί το φορτίο των νανοϋλικών. Οι μετρήσεις του ζ -δυναμικού πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του οργάνου ZetaPlus της εταιρίας Brookhaven Instruments Corporation, εφοδιασμένο με laser σταθερής δέσμης ισχύος 35 mW και το οποίο εκπέμπει στα 660 nm. Σε ένα τυπικό πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 1.6 mL υδατικό διάλυμα νανοϋλικών με συγκέντρωση 1 mg/mL. Για κάθε δείγμα, πραγματοποιούνται δέκα μετρήσεις του ζ -δυναμικού και εξάγεται ο μέσος όρος τους.

4.8.12 Δυναμική σκέδαση φωτός (DLS)

4.8.12.1 Αρχή της μεθόδου

Τα μόρια του πολυμερούς, σε ένα διάλυμα, εκτελούν μεταφορική αλλά και περιστροφική κίνηση και οι συντελεστές διάχυσής τους συνδέονται άμεσα με την κίνησή τους. Αυτό συμβαίνει όταν τα μόρια βρίσκονται σε διαρκή τυχαία κίνηση, η οποία προκαλείται από τη θερμική ενέργεια που μεταβιβάζεται σε αυτά μέσω συγκρούσεων. Χρησιμοποιώντας πειράματα σκέδασης φωτός, μπορούν να προσδιοριστούν οι συντελεστές διάχυσης των μορίων, αφού τα κινούμενα μόρια σκεδάζουν το φως με τρόπο που συνδέεται ποσοτικά με την κίνησή τους. Οι συντελεστές αυτοί συνδέονται άμεσα με χαρακτηριστικές ιδιότητες των μορίων, όπως το μοριακό βάρος, το σχήμα και το μέγεθός τους.

Όταν μια μονοχρωματική ακτινοβολία στο ορατό φάσμα προσπίπτει σε ένα διάλυμα, όπως για παράδειγμα ένα διάλυμα νανοσωματιδίων, το φως σκεδάζεται λόγω διακυμάνσεων συγκέντρωσης (Εικόνα 4.13). Οι διακυμάνσεις αυτές συνδέονται με την κίνηση Brown. Σε ένα διάλυμα, τα σκεδαζόμενα μακρομόρια κινούνται με παρόμοιες ταχύτητες αλλά σε τυχαίες κατευθύνσεις. Λόγω της ομοιότητας της κίνησής τους, το σκεδαζόμενο φως δηλαδή ο αριθμός των σκεδαζομένων φωτονίων, εμφανίζει συσχέτιση με το χρόνο. Μια συνάρτηση χρονικής συσχέτισης μεταξύ δύο σημάτων A και B δίνεται από τη σχέση:

$$g(t) = \lim_{T \rightarrow \infty} (1/T) \int_{t_0}^{t_0+T} A(t)B(t-\tau)dt$$

όπου, τ είναι ο χρόνος καθυστέρησης ή χρόνος δειγματοληψίας, t_0 ο αρχικός χρόνος και T ο χρόνος διεξαγωγής της μέτρησης. Εάν η B είναι μία αργοπορημένη μορφή της A τότε η παραπάνω εξίσωση αποτελεί συνάρτηση αυτοσυσχέτισης.

Σε μια απλή περίπτωση, συνόλου από σφαιρικά μη αλληλοεπιδρώντα μεταξύ τους ομοειδή σωματίδια τα οποία κινούνται μέσα σε ένα διάλυμα, η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης έχει την παρακάτω μορφή:

$$g(\tau) = A_0 + A \exp(-\Gamma t)$$

όπου, $\Gamma = D_i q^2$ είναι ο ρυθμός εξασθένησης (decay rate) της συνάρτησης, D_i ο συντελεστής διάχυσης και q το άνυσμα σκέδασης.

Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατό να προσδιοριστούν οι συντελεστές διάχυσης των σωματιδίων, D , στο μέσο. Ακολούθως, η ακτίνα των σκεδαζόντων σωματιδίων συνδέεται με τη σταθερά απόσβεσης μέσω της εξίσωσης Stokes – Einstein:

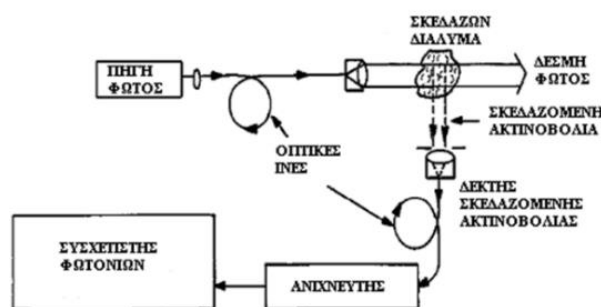
$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

και επομένως

$$R_h = \frac{kTq^2}{6\pi\eta\Gamma}$$

όπου k είναι η σταθερά Boltzmann, T είναι η απόλυτη θερμοκρασία σε οΚ, η το ιξώδες του διαλύματος και R_h η υδροδυναμική ακτίνα των σωματιδίων.

Στην πράξη ο υπολογισμός των υδροδυναμικών ακτινών (R_h) των νανοσωματιδίων απαιτεί την επίλυση της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης, η οποία επιτυγχάνεται με κατάλληλες μαθηματικές μεθόδους ανάλυσης. Στις μεθόδους ανάλυσης χρησιμοποιείται συνήθως είτε η μέθοδος των αθροισμάτων (Cumulants method) είτε η τεχνική κανονικοποίησης αλγορίθμων CONTIN (CONTIN algorithm). Η μέθοδος των αθροισμάτων είναι κατάλληλη για δείγματα με σχετικά στενές κατανομές μεγεθών και μικρούς χρόνους υστέρησης τ . Αντιθέτως η μέθοδος CONTIN είναι κατάλληλη και για συστήματα με μεγάλη πολυδιασπορά, ενώ επιπλέον μας δίνει και την κατανομή μεγέθους σωματιδίων.



Εικόνα 4.13: Πειραματική διάταξη δυναμικής σκέδασης φωτός.

4.8.12.2 Πειραματική διαδικασία

Η κατανομή μεγεθών των νανοϋλικών προσδιορίζεται από μετρήσεις Δυναμικής Σκέδασης Φωτός. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με συσκευή Axios-EX 150 (Triton Hellas) και πηγή laser He-Ne ισχύος 30 mW, με εκπομπή στα 658 nm. Χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής φωτοδιόδων (Avalanche) σε γωνία 90° ως προς την

προσπίπτουσα ακτινοβολία. Σε ένα τυπικό πείραμα μέτρησης της διαμέτρου των νανοσωματιδίων, χρησιμοποιούνται 0.2 mL υδατικό διάλυμα νανοϋλικού συγκέντρωσης 1 mg/mL. Τέλος, για κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκαν 10 μετρήσεις, από τις οποίες επεξεργάζονται χρησιμοποιώντας το μαθηματικό αλγόριθμο CONTIN και λαμβάνεται ο μέσος όρος τους.

4.9 Δέσμευση δοξορουβικίνης στα υβριδικά υλικά

4.9.1 Δέσμευση δοξορουβικίνης και προσδιορισμός συγκέντρωσης της στα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K

Η ακινητοποίηση της DOX πραγματοποιήθηκε διασπείροντας 5 mg από τα oxCNTs@GPEIs σε 5 mL υδατικού διαλύματος DOX (1 mg/mL ή 2 mg/mL, pH = 8.5), χρησιμοποιώντας υπερήχους για 30 min και ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Προκειμένου να απομακρυνθεί μη δεσμευμένη DOX, τα διαλύματα φυγοκεντρήθηκαν στα 25.000 g για 45 min και τα ιζήματα ξεπλύθηκαν επανειλημμένα, ενώ τα υπερκείμενα χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της δεσμευμένης DOX. Τα τελικά νανοϋβριδικά υλικά στα οποία είναι δεσμευμένη η DOX ελήφθησαν έπειτα από λυοφιλοποίηση και φυλάσσονται στους 4 °C μέχρι τη χρήση τους.

Η ποσότητα της DOX δεσμεύτηκε στα oxCNTs@GPEIs με μια μέθοδο ανάλογη με αυτή που αναφέρεται στην βιβλιογραφία [6]. Εν συντομία, η συγκέντρωση της DOX στα υπερκείμενα, δηλαδή η συγκέντρωση της μη δεσμευμένης DOX προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο Cary 100 Conc UV-ορατό (Varian Inc.) στα 480 nm βαθμονομημένο σε τυπικά διαλύματα DOX (2–30 µg/mL). Έτσι, η δεσμευμένη DOX στα oxCNTs@GPEIs υπολογίστηκε από τη διαφορά της αρχικής συγκέντρωσης της DOX και της συγκέντρωσης της DOX που δεν έχει δεσμευτεί. Το ποσοστό φόρτωσης (loading) και η απόδοση δέσμευσης της DOX στα oxCNTs@GPEIs υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας της εξισώσεις (1) και (2), αντίστοιχα:

$$\% \text{ φορτίο DOX (DOX loading)} = \frac{\text{Βάρος δεσμευμένης DOX (mg)}}{\text{Βάρος oxCNTs@GPEIs (mg)} + \text{Βάρος δεσμευμένης DOX (mg)}} * 100 \quad (4.1)$$

$$\% \text{ απόδοση δέσμευσης DOX} = \frac{\text{Βάρος δεσμευμένης DOX (mg)}}{\text{Βάρος αρχικής DOX (mg)}} * 100 \quad (4.2)$$

Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε με ανεξάρτητα πειράματα χρησιμοποιώντας γνωστές συγκεντρώσεις DOX (20-100 μM) και με βάση την καμπύλη αυτή υπολογίστηκε η συγκέντρωση της δεσμευμένης DOX στα δείγματα.

4.9.2 Δέσμευση δοξορουβικίνης και προσδιορισμός συγκέντρωσης της στα oxCNDs@FCDs

Για τη δέσμευση του φαρμάκου, 10 mg oxCNDs@FCDs διασπείρονται σε 10 mL H_2O . Επιπλέον, αφού το pH του διαλύματος γίνει βασικό (pH=9), προστίθενται 10 mg DOX, το διάλυμα εκτίθεται σε υπέρηχους για 30 min και αφήνεται υπό ανάδευση για 24 h. Το τελικό προϊόν, oxCNDs@FCDs/DOX, συλλέγεται μετά από φυγοκέντρηση, εκπλύσεις με νερό και ψυχοεξάχνωση.

Για να εκτιμηθεί η ικανότητα δέσμευσης της DOX, στο oxCNDs@FCDs, συλλέγεται το υπερκείμενο μετά την πρώτη έκπλυση του oxCNDs@FCDs/DOX και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της δεσμευμένης DOX. Έτσι, 30 μL , από το υπερκείμενο διάλυμα, προστίθενται σε 1000 μL H_2O και η συγκέντρωση της DOX προσδιορίζεται με φασματοσκοπία UV-vis στα 480 nm με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης στο ίδιο μήκος κύματος. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε με ανεξάρτητα πειράματα χρησιμοποιώντας γνωστές συγκεντρώσεις DOX (10-50 μM) και με βάση την καμπύλη αυτή υπολογίστηκαν το ποσοστό φόρτωσης (loading) και η απόδοση δέσμευσης της DOX στα oxCNDs@FCDs με τις εξισώσεις (4.1) και (4.2).

4.10 *In vitro* μελέτη της pH-αποκρινόμενης αποδέσμευσης DOX από τα oxCNTs@GPEIs

Η αποδέσμευση της DOX από τα υβριδικά υλικά (oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K) μελετήθηκε σε δύο διαφορετικές συνθήκες pH, 7.4 και 5.5. Συγκεκριμένα, για τα πειράματα αυτά, 5 mg από τα oxCNTs@GPEIs με δεσμευμένη DOX διασπείρονται σε 10 mL PBS (pH = 7.4) ή σε όξινο ρυθμιστικό διάλυμα (pH = 5.5) χρησιμοποιώντας υπέρηχους για 15 min. Έπειτα, επωάζονται στους 37 °C υπό ήπια ανάδευση χρησιμοποιώντας τροχιακό αναδευτήρα Stuart SI500, με ταχύτητα ανάδευσης ~200 rpm. Μετά από συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (ανά 1 ώρα), τα διαλύματα φυγοκεντρώνονται στα 15.000 g, παραλαμβάνεται 1 mL από το υπερκείμενο και μετράται η συγκέντρωση της αποδεσμευμένης DOX χρησιμοποιώντας UV-vis. Για να διατηρηθεί ο τελικός όγκος των διαλυμάτων

σταθερός, προστίθεται 1 mL φρέσκου ρυθμιστικού διαλύματος μετά από κάθε δειγματοληψία και το ίζημα επαναδιασπείρεται χρησιμοποιώντας υπερήχους για 5 min. Το κλάσμα της αποδεσμευμένης DOX έναντι του χρόνου υπολογίζεται με βάση την παρακάτω εξίσωση:

$$\% \text{ αποδέσμευση} = \text{DOX}_t / \text{DOX}_{\text{αρχική}} \times 100 \quad (4.3)$$

όπου, DOX_t είναι η ποσότητα της DOX που απελευθερώνεται σε χρόνο t και $\text{DOX}_{\text{αρχική}}$ είναι η αρχική ποσότητα της DOX που δεσμεύτηκε στα oxCNTs@GPEIs .

4.11 Βιολογική μελέτη των υβριδικών υλικών σε καρκινικές και μη καρκινικές κυτταρικές σειρές

Τα υβριδικά υλικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τις βιολογικές μελέτες ήταν τα oxCNTs@GPEI5K , oxCNTs@GPEI25K και oxCNDs@FCDs . Για τη βιολογική μελέτη των νανοϋλικών αυτών, χρησιμοποιήθηκαν οι καρκινικές κυτταρικές σειρές DU145 και PC3, οι οποίες, όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, εμφανίζουν ανθεκτικότητα κατά τη θεραπεία με DOX, καθώς και με άλλα αντίστοιχα αντικαρκινικά φάρμακα [28-30]. Παράλληλα, για τη βιολογική μελέτη της συμπεριφοράς των υβριδικών υλικών, σε μη καρκινικά κύτταρα, χρησιμοποιήθηκαν τα HEK293 στα παραπάνω υλικά. Τέλος, έγινε βιολογική μελέτη, των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν στην βακτηριακή μελέτη, στα μη καρκινικά κύτταρα HEK293 και COS-7.

Συγκεκριμένα, η καρκινική κυτταρική σειρά DU145 απομονώθηκε από καρκίνο του προστάτη και προέρχεται από μετάσταση όγκου του κεντρικού νευρικού συστήματος. Τα κύτταρα αυτά είναι ευαίσθητα ή και εξαρτώμενα από κάποιες ορμόνες. Επιπλέον, παράγουν τους αυξητικούς παράγοντες EGF, TGF- α αλλά και τον υποδοχέα EGFR σε μεγάλες συγκεντρώσεις, που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ακόμη, παράγουν ενδογενώς, αλλά και διεγείρονται εξωγενώς από τους αυξητικούς παράγοντες bFGF, IGF-1 TGF- β , ενώ εκφράζουν και τους αντίστοιχους υποδοχείς. Τέλος, ένα γνωστό χαρακτηριστικό των κυττάρων αυτών είναι η έκφραση υποδοχέων τρανσφερίνης η οποία, επάγει την ανάπτυξή τους και ενισχύει την ικανότητα μετάστασης [31].

Όσο αφορά την κυτταρική σειρά PC3, προέρχεται από προστατικό αδενοκαρκίνωμα με μετάσταση σε οστά. Τα συγκεκριμένα κύτταρα, διαφοροποιούνται ελαφρώς από

τα υπόλοιπα κύτταρα καθώς δεν εκφράζουν το γονίδιο p53. Επιπλέον, έχουν πάντα ενεργοποιημένο το μονοπάτι της κινάσης 3-φωσφορικής ινοσιτόλης, το οποίο σχετίζεται με την κυτταρική επιβίωση, το μεταβολισμό και την κυτταρική ανάπτυξη. Η διαφορά των PC3 από τα υπόλοιπα φυσιολογικά επιθηλιακά προστατικά κύτταρα, είναι πως η ανάπτυξή τους δεν εξαρτάται από τον ορό. Επίσης, είναι πλήρως ανεξάρτητα από την επίδραση των ανδρογόνων, γλυκοκορτικοειδών, επιδερμικών αυξητικών παραγόντων και αυξητικών παραγόντων των ινοβλαστών. Εμφανίζουν μικρό βαθμό διαφοροποίησης και φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο K-ras, το οποίο είναι σημαντικό για τη σωστή μετάδοση του σήματος στους φυσιολογικούς ιστούς. Τέλος, τα PC3 αποτελούν ένα χρήσιμο μοντέλο για τη μελέτη των βιοχημικών αλλαγών σε κύτταρα με προχωρημένο καρκίνο του προστάτη αλλά και στην αξιολόγηση της απόκρισής τους σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες [32].

Τα HEK293 (Human Embryonic Kidney) αποτελούν αθανатоποιημένα επιθηλιακά εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα και προήλθαν από υγιές ανθρώπινο θηλυκό έμβρυο. Τα απομονωμένα νεφρικά κύτταρα διαμολύνθηκαν με αδενοϊό και αθανатоποιήθηκαν στο εργαστήριο του Alex J. van der Eb, το 1977, δημιουργώντας τα HEK293 [33]. Τα κύτταρα αυτά χρησιμοποιούνται ευρέως στην έρευνα της κυτταρικής βιολογίας, διότι είναι απλά στην ανάπτυξη και την καλλιέργεια, ενώ χρησιμοποιούνται ευρέως σε πειράματα διαμόλυνσης DNA (transfection). Επίσης, τα HEK293 χρησιμοποιούνται και στην βιοτεχνολογία για την παραγωγή πρωτεϊνών και ιών για γονιδιακές θεραπείες. Τέλος, τα HEK293 έχουν περίπλοκο καρυότυπο εμφανίζοντας δύο ή περισσότερα αντίγραφα κάθε χρωμοσώματος, με συνολικό αριθμό χρωμοσωμάτων τα 64.

Τα COS-7 καθιερώθηκαν από τον καθηγητή Yakov Gluzman, το 1981 και προέρχονται από τα νεφρικά κύτταρα ινοβλαστών CV-1 της αφρικάνικης πράσινης μαϊμού, τα οποία τροποποιήθηκαν με μετασχηματισμό με ένα μεταλλαγμένο στέλεχος του ιού Simian (SV40), που κωδικοποιεί το άγριου τύπου T-αντιγόνο [34]. Τα κύτταρα αυτά μοιάζουν κυρίως με ανθρώπινους ινοβλάστες και συχνά λέγονται ινοβλάστες πιθήκων COS-7 ή κύτταρα που μοιάζουν με ινοβλάστες COS-7.

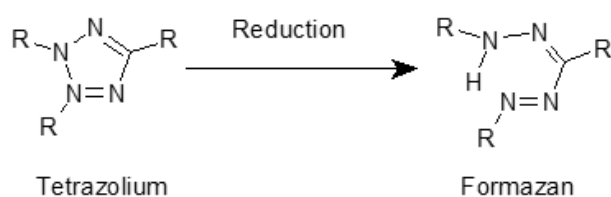
Τέλος, η κυτταρική σειρά 3T3 πρόκειται για κύτταρα εμβρυικών ινοβλαστών ποντικού, τα οποία ξεκίνησαν από μια κυτταρική γραμμή που απομονώθηκε το 1962 στο Τμήμα Παθολογίας του Πανεπιστημίου της Νέας Υόρκης. Η κυτταρική σειρά 3T3 αναφέρεται στο πρωτόκολλο μεταφοράς και εμβολιασμού κυττάρων της γραμμής και σημαίνει «μεταφορά σε 3 μέρες, εμβολιασμός 3×10^5 κυττάρων».

Χρησιμοποιώντας αυτό το πρωτόκολλο, η αθανатоποιημένη κυτταρική σειρά αρχίζει να αναπτύσσεται και να σταθεροποιείται στην καλλιέργεια μετά από περίπου 20-30 γενεές ανάπτυξης *in vitro*. Οι επιστήμονες που καλλιέργησαν αρχικά αυτή τη σειρά ήταν οι George Todaro και Howard Green και έλαβαν τα κύτταρα από ινοβλάστες εμβρυϊκού ελβετικού αλφικού ποντικού. Έκτοτε, η κυτταρική αυτή σειρά χρησιμοποιείται ως μια τυποποιημένη κυτταρική σειρά ινοβλαστών [35].

4.11.1 Μελέτη κυτταροτοξικότητας των υβριδικών υλικών

4.11.1.1 Αρχή της μεθόδου

Η *in vitro* μελέτη της κυτταροτοξικότητας, πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο MTT. Η μέθοδος αυτή είναι μια χρωματομετρική τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας των ουσιών σε κυτταρικές σειρές. Ουσιαστικά, μπορεί να προσδιοριστεί η ικανότητα των ζωντανών κυττάρων να μετατρέπουν το διαλυτό άλας του τετραζολίου (thiazolyl blue tetrazolium bromide-MTT) σε αδιάλυτο ίζημα φορμαζάνης. Τα άλατα του τετραζολίου λαμβάνουν ηλεκτρόνια από τα οξειδωμένα υποστρώματα ή από τα ένζυμα NADPH και NADH (Εικόνα 4.14). Ύστερα από τέσσερις ώρες επώασης στα κύτταρα το MTT σχηματίζει μωβ κρυστάλλους φορμαζάνης, οι οποίοι διαλύονται σε έναν οργανικό διαλύτη και των οποίων η απορρόφηση μετράται σε φασματοφωτόμετρο στα 540 nm. Οι τιμές της συγκέντρωσης της υπό μελέτης ένωσης που απαιτείται για τη μείωση κατά 50% της επιβίωσης των κυττάρων του μάρτυρα (control), IC₅₀, υπολογίζονται από τις καμπύλες συγκέντρωσης και χρησιμοποιούνται ως ένδειξη της ευαισθησίας των κυττάρων σε μια δεδομένη θεραπεία [36]. Η διαδικασία του MTT εμφανίζει κάποια σημαντικά πλεονεκτήματα, σε σύγκριση με άλλες παρόμοιες μεθόδους, τα οποία την καθιστούν ως μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αλλά και αξιόπιστη μέθοδο. Έτσι, η μέθοδος αυτή είναι οικονομική σε σχέση με τις άλλες τεχνικές και κάνοντας χρήση κατάλληλου φασματοφωτόμετρου, είναι εφικτή η μέτρηση μεγάλου αριθμού δειγμάτων ταυτόχρονα [37].



Εικόνα 4.14: Αναγωγή του MTT σε φορμαζάνη.

4.11.1.2 Πειραματική διαδικασία

Η ανάπτυξη των κυτταρικών σειρών έγινε σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης D-MEM (pH=7.4) που περιείχε 10% FBS, 100 U/mL πενικιλίνης, 100 μg/mL στρεπτομυκίνης και 2 mM L-γλουταμίνης, ενώ η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε φλάσκες στους 37 °C σε υγροποιημένη ατμόσφαιρα με 5% CO₂. Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν για ανακαλλιέργεια με διάλυμα που περιείχε 0.05% κ.ο. θρυψίνη και 0.02% κ.ο. EDTA. Τέλος, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε στείρο περιβάλλον μέσα σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής.

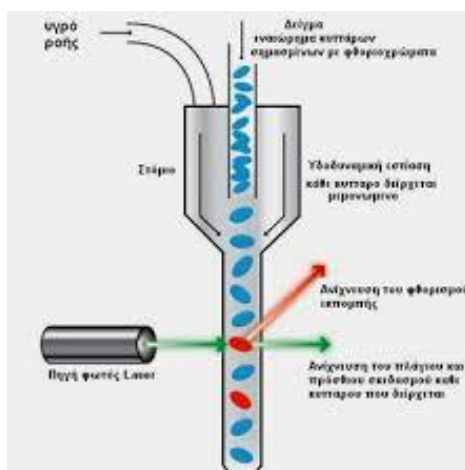
Αναλυτικά, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πλάκες 96 φρεατίων καλλιέργειας (96 well plate) σε αριθμό $1 \cdot 10^4$ κύτταρα ανά φρεάτιο, σε 100 μL μέσου καλλιέργειας και επώαστηκαν για 3 h με τα νανοϋλικά (oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K) σε διάφορες συγκεντρώσεις. Στη συνέχεια, το διάλυμα των νανοϋλικών αντικαταστάθηκε με πλήρες θρεπτικό μέσο και αφέθηκε υπό επώαση για 24 h ή 48 h στους 37 °C. Στην περίπτωση του oxCNTs@FCDs, τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 h, 48 h και 72 h, παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο υλικό απομακρύνθηκε και αντικαταστάθηκε με 100 μL διαλύματος MTT, με συγκέντρωση 1 mg/mL θρεπτικού μέσου (D-MEM). Ύστερα από 4 h επώασης οι κρύσταλλοι φορμαζάνης που δημιουργήθηκαν, διαλύθηκαν σε 100 μL ισοπροπανόλης. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 540 nm (μήκος κύματος αναφοράς) χρησιμοποιώντας το Φασματοφωτόμετρο Infinite 200 PRO Microplate Reader (Tecan). Η τοξικότητα των νανοϋλικών υπολογίστηκε ως το ποσοστό επιβίωσης κυττάρων σε σύγκριση με τα κύτταρα που επώαστηκαν μόνο με πλήρες θρεπτικό μέσο (control). Η μέθοδος του MTT χρησιμοποιείται και στα υβριδικά υλικά που μελετήθηκαν στην αντιβακτηριακή μελέτη. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση των νανοϋλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, τα κύτταρα COS-7 επώαστηκαν για 24 h σε διάφορες συγκεντρώσεις κοντά στις τιμές IC₅₀, οι οποίες υπολογίστηκαν από την μελέτη της βακτηριοκτόνου δράσης τους. Όσο αφορά τα υλικά oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, χρησιμοποιούνται τα κύτταρα HEK293 πάλι για επώαση 24 ωρών, ενώ στα υλικά oxCNTs@30-QPEI, oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα DU145 και 3T3 πάλι για επώαση 24 ωρών σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η υπόλοιπη διαδικασία που ακολουθείτε είναι ίδια, όπως περιγράφεται παραπάνω.

4.11.2 Κυτταρομετρία ροής

4.11.2.1 Αρχή της μεθόδου

Με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής επιτυγχάνεται η παρατήρηση, η ποσοτικοποίηση και ο διαχωρισμός μικροσκοπικών σωματιδίων. Ταυτόχρονα, επιτρέπει την πολυπαραμετρική ανάλυση φυσικών και χημικών ιδιοτήτων των μοναδιαίων κυττάρων, τα οποία ρέουν μέσα σε μία συσκευή ανίχνευσης οπτικών και ηλεκτρονικών σημάτων [38, 39].

Η βασική αρχή λειτουργίας της κυτταρομετρίας ροής βασίζεται στην κατευθυνόμενη ακτινοβολία, από μία ακτίνα φωτός και συγκεκριμένα από ένα μονοχρωματικό λέιζερ, μίας υδροδυναμικά εστιασμένης ροής υγρού, στην οποία εμπεριέχονται τα προς μελέτη σωματίδια, (Εικόνα 4.15). Ακτινοβολώντας τα σωματίδια που διέρχονται από μια σειρά ανιχνευτών/φωτοπολλαπλασιαστών, οι οποίοι είναι τοποθετημένοι στο σημείο όπου η ακτίνα φωτός περνάει διαμέσου της ροής, δημιουργούνται σήματα στα οποία βασίζεται η ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής. Ο ένας ανιχνευτής βρίσκεται στην ίδια ευθεία με το λέιζερ και ανιχνεύει την πρόσθια σκέδαση, ενώ οι άλλοι ανιχνευτές βρίσκονται κάθετα στην ακτίνα και ανιχνεύουν την πλάγια σκέδαση. Κάθε αιωρούμενο σωματίδιο διαμέτρου 0.2 - 150 μm, το οποίο το διαπερνάει η ακτίνα λέιζερ, σκεδάζει την ακτινοβολία. Έτσι, οι φθορίζουσες χρωστικές, οι οποίες είτε υπάρχουν ενδογενώς στο σωματίδιο είτε είναι προσκολλημένες σε αυτό, διεγείρονται και εκπέμπουν ακτινοβολία σε μήκη κύματος μεγαλύτερα από το μήκος κύματος του λέιζερ. Τέλος, Ο συνδυασμός του σκεδαζόμενου φωτός και του φθορισμού συλλέγεται από φωτοανιχνευτές. Με τον τρόπο αυτό, καθίσταται δυνατή η ανάλυση των διακυμάνσεων της έντασης της ακτινοβολίας σε κάθε ανιχνευτή και κατά συνέπεια συλλέγονται πληροφορίες για τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του κάθε σωματιδίου. Οι διακυμάνσεις της έντασης μετατρέπονται σε ηλεκτρικά σήματα και διαβάζονται από το κατάλληλο λογισμικό ενός υπολογιστή, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με τον κυτταρομετρητή [38, 39].



Εικόνα 4.15: Αρχή λειτουργίας του κυτταρομετρητή. Τα σωματίδια περνούν διαμέσου της ακτίνας λέιζερ και η σκεδαζόμενη, καθώς και η φθορίζουσα ακτινοβολία συλλέγεται από τους ανιχνευτές και μετατρέπεται σε ηλεκτρικά σήματα.

4.11.2.2 Πειραματική διαδικασία

Η μέθοδος της κυτταρομετρίας ροής πραγματοποιείται προκειμένου να μελετηθεί η πρόσληψη της ελεύθερης και της δεσμευμένης DOX στα νανοϋλικά (oxCNTs@GPEI5K, oxCNTs@GPEI25K και oxCNDs@FCDs) από τα κύτταρα.

Αρχικά, σε κυτταρικές πλάκες 6 φρεατίων, στρώθηκαν $1 \cdot 10^6$ κύτταρα (DU145 ή HEK293) και επώαστηκαν για 24 h στους 37 °C σε ατμόσφαιρα 5% διοξειδίου του άνθρακα (CO₂). Έπειτα από τις 24 h, αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με PBS και επώαστηκαν με δεσμευμένη και ελεύθερη DOX στις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Η συγκέντρωση των oxCNTs@GPEI5K/DOX και oxCNTs@GPEI25K/DOX ήταν 1 μM ως προς την DOX και η κυτταρική επώαση έλαβε χώρα για 1, 2, 3 και 5 h στους 37 °C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Αντίστοιχα, η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε για το oxCNDs@FCDs/DOX ήταν 1 μM ως προς την DOX και η κυτταρική επώαση έλαβε χώρα για 5 h και 24 h στους 37 °C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο απορρίφθηκε, τα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά από επώαση με θρυψίνη και τελικά μεταφέρθηκαν σε 1 mL θρεπτικού μέσου. Ακολούθησε φυγοκέντρωση των κύτταρα στα 1000 rpm για 5 min, απόρριψη του υπερκείμενου και πλύση με PBS, τουλάχιστον δύο φορές. Τέλος, το κυτταρικό ίζημα επανεωρήθηκε σε 0.5 mL PBS, ούτως ώστε να μετρηθούν. Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το κυτταρόμετρο Becton Dickinson FACSCalibur Flow Cytometer Fluorescence Activated Cell Sorter [40, 41].

Στο ίδιο κυτταρόμετρο πραγματοποιείται και η μελέτη της νέκρωσης-απόπτωσης των κυττάρων για τα υβριδικά υλικά. Γενικά, ο συνδυασμός σήμανσης με ανεξίνη-V και 7-AAD επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ κυττάρων σε πρώιμα στάδια απόπτωσης (early apoptotic cells) (ανεξίνη-V -θετικά), κυττάρων σε τελικά στάδια απόπτωσης (late apoptotic cells) (ανεξίνη-V και 7-AAD - θετικά), νεκρωτικών κυττάρων (necrotic cells) (7-AAD -θετικά) και ζωντανών κυττάρων (ανεξίνη-V και 7-AAD - αρνητικά) [42]. Συγκεκριμένα, κύτταρα DU145 επιστρώθηκαν σε πλάκες καλλιέργειας 6 φρεατίων, όπως προαναφέρθηκε. Τα κύτταρα επώασθησαν με τα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K με και χωρίς DOX σε συγκέντρωση 1 μM ως προς την DOX και 1.96 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ως προς τα υβριδικά υλικά, για 3 h επώαση, ενώ για το oxCNTs@FCDS χρησιμοποιείται συγκέντρωση 1 μM ως προς την DOX και 13.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ως προς το νανοφορέα, για 5 h και 24 h επώαση. Έπειτα, αφού επωαστούν τα κύτταρα, όπως αναφέρεται παραπάνω, συλλέχθηκαν σε σωληνάρια των 15 mL και φυγοκεντρήθηκαν στα 1000 rpm για 5 min, ενώ ακολούθησε έκπλυση δύο φορές με 1 mL PBS. Στη συνέχεια κύτταρα επανεωρήθηκαν μέσα με 100 μL ρυθμιστικού διαλύματος σε σωληνάρια των 5 mL. Για τη χρώση των κυττάρων, στο εναιώρημα των κυττάρων προστέθηκαν 5 μL διαλύματος Ανεξίνης V-FITC και 5 μL διαλύματος 7-AAD. Ύστερα, τα κύτταρα αφέθηκαν υπό ήπια ανάδευση για 15 min σε σκοτεινό περιβάλλον σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Τέλος, σε κάθε σωληνάριο προστέθηκαν ακόμα 400 μL ρυθμιστικό διάλυμα και τα κύτταρα αναλύθηκαν στο κυτταρόμετρο.

4.11.3 Συνεστιακή μικροσκοπία

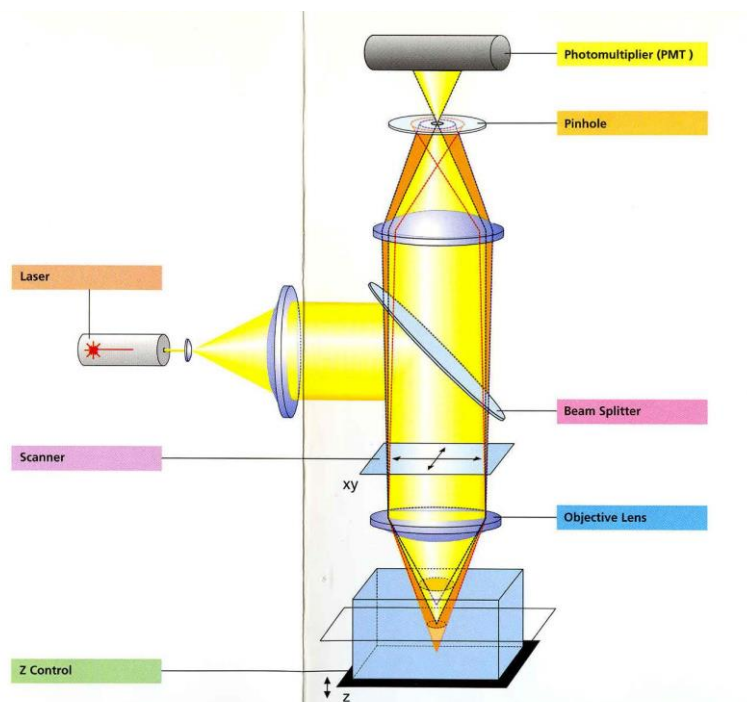
4.11.3.1 Αρχή της μεθόδου

Σε ένα συμβατικό μικροσκόπιο, ένα μεγάλο μέρος του δείγματος αλλά και το επίπεδο στο οποίο οι αντικειμενικοί φακοί εστιάζουν, φωτίζονται ομοιόμορφα. Αυτό οδηγεί σε παρεμβολές από περιοχές πέραν της περιοχής εστίασης. Το φως από τη μη εστιασμένη περιοχή μειώνει την αντίθεση και την ευκρίνεια, καθιστώντας αδύνατη τη διάκριση και τον καθορισμό κυτταρικών και υποκυττάρων δομών. Αντιθέτως, ο φωτισμός στο συνεστιακό μικροσκόπιο είναι διαδοχικός και όχι συνεχής. Ο φωτισμός εστιάζεται σημειακά σε ένα στοιχειώδη όγκο του δείγματος σε μία χρονική στιγμή.

Η βασική αρχή στην οποία βασίζονται τα συστήματα συνεστιακής μικροσκοπίας αναφέρει ότι, τα συστήματα φωτισμού και ανίχνευσης εστιάζουν στον ίδιο στοιχειώδη όγκο δείγματος. Μπορούν να ανιχνευθούν μόνο τα σήματα από το

στοιχειώδη όγκο που φωτίζεται, ενώ τα σήματα έξω από το επίπεδο εστίασης αφαιρούνται με χρήση ειδικών συστημάτων και φίλτρων. Επομένως, ο φωτισμός, το δείγμα και ο ανιχνευτής συνεστιάζουν, δηλαδή εστιάζουν στο ίδιο σημείο. Η ιδιότητα αυτή προσδίδει το όνομα συνεστιακή μικροσκοπία (confocal microscopy).

Τα βασικά εξαρτήματα ενός συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης, με ακτίνες λέιζερ (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM), απεικονίζονται διαγραμματικά στην Εικόνα 4.16.



Εικόνα 4.16: Βασικά εξαρτήματα ενός συνεστιακού μικροσκοπίου.

Αναλυτικά ένα CLSM αποτελείται από:

- 1) **Laser**: αποτελεί την πηγή φωτός, η οποία προβάλλεται πάνω στο δείγμα και το διεγείρει. Η δυνατότητα αυξομείωσης της ισχύος του λέιζερ είτε προστατεύει το δείγμα από φωτολεύκανση (Photobleaching) είτε παρέχει τη δυνατότητα αύξησης του σήματος.
- 2) **Σαρωτής (Scanner)**: η μονάδα σάρωσης κινεί την εστιασμένη δέσμη του λέιζερ κατά μήκος του δείγματος σειρά με σειρά. Είναι εφικτή η ρύθμιση της ταχύτητας σάρωσης (π.χ. 5 frames/sec), του χρόνου του ηλεκτρονικού στοιχείου (περισσότερα πρωτόνια ανά ηλεκτρονικό στοιχείο, λιγότερος θόρυβος), της ανάλυση του εικοστοιχείου (pixel) και του μεγέθους του πλαισίου σάρωσης x/y (π.χ. 512X512 pixels).

- 3) **Z-control:** παρέχει τη δυνατότητα εστίασης στο δείγμα κατά το πάχος του και απόκτησης στοιβάδας εικόνων X-Y κατά τον Z-άξονα, τη δυνατότητα ρύθμισης των μεσοδιαστημάτων κατά τον Z-άξονα και βελτιστοποίησης του μεγέθους βηματισμού κίνησης κατά τον Z-άξονα: 0.5 X πάχος οπτικής τομής. Προαιρετικά είναι εφικτή η γρήγορη σάρωση κατά τον Z-άξονα (HRZ= higher precision of z movement (π.χ. μέγεθος βήματος 10 nm, επαναληψιμότητα 30nm, περιοχή σάρωσης 200 μm).
- 4) **Pinhole:** μικρή οπή η οποία επιτρέπει την επιλογή βάθους και εμποδίζει την ανίχνευση μη εστιασμένου φωτός (out of focus light). Η διάμετρός της καθορίζει το πάχος της οπτικής τομής.
- 5) **Φωτοπολλαπλασιαστής (Photomultiplier, PMT):** ανιχνεύει πρωτόνια τα οποία εκπέμπονται ή ανακλώνται από το δείγμα.
- 6) **Dichroic Beam Splitter:** καθορίζει τη διαδρομή της δέσμης φθορισμού. Καθορίζεται από συνδυασμό βασικών (HFT) και δευτερευόντων διχροϊκών καθρεπτών (NFT) και φίλτρων εκπομπής. Το HFT διαχωρίζει το φως διέγερσης από το φως εκπομπής. Το NFT αποδίδει διαχωρισμό του εκπεμπόμενου φθορισμού π.χ. NFT 545 αντανakλά φως μικρότερο από 545nm και απορροφά φως μεγαλύτερο από 545 nm.
- 7) **Αντικειμενικοί φακοί (Objective lens):** καθορίζουν την ποιότητα της εικόνας (ανάλυση). Χαρακτηρίζονται από την τιμή του αριθμητικού διαφράγματος (numerical aperture, NA), η οποία καθορίζει το μέγεθος σημείου της εικόνας και κατά συνέπεια επηρεάζει το ελάχιστο πάχος τομής, που μπορεί να επιτευχθεί.

Το φως διέγερσης από ένα λέιζερ κατευθύνεται προς το δείγμα. Η δέσμη του φωτός περνάει μέσω του συστήματος σάρωσης και φτάνει στον αντικειμενικό φακό, ο οποίος εστιάζει τη δέσμη σε ένα σημείο πάνω στο δείγμα. Παράγεται εκπεμπόμενος φθορισμός από το δείγμα και διασκορπίζεται προς όλες τις κατευθύνσεις. Ο φθορισμός του δείγματος από το επίπεδο εστίασης, επιστρέφει μέσω του αντικειμενικού φακού και του συστήματος σάρωσης, αντανakλάται από τον διχροϊκό καθρέπτη και εστιάζεται πάνω στον ανιχνευτή. Μπροστά από τον ανιχνευτή υπάρχει ένα φίλτρο, το οποίο περιλαμβάνει μία οπή άνοιγμα (pinhole), η οποία καθορίζει την εικόνα του σημείου στην περιοχή εστίασης του μικροσκοπίου. Ο φθορισμός πάνω και κάτω από το επίπεδο εστίασης δεν περνάει μέσα από το μικρό αυτό άνοιγμα με αποτέλεσμα ακόμα και λίγο φως έξω από το επίπεδο εστίασης να μην φθάνει στον ανιχνευτή. Για να σχηματιστεί μια εικόνα δύο διαστάσεων, η δέσμη από το λέιζερ σαρώνει το δείγμα κάθετα και οριζόντια και η παραγόμενη φθορίζουσα ακτινοβολία

ανιχνεύεται και μετατρέπεται σε ένα σήμα. Το σήμα αυτό απεικονίζεται στην οθόνη του υπολογιστή. Τις περισσότερες φορές, ο ανιχνευτής είναι ένας χαμηλού θορύβου φωτοπολλαπλασιαστής, που μετατρέπει την ενέργεια φωτός σε ηλεκτρικό σήμα [43].

4.11.3.2 Πειραματική διαδικασία

Με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου επιτυγχάνεται η μελέτη του ενδοκυττάρου εντοπισμού τόσο της ελεύθερης όσο και της δεσμευμένης δοξορουβικίνης (DOX), κάνοντας χρήση του φθορισμού της DOX. Συγκεκριμένα, κύτταρα DU145 ή HEK293 (1×10^4) αναπτύχθηκαν σε καλυπτρίδες, οι οποίες ήταν επιστρωμένες με πολυ(L-λυσίνη) και επώασθηκαν για 24 h στους 37 °C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Ύστερα από την επιτυχή προσκόλληση των κυττάρων, το θρεπτικό μέσο αφαιρέθηκε, τα κύτταρα εκπλύθηκαν με PBS και στη συνέχεια επώασθηκαν παρουσία των νανοϋλικών στα οποία είναι εγκλεισμένη η δοξορουβικίνη καθώς και με ελεύθερη δοξορουβικίνη (control). Στην περίπτωση των oxCNTs@GPEI5K/DOX και oxCNTs@GPEI25K/DOX, τα κύτταρα επώασθηκαν για 3 h και 5 h σε συγκέντρωση 1 μM ως προς την DOX, ενώ η χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση της ελεύθερης DOX ήταν 3 μM. Έπειτα, οι ουσίες εκπλύθηκαν με PBS δύο φορές. Για τη σήμανση του πυρήνα των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η TO-PRO-3, μια χρωστική ουσία που ενσωματώνεται αποκλειστικά στον κυτταρικό πυρήνα. Τα κύτταρα επώασθηκαν με 50 μL από διάλυμα TO-PRO-3 (1 mg/mL), για 5 min σε σκοτεινό μέρος.

Στην περίπτωση των oxCNDs@FCDs/DOX, τα κύτταρα επώασθηκαν για 5 h με συγκέντρωση 1 μM ως προς την DOX και 13.2 μg/mL ως προς το υβριδικό υλικό.

Τέλος, ύστερα από εκπλυση με PBS, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν στις καλυπτρίδες με διάλυμα 4% PFA/PBS για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, ούτως ώστε να μελετηθούν περαιτέρω.

Το μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Leica TCS SP8 MP multiphoton confocal microscope (Wetzlar, Germany). Οι εικόνες καταγράφηκαν σε ένα ανιχνευτή φάσματος χρησιμοποιώντας το κατάλληλο εύρος κύματος εκπομπής. Συγκεκριμένα, για την ανίχνευση της DOX και της ροδαμίνης (κόκκινο χρώμα) πραγματοποιήθηκε διέγερση στα 561 nm με ένα laser DPSS και η εκπομπή καταγράφηκε στην περιοχή 570-650 nm. Η ανίχνευση των FCDs (μπλε χρώμα) πραγματοποιήθηκε μετά από διέγερση στα 740nm με ένα laser IR MaiTai DeepSee Ti:Sapphire (Spectra-Physics, Santa Clara, CA, USA) και η εκπομπή καταγράφηκε

στην περιοχή 430-500 nm, ενώ η ανίχνευση του TO-PRO-3 πραγματοποιήθηκε με διέγερση στα 642 nm και η εκπομπή καταγράφηκε στα 661 nm (far red, ψευδοχρώση μπλε). Οι εικόνες ελήφθησαν χρησιμοποιώντας ένα λογισμικό LAS X (Leica Microsystems CMS GmbH) και επεξεργάστηκαν με το λογισμικό Image J.

4.12 Αντιβακτηριακή μελέτη

Η αντιβακτηριακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στα υβριδικά νανοϋλικά oxCNTs@GPEI5K, oxCNTs@GPEI25K, oxCNDs@GPEI5K, oxCNDs@GPEI25K, oxCNTs, oxCNDs καθώς και στα γουανιδιωμένα πολυμερή GPEI5K και GPEI25K. Για την αντιβακτηριακή μελέτη των παραπάνω υλικών, χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη βακτηρίων *Escherichia coli* DH5 Alpha και *Staphylococcus aureus*. Επίσης, για την αντιβακτηριακή μελέτη των υβριδικών υλικών oxCNTs@30-QPEI, oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI χρησιμοποιήθηκαν τα βακτήρια *Escherichia coli* XL1-blue, τα οποία εκφράζουν την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (RFP).

Το *Escherichia coli* είναι ένα βακτήριο με ραβδοειδές σχήμα. Κατατάσσεται στους δυνητικά αναερόβιους μικροοργανισμούς, ανήκει στην ομάδα των αρνητικών κατά gram βακτηρίων (gram (-)) και αναπτύσσεται στους 37 °C [44]. Το βακτήριο αυτό, προέρχεται από το γένος *Escherichia* και είναι μέλος της οικογένειας των εντεροβακτηρίων. Συγκεκριμένα, το κύτταρο του *E. coli* αποτελείται από το κυτταρόπλασμα, όπου περιέχει ένα κυκλικό μόριο DNA και περικλείεται από την κυτταρική μεμβράνη, η οποία περιβάλλεται από το κυτταρικό τοίχωμα. Το κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από δύο δομές, μια περιπλασματική γέλη, η οποία περιέχει ένα στρώμα πεπτιδογλυκάνης και την εξωτερική μεμβράνη [45]. Το συγκεκριμένο στέλεχος DH5, που χρησιμοποιήθηκε, δημιουργήθηκε από τον Douglas Hanahan και είναι ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα στελέχη *Escherichia coli* K-12 για εργαστηριακή χρήση. Τα στελέχη αυτά είναι εμπορικά διαθέσιμα και εμφανίζουν αρκετές ιδιότητες. Αυτές οι ιδιότητες τα καθιστούν κατάλληλα για διάφορες εφαρμογές, όπως είναι ο μετασχηματισμός με μεγάλη αποτελεσματικότητα, η παραγωγή υψηλής ποιότητας πλασμιδιακού DNA εξαιτίας της απουσίας μη εξειδικευμένης ενδονουκλεάσης I (endA1) [46], η διατήρηση των σταθερών πλασμιδίων λόγω των χαμηλών επιπέδων του ομόλογου ανασυνδυασμού (recA1) και ο αποτελεσματικός μετασχηματισμός του με μη μεθυλωμένο DNA εξαιτίας της διακοπής της ενδονουκλεάσης EcoKI (hsdR17) [47].

Από την άλλη, οι σταφυλόκοκκοι είναι ακίνητοι, μη σπορογόνοι, gram (+) κόκκοι, οι οποίοι διατάσσονται είτε ως μεμονωμένα κύτταρα, είτε κατά ζεύγη ή τριάδες ή μικρές αλυσίδες (αλυσίδες), αλλά κυρίως ως βοστρυχοειδείς ομάδες (όπως ένα τσαμπί σταφυλιών). Τα περισσότερα είδη τους είναι προαιρετικώς αναερόβια με εξαίρεση τους *Staphylococcus aureus anaerobius* και *Staphylococcus saccharolyticus* [48]. Ο κύριος παθογόνος σταφυλόκοκκος για τον άνθρωπο, ο *Staphylococcus aureus*, βρίσκεται στο εξωτερικό περιβάλλον και κυρίως στους μυκτήρες (ρουθούνια) των ενηλίκων κατά 20-40%. Μπορεί να αποικίζει και σε άλλα σημεία του ανθρώπινου σώματος, όπως τις παρατριμματικές δερματικές πτυχές, το περίνεο, τις μασχάλες και τον κόλπο. Τις περισσότερες φορές, το βακτήριο αυτό αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπου, όμως κάτω από κατάλληλες συνθήκες μπορεί να γίνει αιτία λοιμώξεων [48]. Δυνητικά, ο *Staphylococcus aureus* είναι ένας παθογόνος μικροοργανισμός, ο οποίος μπορεί να προκαλέσει τροφική δηλητηρίαση, καθώς και διάφορες άλλες μολύνσεις [49]. Για την αντιβακτηριακή μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο *Staphylococcus aureus* 25923 5A, ο οποίος είναι ένα κλινικό προϊόν απομόνωσης με την ονομασία Seattle 1945 και χρησιμοποιείται ως πρότυπο για εργαστηριακό έλεγχο. Εμφανίζει ευαισθησία σε ποικιλία αντιβιοτικών, όπως είναι η μεθυκιλλίνη. Αξίζει να σημειωθεί πως, το απομονωμένο στέλεχος περιέχει ένα στοιχείο σταφυλοκοκκικής χρωμοσωμικής κασέτας, που μοιάζει με χρωμόσωμα τύπου SCC, για το οποίο δεν υπάρχουν γενετικά ανασυνδυαστικά ένζυμα (recombinases) αλλά ούτε και το γονίδιο *mecA*, που είναι υπεύθυνο για την ανθεκτικότητα των βακτηρίων έναντι των αντιβιοτικών [50-53].

4.12.1 Μελέτη ανάπτυξης του βακτηρίου *Escherichia coli* XL1-blue παρουσία των υλικών oxCNTs@30-QPEI, oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI

Η αντιβακτηριακή δράση των τροποποιημένων oxCNTs με τα QPEIs μελετήθηκε στα μετασηματισμένα με το πλασμίδιο pDsRwd2-N1 που κωδικοποιεί την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (RFP), βακτήρια *Escherichia coli* XL1-blue. Τα παραπάνω βακτήρια αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης Luria-Bertani (LB). Το LB αποτελείται από 10% w/v τριπτόνη, 5% w/v εκχύλισμα ζύμης και 10% w/v NaCl, τα οποία διαλύονται σε αποσταγμένο νερό. Το pH ρυθμίζεται στο 7.5 και το LB αποστειρώνεται σε κλίβανο στους 120 °C για 15 min. Η ανάπτυξη των βακτηρίων πραγματοποιείται στο LB στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση σε τροχιακό

αναδευτήρα Stuart SI500 (ταχύτητα ~ 200 rpm) για 16 h σε αερόβιες συνθήκες επώασης. Στη συνέχεια, η καλλιέργεια αραιώνεται σε οπτική πυκνότητα (OD) 0.4 στα 600 nm. Τα υβριδικά υλικά oxCNTs@QPEIs διασπείρονται ομοιογενώς σε νερό με τη βοήθεια υπερήχων και στη συνέχεια προστίθενται στη βακτηριακή καλλιέργεια σε συγκεντρώσεις από 5 έως 400 µg/mL. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε πλάκες 96 φρεατίων καλλιέργειας (96 well plate) με τελικό όγκο 200 µL. Τα βακτήρια παρουσία των oxCNTs@QPEIs επώάζονται στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση στα 100 rpm για 6 h (βέλτιστος χρόνος επώασης των βακτηρίων όπου η ένταση φθορισμού της RFP λαμβάνει τη μέγιστη τιμή). Η βακτηριακή ανάπτυξη μελετήθηκε χρησιμοποιώντας την ένταση φθορισμού της παραγόμενης RFP (διέγερση στα 545 nm, εκπομπή στα 590 nm), χρησιμοποιώντας το Φασματοφωτόμετρο Infinite 200 PRO Microplate Reader from Tecan. Για κάθε υλικό και συγκέντρωση έγιναν 8 επαναλήψεις και πραγματοποιήθηκαν 3 ανεξάρτητα πειράματα. Για να εξαλειφθεί η επίδραση των CNTs στις μετρούμενες εντάσεις, οι αρχικές τιμές των εντάσεων (σε 0 h), αν και μικρές σε σύγκριση με εκείνες που ελήφθησαν μετά από 6 ώρες, αφαιρέθηκαν από τις τελικές μετρήσεις. Βακτήρια τα οποία έχουν επωαστεί μόνο με θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (control) και αντιστοιχεί στο 100% της έντασης φθορισμού.

4.12.2 Κινητική μελέτη της ανάπτυξης των βακτηρίων παρουσία GPEI5K και GPEI25K

Βακτήρια *E. coli* του γένους DH5A, αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης Luria-Bertani (LB). Η ανάπτυξη των βακτηρίων πραγματοποιείται στο LB υπό συνεχή ανάδευση σε θάλαμο επώασης στους 37 °C για 16 h.

Επίσης, βακτήρια *Staphylococcus aureus* 25923 5A αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης Tryptic Soy Broth (TSB), το οποίο περιέχει 15% w/v τριπτόνη, 5% w/v soyaatone και 10% w/v NaCl με pH=7.5. Ακολουθείται η ίδια διαδικασία αποστείρωσης όπως στο LB και στη συνέχεια η ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus* γίνεται υπό συνεχή ανάδευση σε θάλαμο επώασης στους 37 °C για 18 h.

Η ανάπτυξη της καλλιέργειας των δύο βακτηρίων έγινε σε θάλαμο επώασης Lab Tech LSI-1005A. Στη συνέχεια, η ανάπτυξή των βακτηρίων παρακολούθηθηκε φασματοφωτομετρικά παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων των πολυμερών. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα βακτήρια ήταν 10, 15, 20, 50, 100, 200 µg/mL για το GPEI5K και 10, 30, 50, 100, 200 µg/mL για το

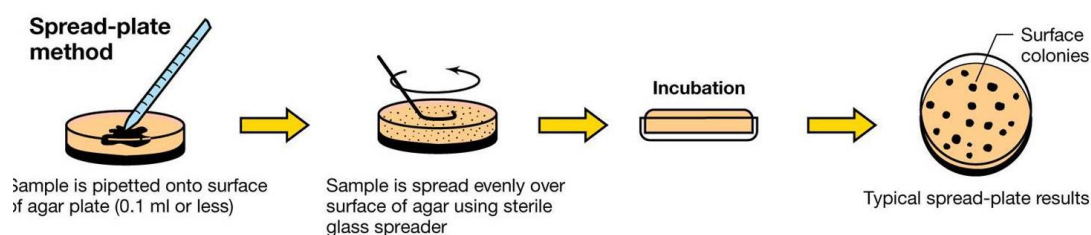
GPEI25K. Οι μετρήσεις απορρόφησης για τα *E. coli* λαμβάνονται ανά 2 h επώασης, ενώ για το *Staphylococcus aureus* ανά 1.5 h, λόγω του ότι αναπτύσσονται ταχύτερα. Η οπτική πυκνότητα της κάθε καλλιέργειας μετράται στα 500 nm (OD) με Φασματοφωτόμετρο Spectronic Helios Alpha UV-vis spectrophotometer της Thermo Fisher Scientific.

4.12.3 Μελέτη της ανάπτυξης των βακτηρίων παρουσία των υβριδικών υλικών (oxCNTs@GPEI5K, oxCNTs@GPEI25K και oxCNDs@GPEI5K, oxCNDs@GPEI25K)

4.12.3.1 Αρχή της μεθόδου

Η μελέτη της ανάπτυξης βακτηρίων παρουσία των υβριδικών υλικών oxCNTs@GPEI5K, oxCNTs@GPEI25K και oxCNDs@GPEI5K, oxCNDs@GPEI25K πραγματοποιήθηκε με την μέθοδος διασποράς σε στερεό θρεπτικό μέσο (spread plate), όπως συνοπτικά απεικονίζεται στην Εικόνα 4.17. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην επιφανειακή ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε τρυβλία (spread plate count), τα οποία μπορούν να αναπτυχθούν και να σχηματίζουν ξεχωριστές και ορατές αποικίες. Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, το αποστειρωμένο, τηγμένο και ψυχρό άγαρ απλώνεται πρώτα σε αποστειρωμένα κενά τρυβλία Petri. Ύστερα από τη στερεοποίηση, τα τρυβλία προεπιάζονται στους κλιβάνους για λίγη ώρα ώστε να ξηραθεί η επιφάνεια του άγαρ, έτσι ώστε οι μικροοργανισμοί να μην συνενωθούν κατά το «άπλωμά» τους πάνω στο άγαρ. Στη συνέχεια, ένας όγκος (συνήθως 0.1 ml ή λιγότερο) μιας καταλλήλως αραιωμένης καλλιέργειας απλώνεται πάνω στην επιφάνεια στρωμένων τρυβλίων με άγαρ χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη σπάτουλα. Ο στόχος είναι η ομοιόμορφη διανομή του δείγματος ώστε να προσροφηθεί στην επιφάνεια του άγαρ. Μετά τη διασπορά, αφήνονται τα τρυβλία για λίγα λεπτά και στη συνέχεια, τοποθετούνται αναποδογυρισμένα στους επωαστικούς κλιβάνους σε συγκεκριμένη θερμοκρασία και χρόνο, αναλόγως το με το είδος του μικροοργανισμού (ψυχρότροφα, μεσόφιλα ή θερμόφιλα) που μελετάμε ώστε να αναπτυχθούν ξεχωριστές και ορατές αποικίες. Η μέθοδος όμως αυτή δεν μετρά απαραίτητα τον πραγματικό συνολικό αριθμό των ζωντανών κυττάρων ανά γραμμάριο δείγματος, αφού τα βακτηριακά κύτταρα υφίστανται μόνα τους ή σε ζευγάρια, αλυσίδες, συμπλέγματα και ομάδες. Για το λόγο αυτό, οι μετρήσεις που προκύπτουν από τη μέθοδο αυτή δεν πρέπει να αναφέρονται ως μετρήσεις ζωντανών

οργανισμών αλλά ως μετρήσεις αποικιών ανά μονάδα ή μονάδες σχηματισμού αποικιών ανά μονάδα (Colony Forming Units, cfu).



Εικόνα 4.17: Συνοπτική απεικόνιση της μεθόδου spread plate.

4.12.3.2 Πειραματική διαδικασία

Για τη μελέτη της ανάπτυξης των βακτηρίων, γίνεται αρχικά η ανάπτυξη των *E. coli* και *Staphylococcus aureus* βακτηρίων στο υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, LB και TSB για 16 h και 18 h, αντίστοιχα, στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση. Μετά την ανάπτυξη των βακτηρίων, μετράται η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας και υπολογίζεται η συγκέντρωσή τους σε cfu/mL. Στην συνέχεια, ετοιμάζονται οι διασπορές των νανοϋλικών στα αντίστοιχα θρεπτικά μέσα σε διάφορες συγκεντρώσεις, οι οποίες εμβολιάζονται με 10 μ L πυκνού διαλύματος βακτηρίων (10^3 cfu/mL), ώστε η τελική συγκέντρωσή τους να είναι 10^2 cfu/mL. Συγκεκριμένα, τα *E. coli* βακτήρια επώαστηκαν παρουσία: (1) 10, 20, 50, 150 μ g/mL oxCNTs, (2) 50, 100, 200, 400, 500 μ g/mL oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, (3) 50, 100, 150, 300, 500, 750 μ g/mL oxCNDs και (4) 10, 20, 50, 100, 200 μ g/mL oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K, ενώ τα *S. aureus* βακτήρια με: (1) 50, 100, 200, 400, 500 μ g/mL oxCNTs, (2) 20, 50, 100, 200, 400, 500, 600 μ g/mL oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, (3) 5, 25, 50, 100, 300, 500, 750 μ g/mL oxCNDs και (4) 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 μ g/mL oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K. Μετά από 24 h επώαση στους 37 °C, μετράται εκ νέου η οπτική πυκνότητα των καλλιεργειών και αραιώνονται με το αντίστοιχο θρεπτικό μέσο, ώστε η συγκέντρωση των βακτηρίων να είναι $\sim 10^{-1}$ cfu/mL.

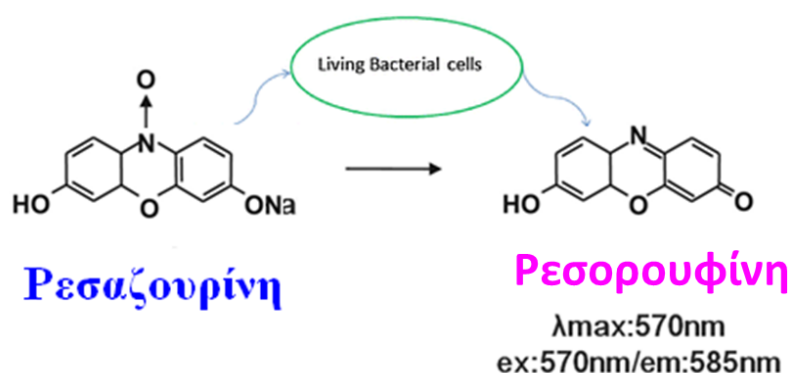
Παράλληλα, ετοιμάστηκαν τα επιστρωμένα με άγαρ τρυβλία. Συγκεκριμένα, σε αποστειρωμένα τρυβλία τοποθετούνται 10 mL διαλύματος άγαρ (10%) σε θρεπτικό μέσο LB για τα πειράματα με τα *E. coli*, ενώ για αυτά με τα *S. aureus* 10 mL διαλύματος άγαρ (15%) σε θρεπτικό μέσο TSB. Στη συνέχεια, αφού αφήσουμε τα τρυβλία να κρυώσουν και να στερεοποιηθεί το υλικό, υπό άσηπτες συνθήκες, εμβολιάζονται με συγκεκριμένο όγκο από το κάθε εναιώρημα βακτηρίων

επωασμένων με και χωρίς τα νανοϋλικά, σε διπλά τρυβλία για την κάθε συγκέντρωση. Με ειδικά γυάλινα ή μεταλλικά ραβδάκια σχήματος Γ, τα οποία πρώτα έχουν αποστειρωθεί, διασπείρονται με κυκλικές κινήσεις τα δείγματα στην επιφάνεια του θρεπτικού υποστρώματος και αφήνονται στους 37 °C για 16 h ή 18 h επώαση. Μετά το πέρας της επώασης πραγματοποιείται καταμέτρηση των αποικιών που αναπτύχθηκαν από τα δύο τρυβλία της ίδιας αραιώσης και λαμβάνεται ο μέσος όρος τους [54].

4.12.4 Μελέτη της βακτηριοκτόνου δράσης των υβριδικών υλικών (Resazurin Assay)

4.12.4.1 Αρχή της μεθόδου

Με τη μέθοδο της ρεσαζουρίνης μελετάται η βακτηριοκτόνος δράσης των υλικών. Η ρεσαζουρίνη είναι μια χρωστική ουσία που είναι ευαίσθητη σε οξειδοαναγωγικό περιβάλλον και χρησιμοποιείται για το προσδιορισμό της βιωσιμότητας των βακτηρίων. Συγκεκριμένα, η μέθοδος αυτή βασίζεται στη μετατροπή της ρεσαζουρίνης, η οποία δεν φθορίζει, στη φθορίζουσα ουσία ρεσορουφίνη, σύμφωνα με την Εικόνα 4.18. Τα νεκρά βακτήρια δεν μπορούν να ανάγουν τη ρεσαζουρίνη στη φθορίζουσα ρεσορουφίνη, υποδηλώνοντας έτσι τον κυτταρικό θάνατο. Συνεπώς, με τη μέθοδο αυτή μετράται η ένταση του φθορισμού της ρεσορουφίνης, που παράγεται από τον μεταβολισμό της ρεσαζουρίνης [55].



Εικόνα 4.18: Μετατροπή της ρεσαζουρίνης στο φθορίζον μόριο ρεσορουφίνης.

4.12.4.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά, βακτήρια *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus* επωάζονται στα θρεπτικά μέσα, LB και TSB για 16 h και 18 h, αντίστοιχα, στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια, μετράται η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας, υπολογίζεται η συγκέντρωση των βακτηρίων (cfu/mL) και αραιώνεται σε τελική

συγκέντρωση $\sim 10^4$ cfu/mL. Έπειτα, διασπείρονται τα νανοϋλικά στα αντίστοιχα θρεπτικά μέσα σε διάφορες συγκεντρώσεις, εμβολιάζονται με 10 μ L πυκνού διαλύματος βακτηρίων (10^4 cfu/mL), ώστε η τελική συγκέντρωσή τους να είναι 10^3 cfu/mL. Συγκεκριμένα, τα *E. coli* βακτήρια επώαστηκαν στους 37 °C παρουσία: (1) 10, 15, 20, 50, 100, 200 μ g/mL GPEI5K, (2) 10, 30, 50, 100, 200 μ g/mL GPEI25K, (3) 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 400, 600, 800 μ g/mL oxCNTs@GPEI5K, (4) 1, 2, 5, 7, 10, 20, 50, 100, 200, 400, 600, 800 μ g/mL oxCNTs@GPEI25K και (5) 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300 μ g/mL oxCNDs@GPEI5K και το oxCNDs@GPEI25K, ενώ τα *S. aureus* με: (1) 10, 20, 50, 100, 200, 400 μ g/mL GPEI5K, (2) 20, 30, 50, 100, 200, 400 μ g/mL GPEI25K, (3) 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 400 μ g/mL oxCNTs@GPEI5K, (4) 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 400, 500, 600 μ g/mL oxCNTs@GPEI25K, (5) 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 500 μ g/mL oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K. Μετά από επώαση 24 h, προστίθενται 10 μ L από διάλυμα ρεσαζουρίνης συγκέντρωσης 6.75 mg/mL και τα βακτήρια επώάζονται για ακόμα 4 h στους 37 °C. Μετά το πέρας της επώασης, οι καλλιέργειες φυγοκεντρώνται στα 10.000 rpm για 5 min και μεταφέρονται 100 μ L από το υπερκείμενο σε μαύρη πλάκα καλλιέργειας 96 φρεατίων [56]. Τέλος, χρησιμοποιώντας το Φασματοφωτόμετρο Infinite 200 PRO Microplate Reader της Tecan, μετρήθηκε ο φθορισμός της ρεσοφουρίνης που παράγεται σε μήκος κύματος διέγερσης 530 nm και εκπομπής 590 nm [55-57]. Για το θετικό έλεγχο (control), τα βακτήρια επώαστηκαν χωρίς την προσθήκη των υλικών, μόνο με το θρεπτικό μέσο LB (για τα *E. coli*) ή TSB (για τα *S. aureus*), ενώ για τον αρνητικό έλεγχο τα θρεπτικά μέσα LB ή TSB δεν εμβολιάστηκαν με βακτήρια.

4.12.5 Έλεγχος της μορφολογίας των βακτηρίων *E. coli* με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

4.12.5.1 Πειραματική διαδικασία

Καλλιέργεια βακτηρίων *E. coli* συγκέντρωσης 10^3 cfu/mL επώαστηκε με τα νανοϋλικά για 24 h στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση. Έπειτα, μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα κάθε δείγματος και μια ποσότητα βακτηρίων από κάθε δείγμα προστέθηκε σε διάλυμα 3% γλουταραλδεΐδης σε ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού νατρίου, 100 mM και pH=7.1, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 500 μ L. Μετά από 12 h ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, τα εναιωρήματα φυγοκεντρήθηκαν στα 10.000 rpm και τα βακτήρια παρελήφθησαν ως ίζημα μετά από έκλυση με ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού νατρίου (100 mM) προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια της

γλουταραλδεΐδης. Στη συνέχεια, τα βακτήρια επαναιωρούνται σε 100 μL ρυθμιστικού κακοδιλικού διαλύματος και τοποθετούνται σε καλυπτρίδες, οι οποίες έχουν επιστρωθεί με ένα λεπτό στρώμα πολυ(L-λυσίνης) και αφήνονται για 30 min, ώστε να κολλήσουν καλά στις καλυπτρίδες. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η αφυδάτωση των βακτηρίων με συνεχόμενες εκπλύσεις με διαλύματα νερού/αιθανόλης διαδοχικών συγκεντρώσεων 0, 25, 50, 70, 95 και 100 % v/v. Για κάθε συγκέντρωση διαλύματος νερού/αιθανόλης πραγματοποιήθηκαν δύο εκπλύσεις, ενώ τα βακτήρια μένουν σε επαφή με τα διαλύματα για περίπου 10 min κάθε φορά, σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Τέλος, όταν στεγνώσουν τελείως οι καλυπτρίδες με τα βακτήρια, κολλώνται σε ταινίες άνθρακα και επιχρυσώνονται ώστε να αποφευχθεί η καταστροφή του δείγματος κατά τη λήψη των εικόνων στο SEM [58].

Βιβλιογραφία 4^ο Κεφαλαίου

- [1] L.A. Tziveleka, A.M.G. Psarra, D. Tsiourvas, C.M. Paleos, «Synthesis and characterization of guanidynylated poly(propylene imine) dendrimers as gene transfection agents», *Journal of Controlled Release*, 117(1) (2007) 137-146.
- [2] L. Staudenmaier, «Verfahren zur darstellung der graphitsäure», *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 31(2) (1898) 1481-1487.
- [3] A. Sapalidis, Z. Sideratou, K.N. Panagiotaki, E. Sakellis, E.P. Kouvelos, S. Papageorgiou, F. Katsaros, «Fabrication of antibacterial poly(vinyl alcohol) nanocomposite films containing dendritic polymer functionalized multi-walled carbon nanotubes», *Frontiers in Materials*, 5(11) (2018).
- [4] Z. Sideratou, D. Tsiourvas, C.M. Paleos, «Quaternized poly(propylene imine) dendrimers as novel pH-sensitive controlled-release systems», *Langmuir*, 16(4) (2000) 1766-1769.
- [5] J.H. Steinar Lynum, Ketil Hox, Ragne Hildrum, Magne Nordvik, (Patent). PCT/NO1998/000093, 18 Mars 2008.
- [6] P. Zygouri, T. Tsoufis, A. Kouloumpis, M. Patila, G. Potsi, A.A. Sevastos, Z. Sideratou, F. Katsaros, G. Charalambopoulou, H. Stamatis, P. Rudolf, T.A. Steriotis, D. Gournis, «Synthesis, characterization and assessment of hydrophilic oxidized carbon nanodiscs in bio-related applications», *RSC Advances*, 8(1) (2018) 122-131.
- [7] C. Liu, P. Zhang, X. Zhai, F. Tian, W. Li, J. Yang, Y. Liu, H. Wang, W. Wang, W. Liu, «Nano-carrier for gene delivery and bioimaging based on carbon dots with PEI-passivation enhanced fluorescence», *Biomaterials*, 33(13) (2012) 3604-3613.
- [8] J. Emsley, «Organic-chemistry», 1st Edition – Mcmurry.J, New Science, 103(1423) (1984) 41-42.
- [9] L.G. Wade, «Organic chemistry», Pearson Education, 2003.
- [10] C.a.C.F.A. Gesellschaft Deutscher, «Fresenius' zeitschrift für analytische chemie», 2005.
- [11] S.P.V. Neil, «Organic chemistry: structure and functionality», 2011.
- [12] Z. M. Khoshhesab, «Reflectance IR spectroscopy. infrared ipetroscopy». *Materials Science, Engineering and Technology*, 2002.
- [13] W.-I. N.J. Harrick, «Internal reflection spectroscopy», New York, 1967.
- [14] James P. Runt and John J. Fitzgerald, «Dielectric spectroscopy of polymeric materials: fundamentals and applications», *Journal of the American Chemical Society*, 1997.
- [15] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, «Principles of instrumental analysis», Cengage Learning, 2017.
- [16] H. Abitan, H. Bohr, P. Buchhave, «Correction to the Beer-Lambert-Bouguer law for optical absorption», *Applied Optics*, 47(29) (2008) 5354-5357.
- [17] P. Misra, M.A. Dubinskii, «Ultraviolet spectroscopy and UV lasers», CRC Press, 2002.
- [18] A.L. Patterson, «The scherrer formula for X-Ray particle size determination», *Physical Review*, 56(10) (1939) 978-982.
- [19] R.B. Prime, «Characterization and cure of dielectric and conducting polymer thick films», *Polymer Engineering and Science*, 32(17) (1992) 1286-1289.
- [20] L.V.A.M.J. Buerger, «The powder method - in X-Ray crystallography», Hill Company, 1958.
- [21] W.M.R. C. D. Wagner, L. E. Davis, J. F. Moulder, and G. E. Muilenberg, «Handbook of x-ray photoelectron spectroscopy», Perkin-Elmer Corporation, 1979.

- [22] Herausgegeben von D. Briggs, «Handbook of X-ray and ultraviolet photoelectron spectroscopy», Heyden & Son, 1979.
- [23] T.A. Carlson, «Photoelectron and auger spectroscopy», Plenum Press, 1975.
- [24] Ν. Φράγκης, «Αρχές ηλεκτρονικής μικροσκοπίας», Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 2003.
- [25] S. Wischnitzer, «Introduction to electron microscopy», Elsevier Science, 2013.
- [26] D.B.W.a.C.B. Carter, «Transmission electron microscopy part 4: spectrometry», 2009.
- [27] P.H. Wiersema, A.L. Loeb, J.T.G. Overbeek, «Calculation of the electrophoretic mobility of a spherical colloid particle», *Journal of Colloid and Interface Science*, 22(1) (1966) 78-99.
- [28] K.L. Mahon, S.M. Henshall, R.L. Sutherland, L.G. Horvath, «Pathways of chemotherapy resistance in castration-resistant prostate cancer», *Endocrine-Related Cancer*, 18(4) (2011) 103.
- [29] G. Theyer, M. Schirmbock, T. Thalhammer, E.R. Sherwood, G. Baumgartner, G. Hamilton, «Role of the MDR-1-encoded multiple drug resistance phenotype in prostate cancer cell lines», *The Journal of Urology*, 150(5 Pt 1) (1993) 1544-1547.
- [30] G.L. David-Beabes, M.J. Overman, J.A. Petrofski, P.A. Campbell, A.M. de Marzo, W.G. Nelson, «Doxorubicin-resistant variants of human prostate cancer cell lines DU145, PC-3, PPC-1, and TSU-PR1: characterization of biochemical determinants of antineoplastic drug sensitivity», *International Journal of Oncology*, 17(6) (2000) 1077-1086.
- [31] M.M. Webber, D. Bello, H.K. Kleinman, M.P. Hoffman, «Acinar differentiation by non-malignant immortalized human prostatic epithelial cells and its loss by malignant cells», *Carcinogenesis*, 18(6) (1997) 1225-1231.
- [32] M.E. Kaighn, K.S. Narayan, Y. Ohnuki, J.F. Lechner, L.W. Jones, «Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)», *Investigative Urology*, 17(1) (1979) 16-23.
- [33] F.L. Graham, J. Smiley, W.C. Russell, R. Nairn, «Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5», *The Journal of General Virology*, 36(1) (1977) 59-74.
- [34] Y. Gluzman, «SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants», *Cell*, 23(1) (1981) 175-182.
- [35] G.J. Todaro, H. Green, «Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines», *The Journal of Cell Biology*, 17(2) (1963) 299-313.
- [36] F. Denizot, R. Lang, «Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability», *Journal of Immunological Methods*, 89(2) (1986) 271-277.
- [37] S.P. Langdon, «Cancer cell culture methods and protocols», 2004.
- [38] H.M. Shapiro, «Practical flow cytometry», John Wiley & Sons, 2005.
- [39] A.L. Givan, «Flow cytometry: first principles», John Wiley & Sons, 2013.
- [40] L. Yang, Z. Wang, J. Wang, W. Jiang, X. Jiang, Z. Bai, Y. He, J. Jiang, D. Wang, L. Yang, «Doxorubicin conjugated functionalizable carbon dots for nucleus targeted delivery and enhanced therapeutic efficacy», *Nanoscale*, 8(12) (2016) 6801-6809.
- [41] M. Shi, K. Ho, A. Keating, M.S. Shoichet, «Doxorubicin-conjugated immunonanoparticles for intracellular anticancer drug delivery», *Advanced Functional Materials*, 19(11) (2009) 1689-1696.

- [42] N.C.L. Zembruski, V. Stache, W.E. Haefeli, J. Weiss, «7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry», *Analytical Biochemistry*, 429(1) (2012) 79-81.
- [43] R.D. Goldman, D.L. Spector, «Live cell imaging: a laboratory manual», Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005.
- [44] V. Wiwanitkit, «Outbreak of *escherichia coli* and diabetes mellitus», *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 15(Suppl 1) (2011) S70-S71.
- [45] S.D.a.I.E.A. Manning, «*escherichia coli* infections», Philadelphia: Chelsea House, 2005.
- [46] R.G. Taylor, D.C. Walker, R.R. McInnes, «*E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing», *Nucleic Acids Research*, 21(7) (1993) 1677-1678.
- [47] B. Anton, E. Raleigh, «Complete Genome Sequence of NEB 5-alpha, a derivative of *escherichia coli* K-12 DH5 α », *Genome Announcements*, 4 (2016).
- [48] W.C.a.E.W.K. Winn, «Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology», Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- [49] M.Z. David, R.S. Daum, Community-associated methicillin-resistant *staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic, *Clinical microbiology reviews* 23(3) (2010) 616-687.
- [50] T. Ito, Y. Katayama, K. Asada, N. Mori, K. Tsutsumimoto, C. Tiensasitorn, K. Hiramatsu, «Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *staphylococcus aureus*», *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(5) (2001) 1323-1336.
- [51] V. Perreten, P. Chanchaithong, N. Prapasarakul, A. Rossano, S.E. Blum, D. Elad, S. Schwendener, «Novel pseudo-staphylococcal cassette chromosome mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* CC45», *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(11) (2013) 5509-5515.
- [52] T.J. Treangen, R.A. Maybank, S. Enke, M.B. Friss, L.F. Diviak, D.K. Karaolis, S. Koren, B. Ondov, A.M. Phillippy, N.H. Bergman, M.J. Rosovitz, «Complete genome sequence of the quality control strain *staphylococcus aureus* ATCC 25923», *Genome Announcements*, 2(6) (2014).
- [53] N.P. Vitko, A.R. Richardson, «Laboratory maintenance of methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (MRSA)», *Current Protocols in Microbiology*, Chapter 9 (2013).
- [54] J.H. Mueller, J. Hinton, «A protein-free medium for primary isolation of the gonococcus and meningococcus», *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 48(1) (1941) 330-333.
- [55] Y. He, S. Ingudam, S. Reed, A. Gehring, T.P. Strobaugh, P. Irwin, «Study on the mechanism of antibacterial action of magnesium oxide nanoparticles against foodborne pathogens», *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1) (2016) 54.
- [56] C.H. Teh, W.A. Nazni, A.H. Nurulhusna, A. Norazah, H.L. Lee, «Determination of antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of larval extract of fly via resazurin-based turbidometric assay», *BMC Microbiology*, 17(1) (2017) 36.
- [57] S. Foerster, V. Desilvestro, L.J. Hathaway, C.L. Althaus, M. Unemo, «A new rapid resazurin-based microdilution assay for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*», *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(7) (2017) 1961-1968.
- [58] N. Kalchayanand, P. Dunne, A. Sikes, B. Ray, «Viability loss and morphology change of foodborne pathogens following exposure to hydrostatic pressures in the

presence and absence of bacteriocins», *International Journal of Food Microbiology*, 91(1) (2004) 91-98.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

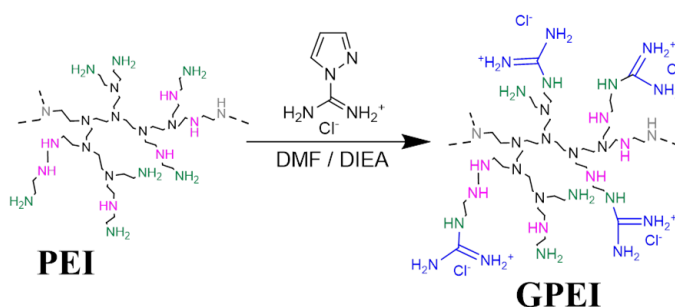
5.1 Υβριδικά υλικά άνθρακα ως φορείς φαρμάκων

5.1.1 Μελέτη των υβριδικών υλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K ως φορείς φαρμάκων

Είναι γνωστό ότι η εισαγωγή ομάδων γουανιδίνης στην επιφάνεια νανοσωματιδίων διευκολύνει τη διέλευση τους δια μέσου των κυτταρικών μεμβρανών. Έτσι, συντέθηκαν γουανιδινικά παράγωγα της PEI, τα οποία είχαν ανάλογη χημικά δομή με γνωστούς δενδριτικούς διαμεμβρανικούς μεταφορείς, όπως τα γουανιδινικά παράγωγα των διαμινοβουτανίου πολυ(προπυλένο ίμινο) δενδριμερών [1-4]. Τα παράγωγα αυτά αλληλεπίδρασαν τόσο ηλεκτροστατικά, όσο και μέσω δεσμών υδρογόνου και δυνάμεων van der Waals, με οξειδωμένους νανοσωλήνες άνθρακα δίνοντας υβριδικά υλικά ικανά να χρησιμοποιηθούν ως φορείς αντικαρκινικών φαρμάκων με υψηλή εκλεκτικότητα ενάντια καρκινικών κυττάρων.

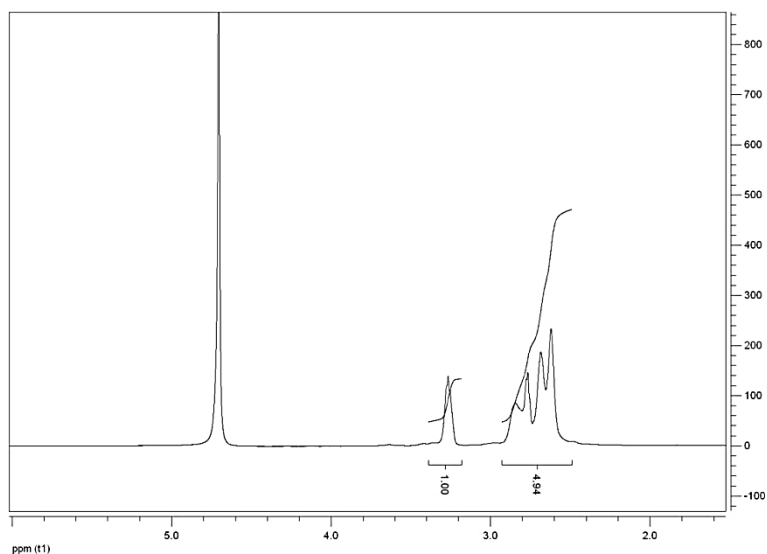
5.1.1.1 Σύνθεση και χαρακτηρισμός των γουανιδιωμένων παραγώγων GPEI5K και GPEI25K

Η εισαγωγή των γουανιδικών ομάδων (G, guanidinium groups) στις πρωτοταγείς τελικές αμινομάδες της PEI επιτεύχθηκε ακολουθώντας γνωστή από τη βιβλιογραφία πορεία [5, 6]. Συγκεκριμένα, οι πρωτοταγείς αμινομάδες της PEI μοριακού βάρους 5 και 25 KDa αντέδρασαν με το υδροχλωρικό άλας της 1H-πυραζολο-καρβοξαμιδίνης σε βασικό περιβάλλον υπό αδρανή ατμόσφαιρα (Εικόνα 5.1). Τα τελικά προϊόντα, GPEI5K και GPEI25K, παρελήφθησαν μετά από λυοφιλίωση, με απόδοση 85%. Η επιτυχής εισαγωγή των γουανιδινικών ομάδων στην PEI (5 και 25 KDa), πιστοποιήθηκε με φασματοσκοπίες FTIR, XPS, ^1H και ^{13}C NMR.

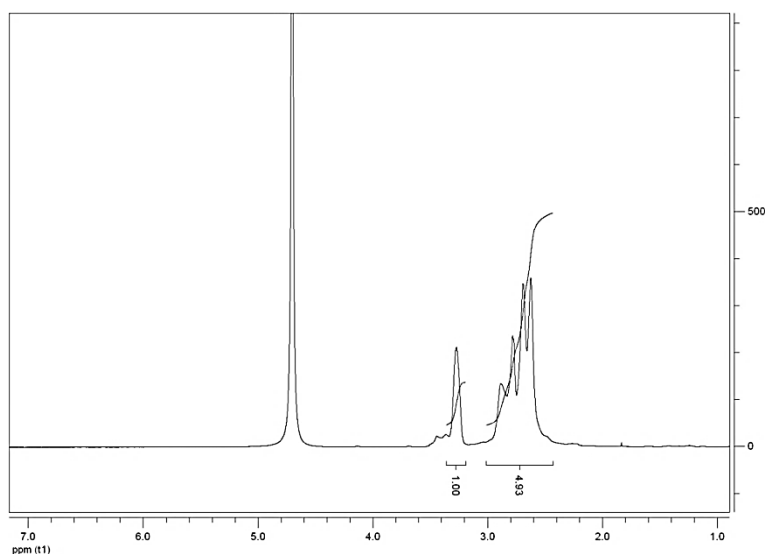


Εικόνα 5.1: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης των γουανιδιωμένων παραγώγων της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης.

Αρχικά, στο Σχήμα 5.1 δίνονται τα φάσματα ^1H NMR των παραγώγων GPEI5K και GPEI25K σε D_2O .



(A)

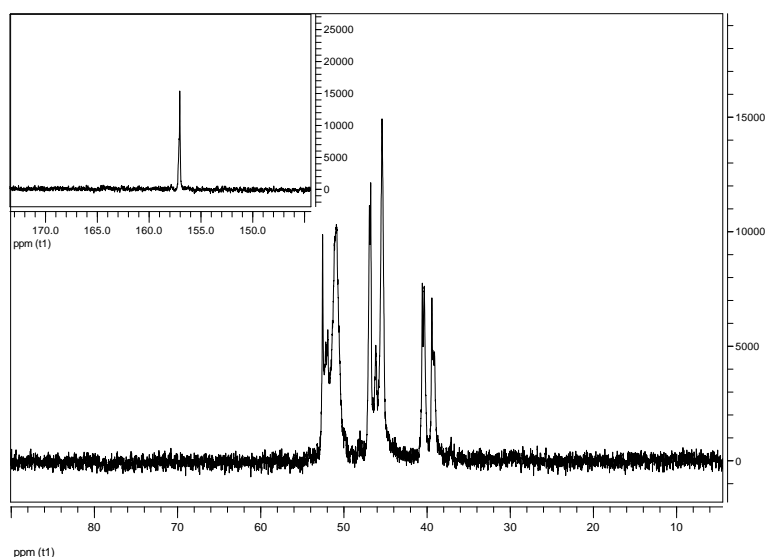


(B)

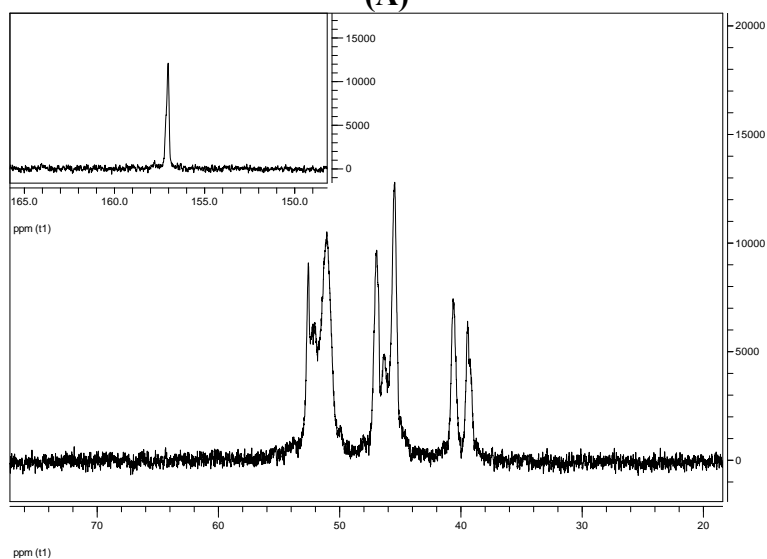
Σχήμα 5.1: Φάσματα ^1H NMR των GPEI5K (A) και GPEI25K (B) σε D_2O .

Αναλυτικά, η επιτυχής εισαγωγή των ομάδων γουανιδίνης στη PEI πιστοποιήθηκε από την κορυφή στα 3.25 ppm, όπως φαίνεται στα παραπάνω φάσματα ^1H NMR και αποδίδεται στα πρωτόνια των α -μεθυλενίων ως προς την γουανιδίνη, ενώ η πολλαπλή κορυφή στην περιοχή των 2.50-2.70 ppm οφείλεται στα πρωτόνια των μεθυλενίων του σκελετού της PEI. Ολοκληρώνοντας τις κορυφές στα 3.25 ppm και 2.70-2.50 ppm, προσδιορίστηκε ο βαθμός υποκατάστασης, όπου βρέθηκε ότι σχεδόν όλες οι πρωτοταγείς αμινομάδες της PEI υποκαταστάθηκαν από ομάδες γουανιδίνης (98% για το GPEI5K και 95% για το GPEI25K).

Επιπλέον, η επιτυχής πρόσδεση των ομάδων γουανιδίνης στις πρωτοταγείς αμινομάδες των PEI επιβεβαιώθηκε και με φασματοσκοπία ^{13}C NMR. Στο Σχήμα 5.2 δίνονται τα φάσματα ^{13}C NMR των παραγώγων GPEI5K και GPEI25K σε D_2O .



(A)

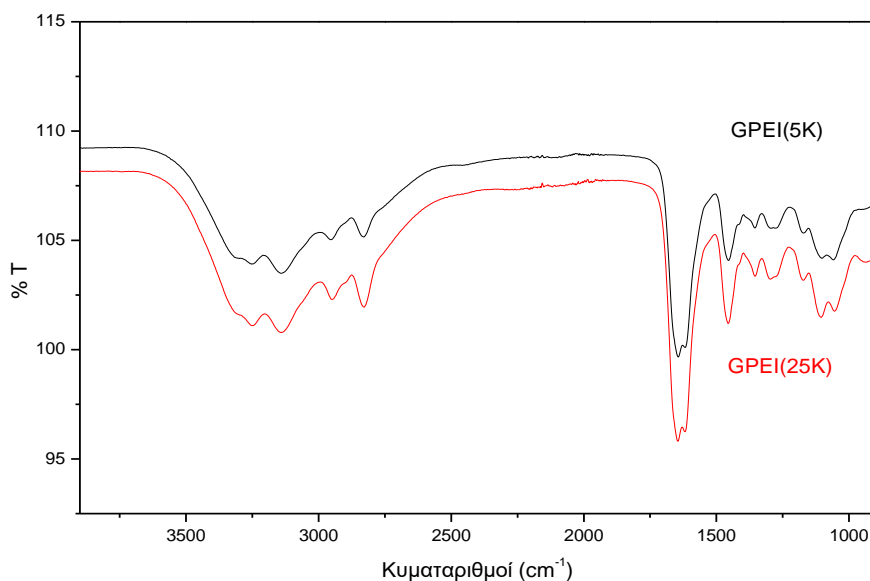


(B)

Σχήμα 5.2: Φάσματα ^{13}C NMR στα 125.1 MHz των GPEI5K (A) και GPEI25K (B) σε D_2O .

Συγκεκριμένα, η κορυφή στα 157.0 ppm και για τα δύο παράγωγα, αντιστοιχεί στον άνθρακα της γουανιδινικής ομάδας, ενώ οι κορυφές στα 40.5 και 39.4 ppm αποδίδονται στους άνθρακες C_{1-3} και C_{1-2} των α -μεθυλενίων ως προς τις γουανιδινικές ομάδες, αντίστοιχα.

Για περαιτέρω ανάλυση των χημικών δομών, τα GPEI παράγωγα χαρακτηρίστηκαν και με φασματοσκοπία υπερώθρου FTIR στα $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.3.

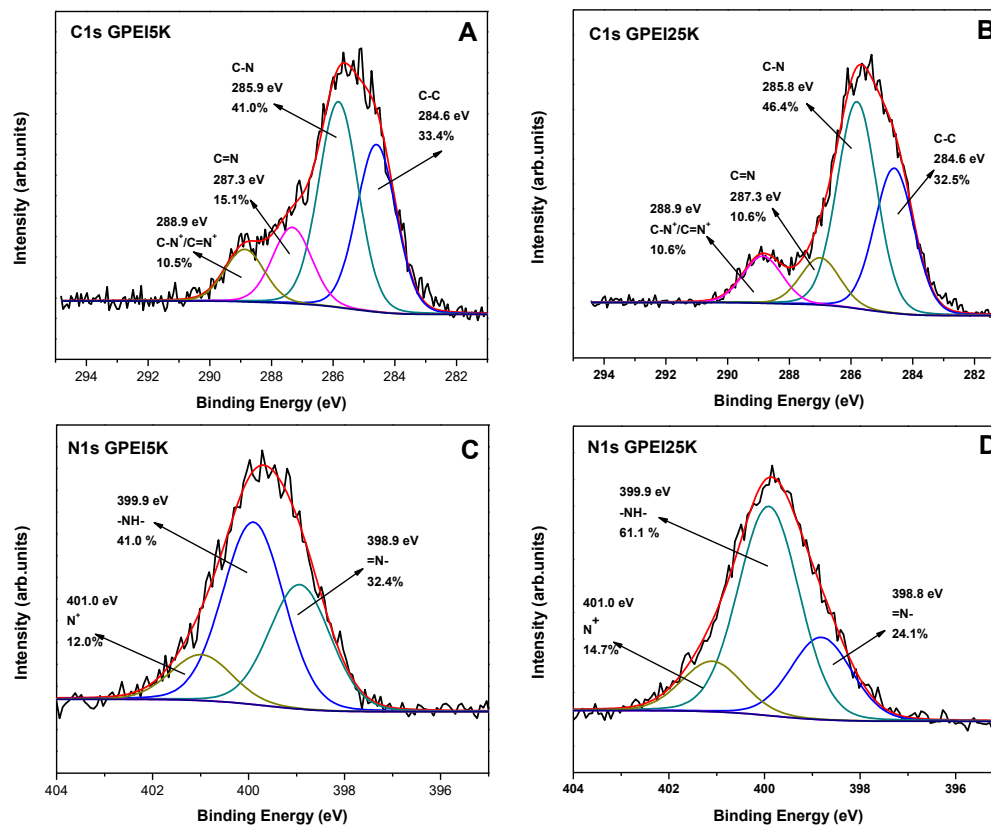


Σχήμα 5.3: Φάσματα FTIR των GPEI παραγώγων.

Όπως φαίνεται στα παραπάνω φάσματα των GPEIs παρατηρούνται και στα δύο, οι κορυφές οι οποίες είναι χαρακτηριστικές των ομάδων της PEI, όπως η δόνηση τάσης των αμινών, οι δονήσεις τάσης, κάμψης, και σείσης των CH_2 , και οι δονήσεις C-N. Αναλυτικά, ξεκινώντας από τις χαρακτηριστικές κορυφές των αλκανίων, στα 2950 και 2830 cm^{-1} συναντάμε τη συμμετρική και την αντισυμμετρική δόνηση τάσης της ομάδας CH_2 , αντίστοιχα. Στην περιοχή των 1460 cm^{-1} του υπέρυθρου είναι γνωστό ότι παρατηρούνται οι απορροφήσεις των CH_2 , λόγω της αντισυμμετρικής δόνησης κάμψης των υδρογόνων όπου στα φάσματα μας αυτή εμφανίζεται στα 1452 cm^{-1} . Επιπλέον, εμφανίζονται οι δονήσεις σείσης των CH_2 στα 1294 cm^{-1} .

Ειδικότερα, στα φάσματα στο Σχήμα 5.3, οι γουανιδινικές ομάδες αναγνωρίζονται από την παρουσία ταινιών απορρόφησης στην περιοχή της δόνησης τάσης του δεσμού NH ($3500\text{-}3300 \text{ cm}^{-1}$), λόγω συμμετρικής και αντισυμμετρικής δόνησης των ατόμων υδρογόνου. Στα φάσματα μας, παρατηρούνται αυτές ως μια ευρεία ταινία με κορυφές στα 3300 , 3252 και 3141 cm^{-1} , ενώ οι δονήσεις κάμψης του NH εμφανίζονται στα 1618 cm^{-1} μαζί με τις δονήσεις τάσης του C=N, οι οποίες εμφανίζονται στα 1646 cm^{-1} . Χαρακτηριστικές των αμινών είναι και οι δονήσεις τάσης του δεσμού C-N που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι στην περιοχή των $1220\text{-}1020 \text{ cm}^{-1}$ και στα φάσματα μας εμφανίζονται στα 1106 (αντισυμμετρική δόνηση τάσης) και 1054 cm^{-1} (συμμετρική δόνηση τάσης) [7].

Ακολούθησε ανάλυση των χημικών δομών των GPEI5K και GPEI25K με φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων-X υψηλής ανάλυσης και τα φάσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στην Σχήμα 5.4.



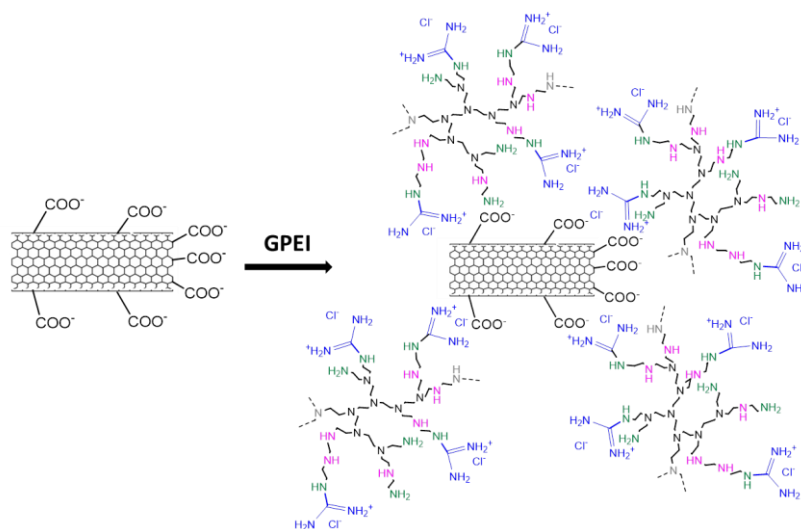
Σχήμα 5.4: Φάσματα XPS υψηλής ανάλυσης C1s (A, B) και N1s (C, D) των GPEI5K και GPEI25K.

Συγκεκριμένα, τα φάσματα υψηλής ανάλυσης του άνθρακα (C1s) και των δύο γουανιδιωμένων πολυμερών που φαίνονται στο Σχήμα 5.4 (A,B) αποτελούνται από τέσσερις κορυφές που αντιπροσωπεύουν τους δεσμούς C-C της PEI καθώς και τους δεσμούς C-N και C=N του σκελετού της πολυαιθυλενιμίνης και των ομάδων της γουανιδίνης, επιβεβαιώνοντας την επιτυχή εισαγωγή των ομάδων γουανιδίνης στην PEI. Παράλληλα, στα παραπάνω φάσματα του άνθρακα παρατηρείται μια ακόμα κορυφή στα 288.9 eV, η οποία αποδίδεται στις πρωτονιωμένες ομάδες γουανιδίνης (C=N⁺) [8]. Στα φάσματα υψηλής ανάλυσης του αζώτου (N1s) (Σχήμα 5.4 C,D) οι καμπύλες προσαρμογής αντιστοιχούν στις διαφορετικές λειτουργικές ομάδες που υπάρχουν στα τελικά πολυμερικά υλικά (GPEI5K και GPEI25K). Στα 398.9 eV παρατηρούνται οι δεσμοί =N- υποδηλώνοντας την παρουσία των ομάδων της γουανιδίνης στα μόρια, ενώ στα 399.9 eV έχουμε τους δεσμούς -NH- από την PEI

και τη γουανιδίνη. Τέλος, η κορυφή στα 401.0 eV αποδίδεται στις πρωτονιωμένες αμινομάδες τόσο της γουανιδίνης όσο και της PEI.

5.1.1.2 Σύνθεση και χαρακτηρισμός των υβριδικών υλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K

Αρχικά, πραγματοποιείται η οξείδωση των νανοσωλήνων άνθρακα (oxCNTs) ακολουθώντας τη γνωστή μέθοδο Staudenmaier, η οποία έχει εφαρμοστεί με μεγάλη επιτυχία για τη χημική οξείδωση του γραφίτη [9]. Χρησιμοποιώντας ως οξειδωτικό μέσο το χλωρικό νάτριο σε ισχυρά όξινο περιβάλλον παραλήφθηκαν νανοσωλήνες άνθρακα τροποποιημένοι με διάφορες λειτουργικές οξυγονούχες ομάδες, όπως υδροξυλικές, καρβοξυλικές, εποξειδικές, κ.α. ομάδες. Στη συνέχεια τα γουανιδιωμένα παράγωγα της PEI αλληλεπίδρασαν με τους οξειδωμένους νανοσωλήνες άνθρακα (oxCNTs). Συγκεκριμένα όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.2, οι θετικώς φορτισμένες γουανιδινικές ομάδες των GPEI αλληλεπίδρασαν με τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες των oxCNTs μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων, αλλά και μέσω διπλών δεσμών υδρογόνου [1-3], ενώ ο σκελετός της PEI προσροφάται στα πλευρικά τοιχώματα των oxCNTs μέσω δεσμών van der Waals [10-13], δίνοντας τα υβριδικά υλικά oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K.

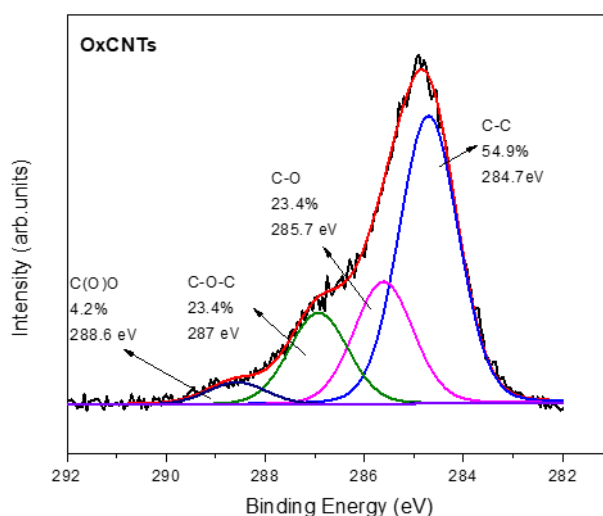


Εικόνα 5.2: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης των υβριδικών υλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K.

Τα υλικά αυτά χαρακτηρίστηκαν φυσικοχημικά με φασματοσκοπίες FTIR, XPS καθώς και με θερμοσταθμική ανάλυση, όπου πιστοποιήθηκε η επιτυχής σύνδεση των υπερδιακλαδισμένων πολυμερών στους νανοσωλήνες, ενώ το ποσοστό σύνδεσης τους προσδιορίστηκε με στοιχειακή ανάλυση και με φασματοσκοπία ^1H NMR

χρησιμοποιώντας ως εσωτερικό πρότυπο το μηλεϊνικό οξύ. Επίσης, η δομή τους μελετήθηκε με περίθλαση ακτίνων-X και φασματοσκοπία Raman, ενώ χαρακτηρίστηκαν μορφολογικά με μικροσκοπίες SEM, TEM και AFM.

Η επιτυχής εισαγωγή των GPEIs στην επιφάνεια των oxCNTs μελετήθηκε με φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων-X. Χρησιμοποιώντας τη συγκεκριμένη τεχνική εξήχθησαν πληροφορίες σχετικά με τον τύπο των αλληλεπιδράσεων μετά την τροποποίηση των oxCNTs με τα GPEIs. Αρχικά μελετήθηκε η δομή των oxCNTs και το φάσμα XPS υψηλής ανάλυσης για τον C1s παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.5.

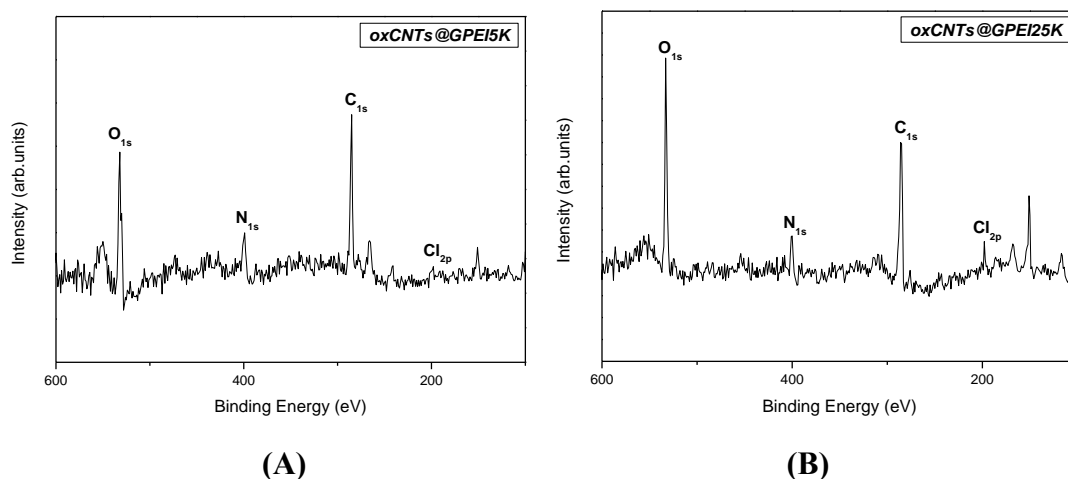


Σχήμα 5.5: Φάσμα XPS υψηλής ανάλυσης C1s των oxCNTs.

Από το φάσμα αυτό, παίρνουμε πληροφορίες για τις λειτουργικές οξυγονούχες ομάδες πάνω στα τοιχώματα των νανοσωλήνων. Η κορυφή του C1s αναλύεται σε τέσσερις κορυφές. Συγκεκριμένα, η κορυφή στα 284.7 eV αποδίδεται στο δεσμό C-C της γραφιτικής δομής των νανοσωλήνων και αντιπροσωπεύει το 54.9% του συνολικού ποσοστού άνθρακα. Επιπλέον, η κορυφή στα 285.7 eV αποδίδεται στο δεσμό C-O, ο οποίος αντιπροσωπεύει το 23.4%, ενώ οι δύο κορυφές στα 287 eV και 288.6 eV αποδίδονται στις εποξειδικές και καρβοξυλικές ομάδες των oxCNTs, αντίστοιχα, αποδεικνύοντας την επιτυχημένη οξείδωση των νανοσωλήνων άνθρακα.

Ακολούθως, στο Σχήμα 5.6 δίνονται τα φάσματα XPS των υβριδικών υλικών (oxCNT@GPEI5K και oxCNT@GPEI25K). Συγκεκριμένα, στα φάσματα XPS (Σχήμα 5.6) παρουσιάζονται όχι μόνο οι χαρακτηριστικές κορυφές O1s και C1s που οφείλονται κυρίως στο γραφιτικό πλέγμα των oxCNTs, αλλά και δύο επιπλέον κορυφές στα ~400 eV και ~200 eV που οφείλονται στα άτομα αζώτου και χλωρίου,

αντίστοιχα, τα οποία προέρχονται αποκλειστικά από τα GPEIs, εφόσον δεν υπάρχουν στο αντίστοιχο φάσμα των oxCNTs. Συνεπώς βεβαιώνεται η παρουσία των GPEI στα τελικά υβριδικά υλικά. Επιπλέον, αναλύοντας αυτές τις κορυφές μπορούν να ληφθούν ποσοτικές πληροφορίες για τα υβριδικά υλικά, οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1. Συγκεκριμένα, τα ατομικά ποσοστά των στοιχείων που υπάρχουν στα υβριδικά υλικά δείχνουν ότι το oxCNTs@GPEI25K διαθέτει μεγαλύτερο ποσοστό αζώτου (8.4%) σε σχέση με το oxCNTs@GPEI5K (4.0%).



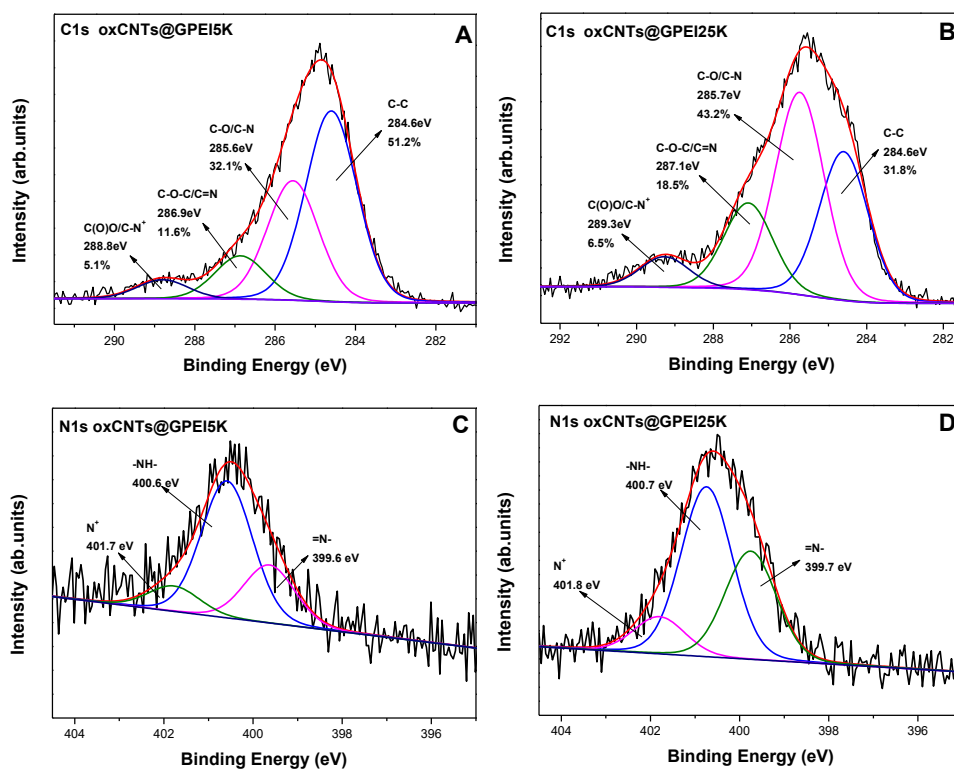
Σχήμα 5.6: Φάσματα XPS των oxCNTs@GPEI5K (A) και oxCNTs@GPEI25K (B).

Πίνακας 5.1: Ατομικά ποσοστά % των oxCNTs τροποποιημένων με τα GPEIs.

	oxCNTs@GPEI5K	oxCNTs@GPEI25K
Στοιχείο	Ατομικά ποσοστά (%)	
Άνθρακας	62.8	67.3
Οξυγόνο	33.2	24.3
Άζωτο	4	8.4

Τα υψηλής ανάλυσης φάσματα XPS του άνθρακα και του αζώτου στα υβριδικά υλικά παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.7. Αρχικά, τα φάσματα του άνθρακα (Σχήμα 5.7 A,B) αναλύονται σε 4 επιμέρους κορυφές. Συγκρίνοντας τα φάσματα με αυτά των οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα, παρατηρούμε μια μεγάλη αύξηση της έντασης της κορυφής στα 285.7 eV, η οποία αποδίδεται στους δεσμούς C-O/C-N. Έτσι το

ποσοστό που αντιπροσωπεύουν αυξάνεται από 23.4% σε 32.1% και 43.2% στα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, αντίστοιχα. Ανάλογη συμπεριφορά παρατηρείται για την κορυφή στα 288.8 eV, που οφείλεται στους δεσμούς C(O)O/C-N⁺, όπου η ένταση αυξάνεται από 4.2% σε 5.1% και 6.5% στα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, αντίστοιχα. Οι αλλαγές αυτές οφείλονται στη συνεισφορά των δεσμών C-N και C-N⁺, οι οποίοι προέρχονται αποκλειστικά από τα GPEIs. Σημειώνεται πως οι παραπάνω κορυφές είναι πιο έντονες στην περίπτωση του oxCNTs@GPEI25K από το oxCNTs@GPEI5K (43.2% αντί για 32.1% και 15.1% αντί για 10.6%, αντίστοιχα) λόγω της υψηλότερης περιεκτικότητας GPEI25K στο τελικό υβριδικό υλικό. Τέλος, παρατηρείται μια μείωση της έντασης στην κορυφή 286.9 eV, η οποία αποδίδεται στους δεσμούς C-O-C/C=N. Η μείωση της έντασης που παρατηρείται οφείλεται στην αλληλεπίδραση των εποξειδικών ομάδων του oxCNTs με τις γουανιδίνες των GPEIs.

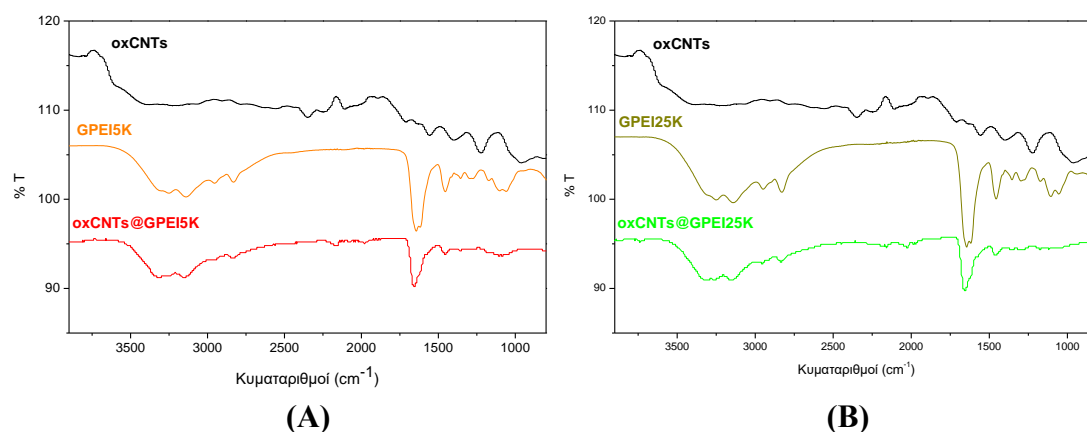


Σχήμα 5.7: Φάσματα XPS υψηλής ανάλυσης C1s (A, B) και N1s (C, D) των oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K.

Όσο αφορά τα υψηλής ανάλυσης φάσματα XPS του αζώτου (Σχήμα 5.7 C,D), και στα δύο υβριδικά υλικά, παρατηρείται μια συνολική μετατόπιση της τάξεως 0.8 eV – 1 eV και για τις τρεις κορυφές, σε σύγκριση με το αντίστοιχο φάσμα N1s των GPEIs (Σχήμα 5.4 C,D). Η μετατόπιση αυτή οφείλεται στη συνεργιστική αλληλεπίδραση

ηλεκτροστατικών δυνάμεων και δεσμών υδρογόνου μεταξύ των οξυγονούχων ομάδων των oxCNTs και γουανιδικών ομάδων των GPEIs.

Στη συνέχεια, οι χημικές δομές oxCNTs@GPEIs χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία υπερύθρου FTIR και τα αντίστοιχα φάσματα δίνονται στο Σχήμα 5.8.

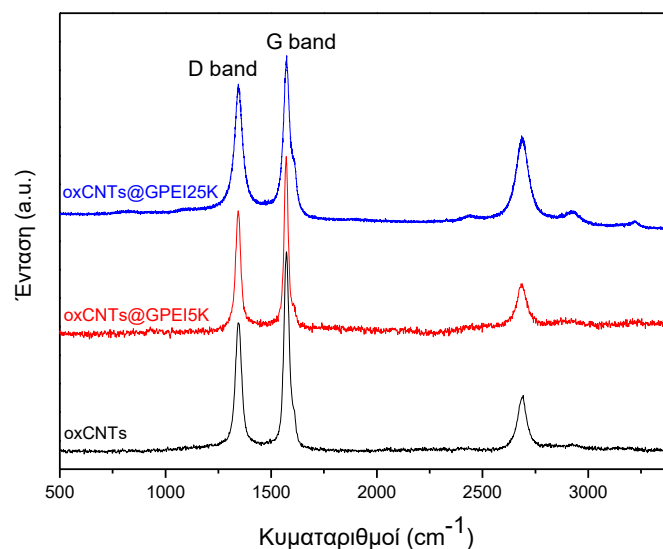


Σχήμα 5.8: Φάσματα FTIR των: (A) oxCNTs, GPEI5K και oxCNTs@GPEI5K και (B) oxCNTs, GPEI25K και oxCNTs@GPEI25K.

Στο φάσμα των oxCNTs (Σχήμα 5.8) φαίνονται οι δονήσεις έκτασης C=C στα 1550 cm⁻¹, η οποία αποδίδεται στη γραφική δομή των νανοσωλήνων. Επιπλέον, η παρουσία των οξυγονούχων ομάδων (καρβοξυλικών, καρβονυλικών, υδροξυλικών και εποξειδικών ομάδων) στην επιφάνεια των νανοσωλήνων επιβεβαιώνεται από την εμφάνιση των κορυφών στα: (α) 1740 cm⁻¹ (ταινία δόνησης έκτασης C=O), (β) 3370 cm⁻¹ (ευρεία ταινία δόνησης έκτασης OH), (γ) 1100 cm⁻¹ (ταινία δόνησης έκτασης C-OH) και (δ) 1565 και 1380 cm⁻¹ (ταινίες αντισυμμετρικών και συμμετρικών δονήσεων έκτασης των καρβοξυλικών ανιόντων, αντίστοιχα) [14]. Από την άλλη πλευρά, στα FTIR φάσματα των δύο γουανιδιωμένων πολυμερών (GPEI5K, GPEI25K) παρουσιάζονται οι χαρακτηριστικές ταινίες λόγω των δονήσεων τάσης των πρωτοταγών και δευτεροταγών αμινομάδων στα 3260 and 3140 cm⁻¹, ενώ στα 1644 και 1619 cm⁻¹ παρατηρούνται οι συμμετρικές και αντισυμμετρικές δονήσεις των γουανιδικών ομάδων (C=N), αντίστοιχα. Επίσης, οι κορυφές στα 2950 και 2830 cm⁻¹ αποδίδονται στις αντισυμμετρικές και στις συμμετρικές δονήσεις έκτασης του CH₂, αντίστοιχα, ενώ η κορυφή στα 1455 cm⁻¹ στις δονήσεις κάμψης του CH₂. Επιπλέον, η παρουσία των κορυφών στα 1105 και 1050 cm⁻¹ αποδίδεται στις αντισυμμετρικές και συμμετρικές δονήσεις του C-N, αντίστοιχα [15]. Συγκρίνοντας τα φάσματα των oxCNTs και των GPEIs με τα αυτά των υβριδικών υλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K είναι εμφανής η ύπαρξη των

χαρακτηριστικών κορυφών τόσο των oxCNTs όσο και των GPEIs στα φάσματα των τελικών προϊόντων, υποδηλώνοντας την επιτυχή αλληλεπίδρασή τους.

Η επιτυχής τροποποίηση των νανοσωλήνων άνθρακα πιστοποιήθηκε επίσης και με φασματοσκοπία Raman. Τα φάσματα των oxCNTs καθώς και των τροποποιημένων υλικών δίνονται στο Σχήμα 5.9.

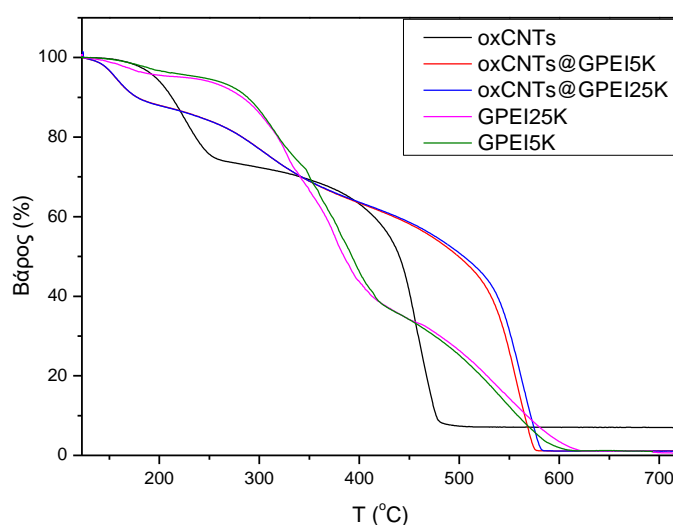


Σχήμα 5.9: Φάσματα Raman των oxCNTs, oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K.

Όπως φαίνεται σε όλα τα φάσματα εμφανίζονται δύο έντονες γραφίτικές ταινίες στα 1345 cm^{-1} και 1585 cm^{-1} . Η ταινία στα 1585 cm^{-1} , γνωστή και ως G-ταινία, προκύπτει από σκέδαση Raman 2ης τάξης, και αποδίδεται στις πλεγματικές ταλαντώσεις των δεσμών C–C ενός καλά οργανωμένου γραφίτικού πλέγματος, ενώ η ταινία στα 1345 cm^{-1} , γνωστή και ως D-ταινία, οφείλεται στην παρουσία ατελειών στο sp^2 δίκτυο του άνθρακα που οφείλονται είτε στην παρουσία άμορφου άνθρακα σε αυτό είτε σε ελαττώματα, όπως κενά ή άλλου είδους άτομα που υποκαθιστούν πλεγματικές θέσεις, τα οποία μειώνουν την κρυσταλλική συμμετρία του. Επίσης, στα 2700 cm^{-1} παρατηρείται η G'-ταινία, η οποία είναι η δευτέρας τάξης αρμονική της D-ταινίας. Είναι ευρέως γνωστό ότι η ένταση της D-ταινίας σχετίζεται με το μέγεθος των δομικών ατελειών στο γραφίτικό πλέγμα και ο λόγος της σχετικής έντασης των D- και G-ταινιών (I_D/I_G) χρησιμοποιείται ευρέως ως δείκτης της κρυσταλλικής τάξης των νανοσωλήνων άνθρακα και επομένως αποτελεί μέτρο για τον προσδιορισμό της έκτασης των ατελειών που μπορεί να προκύψουν μετά από την χημική ή φυσική τροποποίηση τους [16]. Όσο μεγαλύτερος είναι ο λόγος I_D/I_G , τόσο περισσότερες ατέλειες υπάρχουν στο γραφίτικό πλέγμα. Έτσι προσδιορίστηκε ο λόγος I_D/I_G από τα

φάσματα Raman (Σχήμα 5.9) και παρατηρήθηκε ότι μετά την τροποποίηση των νανοσωλήνων με τα GPEIs ο λόγος I_D/I_G για τα oxCNTs αυξάνεται λίγο από 0.73 σε 0.81 και 0.92 για το oxCNTs@GPEI5K και για το oxCNTs@GPEI25K, αντίστοιχα. Αυτό υποδηλώνει ότι τα GPEIs παράγωγα έχουν επιτυχώς προσδεθεί γύρω από τα πλευρικά τοιχώματα των oxCNTs, χωρίς όμως να προκαλέσουν σημαντική μεταβολή στη γραφική δομή τους.

Επιπλέον πληροφορίες σχετικά με την παρουσία των γουανιδιωμένων πολυμερών στα τελικά υβριδικά υλικά λαμβάνονται και με την τεχνική της θερμοβαρυσμικής ανάλυσης (TGA).



Σχήμα 5.10: Καμπύλες θερμοβαρυσμικής ανάλυσης (TGA) των oxCNTs, των GPEIs και των oxCNTs@GPEIs.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.10, στην καμπύλη απώλειας βάρους των oxCNTs παρατηρούνται δύο περιοχές θερμοκρασιών όπου ανιχνεύεται απώλεια βάρους. Στην πρώτη περιοχή θερμοκρασιών 100–240 °C, παρατηρείται ~20% απώλεια βάρους σε σχέση με το αρχικό, το οποίο οφείλεται στη θερμική υποβάθμιση λόγω καύσης των οξυγονούχων λειτουργικών ομάδων που υπάρχουν στην επιφάνεια των oxCNTs, ενώ η θερμική υποβάθμιση σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 350 °C αποδίδεται στη θερμική αποδόμηση του γραφίτικού πλέγματος. Από την άλλη πλευρά, στις καμπύλες TGA των υβριδικών υλικών (oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K), παρατηρείται αρχικά μια μικρή απώλεια βάρους της τάξης του ~10% σε θερμοκρασίες μέχρι 300 °C, ενώ στη συνέχεια μια μεγαλύτερη απώλεια βάρους της τάξης του ~30% στην περιοχή των 300-400 °C, η οποία οφείλεται τόσο στην απομάκρυνση των οξυγονούχων ομάδων των oxCNTs, όσο και στην μερική θερμική

αποδόμηση των GPEIs. Επιπλέον, η θερμική υποβάθμιση των υβριδικών υλικών σε θερμοκρασίες πάνω από 400 °C δεν οφείλεται μόνο στην αποδόμηση του γραφιτικού πλέγματος αλλά και στη θερμική καταστροφή των GPEIs. Τέλος, σε θερμοκρασίες πάνω από τους 550 °C παρατηρείται μια απότομη απώλεια βάρους, η οποία δείχνει την ολική αποδόμηση του γραφιτικού πλέγματος. Είναι προφανές από τα ανωτέρω αποτελέσματα, ότι η παρουσία των GPEIs στην επιφάνεια οxCNTs καθυστερεί τη θερμική αποδόμηση των νανοσωλήνων άνθρακα, γεγονός που αποτελεί άλλη μια απόδειξη της επιτυχούς τροποποίησης των οxCNTs με τα GPEIs.

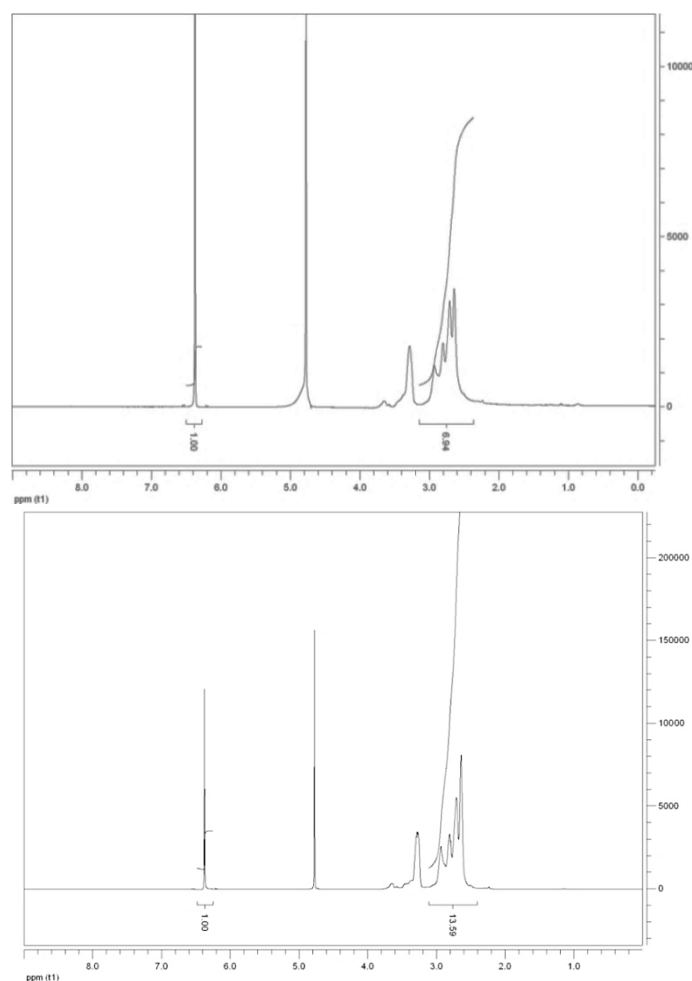
Δυστυχώς με τη χρήση της θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης δεν μπορούμε να προσδιορίσουμε ακριβώς την ποσότητα του πολυμερούς πάνω στους νανοσωλήνες, παρά μόνο να εξάγουμε ποιοτικά αποτελέσματα, διότι λαμβάνει χώρα ταυτόχρονη θερμική αποδόμηση τόσο των οxCNTs όσο και των GPEIs. Προκειμένου λοιπόν να αξιολογηθεί και να επιβεβαιωθεί η παρουσία των GPEIs στα υβριδικά υλικά, εφαρμόζεται η φασματοσκοπία ^1H NMR χρησιμοποιώντας μηλεϊνικό οξύ ως εσωτερικό πρότυπο [17]. Από τα φάσματα ^1H NMR των οxCNTs@GPEI5K και οxCNTs@GPEI25K (Σχήμα 5.11), επιβεβαιώνεται η παρουσία των GPEIs στα υβριδικά υλικά, αφού οι κορυφές στα 3.25 ppm και 2.70-2.50 ppm αποδίδονται αποκλειστικά στα πρωτόνια των GPEIs. Συγκρίνοντας τα ολοκληρώματα των κορυφών στα: (α) 6.35 ppm, που αποδίδονται στα πρωτόνια των CH ομάδων του μηλεϊνικού οξέος και (β) 2.70-2.50 ppm που αποδίδονται στα πρωτόνια των CH₂ ομάδων του σκελετού της PEI, βρέθηκε ότι κατά μέσο όρο 32 μmol (0,214 g) GPEI5K και 8.5 μmol (0.284 g) GPEI25K συνδέθηκαν με 1 g οxCNTs@GPEI5K και οxCNTs@GPEI25K υβριδικού υλικού, αντίστοιχα.

Στη συνέχεια έγιναν μετρήσεις στοιχειακής ανάλυσης όλων των υλικών, οι οποίες επιβεβαίωσαν τα παραπάνω αποτελέσματα. Με βάση τη βιβλιογραφία και λαμβάνοντας υπόψη ότι το ποσοστό του αζώτου στα τροποποιημένα οxCNTs προέρχεται σχεδόν αποκλειστικά από τα GPEIs [18, 19], προσδιορίστηκε η ποσότητα των GPEIs πάνω στους οξειδωμένους νανοσωλήνες, χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο:

$$\text{GPEI (\% w/w)} = (N_s - N_{\text{oxCNTs}}) / (N_{\text{GPEI}} - N_{\text{oxCNTs}}) * 100$$

όπου, N_s , N_{GPEI} και N_{oxCNTs} , είναι το κλάσμα στοιχειακής μάζας του αζώτου για το υβριδικό υλικό, το GPEI και τα οxCNTs, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της στοιχειακής ανάλυσης συνοψίζονται στον Πίνακα 5.2. Σύμφωνα με αυτά, βρέθηκε ότι

τα ποσοστά των GPEIs στα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K είναι 22.7 και 27.5 % w/w, αντίστοιχα, τα οποία συμφωνούν και με τα αυτά που υπολογίστηκαν από τη φασματοσκοπία ^1H NMR.



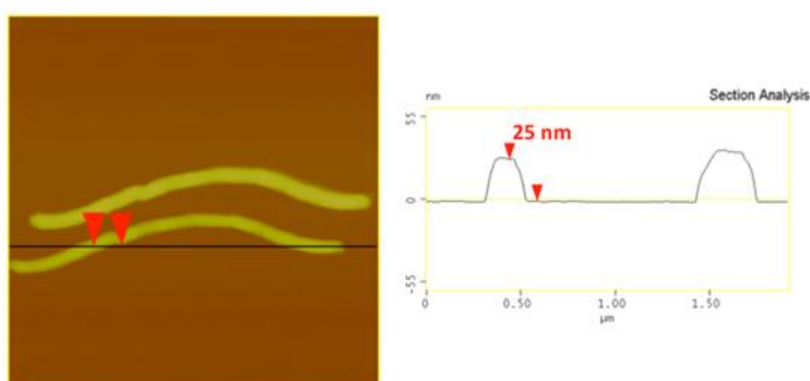
Σχήμα 5.11: Φάσματα ^1H NMR των oxCNTs@GPEI5K (πάνω) και oxCNTs@GPEI25K (κάτω) συμπεριλαμβανομένου του μηλεϊνικού οξέος.

Πίνακας 5.2: Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης των oxCNTs, GPEIs και oxCNTs@GPEIs και υπολογισμός εξ αυτών των ποσοστών GPEI στα oxCNTs.

Υλικό	Στοιχειακή ανάλυση (% w/w)			GPEI (% w/w)
	C	H	N	
oxCNTs	91.52	1.86	0.23	
GPEI5K	35.63	10.26	32.32	
oxCNTs@GPEI5K	69.54	2.08	7.51	22.7%
GPEI25K	38.19	8.52	33.56	
oxCNTs@GPEI25K	59.29	1.51	9.40	27.5 %

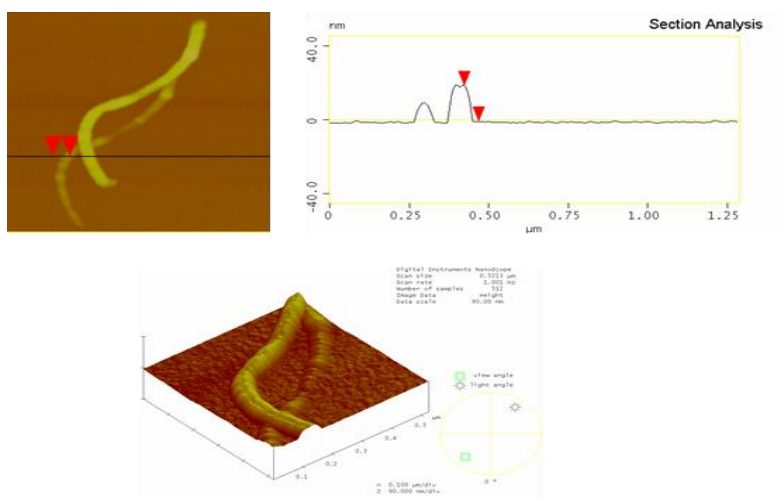
Η μορφολογία των υβριδικών υλικών μελετήθηκε με μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων (AFM), ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) και ηλεκτρονική μικροσκοπία διερχόμενης δέσμης υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRTEM).

Οι εικόνες AFM των oxCNTs αλλά και των υβριδικών υλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, λαμβάνονται αφού πρώτα διασπαρθούν τα νανοϋλικά σε μεθανόλη και στη συνέχεια τοποθετηθούν πάνω σε υπόστρωμα πυριτίου (Si-wafer) όπου και αφήνεται να εξατμισθεί η μεθανόλη. Όπως φαίνεται στις Εικόνες 5.3, 5.4 και 5.5 μπορούμε να διακρίνουμε τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των oxCNTs στη νανοκλίμακα πριν και μετά την αλληλεπίδρασή τους με τα πολυμερή.

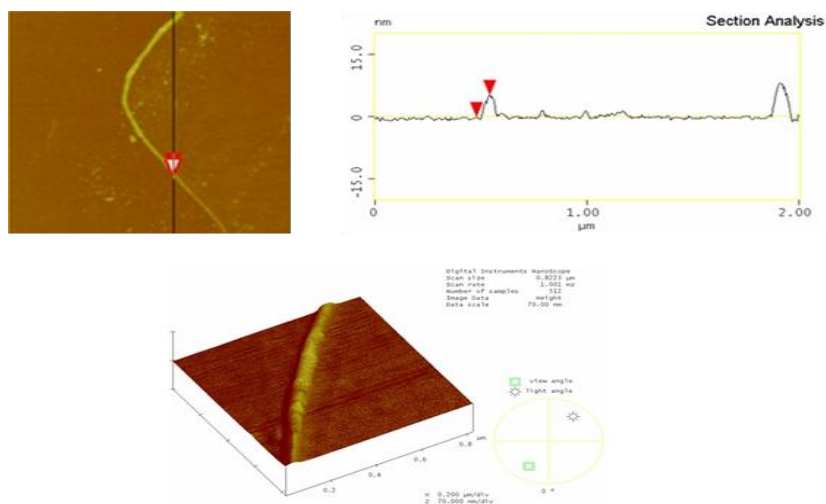


Εικόνα 5.3: Εικόνα AFM των oxCNTs.

Αρχικά, από την Εικόνα 5.3 μπορούμε να διακρίνουμε τους νανοσωλήνες, αλλά και να υπολογιστεί η μέση διάμετρος των οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα πριν την τροποποίηση τους με τα πολυμερή, η οποία είναι μεταξύ 15 και 25 nm. Στη συνέχεια στις Εικόνες 5.4 και 5.5 φαίνονται τα υβριδικά υλικά στα οποία έχουν επιτυχώς προσδεθεί τα πολυμερή στα τοιχώματα των oxCNTs.



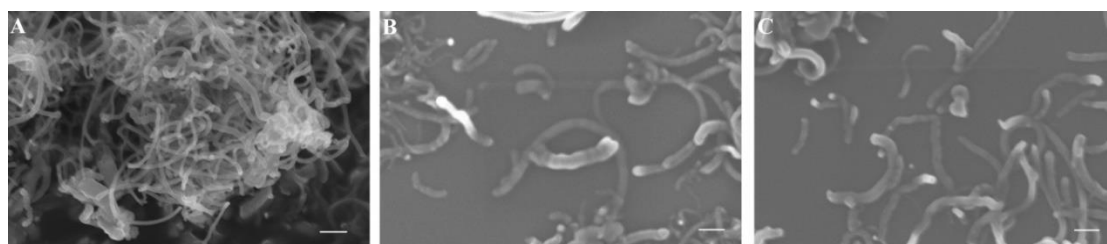
Εικόνα 5.4 Εικόνες AFM των oxCNTs@GPEI5K.



Εικόνα 5.5: Εικόνες AFM των oxCNTs@GPEI25K.

Από την τοπογραφική τομή του oxCNTs@GPEI5K (Εικόνα 5.4) προκύπτει ότι υπάρχει μια επικάλυψη, της τάξεως των 0.10-0.13 μm, στα πλευρικά τοιχώματα των νανοσωλήνων. Αντίστοιχη επικάλυψη υπάρχει και στα τοιχώματα του oxCNTs@GPEI25K (Εικόνα 5.5). Παράλληλα, από τις παραπάνω εικόνες AFM διαπιστώνεται πως η μέση διάμετρος των υβριδικών υλικών είναι περίπου 30-40 nm. Η αύξηση της μέσης διαμέτρου στα τροποποιημένα υλικά δηλώνει την επιτυχή πρόσδεση των πολυμερών στα τοιχώματα των oxCNTs.

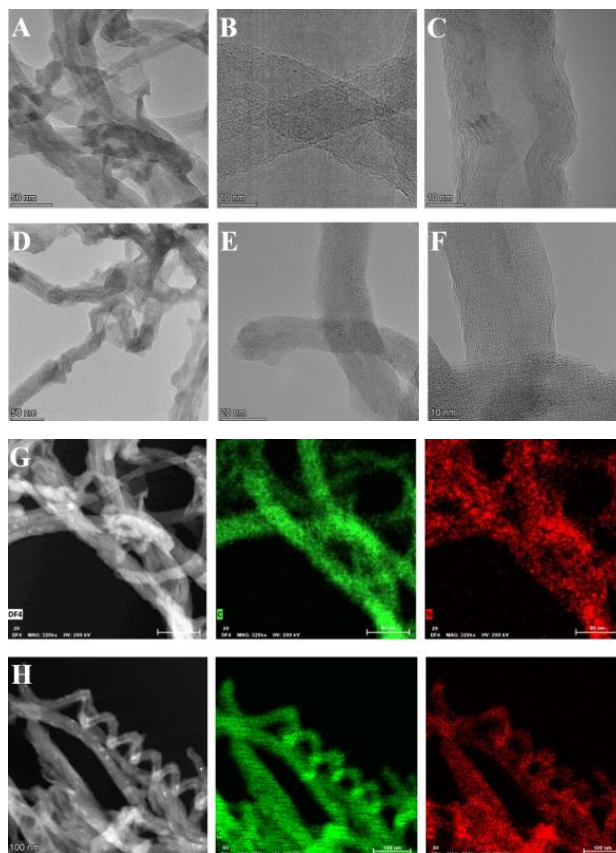
Στη συνέχεια οι οξειδωμένοι νανοσωλήνες άνθρακα και τα υβριδικά υλικά μελετήθηκαν μορφολογικά με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM), όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.6.



Εικόνα 5.6: Εικόνες SEM των oxCNTs (A), oxCNTs@GPEI5K (B) και oxCNTs@GPEI25K (C). Η κλίμακα είναι 200 nm.

Στην Εικόνα 5.6 (A) οι οξειδωμένοι νανοσωλήνες άνθρακα εμφανίζονται «μπλεγμένοι» μεταξύ τους, ενώ κάποιοι από αυτούς σχηματίζουν συσσωματώματα. Αντιθέτως, στις Εικόνες 5.6 (B,C) των τροποποιημένων νανοσωλήνων άνθρακα με τα πολυμερή παρόλο που η μορφολογία τους δεν άλλαξε ιδιαίτερα, φαίνονται να είναι καλύτερα διασπαρμένοι, ενώ δεν υπάρχουν συσσωματώματα. Επιπλέον, η επιφάνεια των τοιχωμάτων των υβριδικών υλικών δεν φαίνεται να είναι τόσο λεία, όσο στην

περίπτωση των oxCNTs, αποδεικνύοντας την επιτυχή τροποποίηση των πλευρικών τοιχωμάτων των νανοσωλήνων με τα πολυμερή.



Εικόνα 5.7: Εικόνες TEM υψηλής ανάλυσης των oxCNTs@GPEI5K (A, B, C) και oxCNTs@GPEI25K (D, E, F) και σκοτεινού πεδίου των oxCNTs@GPEI5K (G) και oxCNTs@GPEI25K (H) συνοδευόμενες από τις εικόνες χαρτογράφησης κατανομής άνθρακα (πράσινο) και αζώτου (κόκκινο) των αντίστοιχων περιοχών.

Επίσης, η μορφολογία των τροποποιημένων νανοσωλήνων με τα γουανιδιωμένα πολυμερή, αλλά και η παρουσία των GPEIs πάνω στους οξειδωμένους νανοσωλήνες αξιολογήθηκαν συνδυάζοντας εικόνες υψηλής ανάλυσης και σκοτεινού πεδίου συνοδευόμενες από τις εικόνες χαρτογράφησης κατανομής άνθρακα και αζώτου των αντίστοιχων περιοχών. Από την Εικόνα 5.7 (A-F) μπορούμε να παρατηρήσουμε την γραφική δομή των τοιχωμάτων των oxCNTs, οι οποίοι είναι πλήρως καλυμμένοι από ένα άμορφο στρώμα πολυμερούς. Επίσης η παρουσία των GPEIs πάνω στους νανοσωλήνες, αποδεικνύεται και με τον προσδιορισμό της χωρικής κατανομής του άνθρακα και του αζώτου από τις εικόνες χαρτογράφησης κατανομής των στοιχείων (Εικόνα 5.7 (G-H)). Από τις εικόνες αυτές είναι προφανές ότι τα oxCNTs καλύπτονται ομοιόμορφα από τα GPEIs, αφού το άζωτο (κόκκινο) που προέρχεται αποκλειστικά από το GPEI, είναι ομοιόμορφα κατανεμημένο στην ίδια θέση όπου

ανιχνεύεται και ο άνθρακας (πράσινο). Από τα παραπάνω αποτελέσματα, βεβαιώνεται η επιτυχής σύνδεση των GPEIs με τα γραφικά τοιχώματα των oxCNTs.

5.1.1.3 Χαρακτηρισμός των υδατικών διασπορών των υβριδικών υλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K

Η επιτυχής τροποποίηση των oxCNTs με τα GPEIs επιβεβαιώθηκε επίσης από την αύξηση της ικανότητας των oxCNTs να διασπαρθούν σε υδατικά μέσα. Έτσι παρασκευάστηκαν υδατικές διασπορές των oxCNTs, oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K σε συγκέντρωση 1.0 mg/mL και παρατηρήθηκαν επί 6 μήνες. Στην Εικόνα 5.8 παρουσιάζονται οι υδατικές διασπορές μετά από έκθεση σε υπερήχους (A), έπειτα από 1 μήνα ηρεμίας (B) και μετά από 6 μήνες ηρεμίας (C).

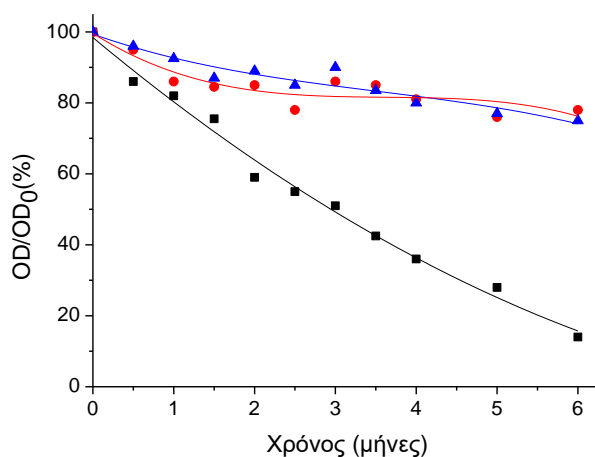


Εικόνα 5.8: Διασπορές των oxCNTs (1), oxCNTs@GPEI5K (2) και oxCNTs@GPEI25K (3) σε νερό (1 mg/mL) αμέσως μετά τους υπερήχους (A), μετά από παραμονή σε ηρεμία για 1 μήνα (B) και για 6 μήνες (C).

Είναι προφανές ότι η υδατική σταθερότητα των oxCNTs είναι χαμηλή, καθώς τα oxCNTs έχουν αρχίσει να συσσωματώνονται μετά από ένα μήνα από τη διαδικασία κατεργασίας με υπερήχους, ενώ μετά από 6 μήνες παρατηρείται ότι έχουν πλήρως καταβυθιστεί. Η συμπεριφορά αυτή οφείλεται στην έντονη τάση τους να συσσωματώνονται σε υδατικά διαλύματα, λόγω της υψηλής επιφανειακής τους ενέργειας [20].

Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για τη βελτίωση της ικανότητας διασποράς των νανοσωλήνων σε υδατικά μέσα, όπως η τροποποίηση της επιφάνειάς τους χρησιμοποιώντας διάφορες διεργασίες οξείδωσης [21] ή η διασπορά τους σε υδατικά διαλύματα που περιέχουν διάφορα επιφανειοδραστικά [22, 23] ή πολυμερή [24-26] σε υψηλές συγκεντρώσεις, αλλά παρόλα αυτά οι προκύπτουσες διασπορές ήταν σταθερές μόνο για μικρό χρονικό διάστημα. Στην παρούσα εργασία, θετικά φορτισμένα, γουανιδιωμένα παράγωγα της PEI χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να τροποποιήσουν τους αρνητικώς φορτισμένους νανοσωλήνες άνθρακα μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, δεσμών υδρογόνου και δυνάμεων van der Waals, λαμβάνοντας έτσι oxCNTs διακοσμημένα με θετικά φορτισμένες ομάδες τα

οποία μπορούν να διασπαρθούν επιτυχώς σε υδατικά μέσα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.8 οι υδατικές διασπορές και των δύο υβριδικών υλικών παραμένουν σταθερές μετά από έξι μήνες από τη διαδικασία κατεργασίας με υπερήχους, εφόσον δεν παρατηρείται σχηματισμός συσσωματωμάτων, αλλά ούτε και καθίζηση. Η βελτιωμένη ιδιότητα διασποράς των υβριδικών υλικών αποδίδεται στην παρουσία των ομάδων της γουανιδίνης στην επιφάνεια των οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα, οι οποίες ενισχύουν την υδροφιλικότητα των νανοσωλήνων, παρέχοντας υψηλή υδατική συμβατότητα, με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η συσσωμάτωση των οxCNTs, λόγω ηλεκτροστατικών απωθήσεων. Συνεπώς, τα παραγόμενα υβριδικά υλικά (οxCNTs@GPEI5K και οxCNTs@GPEI25K) διασπείρονται ομοιόμορφα σε υδατικά μέσα, λόγω της παρουσίας των υδρόφιλων ομάδων στην επιφάνεια των οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα.



Σχήμα 5.12: Μελέτη σταθερότητας των υδατικών διασπορών (1 mg/mL) των οxCNTs (μαύρο), οxCNTs@GPEI5K (κόκκινο) και οxCNTs@GPEI25K (μπλε) χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία UV-vis.

Στο Σχήμα 5.12 μελετάται η σταθερότητα των υλικών χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία UV-vis. Όπως είναι ήδη γνωστό από τη βιβλιογραφία, τα καλώς διασπαρμένα CNTs, σε αντίθεση με τα συσσωματωμένα CNTs, απορροφούν στην περιοχή UV-vis και εμφανίζουν μια χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης στα 263 nm [27]. Έτσι, είναι δυνατόν να διερευνηθεί η ικανότητα διασποράς τους με φασματοσκοπία UV-vis. Αναλυτικά, στο Σχήμα 5.12 φαίνεται η μείωση της οπτικής πυκνότητας (OD) των υδατικών διασπορών των οxCNTs και των υβριδικών παραγώγων, συναρτήσει του χρόνου. Είναι πολύ φανερό ότι οι υδατικές διασπορές των οxCNTs@GPEI5K και οxCNTs@GPEI25K παραμένουν σταθερές τουλάχιστον για 6 μήνες, εφόσον οι οπτικές πυκνότητές τους μειώθηκαν μόνο κατά 20%, σε

σύγκριση με την αρχική οπτική πυκνότητα OD₀. Αντιθέτως, η οπτική πυκνότητα της υδατικής διασποράς των oxCNTs μειώθηκε κατά 90% μετά από το πέρασμα 6 μηνών από τη διαδικασία κατεργασίας με υπερήχους. Αυτό οφείλεται στη σταδιακή συσσωμάτωση των oxCNTs και τελικά στην καθίζηση τους. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με την οπτική παρατήρηση της Εικόνας 5.8. Εξ όσων γνωρίζουμε, η υδατική σταθερότητα που επετεύχθη μετά την τροποποίηση των oxCNTs με GPEIs, η οποία είναι κρίσιμη παράμετρος για ένα σύστημα χορήγησης φαρμάκων, είναι μία από τις υψηλότερες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

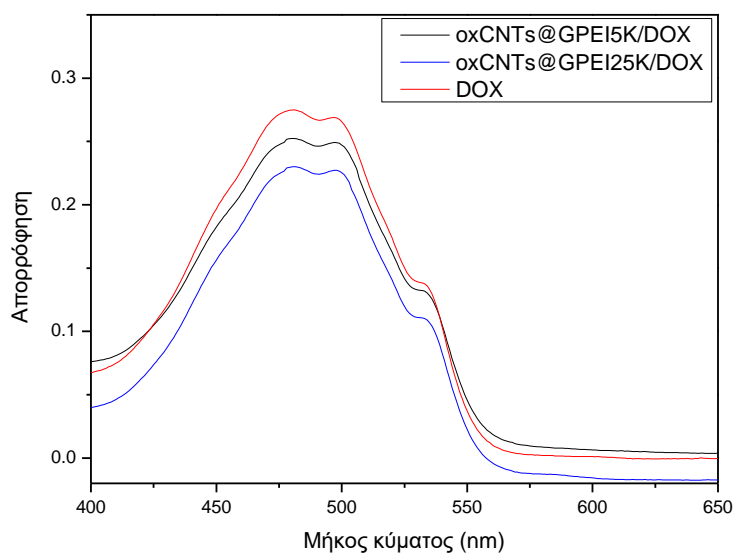
Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε μέτρηση ζ-δυναμικού σε όλα τα δείγματα όπου πιστοποιείται, για ακόμα μια φορά, η επιτυχής τροποποίηση των νανοσωλήνων άνθρακα με τα γουανιδιωμένα πολυμερή. Όπως ήταν αναμενόμενο η τιμή του ζ-δυναμικού της διασποράς των oxCNTs σε pH=7.0 ήταν $-30.6_{\pm 1.4}$ mV, λόγω των επιφανειακών αρνητικών φορτίων που υπάρχουν στην επιφάνεια τους. Αντιθέτως, μετά την τροποποίηση, οι τιμές του ζ-δυναμικού των υδατικών διασπορών των oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K αυξήθηκαν σε υψηλά θετικές τιμές, $+50.4_{\pm 0.8}$ mV και $+54.9_{\pm 0.8}$ mV, αντίστοιχα. Η αύξηση των τιμών υποδηλώνει την επιτυχή τροποποίηση των oxCNTs με τις θετικά φορτισμένες ομάδες της γουανιδίνης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι διασπορές που έχουν τιμές ζ-δυναμικού μεγαλύτερες από +30 mV, είναι πολύ σταθερές, λόγω της ηλεκτροστατικής απόθησης που προκαλείται από το πολύ υψηλό επιφανειακό φορτίο, το οποίο εμποδίζει τη συσσωμάτωση των σωματιδίων, όπως στην περίπτωση μας [28].

5.1.1.4 Δέσμευση δοξορουβικίνης στα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K

Για την αξιολόγηση και τη μελέτη των υβριδικών νανοϋλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K ως νανοφορείς αντικαρκινικών φαρμάκων χρησιμοποιήθηκε η δοξορουβικίνη (DOX), ένα φάρμακο της ομάδας των ανθρακυκλινών. Η δοξορουβικίνη, είναι ένα από τα πιο αποτελεσματικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα τα οποία χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία πολλών τύπων καρκίνου [29]. Ένα από τα σοβαρότερα μειονεκτήματα της μακρόχρονης αντικαρκινικής θεραπείας είναι η ανθεκτικότητα της σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες. Συνεπώς, η επαναλαμβανόμενη χορήγηση της DOX οδηγεί αφενός στη δημιουργία καρκινικών όγκων ανθεκτικών στο φάρμακο και αφετέρου στην αυξημένη κυτταροτοξικότητα έναντι των φυσιολογικών κύτταρων [30]. Επιπλέον μια από τις πιο κοινές

παρενέργειες της δοξορουβικίνης είναι η καρδιοτοξικότητα. Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές έρευνες, οι οποίες στοχεύουν στον περιορισμό των παρενεργειών της DOX, διατηρώντας ή ενισχύοντας τη θεραπευτική της δράση.

Η δέσμευση της DOX πραγματοποιήθηκε υπό βασικές συνθήκες (pH=9) με απλή ανάμιξη των υδατικών διασπορών oxCNTs@GPEIs με υδατικό διάλυμα DOX σε αναλογίες 1:1 και 1:2. Το ποσοστό της δεσμευμένης DOX στα oxCNTs@GPEIs και η απόδοση της δέσμευσης στα oxCNTs@GPEIs προσδιορίστηκαν φασματοσκοπικά χρησιμοποιώντας UV-vis και υπολογίστηκαν με βάση τις εξισώσεις (4.1) και (4.2) οι οποίες βρίσκονται στο κεφάλαιο 4.9.1 (Σχήμα 5.13).

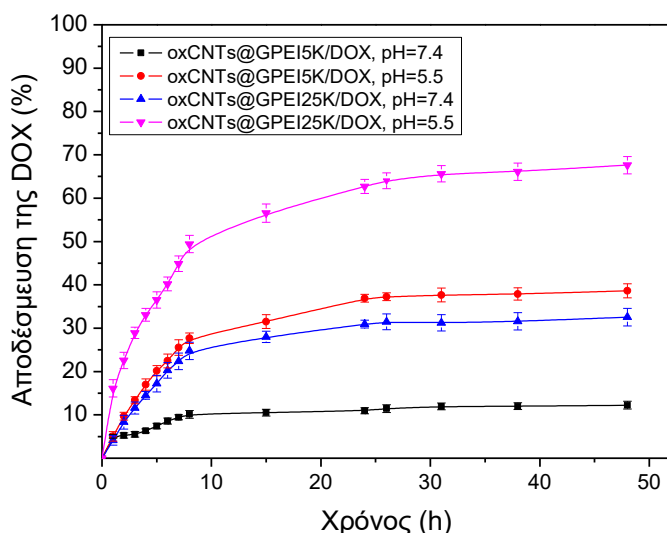


Σχήμα 5.13: Φάσματα απορρόφησης της ελεύθερης DOX (κόκκινο) και της μη δεσμευμένης στα oxCNTs@GPEI5K (μαύρο) και oxCNTs@GPEI25K (μπλε).

Το ποσοστό δεσμευμένης DOX στα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K είναι 43.0% και 62.5%, αντίστοιχα, και η απόδοση της δέσμευσης της DOX είναι 77.1% και 98.6%, αντίστοιχα, όταν η αρχική συγκέντρωση της DOX είναι 1 mg/mL. Αυξάνοντας την αρχική συγκέντρωση της DOX σε 2 mg/mL, η απόδοση της δέσμευσης αυξάνεται σε 78.7% για το oxCNTs@GPEI5K και 99.5% για το oxCNTs@GPEI25K, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά δέσμευσης της DOX είναι 44.5% και 51.7%. Πρέπει να σημειωθεί ότι υπό παρόμοιες πειραματικές συνθήκες το ποσοστό της δέσμευσης της DOX στα oxCNTs ήταν πολύ χαμηλότερο (35% και 47%, όταν η αρχική συγκέντρωση της DOX ήταν 1 και 2 mg/mL, αντίστοιχα) συγκρινόμενο με το αντίστοιχο ποσοστό των oxCNTs@GPEIs. Αυτό αποδίδεται οφείλεται στην παρουσία των GPEIs στα τοιχώματα των oxCNTs, καθώς είναι

γνωστό ότι τα δενδριτικά πολυμερή και τα παράγωγά τους μπορούν να εγκλείσουν αποτελεσματικά διάφορα δραστικά μόρια όπως είναι η δοξορουβικίνη [31, 32].

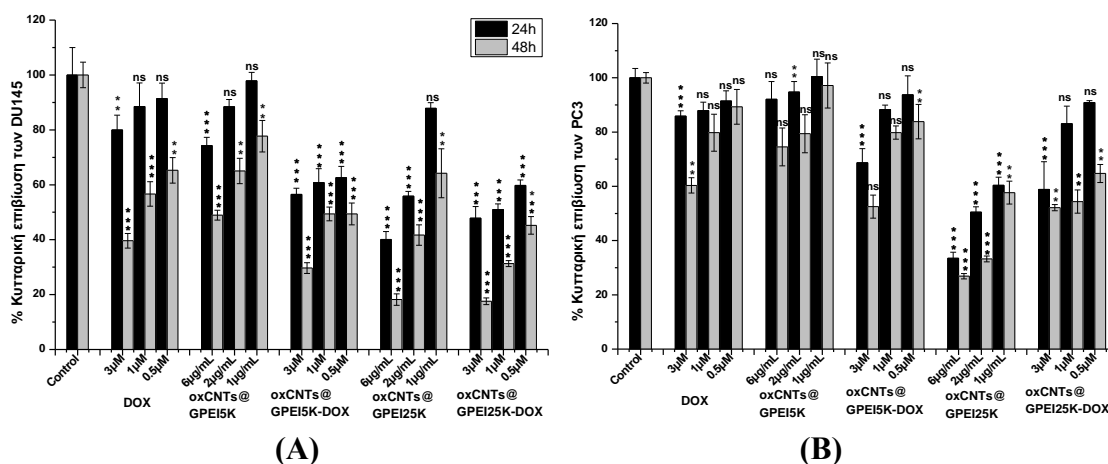
Επιπλέον, η *in vitro* αποδέσμευση της DOX από τα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K μελετήθηκε σε δύο διαφορετικές συνθήκες pH, στο 7.4 και στο 5.5, με σκοπό την προσομοίωση των φυσιολογικών συνθηκών και του λυσοσωμικού περιβάλλοντος [33], αντίστοιχα. Στο Σχήμα 5.14 παρατηρείται η αποδέσμευση της DOX και από τα δύο υβριδικά υλικά σε pH = 7.4 και 5.5. Όπως φαίνεται, μόνο το 10% και το 27% της δεσμευμένης DOX αποδεσμεύτηκε σε φυσιολογικό pH (pH = 7.4) με σχεδόν γραμμικό ρυθμό από τα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, αντίστοιχα, κατά τις 8 πρώτες ώρες, ενώ στη συνέχεια η αποδέσμευση ήταν πιο αργή, καθώς περίπου 2% και 10% της δεσμευμένης DOX αποδεσμεύτηκε από τα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, αντίστοιχα, στις επόμενες 40 ώρες. Αντιθέτως, η DOX αποδεσμεύτηκε από τα δύο νανοϋλικά με πολύ ταχύτερο ρυθμό σε όξινο περιβάλλον (pH = 5.5). Συγκεκριμένα, το 27% (oxCNTs@GPEI5K) και το 50% (oxCNTs@GPEI25K) της δεσμευμένης DOX αποδεσμεύτηκε με σταθερό ρυθμό στις 8 πρώτες ώρες, ενώ στη συνέχεια η απελευθέρωση ήταν πιο ήπια, δεδομένου ότι περίπου 12% (oxCNTs@GPEI5K) και 17% (oxCNTs@GPEI25K) της δεσμευμένης DOX αποδεσμεύτηκε στις επόμενες 40 ώρες. Επίσης, από το Σχήμα 5.14, είναι εμφανές ότι η DOX αποδεσμεύεται από το oxCNTs@GPEI25K με σημαντικά ταχύτερο ρυθμό σε σχέση με το oxCNTs@GPEI5K και στα δύο εξεταζόμενα pH. Είναι γνωστό ότι η DOX αποπρωτονιώνεται μερικώς σε φυσιολογικό pH, εφόσον είναι ασθενής βάση (pKa = 8.2–8.3) [34], γεγονός που ευνοεί τις π-π αλληλεπιδράσεις με τα MWCNTs [35, 36]. Επομένως, σε αυτό το pH, η DOX παραμένει δεσμευμένη στους νανοφορείς, ενώ αντιθέτως, στο ελαφρώς όξινο περιβάλλον (pH = 5.5) υπερισχύει η πρωτονιωμένη μορφή της DOX, προκαλώντας τη γρήγορη απελευθέρωσή της. Ανάλογα αποτελέσματα αναφέρονται και από άλλες ερευνητικές ομάδες [36, 37], για παρόμοιες συνθήκες pH που προσομοιάζουν το περιβάλλον του όγκου ή το μικροπεριβάλλον των ενδοκυττάρων λυσοσωμάτων. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η DOX απελευθερώθηκε από τους τροποποιημένους νανοσωληνούς άνθρακα με σημαντικά πιο αργό ρυθμό σε φυσιολογικό pH, συγκρινόμενο με το ήπια όξινο pH. Επομένως, αναμένεται η DOX να μην αποδεσμεύεται στους φυσιολογικούς ιστούς αφού θα παραμένει δεσμευμένη στους νανοφορείς, ενώ να απελευθερώνεται στοχευμένα στους καρκινικούς όγκους, όπου το εξωκυττάριο περιβάλλον τους είναι ελαφρώς όξινο.



Σχήμα 5.14: Αποδέσμευση της DOX από τα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K σε pH = 7.4 και 5.5.

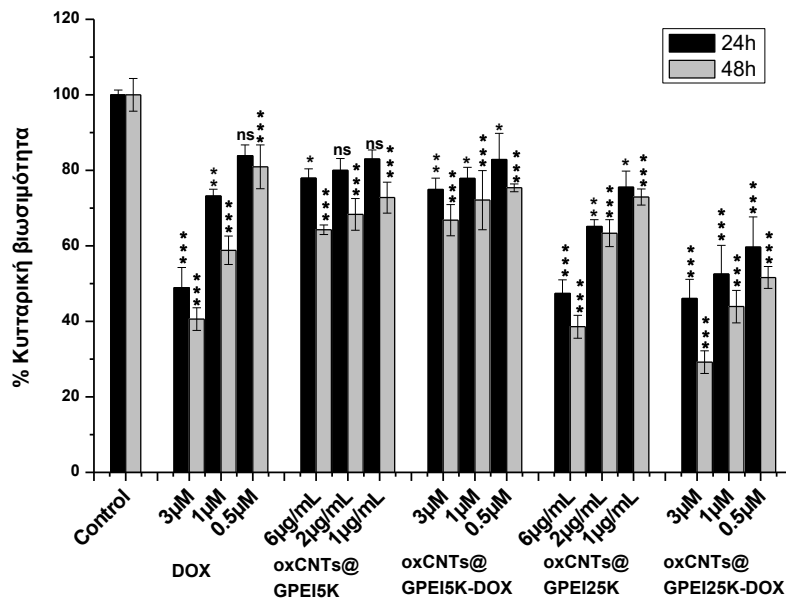
5.1.1.5 Βιολογική μελέτη των υβριδικών υλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K με δεσμευμένη δοξορουβικίνη (DOX)

Η αντικαρκινική δράση της δεσμευμένης DOX στα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K μελετήθηκε σε δύο ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές του προστάτη, τις DU145 και PC3, οι οποίες είναι γνωστό ότι εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην DOX [38-40]. Παράλληλα, η δράση της μελετήθηκε και στη μη καρκινική σειρά HEK293, η οποία έχει ως προέλευση ανθρώπινο εμβρυϊκό νεφρικό ιστό. Έτσι, η κυτταροτοξικότητα της δεσμευμένης DOX στα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K αξιολογήθηκε στις παραπάνω κυτταρικές σειρές σε σύγκριση με την ελεύθερη DOX με την ευρέως χρησιμοποιούμενη, από τη βιβλιογραφία, μέθοδο του MTT. Για τον κυτταροτοξικό έλεγχο, οι τρεις κυτταρικές σειρές επώαστηκαν παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων δεσμευμένης DOX (oxCNTs@GPEI5K/DOX και oxCNTs@GPEI25K/DOX), ελεύθερης DOX και νανοϋλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, για τρεις ώρες και στη συνέχεια ακολούθησε ο προσδιορισμός της επιβίωσης των κυττάρων μετά από 24 και 48 ώρες επώασης. Σε αυτά τα πειράματα η συγκέντρωση της ελεύθερης και της δεσμευμένης DOX ήταν 0.5, 1 και 3 μM . Επίσης, σε όλα τα πειράματα, οι συγκεντρώσεις των υβριδικών νανοϋλικών (oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K) ήταν 1, 2 και 6 $\mu\text{g/mL}$. Τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικότητας δίνονται στο Σχήμα 5.15 και 5.16.



Σχήμα 5.15: Βιωσιμότητα των DU145 (A) και PC3 (B) ύστερα από επώαση με διάφορες συγκεντρώσεις των νανοφορέων oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, της ελεύθερης DOX και της δεσμευμένης DOX στους νανοφορείς (oxCNTs@GPEI5K/DOX, oxCNTs@GPEI25K/DOX) για 3 h. Η επιβίωση των κυττάρων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT ύστερα από 24 και 48 ώρες μετά την επώαση. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$ και χωρίς στατιστική σημασία (ns), $p > 0.05$.**

Με βάση το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρήθηκε ότι η ελεύθερη DOX μετά από επώαση 24 ωρών δεν παρουσιάζει κάποια σημαντική διαφορά στην τοξικότητα ανάμεσα στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές, καθώς επίσης ότι δεν δείχνει να είναι και ιδιαίτερα τοξική στα καρκινικά κύτταρα αφού στη μεγαλύτερη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση (3 μM) η κυτταροτοξικότητα είναι γύρω στο 10-20% (80-90% κυτταρική επιβίωση). Αντιθέτως, η ελεύθερη DOX, μετά από επώαση 48 ωρών, φαίνεται να έχει μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα στα DU145 (~ 40% κυτταρική βιωσιμότητα στη μεγαλύτερη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση, 3 μM), σε σύγκριση με τα, πιο ανθεκτικά στην DOX, κύτταρα PC3 (~60% κυτταρική επιβίωση στην ίδια συγκέντρωση, 3 μM). Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με την τοξικότητα της DOX έναντι των κυττάρων DU145 και PC3, όπου έχει βρεθεί ότι τα DU145 είναι πιο ευαίσθητα στην DOX σε σύγκριση με τα PC3 [41]. Από την άλλη πλευρά, όταν η DOX είναι δεσμευμένη πάνω στον φορέα oxCNTs@GPEI5K η βιωσιμότητα των DU145 κυττάρων μειώνεται αρκετά, όσο αυξάνεται η συγκέντρωση, με μέγιστη θνησιμότητα ~ 70% μετά από 48h επώαση (30% κυτταρική επιβίωση). Αντιθέτως, όταν κύτταρα PC3 επώαστηκαν παρουσία δεσμευμένης DOX στα oxCNTs@GPEI5K (oxCNTs@GPEI5K/DOX), η κυτταρική βιωσιμότητα επηρεάστηκε κυρίως στις μεγάλες συγκεντρώσεις (~50% κυτταρική επιβίωση στη μεγαλύτερη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση της DOX, 3 μM).



Σχήμα 5.16: Βιωσιμότητα της μη καρκινικής κυτταρικής σειράς HEK293 ύστερα από επώαση με διάφορες συγκεντρώσεις των νανοφορέων oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, της ελεύθερης DOX και της δεσμευμένης DOX στους νανοφορείς (oxCNTs@GPEI5K/DOX, oxCNTs@GPEI25K/DOX) για 3 h. Η επιβίωση των κυττάρων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT ύστερα από 24 και 48 ώρες μετά την επώαση. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$ και χωρίς στατιστική σημασία (ns), $p > 0.05$.**

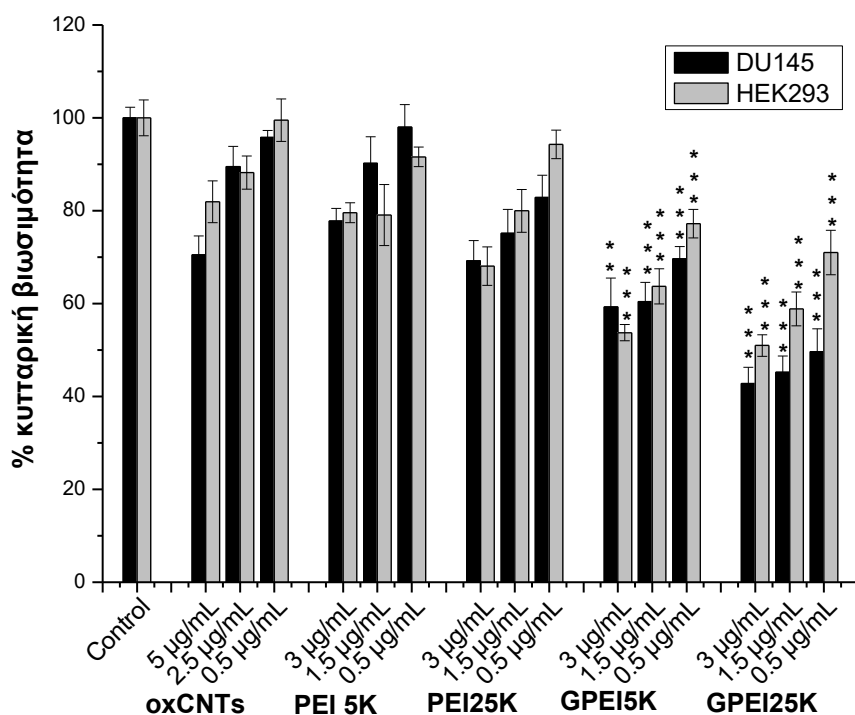
Στο Σχήμα 5.16, σε αντίθεση με τα καρκινικά κύτταρα, η βιωσιμότητα των μη καρκινικών κυττάρων HEK293, παρουσία ελεύθερης DOX, φαίνεται ότι μειώνεται σημαντικά τόσο ύστερα από επώαση 24 ωρών, όσο και 48 ωρών (~ 40–50% κυτταρική επιβίωση στη μεγαλύτερη συγκέντρωση DOX, 3 μM), αποτέλεσμα το οποίο συμφωνεί με τη βιβλιογραφία [42]. Αντιθέτως, η δεσμευμένη DOX στα oxCNTs@GPEI5K (oxCNTs@GPEI5K/DOX) δεν παρουσιάζει σχεδόν καθόλου τοξικότητα τόσο μετά από επώαση 24 ωρών, όσο και 48 ωρών έναντι των μη καρκινικών κυττάρων HEK293 (~75–80% κυτταρική επιβίωση στη μεγαλύτερη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση ως προς την DOX, 3 μM). Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η δραστηριότητα της DOX αυξάνεται σημαντικά και ειδικότερα στα καρκινικά κύτταρα όταν είναι δεσμευμένη στα oxCNTs@GPEI5K. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως το oxCNTs@GPEI5K δεν εμφάνισε σχεδόν καθόλου κυτταροτοξικότητα στη μη καρκινική σειρά αλλά και στις καρκινικές κυτταρικές σειρές (~75 % κυτταρική επιβίωση στη μεγαλύτερη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση, 6 $\mu\text{g/mL}$, μετά από 48 h επώαση). Συνεπώς συμπεραίνεται ότι ο νανοφορέας

oxCNTs@GPEI5K μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα ασφαλές σύστημα για μεταφορά φαρμάκων.

Επιπλέον, με βάση τα Σχήματα 5.15 και 5.16 και όσον αφορά το σύστημα oxCNTs@GPEI25K/DOX, παρατηρήθηκε πως η δεσμευμένη DOX εμφανίζει μεγάλη κυτταροτοξικότητα σε όλες τις κυτταρικές σειρές και κυρίως στα κύτταρα DU145 και HEK293 μετά από 48 h επώαση. Σε αντίθεση με το oxCNTs@GPEI5K, ύστερα από επώαση των κυττάρων με το oxCNTs@GPEI25K για 24 h και 48 h, η βιωσιμότητα όλων των κυτταρικών σειρών μειώνεται σημαντικά με τρόπο εξαρτώμενο της συγκέντρωσης. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, συμπεραίνεται ότι ο νανοφορέας oxCNTs@GPEI25K είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί σε βιολογικές εφαρμογές, αλλά μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις όπου εμφανίζει σχετικά χαμηλή τοξικότητα (~60% επιβίωση των DU145 και PC3, ~80% επιβίωση των HEK293 στη συγκέντρωση 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ μετά από 48 h επώαση).

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί, περαιτέρω, αν η κυτταροτοξικότητα του φορέα oxCNTs@GPEI25K δεν οφείλεται στην παρουσία των oxCNTs ή του GPEI25K, αλλά στον συνδυασμό τους, μελετήθηκε μεμονωμένα η τοξικότητα των oxCNTs και των GPEIs στα κύτταρα DU145 σε συγκεντρώσεις ανάλογες με αυτές που περιέχονται στα oxCNTs@GPEIs. Έτσι, στο Σχήμα 5.17, παρατηρείται ότι τα oxCNTs εμφανίζουν χαμηλή τοξικότητα μετά από επώαση 24 h (~70% κυτταρική επιβίωση στη μέγιστη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε). Ανάλογα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία, όπου βρέθηκε ότι τα oxCNTs εμφανίζουν αντίστοιχη κυτταροτοξικότητα έναντι διάφορων τύπων καρκινικών κυττάρων, η οποία οφείλεται στην καταστροφή της κυτταρικής τους μεμβράνης και στην αύξηση του οξειδωτικού στρες που οδηγεί στην πρόκληση κυτταρικής απόπτωσης [43-45]. Αξιοσημείωτο είναι ότι και τα δύο πολυμερή GPEI5K και GPEI25K εμφανίζουν σημαντική κυτταροτοξικότητα (50% και 60% κυτταρική επιβίωση σε συγκεντρώσεις σχεδόν ίδιες με εκείνες που περιέχονται στα 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ των oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, αντίστοιχα, δηλαδή 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), με το GPEI25K να είναι περισσότερο κυτταροτοξικό. Συγκρίνοντας τις τοξικότητες και των δύο γουανιδιωμένων παραγώγων GPEIs με αυτές των αρχικών πολυμερών PEIs, είναι εμφανές πως και τα δύο GPEIs εμφανίζουν μεγαλύτερη τοξικότητα. Αυτό είναι πιθανόν να οφείλεται στην αποτελεσματική εισαγωγή τους στα κύτταρα, καθώς όπως είναι γνωστό, πολυμερή που φέρουν γουανιδικές ομάδες προλαμβάνονται αποτελεσματικότερα από τα κύτταρα σε σχέση με τα αντίστοιχα πολυμερή που

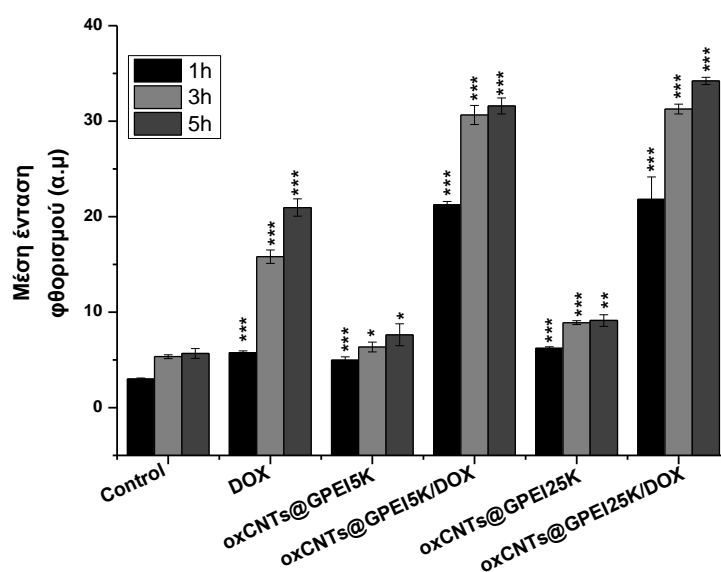
φέρουν αμινομάδες [3-5, 46-48]. Ως εκ τούτου, η κυτταροτοξικότητα των oxCNTs@GPEIs είναι δυνατόν να αποδοθεί στο συνδυασμό και των δύο συστατικών (oxCNTs και GPEIs). Επιπλέον, η τοξικότητα του oxCNTs@GPEI25K εμφανίζεται μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή του oxCNTs@GPEI5K, καθώς περιέχει περισσότερο πολυμερές (27.5% στο oxCNTs@GPEI25K αντί 22.7% στο oxCNTs@GPEI5K).



Σχήμα 5.17: Βιωσιμότητα της μη καρκινικής κυτταρικής σειράς HEK293 και της καρκινικής σειράς DU145 ύστερα από επώαση με διάφορες συγκεντρώσεις των oxCNTs, GPEI5K και GPEI25K και των αρχικών πολυμερών PEI5K και PEI25K για 3 h. Η επιβίωση των κυττάρων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο MTT ύστερα από 24 μετά την επώαση. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο t-test, όπου ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$.**

Στη συνέχεια μελετήθηκε η πρόσληψη της ελεύθερης και της δεσμευμένης DOX από τα κύτταρα με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής όπου προσδιορίστηκε ποσοτικά η κυτταρική πρόσληψη της DOX, χρησιμοποιώντας το εγγενή φθορισμό της DOX ($\lambda_{em.}=575$ nm και $\lambda_{ex.}=488$ nm). Αναλυτικά, η καρκινική κυτταρική σειρά DU145 και η μη καρκινική κυτταρική σειρά HEK293, επώαστηκαν παρουσία ελεύθερης DOX και DOX δεσμευμένης στα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, καθώς και παρουσία των υβριδικών υλικών, για 1, 3 και 5 ώρες. Στα πειράματα αυτά η συγκέντρωση της DOX ήταν 1 μ M και των υβριδικών νανοϋλικών 2 μ g/mL. Στη συνέχεια, τα κύτταρα συλλέχθηκαν και ακολούθησε μέτρηση της μέσης έντασης

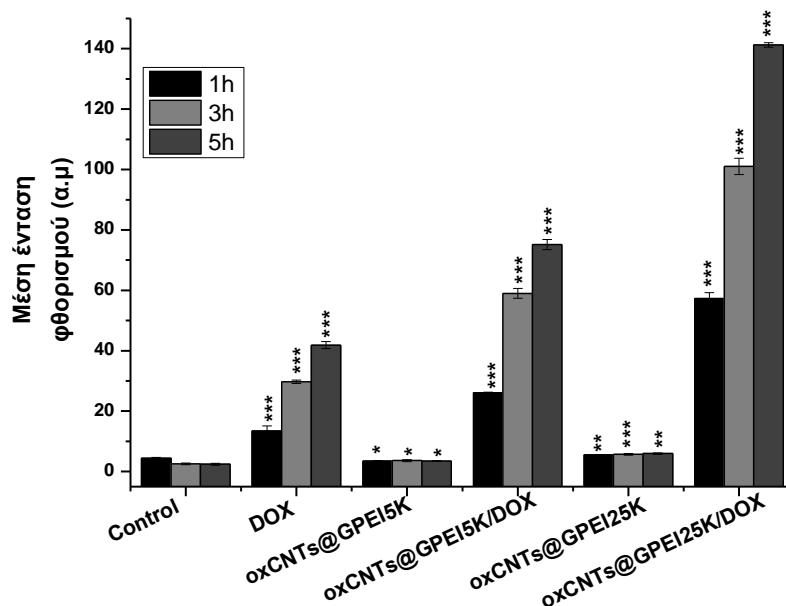
φθορισμού της DOX που έχει προσληφθεί από τα κύτταρα, όπως φαίνεται στα Σχήματα 5.18 και 5.19.



Σχήμα 5.18: Κυτταρική πρόσληψη της DOX σε κύτταρα DU145 με κυτταρομετρία ροής. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ελεύθερη DOX και δεσμευμένη DOX στους νανοφορείς oxCNTs@GPEI5K ή oxCNTs@GPEI25K καθώς και με τους νανοφορείς για 1, 3, 5 h. Η συγκέντρωση της DOX σε όλα τα πειράματα ήταν 1 μ M, ενώ η αντίστοιχη συγκέντρωση των νανοφορέων ήταν 2 μ g/mL. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$.**

Με βάση τα Σχήματα 5.18 και 5.19 διαπιστώνεται πως η κυτταρική πρόσληψη της DOX αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου είτε αυτή είναι σε ελεύθερη μορφή, είτε σε δεσμευμένη. Επιπλέον, η κυτταρική πρόσληψη της δεσμευμένης DOX και στα δύο υβριδικά υλικά φαίνεται να είναι μεγαλύτερη από αυτή της ελεύθερης DOX. Συγκεκριμένα, όταν κύτταρα DU145 επωαστούν με τα συστήματα oxCNTs@GPEI5K/DOX και oxCNTs@GPEI25K/DOX για 3 h (συγκέντρωση 1 μ M ως προς την DOX), η κυτταρική πρόσληψη της δεσμευμένης DOX εμφανίζεται διπλάσια από αυτή της ελεύθερης DOX. Επίσης, ο φθορισμός των κυττάρων που έχουν επωαστεί με τη δεσμευμένη DOX δεν αλλάζει δραματικά μετά τις 3 h, γεγονός που υποδηλώνει ότι εντός τριών ωρών το μεγαλύτερο ποσοστό της δεσμευμένης DOX έχει εισέλθει στα κύτταρα. Από την άλλη μεριά, με βάση το Σχήμα 5.19, η πρόσληψη της δεσμευμένης DOX από τα μη καρκινικά κύτταρα HEK293, και για τα δύο υβριδικά υλικά, φαίνεται να είναι ακόμα μεγαλύτερη σε σύγκριση με αυτή από τα καρκινικά κύτταρα, αλλά και της ελεύθερης DOX. Συγκεκριμένα, όταν μη καρκινικά κύτταρα HEK293 επωαστούν με δεσμευμένη DOX στα oxCNTs@GPEI5K και

oxCNTs@GPEI25K για 3 h (συγκέντρωση 1 μM ως προς την DOX), η πρόσληψη της δεσμευμένης DOX στα oxCNTs@GPEI5K γίνεται διπλάσια από αυτή της ελεύθερης DOX, ενώ η αντίστοιχη του συστήματος oxCNTs@GPEI25K/DOX είναι πάνω από τρεις φορές μεγαλύτερη. Επιπλέον, παρατηρείται περαιτέρω αύξηση της κυτταρικής πρόσληψης του συστήματος oxCNTs@GPEI25K/DOX με την αύξηση του χρόνου επώασης. Αυτό επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα του κυτταροτοξικού ελέγχου (Σχήματα 5.15 Α και 5.16), όπου το σύστημα oxCNTs@GPEI25K/DOX εμφανίζεται πιο τοξικό από το oxCNTs@GPEI5K/DOX. Τέλος, προκειμένου να πιστοποιηθεί ότι ο φθορισμός που μετρήθηκε οφείλεται αποκλειστικά στην πρόσληψη της DOX, προσδιορίστηκε η ένταση φθορισμού των κυττάρων ύστερα από επώαση τους είτε μόνο με θρεπτικό μέσο, είτε μόνο με τα υβριδικά υλικά oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, στην ίδια συγκέντρωση με την αντίστοιχη των συστημάτων με τη δεσμευμένη DOX, όπου, όπως ήταν αναμενόμενο, βρέθηκε πολύ χαμηλός και σχεδόν ίσος με τον αυτοφθορισμό των κυττάρων.



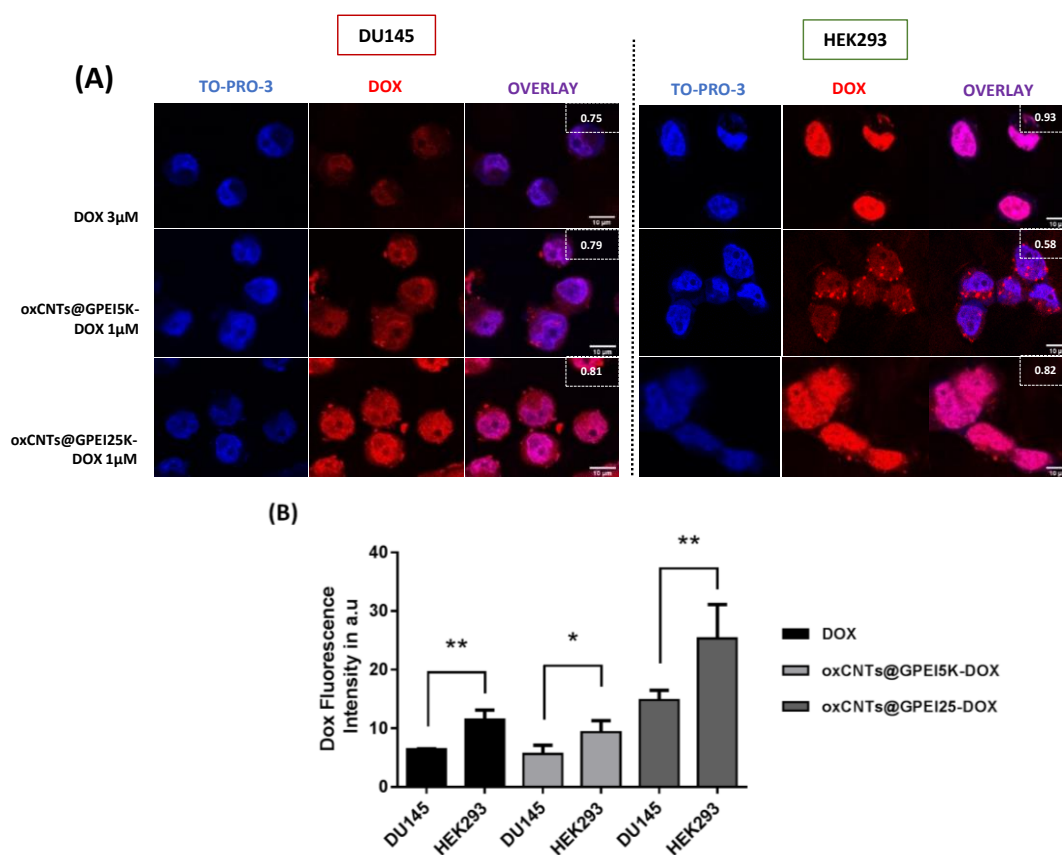
Σχήμα 5.19: Κυτταρική πρόσληψη της DOX σε κύτταρα HEK293 με κυτταρομετρία ροής. Τα κύτταρα επώαστηκαν με ελεύθερη DOX και δεσμευμένη DOX στους νανοφορείς oxCNTs@GPEI5K ή oxCNTs@GPEI25K καθώς και με τους νανοφορείς για 1, 3, 5 h. Η συγκέντρωση της DOX σε όλα τα πειράματα ήταν 1 μM , ενώ η αντίστοιχη συγκέντρωση των νανοφορέων ήταν 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Η κυτταρική πρόσληψη της ελεύθερης και δεσμευμένης DOX μελετήθηκε, επίσης, με την τεχνική της συνεστιακής μικροσκοπίας (confocal microscopy), λόγω του

εγγενούς φθορισμού της DOX. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε ο ενδοκυττάριος εντοπισμός της ελεύθερης και της δεσμευμένης DOX, προσδιορίζοντας το συνολικό φθορισμό της DOX εντός των κυττάρων και πραγματοποιώντας, περαιτέρω, ανάλυση του υποκυττάριου εντοπισμού της, κάνοντας χρήση του συντελεστή συσχέτισης Pearson (Pearson correlation coefficient, PCC). Για τη μελέτη αυτή, επιλέχθηκαν τα καρκινικά κύτταρα DU145 και τα μη καρκινικά κύτταρα HEK293. Σε όλα τα πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας, τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία κατάλληλης συγκέντρωσης DOX, ώστε να αποφευχθεί ο κυτταρικός θάνατος κατά τη διάρκεια του πειράματος. Έτσι, επιλέχθηκε η συγκέντρωση 1 μM για τη δεσμευμένη DOX στους νανοφορείς (oxCNTs@GPEI5K/DOX και oxCNTs@GPEI25K/DOX) και 3 μM για την ελεύθερη DOX. Όπως παρατηρείται στο Σχήμα 5.20, μετά από 3 h επώαση, η DOX έχει εισχωρήσει σε μεγαλύτερο βαθμό στα HEK293 κύτταρα από ότι στα DU145, ανεξαρτήτως αν είναι ελεύθερη ή δεσμευμένη στους νανοφορείς, αποτέλεσμα που συμφωνεί με αυτό της κυτταρομετρίας ροής.

Παρόλο που η δεσμευμένη DOX προλαμβάνεται στις ίδιες συνθήκες περισσότερο από τα μη καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα καρκινικά, αυτό δεν μεταφράζεται απαραίτητα και σε αύξηση της δραστηριότητας της, καθώς τα κύτταρα DU145 είναι περισσότερο ευαίσθητα στη δεσμευμένη DOX από ότι τα κύτταρα HEK293, κυρίως στην περίπτωση του συστήματος oxCNTs@GPEI5K/DOX (Σχήμα 5.15A και Σχήμα 5.16). Από την άλλη πλευρά, η πρόσληψη της ελεύθερης DOX από τα κύτταρα HEK293 συνοδεύεται από υψηλότερη τοξικότητα σε σχέση με τα κύτταρα DU145. Συνεπώς, το ποσοστό πρόσληψη της DOX δεν είναι άμεσα συνδεδεμένο με την αντικαρκινική της δράση, αλλά πιθανότατα σχετίζεται με τον ενδοκυττάριο εντοπισμό της. Πράγματι, όπως φαίνεται από το Σχήμα 5.20, στην περίπτωση των HEK293 κυττάρων η ελεύθερη DOX βρίσκεται εξ' ολοκλήρου στον πυρήνα των κυττάρων (PCC 0.93), ενώ η δεσμευμένη DOX στα oxCNTs@GPEI5K βρίσκεται τόσο στον πυρήνα (PCC 0.58), όσο και στο κυτταρόπλασμα. Αντίθετα, στα κύτταρα DU145, η δεσμευμένη DOX στα oxCNTs@GPEI5K εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων (PCC 0.79), όπως και η ελεύθερη DOX (PCC 0.75). Έτσι, φαίνεται ότι λόγω της έλλειψης υποδοχέων αντοχής σε πολλά φάρμακα, στα μη καρκινικά κύτταρα η ελεύθερη DOX συσσωρεύεται γρήγορα στον πυρήνα των κυττάρων, ενώ η δεσμευμένη DOX παραμένει στα οργανίδια του κυτταροπλάσματος, όπως είναι τα λυσοσώματα και τα ενδοσώματα, καθυστερώντας έτσι την αποδέσμευση της DOX προς τον πυρήνα, όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες έρευνες [42]. Αντίθετα, τα

καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να αποβάλλουν τα αντικαρκινικά φάρμακα, όπως την DOX, οδηγώντας σε ανθεκτικότητα σε αυτά και συνεπώς σε μείωση της τοξικότητάς τους.

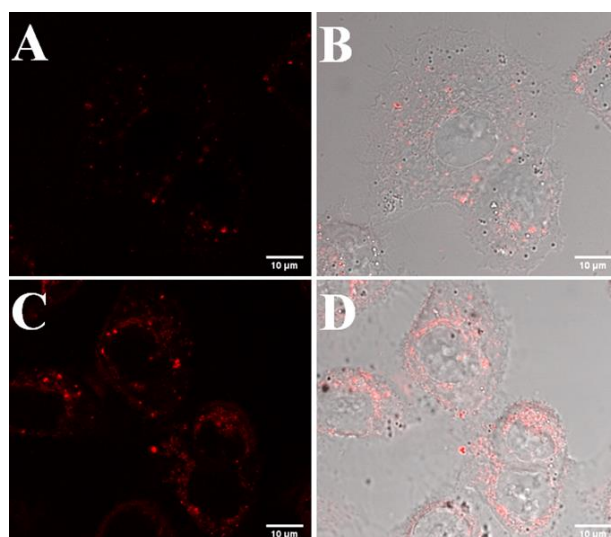


Σχήμα 5.20: Συγκριτική μελέτη της πρόσληψης της DOX από καρκινικά κύτταρα DU145 και μη καρκινικά κύτταρα HEK293, ύστερα από επώαση με ελεύθερη DOX (3 μM) και με τα συστήματα oxCNTs@GPEI5K/DOX και oxCNTs@GPEI25K/DOX (1 μM, ως προς την DOX) για 3 ώρες. (A) Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας που απεικονίζουν την ενδοκυττάρια πρόσληψη της DOX (κόκκινο), τους πυρήνες των κυττάρων (μπλε) καθώς και την υπέρθεση των δύο εικόνων (overlay) με τον αντίστοιχο συντελεστή συσχέτισης Pearson. Η κλίμακα είναι στα 10 μM. (B) Ποσοτικοποίηση της έντασης φθορισμού της DOX στις κυτταρικές σειρές. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Τα παραπάνω αποτελέσματα της κυτταρικής πρόσληψης συμφωνούν με τη βιβλιογραφία όπου η DOX προσλαμβάνεται εντός των κυττάρων, κυρίως μέσω διάχυσης, και στη συνέχεια εντοπίζεται γρήγορα στον πυρήνα όπου ενσωματώνεται στο πυρηνικό DNA [49]. Αντιθέτως, ο κύριος μηχανισμός μεταφοράς των νανοσωματιδίων εντός των κυττάρων είναι η ενδοκύττωση, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η είσοδός τους εντός του πυρήνα [50]. Ειδικότερα, αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι οι καλά διεσπαρμένοι νανοσωλήνες άνθρακα εισχωρούν στα

κύτταρα είτε με ενδοκύττωση είτε άμεσα μέσω της μεμβράνης των κυττάρων και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα [51]. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε και με τα oxCNTs@GPEIs, τα οποία εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.9. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί πως η παρουσία των ομάδων της γουανιδίνης παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική πρόσληψη, αφού όπως είναι γνωστό πολυμερή τροποποιημένα με γουανιδινικές ομάδες προσλαμβάνονται αποτελεσματικότερα από τα κύτταρα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα, πλούσια σε αμινομάδες, πολυμερή. Αυτό συμβαίνει λόγω της ισχυρότερης αλληλεπίδρασης τους με την κυτταρική μεμβράνη και συγκεκριμένα λόγω της αλληλεπίδρασης των ομάδων της γουανιδίνης με τις ανιοντικές ομάδες των συστατικών της κυτταρικής μεμβράνης (π.χ. καρβοξυλικές, φωσφορικές ή θειϊκές ομάδες) μέσω ιοντικών δυνάμεων και δεσμών υδρογόνου [1, 4, 46, 48]. Από την Εικόνα 5.9, φαίνεται επίσης ότι η κυτταρική πρόσληψη του oxCNTs@GPEI25K είναι μεγαλύτερη από αυτή του oxCNTs@GPEI5K, πιθανότατα, αφενός λόγω της μεγαλύτερης περιεκτικότητας του σε GPEI25K και αφετέρου λόγω του μεγαλύτερου μοριακού βάρους του GPEI25K, που ενισχύει την ικανότητά του να διεισδύει στα κύτταρα [3, 47]. Για το λόγο αυτό, η δεσμευμένη DOX προσλαμβάνεται από τα κύτταρα μαζί με τους νανοφορείς και στη συνέχεια απελευθερώνεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Είναι ξεκάθαρο ότι στα καρκινικά κύτταρα, η DOX που αποδεσμεύεται από το νανοφορέα oxCNTs@GPEI5K, ο οποίος όπως αποδείχθηκε ότι εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 5.9), εισέρχεται στον πυρήνα με γρηγορότερο ρυθμό, προκαλώντας μεγαλύτερη τοξικότητα και άρα μεγαλύτερη δραστικότητα της DOX, σε σχέση με τη δραστικότητα της στα μη καρκινικά κύτταρα. Αυτή η εκλεκτικότητα πιθανόν να συνδυάζεται με τη μεγαλύτερη λυσοσωμική ευθραυστότητα των καρκινικών κυττάρων σε σχέση με αυτή των μη καρκινικών κυττάρων [52]. Αναλυτικότερα, σε μια τελευταία μελέτη αποδείχθηκε ότι σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων, νανοσωματίδια που φέρουν θετικές και αρνητικές ομάδες, όπως οι νανοφορείς oxCNTs@GPEIs, συσσωρεύονται ως μεγάλα συσσωματώματα στα λυσοσώματα των καρκινικών κυττάρων μετά από μια σειρά αντιδράσεων συσσωμάτωσης, εξαρτώμενης του pH, εμποδίζοντας, έτσι, τη διαφυγή τους μέσω εξοκυττάρωσης. Αποτέλεσμα αυτού είναι η αύξηση της ωσμωτικής πίεσης μέσα στα λυσοσώματα, η διόγκωση τους, η αύξηση της περατότητας της λυσοσωμικής μεμβράνης και η διάσπαση της, οδηγώντας, τελικά, τα κύτταρα σε θάνατο. Αντιθέτως, τα εν λόγω νανοσωματίδια απομακρύνονται εύκολα από τα μη καρκινικά κύτταρα μέσω

εξωκυττάρωσης, χωρίς να τους προκαλούν κάποια βλάβη [53]. Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με τα παραπάνω, καθώς φαίνεται ότι το σύστημα oxCNTs@GPEI5K/DOX αδυνατεί να διαφύγει από τα λυσοσώματα των καρκινικών κυττάρων, οδηγώντας στην διόγκωσή τους και τελικά στο θάνατο τους, σε αντίθεση με αυτό που συμβαίνει στα μη καρκινικά κύτταρα. Επιπλέον, η μεγαλύτερη δραστικότητα της δεσμευμένης DOX στα oxCNTs@GPEI5K που παρατηρείται στα καρκινικά κύτταρα πιθανόν αποδίδεται στο συνδυασμό της μεγαλύτερης λυσοσωμικής ευθραυστότητας των καρκινικών κυττάρων σε σχέση με αυτή των μη καρκινικών κυττάρων και με το γεγονός ότι η DOX απελευθερώνεται ταχύτερα από το oxCNTs@GPEI5K σε όξινο περιβάλλον, όπως αυτό των λυσοσωμάτων ($\text{pH} \approx 4.8$) [33], από ότι σε φυσιολογικό, όπως αποδείχθηκε από τα πειράματα αποδέσμευσης (Σχήμα 5.14). Αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και σε άλλες μελέτες στη βιβλιογραφία [36, 37].



Εικόνα 5.9: Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας σε καρκινικά κύτταρα DU145 παρουσία των υβριδικών υλικών επισημασμένα με ροδαμίνη. Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία των επισημασμένων oxCNTs@GPEI5K-Rh (A,B) και oxCNTs@GPEI25K-Rh (C,D) σε συγκέντρωση 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ για 3 h. Η κλίμακα είναι στα 10 μM .

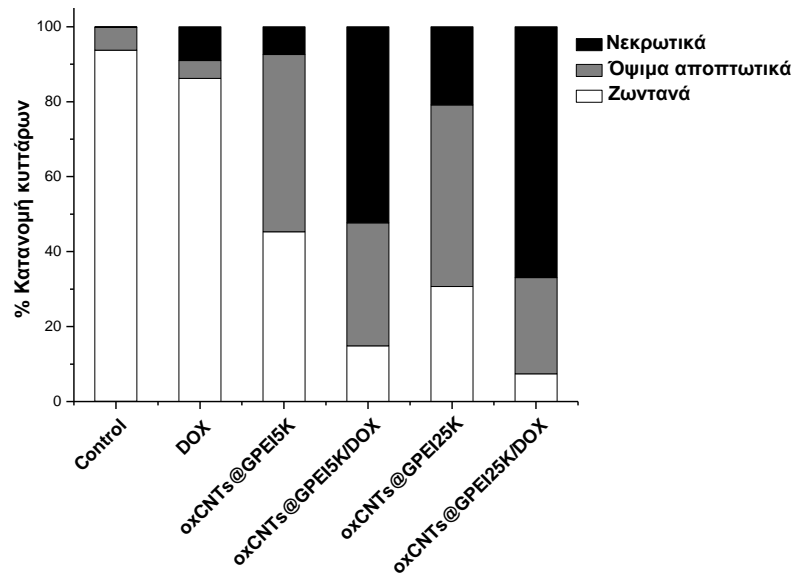
Αντιθέτως, το σύστημα oxCNTs@GPEI25K/DOX δεν εμφανίζει την ίδια εκλεκτικότητα με το oxCNTs@GPEI5K/DOX, αφού προσλαμβάνεται ταχύτατα και από τους δύο τύπους κυττάρων (καρκινικών και μη). Στη συνέχεια, η δεσμευμένη DOX απελευθερώνεται γρήγορα από το νανοφορέα oxCNTs@GPEI25K, ο οποίος εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.9 και τελικά εισέρχεται σχεδόν αποκλειστικά στον πυρήνα των κυττάρων (PCC 0.81 στα DU145

και PCC 0.82 στα HEK293), με αποτέλεσμα να εμφανίζει μεγάλη τοξικότητα, ανεξάρτητα από τον τύπο των κυττάρων. Αυτή η διαφοροποιημένη συμπεριφορά μπορεί να αποδοθεί αφενός στην αυξημένη κυτταρική πρόσληψη του φορέα oxCNTs@GPEI25K, σε σχέση με αυτή του oxCNTs@GPEI5K, και αφετέρου στο σημαντικά ταχύτερο ρυθμό απελευθέρωσης της DOX από το oxCNTs@GPEI25K, σε σχέση με το oxCNTs@GPEI5K, και στα δύο εξεταζόμενα pH, όπως φαίνεται από τα πειράματα αποδέσμευσης (Σχήμα 5.14).

Τέλος, διερευνήθηκε αν η δεσμευμένη DOX στους νανοφορείς προκαλεί αποπτωτικό ή νεκρωτικό θάνατο των κυττάρων DU145. Συγκεκριμένα, καρκινικά κύτταρα DU145 επώαστηκαν για 3 h παρουσία ελεύθερης DOX (1 μ M), δεσμευμένης DOX στα νανοϋλικά oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K (1 μ M, ως προς την DOX) και των υβριδικών υλικών (2 μ g/mL). Στη συνέχεια προσδιορίστηκε ποσοτικά ο αριθμός των ζωντανών (live), των όψιμων αποπτωτικών (late apoptotic) και των νεκρωτικών (necrotic) κυττάρων με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής, μετά από ταυτόχρονη χρώση των κυττάρων με δύο χρωστικές, της 7-αμινο-ακτινομυκίνης D (7-AAD) και της ανεξίνης V τροποποιημένης με φλουοροσκεΐνη (Annexin V-FITC). Η ανεξίνη V είναι μια πρωτεΐνη που συνδέεται κατά προτίμηση με την αρνητικά φορτισμένη φωσφατιδυλοσερίνη της εξωτερικής μεμβράνης, παρουσία ιόντων Ca^{+2} , η οποία μεταφέρεται από την εσωτερική προς την εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, κατά την απόπτωση [54]. Καθώς η αποπτωτική διαδικασία προχωράει, η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης καταστρέφεται. Η 7-AAD είναι μια χρωστική που συνδέεται με το DNA. Όμως λόγω του ότι δεν μπορεί να εισέλθει στα ζωντανά και πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα, χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό μόνο των όψιμων αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων όπου έχει γίνει λύση της κυτταρικής μεμβράνης [55]. Η ταυτόχρονη χρώση των κυττάρων με την ανεξίνη V-FITC (πράσινος φθορισμός σε μήκος κύματος 488 nm) και με τη χρωστική 7-AAD (κόκκινος φθορισμός σε μήκος κύματος 635 με 675 nm), επιτρέπει τη διάκριση των τεσσάρων διαφορετικών κατηγοριών κυττάρων όπως φαίνεται παρακάτω:

- **Ζωντανά κύτταρα (live):** αρνητικά και για τις 2 χρωστικές (FITC-/7-AAD-)
- **Πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα (early apoptotic):** θετικά μόνο για ανεξίνη V-FITC (FITC+/7-AAD-)
- **Όψιμα αποπτωτικά κύτταρα (late apoptotic):** θετικά και για τις 2 χρωστικές (FITC+/7-AAD+).

- **Νεκρωτικά κύτταρα (necrotic cells):** κύτταρα θετικά μόνο για 7-AAD (FITC-/7-AAD+).



Σχήμα 5.21: Ποσοτικός προσδιορισμός των ζωντανών, των όψιμων αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων DU145 ύστερα από επώαση με ελεύθερη και δεσμευμένη DOX, καθώς και των υβριδικών νανοϋλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, για 3 h με τις χρωστικές Annexin V-FITC/7-AAD. Η συγκέντρωση της DOX είναι 1 μ M και η αντίστοιχη συγκέντρωση των νανοφορέων είναι 2 μ g/mL.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.21, μετά από επώαση 3 h με τον νανοφορέα oxCNTs@GPEI25K παρατηρείται ότι ο θάνατος των κυττάρων επέρχεται μέσω απόπτωσης (49%) αλλά και νέκρωσης (21%) σε σύγκριση με τον νανοφορέα oxCNTs@GPEI5K, όπου το ποσοστό νέκρωσης είναι μικρότερο (48% απόπτωση και 7% νέκρωση). Αυτό υποδηλώνει πως το oxCNTs@GPEI25K προκαλεί μεγαλύτερη διαταραχή της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, πιθανότατα λόγω της υψηλότερης περιεκτικότητάς του σε πολυμερές, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα να προσλαμβάνεται αποτελεσματικότερα από τα κύτταρα και άρα εμφανίζει μεγαλύτερη τοξικότητα. Επιπλέον, όταν κύτταρα DU145 επώαστηκαν με δεσμευμένη DOX στους νανοφορείς, παρατηρήθηκαν μεγαλύτερα ποσοστά αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα που επώαστηκαν με ίδια συγκέντρωση ελεύθερης DOX. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι το σύστημα oxCNTs@GPEI25K/DOX προκαλεί υψηλότερα ποσοστά νέκρωσης/απόπτωσης (26% απόπτωση και 67% νέκρωση). Από τα αποτελέσματα στο Σχήμα 5.21 παρατηρείται, επίσης, ότι απουσιάζουν κύτταρα σε πρώιμο αποπτωτικό στάδιο, γεγονός που υποδηλώνει τον έντονο και ανεξέλεγκτο κυτταρικό θάνατο που λαμβάνει χώρα, ο οποίος αποδίδεται στη ταχύτερη

ενδοκύττωση και αποδέσμευση της DOX από τους νανοφορείς. Συνεπώς, η δεσμευμένη DOX στους νανοφορείς είναι ικανή να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο σε μικρό ποσοστό μέσω μηχανισμού απόπτωσης αλλά κυρίως μέσω νέκρωσης, με το σύστημα oxCNTs@GPEI25K/DOX να είναι πιο τοξικό στα κύτταρα σε σύγκριση με το oxCNTs@GPEI5K/DOX.

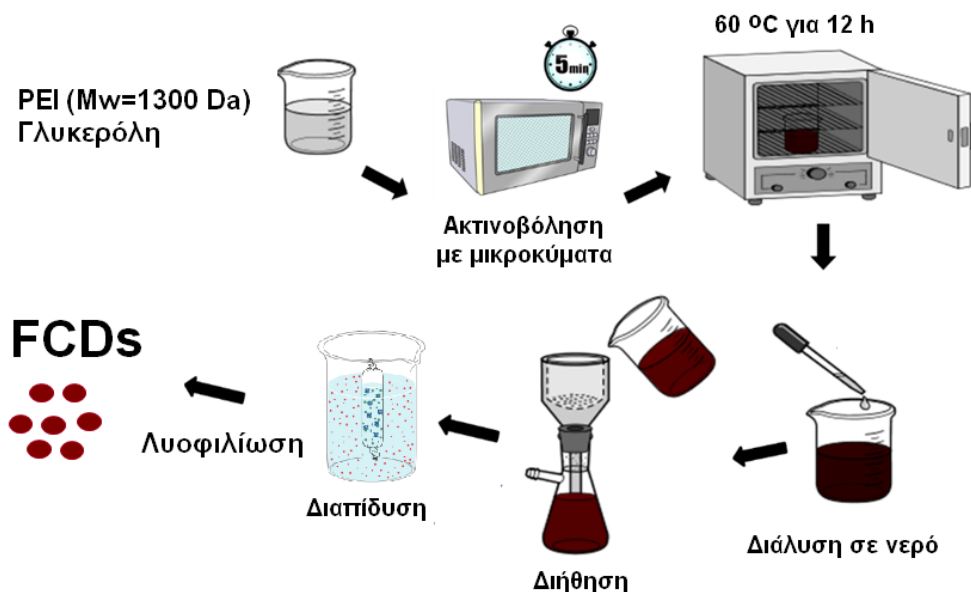
Εν κατακλείδι, γίνεται σαφές ότι, η χορήγηση του συστήματος oxCNTs@GPEI5K/DOX σε καρκινικά και μη καρκινικά κύτταρα οδηγεί σε αυξημένη και εκλεκτική τοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα σε αντίθεση με τα μη καρκινικά, αυξάνοντας σημαντικά τη δραστηριότητα της DOX, σε σύγκριση με την ελεύθερη μορφή της, μέσω ενός γρήγορου και καταστροφικού θανάτου από τον οποίο τα καρκινικά κύτταρα δεν μπορούν να ανακάμψουν. Συμπερασματικά, ο νανοφορέας oxCNTs@GPEI5K είναι ένα αποτελεσματικό σύστημα μεταφοράς της DOX που παρουσιάζει σημαντική εκλεκτική τοξικότητα έναντι των καρκινικών κυττάρων, αποτελώντας ένα ελπιδοφόρο για περαιτέρω μελέτη σύστημα, για την θεραπεία του καρκίνου.

5.1.2 Μελέτη του υβριδικού υλικού oxCNDs@FCDs ως φορέας φαρμάκων

Ποικίλα νανοϋλικά έχουν προταθεί για βιοϊατρικές εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένων των συστημάτων ανίχνευσης, διάγνωσης και θεραπείας. Με βάση τις εφαρμογές αυτές, οι φθορίζουσες τελείες άνθρακα (FCDs) καθώς και άλλα υλικά με βάση τον άνθρακα έχουν αποτελέσει αντικείμενο έρευνας πολλών επιστημονικών ομάδων. Έχει αποδειχθεί ότι τα FCDs είναι φθορίζοντα νανοσωματίδια, ικανά να χρησιμοποιηθούν ως συστήματα ανίχνευσης και μεταφοράς φαρμάκων. Από την άλλη πλευρά, νανοδομημένα υλικά άνθρακα όπως νανοσωλήνες άνθρακα, φουλερένια, γραφένιο κ.α. χρησιμοποιούνται εκτενώς ως φορείς φαρμάκων. Έτσι, στην παρούσα εργασία, μελετήθηκαν τροποποιημένοι νανοδίσκοι άνθρακα, οι οποίοι αντιπροσωπεύουν μια εναλλακτική προσέγγιση του κλασικού γραφενίου, με φθορίζουσες τελείες άνθρακα ως ένα σύστημα ταυτόχρονης ανίχνευσης και μεταφοράς φαρμάκων (theranostics).

5.1.2.1 Σύνθεση και χαρακτηρισμός του υβριδικού υλικού oxCNDs@FCDs

Οι νανοδίσκοι άνθρακα (oxCNDs) παρασκευάζονται μέσω της πυρόλυσης Κνæerner Carbon Black & H₂ (CB&H) [56]. Στην παρούσα εργασία, αρχικά, πραγματοποιήθηκε οξείδωση των oxCNDs, ακολουθώντας τη γνωστή μέθοδο Staudenmaier, όπως έγινε παραπάνω με τους νανοσωλήνες άνθρακα [57]. Χρησιμοποιώντας ως οξειδωτικό μέσο το χλωρικό νάτριο σε ισχυρά όξινο περιβάλλον παραλήφθηκαν νανοδίσκοι άνθρακα τροποποιημένοι με διάφορες λειτουργικές πολικές ομάδες, όπως υδροξυλικές, καρβοξυλικές, εποξειδικές ομάδες, κ.α.. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν FCDs μέσω της ακτινοβόλησης οργανικών ενώσεων με μικροκύματα (Εικόνα 5.10), ακολουθώντας γνωστή από τη βιβλιογραφία συνθετική πορεία [58]. Έτσι χρησιμοποιώντας την υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη μοριακού βάρους 1300 Da ως παράγοντα παθητικοποίησης της επιφάνειας και κιτρικό οξύ ως πηγή άνθρακα σε αναλογία 0.5:1 (w/w), παρασκευάστηκαν FCDs με κβαντική απόδοση 48.5% και περιεκτικότητα σε πρωτοταγείς αμινομάδες 1.18±0.02 mmol NH₂/g.

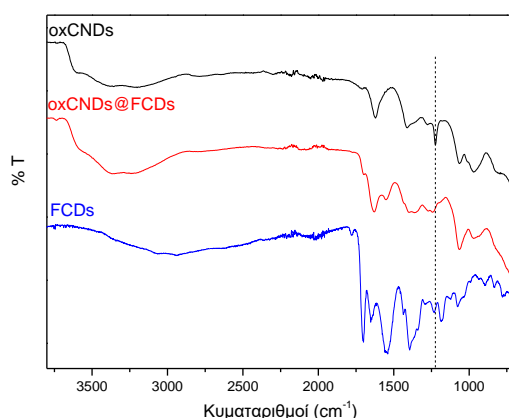


Εικόνα 5.10: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης των φθοριζουσών νανοτελειών άνθρακα.

Ακολούθως, οι πρωτοταγείς αμινομάδες των FCDs αντέδρασαν με τις λειτουργικές ομάδες των νανοδίσκων σε αλκαλικό περιβάλλον, λαμβάνοντας ένα νέο υλικό το oxCNDs@FCDs. Συγκεκριμένα, οι αμινομάδες των FCDs αντιδρούν με τις εποξειδικές ομάδες των oxCNDs μετά από άνοιγμα των δακτυλίων τους σε αλκαλικό περιβάλλον και αφετέρου με τις καρβοξυλικές ομάδες των oxCNDs μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Το προκύπτον υβριδικό υλικό χαρακτηρίστηκε φυσικοχημικά με φασματοσκοπίες FTIR, Raman, XPS και φθορισμού, καθώς και με θερμοβαρυμετρική ανάλυση και περίθλαση ακτίνων-X. Η μορφολογία του μελετήθηκε με μικροσκοπίες SEM και TEM, ενώ το ποσοστό των FCDs στο υβριδικό υλικό προσδιορίστηκε με φασματοσκοπία ^1H NMR χρησιμοποιώντας ως εσωτερικό πρότυπο το μηλεϊνικό οξύ.

Στο Σχήμα 5.22 παρουσιάζονται τα φάσματα FTIR των oxCNDs@FCDs καθώς και των oxCNDs και FCDs. Αναλυτικά, στο φάσμα FTIR των FCDs διακρίνονται μια ευρεία κορυφή με κέντρο τα 3300 cm^{-1} η οποία αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των ομάδων OH και NH, μια κορυφή στα 1705 cm^{-1} που αποδίδεται στη δόνηση τάσης των C=O των καρβοξυλομάδων, καθώς και οι κορυφές στα 1650 , 1545 και 1240 cm^{-1} λόγω των δονήσεων του Αμιδίου I, II και III αντίστοιχα. Οι δονήσεις κάμψης των αμινομάδων πιθανότατα επικαλύπτονται από την κορυφή στα 1650 cm^{-1} , ενώ οι αντίστοιχες δονήσεις κάμψης των ομάδων CH₂ εμφανίζονται στα 1435 cm^{-1} . Η

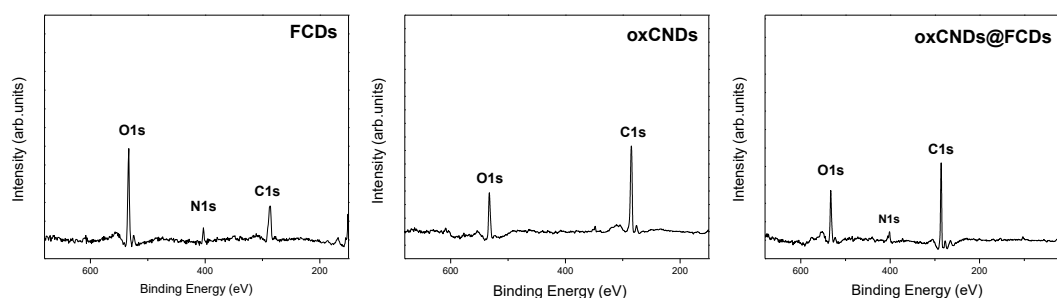
κορυφή στα 1400 cm^{-1} αποδίδεται σε ταινία κάμψης του C-O-H (in plane bending), ενώ και στα 1075 cm^{-1} αποδίδεται σε ταινία τάσης του C-O τριτοταγών υδροξυλίων και N-H πρωτοταγών αμινών. Από την άλλη πλευρά, στο φάσμα των oxCNDs φαίνονται οι δονήσεις τάσης και κάμψης του C=C στα 1620 και 965 cm^{-1} , λόγω της γραφιτικής δομής τους, ενώ η παρουσία των οξυγονούχων ομάδων (καρβοξυλικών, καρβονυλικών, υδροξυλικών και εποξειδικών ομάδων) στην επιφάνεια των νανοδίσκων επιβεβαιώνεται από την εμφάνιση των κορυφών στα: (α) 3370 cm^{-1} (ευρεία ταινία δόνησης έκτασης OH), (β) 1710 cm^{-1} (ταινία δόνησης τάσης C=O των καρβοξυλομάδων), (γ) 1405 cm^{-1} (ταινία δόνησης τάσης C-O-H), (δ) στα 1224 cm^{-1} (ταινία αντισυμμετρικής δόνησης τάσης των γεφυρών C-O-C της εποξειδικής ομάδας) και (ε) 1070 cm^{-1} αποδίδεται σε ταινία τάσης του C-O των υδροξυλίων. Συγκρίνοντας τα φάσματα των αρχικών υλικών με το φάσμα των oxCNDs@FCDs, όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές τόσο των oxCNDs όσο και των FCDs εμφανίζονται εκτός της κορυφής των oxCNDs στα 1224 cm^{-1} , γεγονός που υποδηλώνει την επιτυχή αντίδραση των αμινομάδων των FCDs με τις εποξειδικές ομάδες των νανοδίσκων άνθρακα.



Σχήμα 5.22: Φάσματα FTIR των oxCNDs, FCDs και του υβριδικού υλικού oxCNDs@FCDs.

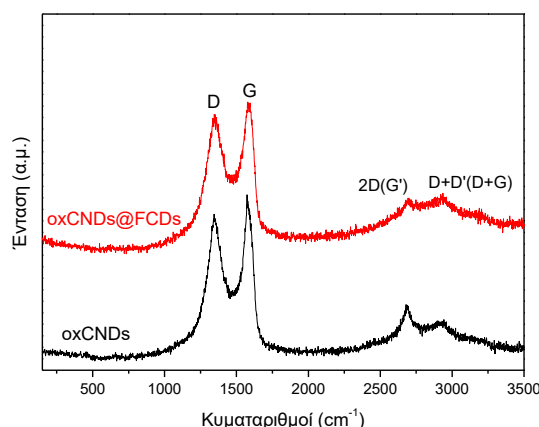
Στη συνέχεια, δίνονται τα φάσματα XPS των νανοϋλικών FCDs, oxCNDs καθώς και του υβριδικού υλικού (oxCNDs@FCDs). Συγκεκριμένα, στα φάσματα XPS (Σχήμα 5.23) παρουσιάζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές O1s και C1s που οφείλονται κυρίως στο γραφιτικό πλέγμα των oxCNDs. Στο φάσμα των φθοριζουσών τελειών άνθρακα, αλλά και στο υβριδικό υλικό παρουσιάζεται ακόμα μια κορυφή στα $\sim 400\text{ eV}$ που οφείλεται στα άτομα άζωτου (N1s), η οποία προέρχεται αποκλειστικά από τα FCDs, εφόσον δεν υπάρχουν στο αντίστοιχο φάσμα των oxCNDs. Συνεπώς, με αυτόν

τον τρόπο βεβαιώνεται η παρουσία των FCDs στα τελικά υβριδικά υλικά. Παράλληλα, αναλύοντας αυτές τις κορυφές μπορούν να ληφθούν ποσοτικές πληροφορίες για τα υβριδικά υλικά. Συγκεκριμένα, από τα ατομικά ποσοστά των στοιχείων διαπιστώνεται και ποσοτικά ότι τα FCDs έχουν ποσοστό αζώτου 7.5%, τα oxCNDs δεν έχουν καθόλου ποσοστό αζώτου και το oxCNDs@FCDs εμφανίζει ποσοστό αζώτου 5.4%, κάτι που επιβεβαιώνει την επιτυχή εισαγωγή των νανοτελειών στους οξειδωμένους νανοδίσκους.



Σχήμα 5.23: Φάσματα XPS των FCDs, oxCNDs και oxCNDs@FCDs.

Στη συνέχεια, η δομή των oxCNDs@FCDs μελετήθηκε με φασματοσκοπία Raman. Τα φάσματα των oxCNDs καθώς και oxCNDs@FCDs δίνονται στο Σχήμα 5.24. Όπως προαναφέρθηκε στην περίπτωση των νανοσωλήνων, η ταινία G αποδίδεται στις πλεγματικές ταλαντώσεις των δεσμών C–C του γραφιτικού πλέγματος, ενώ η ταινία D οφείλεται στην αταξία των ατόμων άνθρακα με sp^2 υβριδισμό και εκφράζει τις ατέλειες που υπάρχουν στο γραφιτικό πλέγμα, λόγω της παρουσίας ατόμων άνθρακα με sp^3 υβριδισμό.

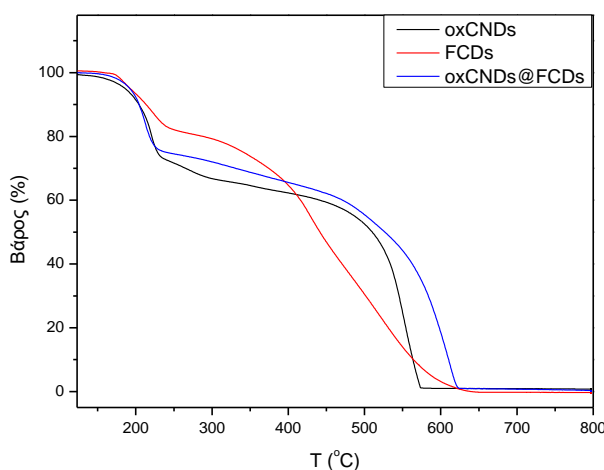


Σχήμα 5.24: Φάσματα Raman των oxCNDs και oxCNDs@FCDs.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.24 τα δύο φάσματα εμφανίζουν δύο έντονες γραφιτικές ταινίες στα 1345 cm^{-1} και 1589 cm^{-1} . Η ταινία στα 1589 cm^{-1} είναι η ταινία G, ενώ η

ταινία στα 1345 cm^{-1} είναι η ταινία D. Επιπλέον φαίνεται η ταινία 2D ή G' στα 2692 cm^{-1} που αποδίδεται στη δευτέρας τάξης αρμονική της ταινίας D. Εκτός αυτών παρατηρούνται ακόμα μία ταινία, η D+D' ή κατά άλλους D+G ταινία στα 2930 cm^{-1} που οφείλεται στις υψηλής τάξης διαταραχές του γραφιτικού πλέγματος (ατόμων άνθρακα με sp^3 υβριδισμό) [59]. Όπως προαναφέρθηκε ο λόγος της σχετικής έντασης των ταινιών D και G (I_D/I_G) χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό της έκτασης των ατελειών του γραφιτικού πλέγματος που μπορεί να προκύψουν μετά από χημική ή φυσική τροποποίηση τέτοιων υλικών και όσο μεγαλύτερος είναι ο λόγος αυτός τόσο περισσότερες ατέλειες υπάρχουν στο γραφιτικό πλέγμα. Έτσι προσδιορίστηκε ο λόγος I_D/I_G από τα φάσματα Raman (Σχήμα 5.24) και παρατηρήθηκε ότι μετά την τροποποίηση των νανοδίσκων με τις φθορίζουσες νανοτελείες, ο λόγος I_D/I_G για τα oxCNDs αυξάνεται λίγο από 0.90 σε 0.97 για τα oxCNDs@FCDs. Αυτό υποδηλώνει ότι οι φθορίζουσες νανοτελείες άνθρακα έχουν επιτυχώς προσδεθεί πάνω σε όλη την επιφάνεια των oxCNDs, χωρίς όμως να προκαλούν σημαντική αλλαγή στη γραφιτική δομή τους.

Επιπλέον πληροφορίες σχετικά με την παρουσία των FCDs στο τελικό υβριδικό υλικό λαμβάνονται και με την τεχνική της θερμοβαρυσμικής ανάλυσης (TGA).



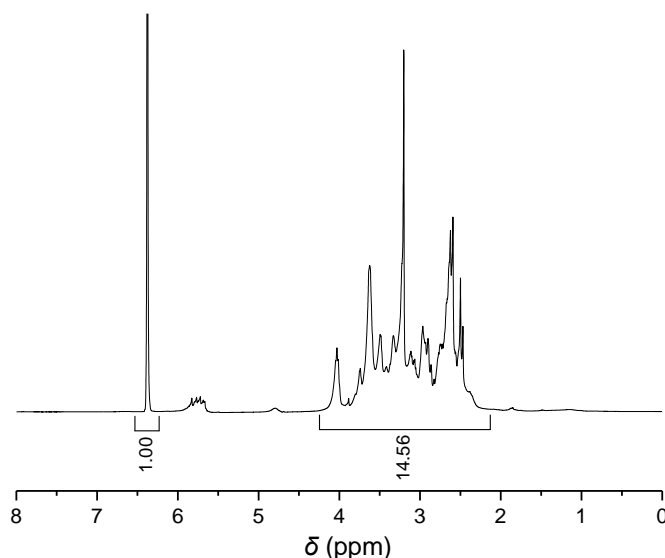
Σχήμα 5.25: Καμπύλες θερμοβαρυσμικής ανάλυσης (TGA) των oxCNDs, FCDs και oxCNDs@FCDs.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.25, στην καμπύλη απώλειας βάρους των oxCNDs παρατηρούνται δύο περιοχές απώλειας βάρους. Η μια βρίσκεται στην περιοχή θερμοκρασιών $150\text{--}300\text{ }^\circ\text{C}$, όπου παρατηρείται απώλεια βάρους $\sim 30\%$ σε σχέση με το αρχικό, η οποία οφείλεται στη θερμική υποβάθμιση λόγω καύσης των

οξυγονούχων λειτουργικών ομάδων που υπάρχουν στους οξειδωμένους νανοδίσκους άνθρακα. Η δεύτερη περιοχή βρίσκεται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 400 °C και η απώλεια βάρους που παρατηρείται οφείλεται στη θερμική αποδόμηση του γραφιτικού πλέγματος των oxCNDs. Από την άλλη πλευρά, στην καμπύλη TGA των FCDs παρατηρούνται δύο περιοχές απώλειας βάρους. Η πρώτη περιοχή είναι σε θερμοκρασίες 150-250 °C, όπου παρατηρείται απώλεια βάρους ~20%, η οποία οφείλεται στη θερμική υποβάθμιση λόγω απομάκρυνσης των εξωτερικών λειτουργικών ομάδων των FCDs. Η δεύτερη περιοχή βρίσκεται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 350 °C, όπου λαμβάνει χώρα, σταδιακά, η πλήρης θερμική αποδόμηση των FCDs. Τέλος, στη καμπύλη TGA του υβριδικού υλικού (oxCNDs@FCDs), εντοπίζονται τρεις περιοχές απώλειας βάρους. Αρχικά, στην περιοχή των θερμοκρασιών 150-230 °C παρατηρείται μια απώλεια βάρους ~25%, ενώ μια άλλη απώλεια βάρους κατά ~15% σε θερμοκρασίες 230-450 °C, οι οποίες οφείλονται στην απομάκρυνση των λειτουργικών ομάδων τόσο των oxCNDs όσο και των FCDs. Στη συνέχεια, σε θερμοκρασίες πάνω από τους 450 °C παρατηρείται μία απότομη απώλεια βάρους λόγω της πλήρους θερμικής αποδόμησης των oxCNDs και των FCDs. Συγκρίνοντας τις καμπύλες των οξειδωμένων νανοδίσκων και των νανοτελειών άνθρακα με αυτή του υβριδικού υλικού παρατηρείται ότι η πλήρης θερμική αποδόμηση των oxCNDs@FCDs ολοκληρώνεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες σε σχέση με αυτές των νανοδίσκων και των FCDs, γεγονός που πιστοποιεί την επιτυχή σύζευξη των oxCNDs και των FCDs.

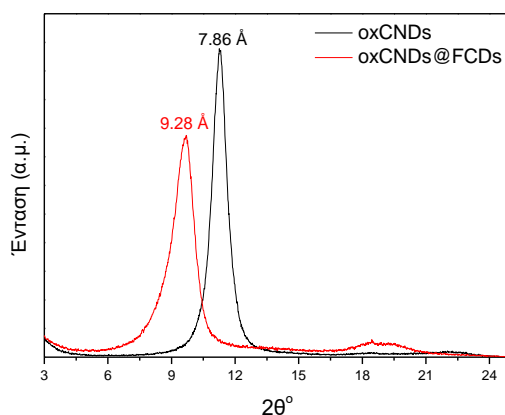
Δυστυχώς με τη χρήση της θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης δεν μπορούμε να προσδιορίσουμε ακριβώς την ποσότητα των FCDs που είναι δεσμευμένες στους νανοδίσκους παρά μόνο να εξάγουμε ποιοτικά αποτελέσματα διότι λαμβάνει χώρα ταυτόχρονη θερμική αποδόμηση τόσο των oxCNDs, όσο και των FCDs. Προκειμένου λοιπόν να επιβεβαιωθεί η παρουσία των FCDs στα υβριδικά υλικά, μελετήθηκαν τα oxCNDs@FCDs με φασματοσκοπία ^1H NMR, ενώ προσδιορίστηκε το ποσοστό των FCDs στα τελικά προϊόντα με την ίδια τεχνική, χρησιμοποιώντας μηλεϊνικό οξύ ως εσωτερικό πρότυπο [17]. Από το φάσμα ^1H NMR των oxCNDs@FCDs (Σχήμα 5.26), επιβεβαιώνεται η παρουσία των FCDs στα υβριδικά υλικά. Συγκεκριμένα, φαίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές των FCDs στην περιοχή 2-4 ppm, που αποδίδονται σε πρωτόνια μεθυλίων δίπλα σε αμινομάδες ή σε αμιδικούς δεσμούς ή σε οξυγονούχες ομάδες καθώς και η πολλαπλή κορυφή στα 5.5-6 ppm που αποδίδεται σε πρωτόνια διπλού δεσμού (-CH=CH-) [60]. Συγκρίνοντας τα ολοκληρώματα των κορυφών στα:

(α) 6.35 ppm, που αποδίδονται στα πρωτόνια των CH ομάδων του μηλεϊνικού οξέος και (β) 2-4 ppm που αποδίδονται στα πρωτόνια των FCDs, βρέθηκε ότι κατά μέσο όρο 0.23 g FCDs περιέχονται σε 1 g oxCNDs@FCDs υβριδικού υλικού (23% w/w).



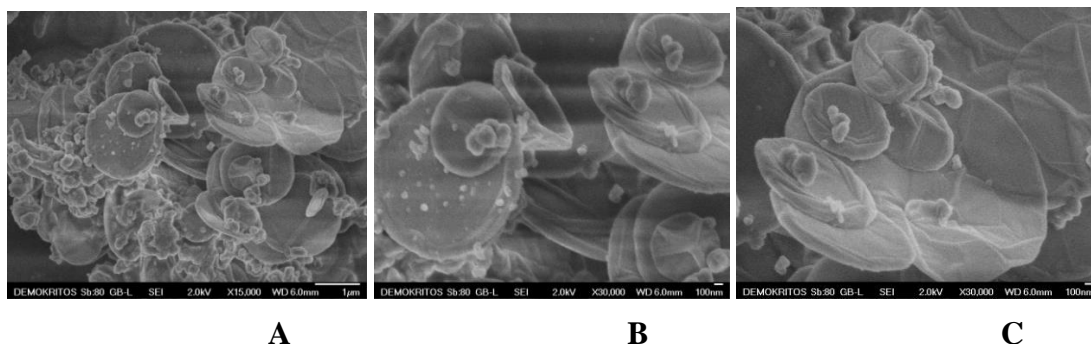
Σχήμα 5.26: Φάσμα ¹H NMR των oxCNDs@FCDs παρουσία μηλεϊνικού οξέος.

Η περίθλαση ακτίνων-X, είναι γνωστό ότι χρησιμοποιείται ευρέως στο χαρακτηρισμό φυλλόμορφων υλικών, εφόσον, εφαρμόζοντας το νόμο του Bragg, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί με ακρίβεια η απόσταση d_{001} . Έτσι, στο Σχήμα 5.27 παρουσιάζονται τα διαγράμματα περίθλασης ακτίνων-X των oxCNDs και oxCNDs@FCDs για τη μελέτη της δομής τους. Συγκεκριμένα, στο διάγραμμα XRD του oxCNDs εμφανίζεται μια οξεία κορυφή [001] στα 11.4° που αντιστοιχεί σε διαστρωματική απόσταση $d_{001} = 7.86 \text{ \AA}$. Μετά από την αντίδραση των νανοδίσκων με τα FCDs, παρατηρείται μια μικρή αύξηση της d_{001} διαστρωματικής απόστασης από τα 7.86 \AA στα 9.28 \AA , η οποία υποδηλώνει μια διαταραχή στην οργάνωση των γραφιτικών φύλλων. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στη σύζευξη των FCDs με τις ομάδες των oxCNDs που εντοπίζονται στις άκρες των γραφιτικών δίσκων, κυρίως καρβοξυλικές ομάδες, με αποτέλεσμα να προκαλούν αυτή την μικρή αύξηση της διαστρωματικής απόστασης. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα της περίθλασης ακτίνων-X υποδηλώνουν ότι οι φθορίζουσες νανοτελείες άνθρακα έχουν επιτυχώς προσδεθεί στα oxCNDs, χωρίς να προκαλούν σημαντική μεταβολή της γραφιτικής δομής τους.



Σχήμα 5.27: Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων-X των oxCNDs και oxCNDs@FCDs.

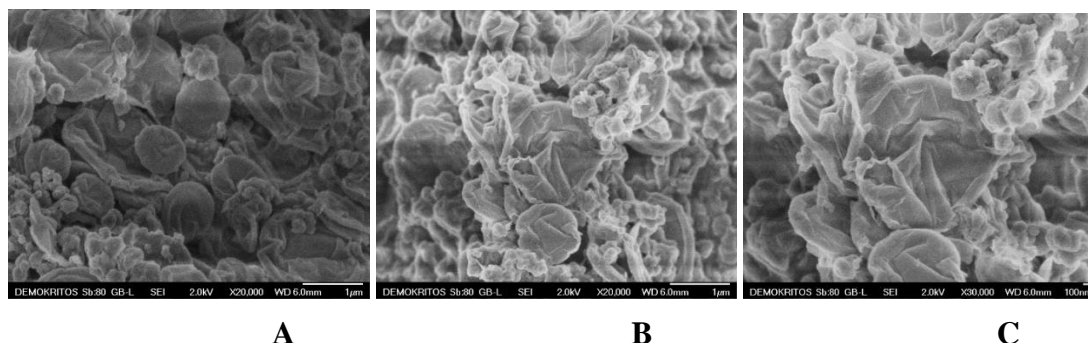
Η μορφολογία του υβριδικού υλικού, αλλά και των αρχικών νανοδίσκων άνθρακα, μελετήθηκε με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) και με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM).



Εικόνα 5.11: Εικόνες SEM των oxCNDs. Η κλίμακα είναι 1 μm (A) και 100 nm (B,C).

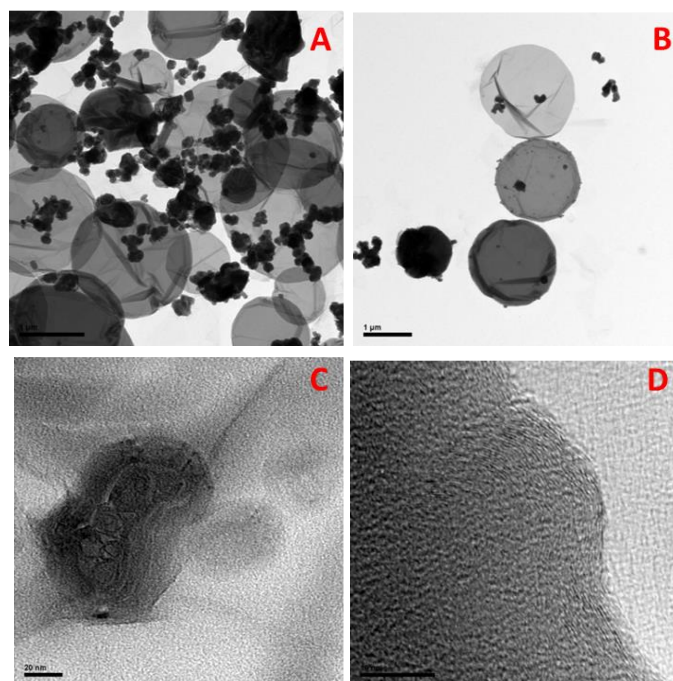
Στην Εικόνα 5.11 εμφανίζονται οι αρχικοί οξειδωμένοι νανοδίσκοι άνθρακα, οι οποίοι φαίνονται ως είναι ομοιογενείς δίσκοι διαμέτρου 1-3 nm, ενώ σε μερικούς από αυτούς υπάρχουν νανοσωματίδια άνθρακα (30-100 nm) που πιθανώς παράγονται κατά τη σύνθεση των αρχικών νανοδίσκων. Επίσης, παρατηρούνται κάποιες πτυχώσεις πάνω στους δίσκους που είναι μεμονωμένα στρώματα γραφενίου που έχουν αποσπαστεί από τους δίσκους λόγω της ισχυρής όξινης επεξεργασίας. Επιπλέον, στην Εικόνα 5.11 εκτός από δομές με σχήμα δίσκου φαίνονται και άλλες με σχήμα κώνου, οι οποίες παράγονται, όπως είναι γνωστό, κατά τη σύνθεση των αρχικών νανοδίσκων, λόγω της ύπαρξης δομικών ατελειών στο εξαγωνικό γραφιτικό πλέγμα τους [56, 61]. Συγκρίνοντας τις εικόνες SEM των νανοδίσκων με αυτές του υβριδικού υλικού (Εικόνα 5.12), παρατηρούμε πως οι νανοδίσκοι διατηρούν τη

δισκοειδή μορφή τους, αλλά εμφανίζονται με περισσότερες πτυχώσεις στην επιφάνειά τους. Αυτό οφείλεται πιθανότητα στο γεγονός ότι, κατά την τροποποίησή τους με τις φθορίζουσες νανοτελείες, προκαλείται μερική αποφυλλοποίηση.



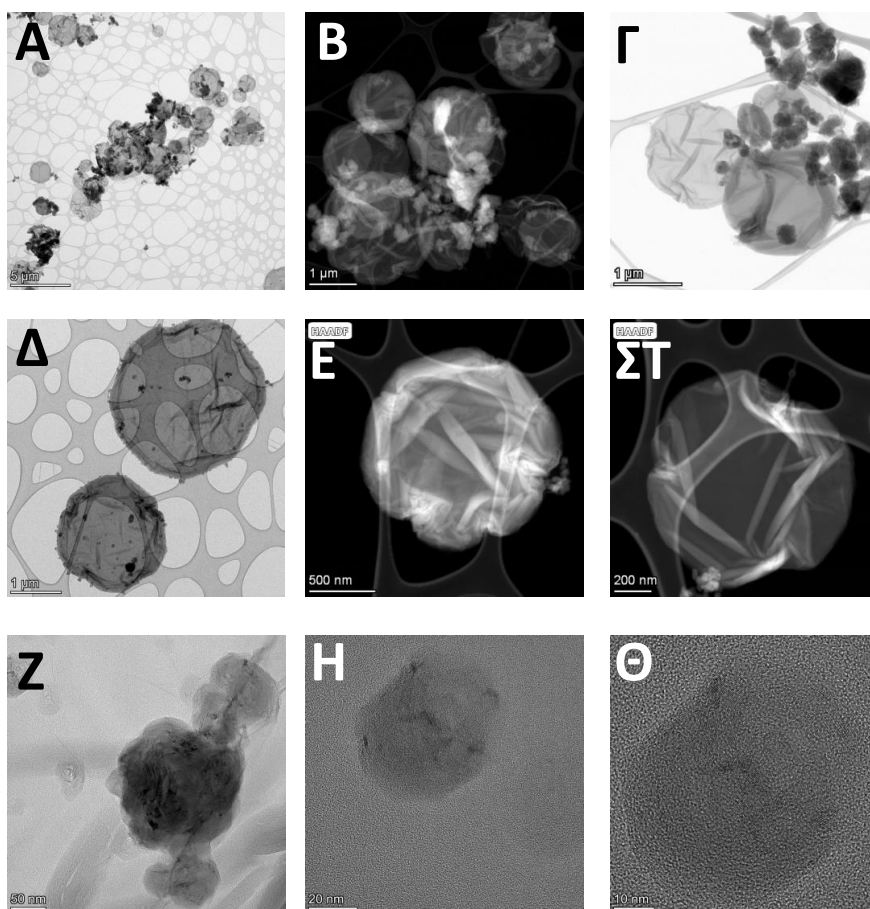
Εικόνα 5.12: Εικόνες SEM των oxCNDs@FCDs. Η κλίμακα είναι 1 µm (A,B) και 100 nm (C).

Ανάλογες εικόνες ελήφθησαν και με την τεχνική της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης. Συγκεκριμένα, στην Εικόνα 5.13 (A,B) οι νανοδίσκοι φαίνονται ως είναι ομοιογενείς δίσκοι διαμέτρου 1-3 nm, ενώ παρατηρούνται κάποιες πτυχώσεις πάνω στην επιφάνειά τους, που είναι μεμονωμένα στρώματα γραφενίου που έχουν αποσπαστεί από αυτούς λόγω της ισχυρής όξινης επεξεργασίας (Εικόνα 5.13 C). Επίσης, στην Εικόνα 5.13 D φαίνεται το γραφιτικό πλέγμα των οξειδωμένων νανοδίσκων άνθρακα.



Εικόνα 5.13: Εικόνες TEM των oxCNDs. Η κλίμακα είναι 1 µm (A,B), 20 nm (C) και 10 nm (D).

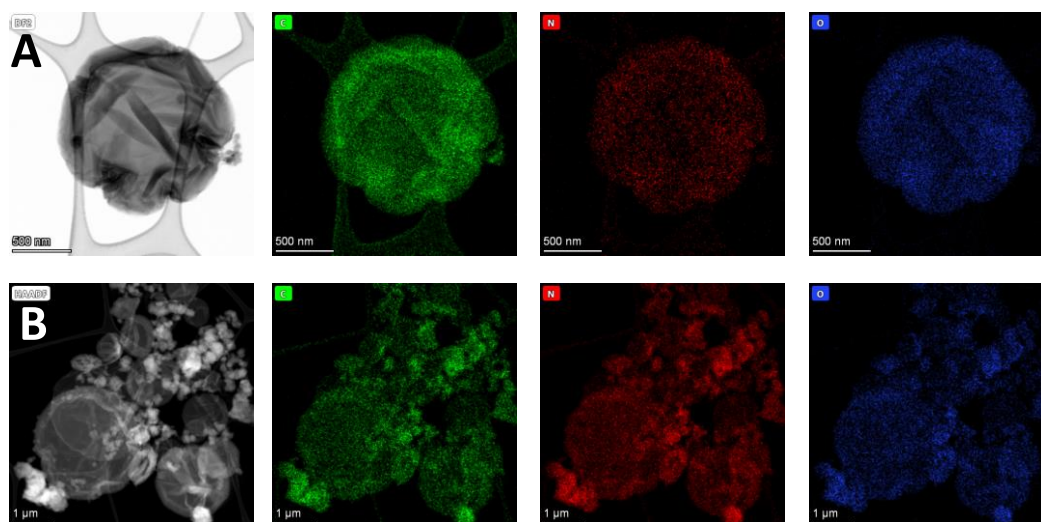
Συγκρίνοντας την Εικόνα 5.13 (Α,Β) με την Εικόνα 5.14 (Α-ΣΤ) παρατηρούμε ότι, μετά την τροποποίησή τους, οι νανοδίσκοι άνθρακα παραμένουν ομογενείς, διατηρώντας το αρχικό τους σχήμα και μέγεθος, ενώ παρατηρούνται περισσότερες πτυχώσεις στην επιφάνειά τους, λόγω μερικής αποφυλλοποίησης των δίσκων (Εικόνα 5.14 (Γ-ΣΤ)). Στην Εικόνα 5.14 (Δ) διακρίνονται νανοσωματίδια άνθρακα (30-50 nm) ή/και γραφίτικα φυλλίδια πάνω στους νανοδίσκους, τα οποία είναι πιο ευδιάκριτα στην Εικόνα 5.14 (Ζ-Θ).



Εικόνα 5.14: Εικόνες TEM των oxCNDs@FCDs. Η κλίμακα είναι 5 μm (Α), 1 μm (Β-Δ), 500 nm (Ε), 200 nm (ΣΤ), 50 nm (Ζ), 20 nm (Η) και 10 nm (Θ).

Επίσης, η παρουσία των FCDs πάνω στους οξειδωμένους νανοδίσκους πιστοποιήθηκε συνδυάζοντας την τεχνική της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης υψηλής ανάλυσης (HRTEM) και τη φασματοσκοπική μέθοδο ενεργειακής διασποράς ακτίνων-Χ (EDX). Συγκεκριμένα, η παρουσία των FCDs πάνω στους νανοδίσκους επιβεβαιώνεται συνδυάζοντας εικόνες υψηλής ανάλυσης και σκοτεινού πεδίου συνοδευόμενες από τις εικόνες χαρτογράφησης κατανομής των στοιχείων άνθρακα, οξυγόνου και αζώτου των αντίστοιχων περιοχών. Από την Εικόνα 5.15 είναι

προφανές ότι τα FCDs είναι ομοιόμορφα δεσμευμένα σε όλη την επιφάνεια των oxCNDs, αφού το άζωτο (κόκκινο) που προέρχεται αποκλειστικά από τα FCDs, είναι ομοιόμορφα κατανεμημένο στην ίδια θέση όπου ανιχνεύεται και ο άνθρακας (πράσινο) και το οξυγόνο (μπλε).

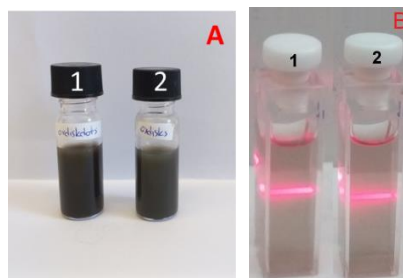


Εικόνα 5.15: Εικόνες φωτεινού πεδίου TEM των oxCNDs@FCDs (A, B), συνοδευόμενες από τις εικόνες χαρτογράφησης κατανομής των στοιχείων άνθρακα (πράσινο), αζώτου (κόκκινο) και οξυγόνου (μπλε) των αντίστοιχων περιοχών.

5.1.2.2 Χαρακτηρισμός των υδατικών διασπορών του υβριδικού υλικού oxCNDs@FCDs

Στη συνέχεια μελετήθηκε η ικανότητα των oxCNDs@FCDs να διασπαρθούν σε υδατικό μέσο. Έτσι, σε 1 mL νερού διασπάρθηκε 1 mg oxCNDs@FCDs με τη βοήθεια υπερήχων, λαμβάνοντας ομογενή και σταθερή υδατική διασπορά, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.16 A. Για συγκριτικούς λόγους παρασκευάστηκε η υδατική διασπορά των oxCNDs, συγκέντρωσης 1 mg/mL, όπου και αυτή φαίνεται το ίδιο σταθερή και ομογενής, όπως και των oxCNDs@FCDs, λόγω της παρουσίας των οξυγονούχων ομάδων στην επιφάνεια των νανοδίσκων που προάγουν την υδροφιλικότητα τους, όπως ήδη έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία [57]. Επιπλέον, απόδειξη της ικανότητάς τους να διασπείρονται αποτελεσματικά σε υδατικά μέσα, δίνοντας ομογενείς διασπορές, λαμβάνεται και όταν μια λεπτή δέσμη φωτός, π.χ. η δέσμη φωτός ενός laser, διέρχεται μέσα από αυτά, τότε λόγω της σκέδασης η πορεία της δέσμης μέσα στη διασπορά είναι ορατή (Εικόνα 5.16 B). Το γεγονός αυτό δεν παρατηρείται κατά τη διέλευση της δέσμης μέσα από ένα μη ομογενές διάλυμα (φαινόμενο Tyndall). Το φαινόμενο αυτό είναι χαρακτηριστικό για σταθερά

κολλοειδή διαλύματα, όπου τα διεσπαρμένα σωματίδια είναι μεγέθους από 1 έως 1000 nm [62].

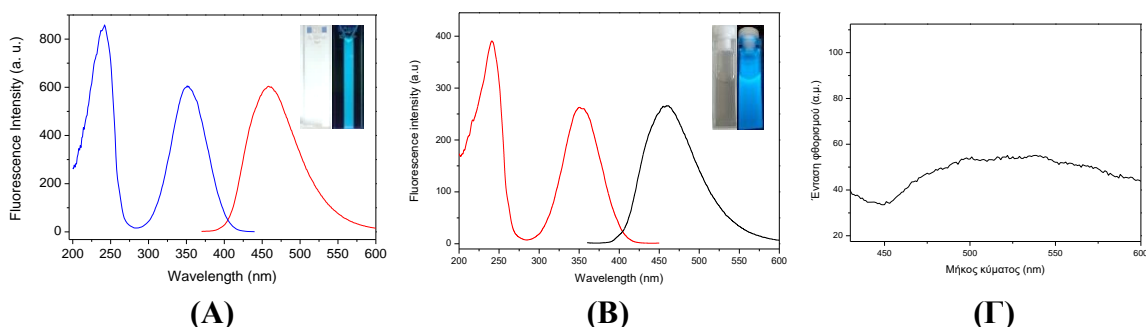


Εικόνα 5.16: Φωτογραφίες υδατικών διασπορών των oxCNDs@FCDs (1) και oxCNDs (2): (A) συγκέντρωσης 1 mg/mL αμέσως μετά τους υπερήχους και (B) συγκέντρωσης 0.2 mg/mL που δείχνει το φαινόμενο σκέδασης Tyndall.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μέτρηση ζ-δυναμικού των oxCNDs@FCDs και oxCNDs διασπορών. Όπως στην περίπτωση των οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα, έτσι και εδώ, η τιμή του ζ-δυναμικού της διασποράς των oxCNDs σε pH=7.0 βρέθηκε ίση με -53.2 ± 2.5 mV, λόγω των αρνητικά φορτισμένων οξυγονούχων ομάδων στην επιφάνεια των δίσκων. Μετά την τροποποίηση, η τιμή του ζ-δυναμικού για την υδατική διασπορά των oxCNDs@FCDs παραμένει σχεδόν αμετάβλητη και ίση με -50.0 ± 1.3 mV, το οποίο ήταν αναμενόμενο, εφόσον τα FCDs περιέχουν τόσο αρνητικώς (καρβοξυλομάδες) όσο και θετικώς (αμινομάδες) φορτισμένες ομάδες. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι διασπορές που έχουν μεγάλες αρνητικές τιμές ζ-δυναμικού, δηλώνουν ότι είναι πολύ σταθερά εναιωρήματα, λόγω της ηλεκτροστατικής απώθησης που προκαλείται από τα πολύ υψηλά επιφανειακά φορτία, τα οποία εμποδίζουν τη συσσωμάτωση των σωματιδίων, όπως στην περίπτωση μας των oxCNDs@FCDs [28].

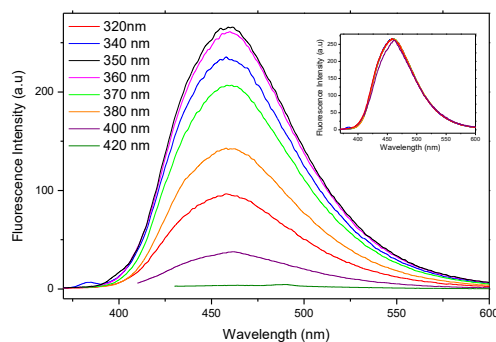
Στη συνέχεια, τόσο τα αρχικά FCDs, όσο και το υβριδικό υλικό μελετήθηκε με φασματοσκοπία φθορισμού. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.28 A, το φάσμα διέγερσης των FCDs παρουσιάζει δύο κορυφές απορρόφησης: η κορυφή στα 240 nm οφείλεται είτε σε μεταβάσεις $n \rightarrow \sigma^*$ (C-OH) είτε σε $\pi \rightarrow \pi^*$ μεταβάσεις των περιοχών sp^2 του δικτύου άνθρακα, ενώ η κορυφή στα 352 nm προέρχεται από $n \rightarrow \pi^*$ (C=O και C=N) μεταβάσεις του sp^3 ανθράκων που συνδέονται με άτομα οξυγόνου και αζώτου των λειτουργικών ομάδων [63-68]. Αντίστοιχες απορροφήσεις παρατηρούνται στο φάσμα διέγερσης των oxCNDs@FCDs (Σχήμα 5.28 B). Επιπλέον, όταν υδατικά διαλύματα των FCDs διεγερθούν σε μήκος κύματος 352 nm, λαμβάνεται φάσμα εκπομπής με μέγιστο στα 460 nm, ενώ παρουσιάζουν ισχυρό μπλε φθορισμό μετά από διέγερση

στην περιοχή UV (Σχήμα 5.28 Α). Αντίστοιχα, όταν υδατικά διαλύματα των oxCNDs@FCDs διεγερθούν στο ίδιο μήκος κύματος (352 nm), λαμβάνεται αντίστοιχο φάσμα εκπομπής με τα FCDs με μέγιστο στα 460 nm, ενώ και αυτά παρουσιάζουν ισχυρό μπλε φθορισμό μετά από διέγερση στην περιοχή UV (Σχήμα 5.28 Β). Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, είναι σαφής η παρουσία των FCDs στο υβριδικό υλικό, εφόσον μετά από αντίστοιχη διέγερση υδατικού διαλύματος νανοτελειών άνθρακα δεν λαμβάνεται εκπομπή (Σχήμα 5.28 Γ).



Σχήμα 5.28: Φάσματα διέγερσης και εκπομπής φθορισμού ($\lambda_{ex}=352$ nm) των FCDs (Α) καθώς και φάσματα εκπομπής φθορισμού ($\lambda_{ex}=352$ nm) των oxCNDs@FCDs (Β) και των oxCNDs (Γ).

Επίσης, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.29, όταν υδατική διασπορά των oxCNDs@FCDs διεγερθεί σε μήκη κύματος από 320 έως 380 nm, λαμβάνονται φάσματα εκπομπών με μέγιστο στα 460 nm, το οποίο δεν μεταβάλλεται συναρτήσει του μήκους κύματος διέγερσης, παρά μόνο όταν η διέγερση είναι σε μήκη κύματος μεγαλύτερα των 400 nm. Η ένταση του φθορισμού του είναι μέγιστη σε $\lambda_{ex}=350$ nm και μειώνεται με την αύξηση του μήκους κύματος διέγερσης. Η διέγερση σε μήκη κύματος άνω των 400 nm έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση του μέγιστου σε ~ 470 nm, αν και με πολύ χαμηλή ένταση.

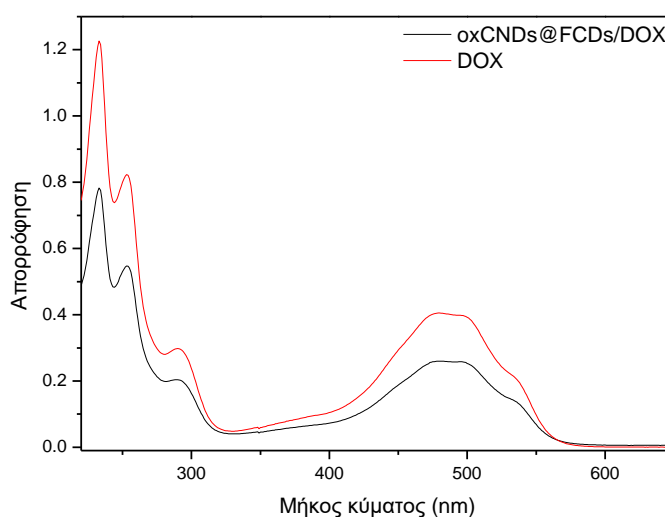


Σχήμα 5.29: Φάσματα εκπομπής φθορισμού των oxCNDs@FCDs συναρτήσει του μήκους κύματος διέγερσης. Ένθετο Σχήμα: Τα αντίστοιχα κανονικοποιημένα φάσματα εκπομπής φθορισμού σε διάφορα μήκη κύματος διέγερσης.

5.1.2.3 Δέσμευση δοξορουβικίνης στα oxCNDs@FCDs

Στη συνέχεια μελετήθηκε η ικανότητα των oxCNDs@FCDs να χρησιμοποιηθούν ως αποτελεσματικό σύστημα αντίχενσης και μεταφοράς φαρμάκων. Έτσι χρησιμοποιήθηκε η δοξορουβικίνη, ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο αντικαρκινικό φάρμακο. Η DOX δεσμεύτηκε επιτυχώς στο oxCNDs@FCDs, κυρίως μέσω π-π αλληλεπιδράσεων, μεταξύ του τμήματος της κινόνης της DOX και των γραφιτικών στρωμάτων των oxCNDs@FCDs [69], αλλά και μέσω ιοντικών δυνάμεων, μεταξύ της αμινομάδας της DOX και των καρβοξυλομάδων των oxCNDs@FCDs.

Η δέσμευση της DOX πραγματοποιήθηκε υπό βασικές συνθήκες (pH=9) με απλή ανάμιξη υδατικής διασποράς oxCNDs@FCDs με υδατικό διάλυμα DOX σε αναλογίες 1:1. Η δέσμευση της DOX στα oxCNDs@FCDs προσδιορίστηκε από την απορρόφηση του υπερκείμενου, δηλαδή υπολογίζοντας τη μη δεσμευμένη DOX ακολουθώντας γνωστή από τη βιβλιογραφία πορεία [57]. Συγκεκριμένα, με βάση πρότυπη καμπύλη αναφοράς για την DOX που παρασκευάζεται χρησιμοποιώντας διαλύματα DOX γνωστής συγκέντρωσης (10–50 μM) και την τιμή απορρόφησης της στα 480 nm, υπολογίζεται η συγκέντρωση της μη δεσμευμένης DOX (Σχήμα 5.30). Το ποσοστό της δεσμευμένης DOX στα oxCNDs@FCDs και η απόδοση δέσμευσής της προσδιορίστηκαν φασματοσκοπικά χρησιμοποιώντας UV–vis και υπολογίστηκαν με βάση τις εξισώσεις (1) και (2) οι οποίες βρίσκονται στο κεφάλαιο 4.9.1.



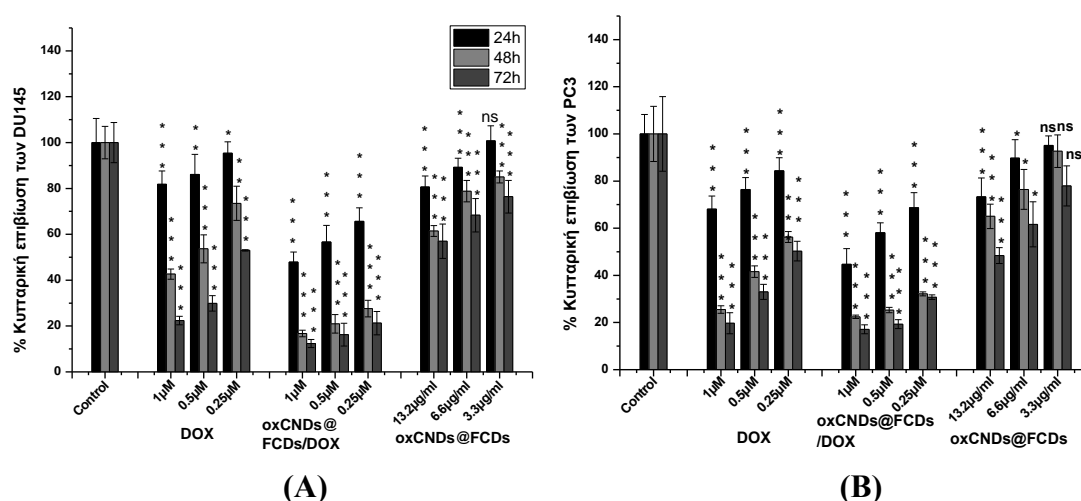
Σχήμα 5.30: Φάσματα απορρόφησης της ελεύθερης δοξορουβικίνης (κόκκινο) και του υπερκείμενου διαλύματος του υβριδικού νανοϋλικού με δεσμευμένη DOX, oxCNDs@FCDs/DOX (μαύρο) σε νερό.

Με αρχική συγκέντρωση της DOX 1 mg/mL, το ποσοστό δεσμευμένης DOX στα oxCNDs@FCDs είναι 40.8%, ενώ η απόδοση δέσμευσής της είναι 50.7%.

5.1.2.4 Βιολογική μελέτη των oxCNDs@FCDs με δεσμευμένη δοξορουβικίνη (DOX)

Η αντικαρκινική δράση της δεσμευμένης DOX στα oxCNDs@FCDs μελετήθηκε σε δύο ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές του προστάτη, τις DU145 και PC3, οι οποίες όπως αναφέρθηκε και παραπάνω εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην DOX [38-40]. Επιπλέον, η μελέτη της κυτταροτοξικότητας των υλικών πραγματοποιήθηκε και στα μη καρκινικά κύτταρα HEK293, τα οποία προέρχονται από ανθρώπινο εμβρυϊκό νεφρικό ιστό.

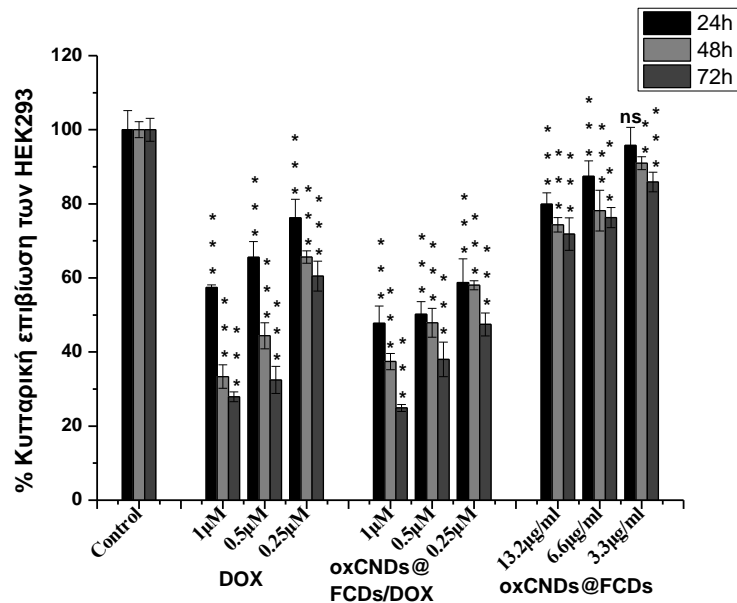
Ο κυτταροτοξικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε όλες τις κυτταρικές σειρές που αναφέρθηκαν παραπάνω, ακολουθώντας την ευρέως χρησιμοποιούμενη, από τη βιβλιογραφία, μέθοδο του MTT. Για τον κυτταροτοξικό έλεγχο, οι τρεις κυτταρικές σειρές επώαστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις του νανοϋλικού oxCNDs@FCDs, του νανοϋλικού oxCNDs@FCDs με δεσμευμένο φάρμακο oxCNDs@FCDs/DOX και της ελεύθερης δοξορουβικίνης (DOX) για 24 και 48 ώρες και προσδιορίστηκε η επιβίωση των κυττάρων. Ειδικότερα, σε αυτά τα πειράματα η συγκέντρωση της ελεύθερης και της δεσμευμένης DOX ήταν 0.25, 0.5 και 1 μM . Επίσης, σε όλα τα πειράματα, οι συγκεντρώσεις του υβριδικού νανοϋλικού (oxCNDs@FCDs) ήταν 3.3, 6.6 και 13.2 $\mu\text{g/mL}$. Τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικότητας παρουσιάζονται στα Σχήματα 5.31 και 5.32.



Σχήμα 5.31: Κυτταρική βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων DU145 (A) και PC3 (B). Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία ελεύθερης δοξορουβικίνης, oxCNDs@FCDs και του συστήματος oxCNDs@FCDs/DOX. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$ και χωρίς στατιστική σημασία (ns), $p > 0.05$.**

Από το Σχήμα 5.31 παρατηρείται πως η ελεύθερη DOX και στις δύο καρκινικές σειρές κυττάρων εμφανίζει μικρότερη δραστικότητα σε σχέση με τη δεσμευμένη DOX. Συγκεκριμένα, τα ποσοστά επιβίωσης των κυττάρων και των δύο καρκινικών σειρών είναι σημαντικά μειωμένα όταν αυτά επωάζονται παρουσία δεσμευμένης DOX σε σύγκριση αυτά που επωάζονται με ελεύθερη DOX, ιδιαίτερα μετά από 48 h επώασης. Αναλυτικά, το ποσοστό επιβίωσης των DU145 κυττάρων βρέθηκε ότι είναι ~28%, όταν επωαστούν παρουσία δεσμευμένης DOX στη μικρότερη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση (0.25 μ M) και μετά από 48 h επώασης, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό επιβίωσης παρουσία ελεύθερης DOX είναι ~74%. Αντίστοιχα ποσοστά επιβίωσης παρατηρούνται στα κύτταρα PC3, όπου το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων είναι ~32% όταν επώαστηκαν παρουσία του συστήματος oxCNDs@FCDs/DOX, ενώ παρουσία ελεύθερης DOX το ποσοστό επιβίωσης των PC3 κύτταρων είναι ~56% (συγκέντρωση 0.25 μ M, ως προς την DOX και 48 h επώαση). Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρούνται και όταν τα κύτταρα επωάστηκαν για 72 h, όπου στη μικρότερη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση η δεσμευμένη DOX είναι αρκετά πιο τοξική (~20% βιωσιμότητα των DU145 και ~30% βιωσιμότητα των PC3) σε σχέση με την ελεύθερη DOX (~50% βιωσιμότητα και των δύο κυτταρικών σειρών). Σημαντικό είναι ότι τα oxCNDs@FCDs εμφανίζουν σχετικά χαμηλή τοξικότητα ακόμα και στην υψηλότερη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση (13.2 μ g/mL) μετά από 72 h επώασης έναντι και των δύο κυτταρικών σειρών, με ποσοστό κυτταρικής επιβίωσης ~60% (DU145) και ~50% (PC3).

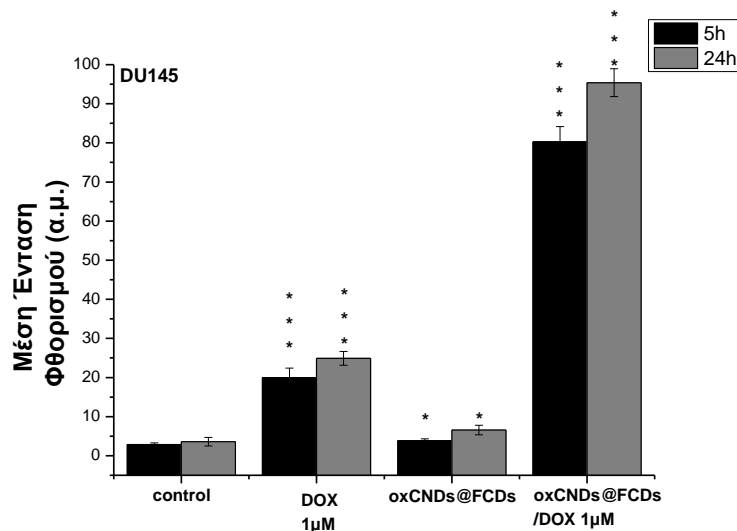
Στη συνέχεια μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα τόσο του υβριδικού νανοϋλικού όσο και του συστήματος oxCNDs@FCDs/DOX έναντι της φυσιολογικής κυτταρικής σειράς HEK293. Με βάση τα αποτελέσματα στο Σχήμα 5.32 διαπιστώνεται πως η δεσμευμένη DOX εμφανίζει αντίστοιχη τοξικότητα με την ελεύθερη. Συγκρίνοντας όμως την τοξικότητα της δεσμευμένης DOX στα καρκινικά κύτταρα με αυτή στα μη καρκινικά φαίνεται ότι η δεσμευμένη DOX είναι πιο τοξική στα καρκινικά κύτταρα. Συγκεκριμένα, τα ποσοστά βιωσιμότητας των DU145 και των PC3 είναι 15-20% όταν επωαστούν με δεσμευμένη DOX (1 μ M) για 48 h και 10-15% μετά από 72 h επώασης, ενώ τα αντίστοιχα στα μη καρκινικά κύτταρα είναι 60 και 50%. Είναι σημαντικό, επίσης, να αναφερθεί ότι το oxCNDs@FCDs εμφανίζει πολύ χαμηλότερη τοξικότητα στα μη καρκινικά κύτταρα ακόμα και στην υψηλότερη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση και μετά από 72 h επώασης (~73 % βιωσιμότητα των HEK293), σε σχέση με αυτή στα καρκινικά κύτταρα.



Σχήμα 5.32: Κυτταρική βιωσιμότητα των φυσιολογικών κυττάρων HEK293. Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία ελεύθερης δοξορουβικίνης, oxCNDs@FCDs και του συστήματος oxCNDs@FCDs/DOX. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$ και χωρίς στατιστική σημασία (ns), $p > 0.05$.**

Συνεπώς, με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, η δεσμευμένη DOX στα oxCNDs@FCDs φαίνεται να είναι πιο δραστική σε σχέση με την ελεύθερη DOX και να εμφανίζει εκλεκτικότητα στα καρκινικά κύτταρα. Επιπλέον, ο νανοφορέας oxCNDs@FCDs εμφάνισε ελάχιστη τοξικότητα στα μη καρκινικά κύτταρα γεγονός που τον καθιστά κατάλληλο για περαιτέρω μελέτη ως ένα αποτελεσματικό και ασφαλές σύστημα χορήγησης φαρμάκων.

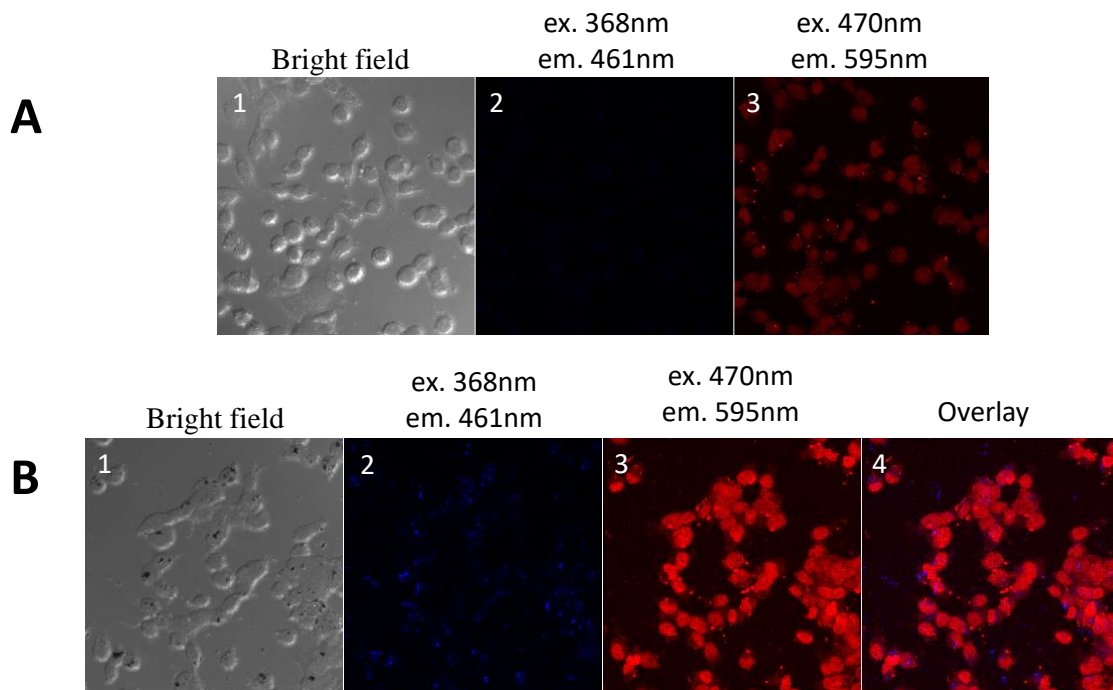
Ακολούθως, μελετήθηκε η ικανότητα των oxCNDs@FCDs να μεταφέρουν την DOX στα κύτταρα. Έτσι, η ενδοκυττάρια πρόσληψη της DOX μελετήθηκε ποσοτικά με κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry) και παρατηρήθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία (Confocal Laser Scanning Microscopy CLSM), κάνοντας χρήση του φθορισμού της DOX. Έτσι, αρχικά μελετήθηκε η πρόσληψη της εγκλεισμένης DOX σε σχέση με την ελεύθερη DOX στην καρκινική κυτταρική σειρά DU145 με κυτταρομετρία ροής. Συγκεκριμένα, καρκινικά κύτταρα DU145 επώαστηκαν παρουσία DOX, oxCNDs@FCDs και oxCNDs@FCDs/DOX. Η συγκέντρωση της DOX σε όλα τα πειράματα ήταν 1 μM και του υβριδικού νανοϋλικού 13.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ για 5 και 24 ώρες επώασης. Έπειτα, έγινε συλλογή των κυττάρων και μετρήθηκε ο φθορισμός της DOX ($\lambda_{em}=575 \text{ nm}$ και $\lambda_{ex}=488 \text{ nm}$) που έχει προσληφθεί από τα κύτταρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.33.



Σχήμα 5.33: Ποσοτική ανάλυση της μέσης έντασης φθορισμού της ελεύθερης DOX και του υβριδικού νανοϋλικού με και χωρίς την DOX, σε συγκέντρωση 1 μM ως προς το φάρμακο, για 5 και 24 ώρες επώασης στα καρκινικά κύτταρα DU145. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου * $p<0.05$, ** $p<0.01$, * $p<0.001$.**

Από τα αποτελέσματα αυτά διαπιστώνεται πως η κυτταρική πρόσληψη της DOX αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου τόσο στην περίπτωση που τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία ελεύθερης, όσο και δεσμευμένης δοξορουβικίνης. Βέβαια, είναι εμφανές πως η κυτταρική πρόσληψη της DOX ενισχύεται σημαντικά όταν η DOX είναι δεσμευμένη στα oxCNDs@FCDs. Συγκεκριμένα, όταν τα κύτταρα επώαστηκαν για 5 h με το σύστημα oxCNDs@FCDs/DOX, η ένταση φθορισμού της DOX στα κύτταρα ήταν τέσσερις φορές μεγαλύτερη από αυτήν που μετρήθηκε όταν τα κύτταρα επώαστηκαν με ελεύθερη DOX. Περαιτέρω αύξηση της έντασης φθορισμού της DOX παρατηρείται μετά από 24 h επώασης με το σύστημα oxCNDs@FCDs/DOX (5 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την ελεύθερη DOX), δηλώνοντας ότι η ενδοκυττάρια πρόσληψη της DOX βελτιώνεται όταν είναι δεσμευμένη στα oxCNDs@FCDs. Ως μάρτυρες (control) χρησιμοποιήθηκαν για λόγους σύγκρισης κύτταρα τα οποία είχαν επωαστεί μόνο με θρεπτικό μέσο ή oxCNDs@FCDs και που, όπως ήταν αναμενόμενο, παρουσίασαν μόνο ελάχιστο αυτοφθορισμό.

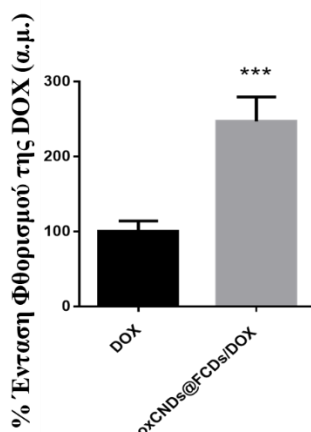
Στη συνέχεια, τόσο η κυτταρική πρόσληψη της δεσμευμένης DOX στα oxCNDs@FCDs, όσο και η ικανότητα των oxCNDs@FCDs να χρησιμοποιηθούν ως αποτελεσματικό σύστημα αντίχενωσης με πιθανές εφαρμογές στη βιοαπεικόνιση, μελετήθηκαν με την τεχνική της συνεστιακής μικροσκοπίας (Εικόνα 5.17).



Εικόνα 5.17: Ενδοκυττάριος εντοπισμός της DOX (κόκκινο) με συνεστιακή μικροσκοπία σε καρκινικά κύτταρα DU145, τα οποία επώαστηκαν παρουσία: (A) ελεύθερης DOX και (B) δεσμευμένης DOX στα oxCNDs@FCDs (μπλε) για 5 ώρες. Η συγκέντρωση της DOX σε όλα τα πειράματα ήταν 1 μ M και του υβριδικού νανοϋλικού 13.2 μ g/mL.

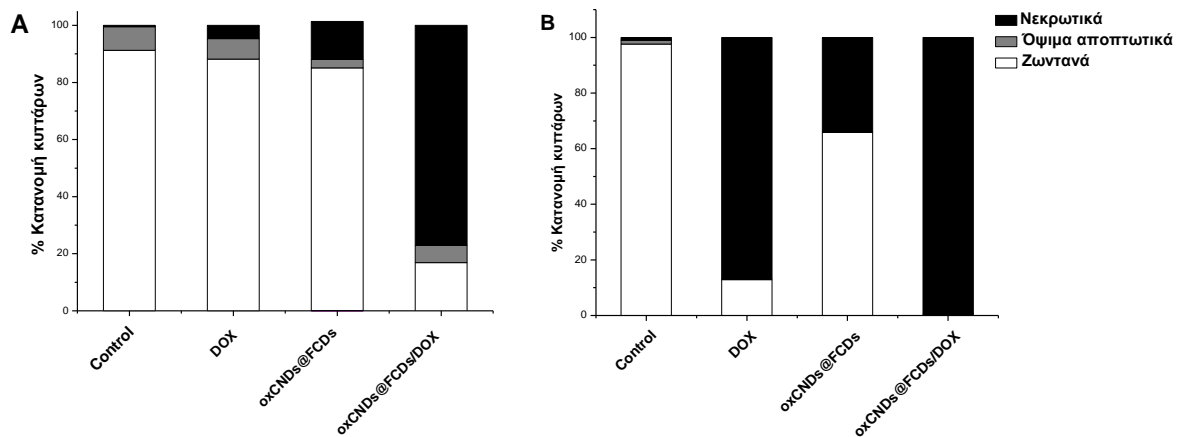
Έτσι, καρκινικά κύτταρα DU145 επώαστηκαν παρουσία της DOX και του συστήματος oxCNDs@FCDs/DOX για 5 h. Η συγκέντρωση της DOX σε όλα τα πειράματα ήταν 1 μ M και του υβριδικού νανοϋλικού 13.2 μ g/mL. Στην Εικόνα 5.17 δίνονται οι εικόνες που λήφθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία. Αναλυτικά, στην Εικόνα 5.17 A(3) φαίνονται κύτταρα DU145 που έχουν επωαστεί με ελεύθερη DOX (κόκκινο, δεξιά εικόνα) και στα οποία φαίνεται ότι η ελεύθερη DOX εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων, όπως αναμενόταν, εφόσον είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι εντοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου [49]. Επίσης, στην Εικόνα 5.17 B φαίνονται κύτταρα DU145 που έχουν επωαστεί με το σύστημα oxCNDs@FCDs/DOX. Στην Εικόνα 5.17 B(2) φαίνεται ότι τα oxCNDs@FCDs εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων (μπλε), ενώ στην Εικόνα 5.17 B(3) φαίνεται ότι η δεσμευμένη DOX εντοπίζεται τόσο στο πυρήνα των κυττάρων όσο και στο κυτταρόπλασμα. Από την υπέρθεση των εικόνων που λαμβάνεται (Εικόνα 5.17 B(4)) παρατηρείται ότι δεν υπάρχει σαφής συνεντοπισμός της DOX και των φοριζουσών νανοτελειών άνθρακα (μπλε-κόκκινο), που δηλώνει ότι η DOX

αποδεσμεύεται σταδιακά από το φορέα που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα για να καταλήξει στον πυρήνα του κυττάρου, διατηρώντας, έτσι, τη δραστικότητα της. Ακολούθως, οι εικόνες που ελήφθησαν από τη συνεστιακή μικροσκοπία επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Image J προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί η κυτταρική πρόσληψη της DOX. Συγκρίνοντας το φθορισμό των κυττάρων που επώαστηκαν με ελεύθερη DOX με αυτόν των κυττάρων που επώαστηκαν με δεσμευμένη DOX στα oxCNDs@FCDs (Σχήμα 5.34), διαπιστώνεται ότι η δεσμευμένη DOX προσλαμβάνεται από τα κύτταρα κατά τρεις φορές περισσότερο από ότι η ελεύθερη DOX. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με αυτά της κυτταρομετρίας ροής (Σχήμα 5.33) και επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα του κυτταροτοξικού ελέγχου (Σχήμα 5.31), όπου η δεσμευμένη DOX στα oxCNDs@FCDs εμφανίζει μεγαλύτερη δραστικότητα από την ελεύθερη DOX.



Σχήμα 5.34: Ποσοτικοποίηση του συνολικού φθορισμού της DOX με συνεστιακή μικροσκοπία στα καρκινικά κύτταρα DU145. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου * $p < 0.001$.**

Τέλος, μελετήθηκε η δράση της δεσμευμένης DOX στα oxCNDs@FCDs μέσω του προσδιορισμού της απόπτωσης/νέκρωσης των κυττάρων DU145. Συγκεκριμένα, καρκινικά κύτταρα DU145 επώαστηκαν για 5 h και 24 h παρουσία ελεύθερης DOX (1 μ M), δεσμευμένης DOX στα oxCNDs@FCDs/DOX (1 μ M, ως προς την DOX) και του υβριδικού υλικού (13.2 μ g/mL). Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν ποσοτικά ο αριθμός των ζωντανών, των όψιμων αποπτωτικών (late apoptotic) και των νεκρωτικών (necrotic) κυττάρων με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής, μετά από ταυτόχρονη χρώση των κυττάρων με δύο χρωστικές, την 7-αμινο-ακτινομυκίνη D (7-AAD) και την ανεξίνη V, τροποποιημένης με φλουοροσκεΐνη (Annexin V-FITC) [55].



Σχήμα 5.35: % Ποσοτικός προσδιορισμός των ζωντανών, των όψιμων αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων DU145 που επώαστηκαν με ελεύθερη και δεσμευμένη DOX, καθώς και του υβριδικού νανοϋλικού oxCNDs@FCDs, για (A) 5 h και (B) 24 h μετρούμενα με χρώση 7-AAD. Η συγκέντρωση της DOX είναι 1 μ M και η αντίστοιχη συγκέντρωση του νανοφορέα είναι 13.2 μ g/mL.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.35, μετά από επώαση 5 h με τον νανοφορέα oxCNDs@FCDs παρατηρείται ότι ο θάνατος των κυττάρων λαμβάνει χώρα κυρίως μέσω νέκρωσης (13%) από ότι μέσω απόπτωσης (3%), ενώ μετά από επώαση 24 h ο ο θάνατος των κυττάρων πραγματοποιείται αποκλειστικά μέσω νέκρωσης (35%). Αυτό υποδηλώνει πως το oxCNDs@FCDs προκαλεί διαταραχή της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης με την πάροδο του χρόνου, πιθανότατα λόγω της υψηλότερης πρόσληψής του από τα κύτταρα και άρα να εμφανίζει μεγαλύτερη τοξικότητα. Επιπλέον, όταν κύτταρα DU145 επώαστηκαν με δεσμευμένη DOX στα oxCNDs@FCDs, μεγαλύτερα ποσοστά κυρίως νεκρωτικών κυττάρων παρατηρήθηκαν σε σχέση με αυτά των κυττάρων που επώαστηκαν με ίδια συγκέντρωση ελεύθερης DOX. Συγκεκριμένα, μετά από επώαση 5 h, το σύστημα oxCNDs@FCDs/DOX προκαλεί υψηλότερα ποσοστά νέκρωσης (80% νέκρωση) από ότι η ελεύθερη DOX (7% απόπτωση και 5% νέκρωση). Από την άλλη πλευρά, μετά από επώαση 24 h το σύστημα oxCNDs@FCDs/DOX προκαλεί 100% νέκρωση, ενώ η ελεύθερη DOX 88%. Από τα αποτελέσματα στο Σχήμα 5.35 παρατηρείται, επίσης, ότι απουσιάζουν κύτταρα σε πρώιμο αποπτωτικό στάδιο, ενώ τα όψιμα αποπτωτικά κύτταρα είναι ελάχιστα, γεγονός που υποδηλώνει τον έντονο και ανεξέλεγκτο κυτταρικό θάνατο που λαμβάνει χώρα, ο οποίος αποδίδεται στην ταχύτερη ενδοκύττωση και ενδοκυτταρική αποδέσμευση της DOX από τα oxCNDs@FCDs. Συνεπώς, η δεσμευμένη DOX είναι ικανή να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο μέσω

νέκρωσης, με το σύστημα oxCNDs@FCDs/DOX να είναι πολύ πιο τοξικό στα κύτταρα σε σύγκριση με την ελεύθερη DOX.

Εν κατακλείδι συμπεραίνουμε ότι, η χορήγηση της δεσμευμένης DOX σε καρκινικά προστατικά κύτταρα DU145 και PC3, τα οποία είναι ανθεκτικά στην DOX, οδήγησε σε αυξημένη δραστηριότητα σε σχέση με την ελεύθερη DOX, ακόμα και σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις DOX (0.25 μ M). Έτσι, οι τροποποιημένοι νανοδίσκοι άνθρακα με φθορίζουσες νανοτελείες άνθρακα, οι οποίοι βρέθηκε ότι εμφανίζουν πολύ χαμηλή κυτταροτοξικότητα, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω ως ένα αποτελεσματικό σύστημα ανίχνευσης και μεταφοράς φαρμάκων.

5.2 Υβριδικά Υλικά ως Αντιβακτηριακά Υλικά

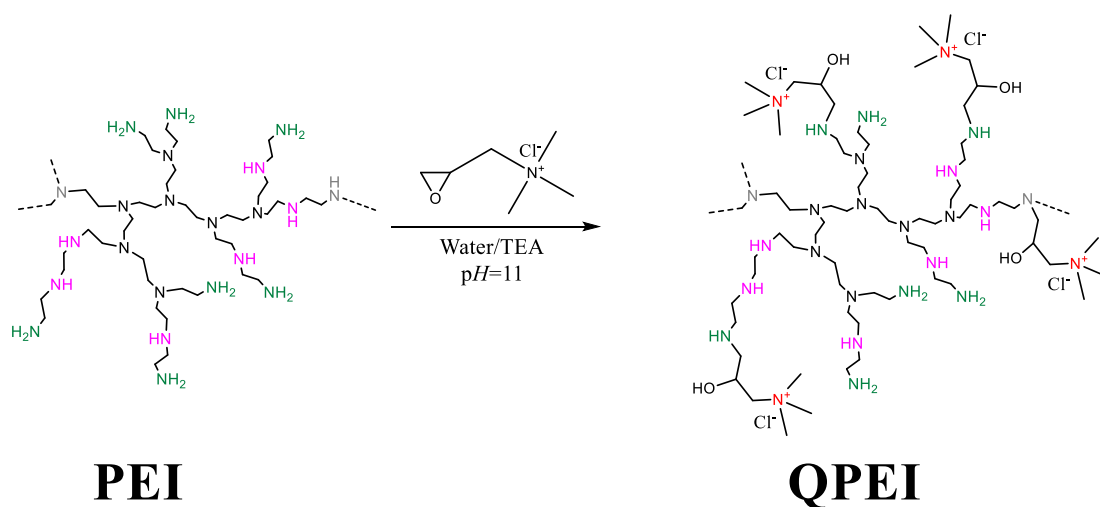
Γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία ότι νανοϋλικά με βάση νανοδομημένους άνθρακες καθώς και πολυμερή που φέρουν κατάλληλες θετικά φορτισμένες ομάδες, όπως τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα, ομάδες γουανιδίνης, αργινινικές ομάδες, κοκ., εμφανίζουν σημαντικές αντιβακτηριακές ιδιότητες [70, 71]. Τα τελευταία χρόνια οι αντιβακτηριακές ιδιότητες των νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα έχουν απασχολήσει αρκετά την ερευνητική κοινότητα [72, 73]. Προηγούμενες μελέτες με νανοσωλήνες άνθρακα έδειξαν αξιοσημείωτη αντιβακτηριακή δράση κατά των gram (+) και gram (-) βακτηρίων [74, 75]. Η αντιβακτηριακή δράση των νανοϋλικών αυτών αποδόθηκε σε βλάβες που προκαλεί η επαφή τους με την κυτταρική μεμβράνη [76]. Από την άλλη πλευρά, τις τελευταίες δεκαετίες τα δενδριτικά πολυμερή [77-80] έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για διάφορες βιολογικές εφαρμογές όπως ως αντιβακτηριδιακά υλικά [81-83] κυρίως λόγω των δομικών τους χαρακτηριστικών, εκ των οποίων τα κυριότερα είναι η ύπαρξη νανοκοιλοτήτων στο μόριο τους και η παρουσία πολλών επιφανειακών ομάδων στην επιφάνεια του μορίου τους. Επομένως, οι επιφανειακές τους ομάδες μπορεί να τροποποιηθούν κατάλληλα προδίνοντας τους πολυλειτουργικό χαρακτήρα [84-88]. Επιπλέον, λόγω της ποικίλης τροποποίησης τους είναι δυνατόν να προκύψουν νέα ελπιδοφόρα αντιβακτηριακά υλικά [89-91]. Ιδιαίτερα, τα δενδριτικά πολυμερή έχουν υψηλή πυκνότητα θετικού φορτίου, αλληλεπιδρούν ισχυρά με τη μεμβράνη των βακτηρίων, η οποία είναι αρνητικά φορτισμένη, μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, καθιστώντας τα πολύ αποτελεσματικά [70, 89]. Συνεπώς, αν συνδυαστούν οι δύο προαναφερθείσες κατηγορίες υλικών (υλικά άνθρακα και δενδριτικά πολυμερή), αναμένεται να εμφανίζουν ισχυρή αντιβακτηριδιακή δράση.

5.2.1 Αντιβακτηριακή μελέτη των υβριδικών υλικών oxCNTs@30-QPEI, oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο συνδυασμός νανοϋλικών άνθρακα με τα δενδριτικά πολυμερή εμφανίζει ελπιδοφόρα αποτελέσματα σε αντιβακτηριακές μελέτες. Έτσι συντέθηκαν οξειδωμένοι νανοσωλήνες άνθρακα (oxCNTs), οι οποίοι τροποποιήθηκαν με τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης (PEI), με βαθμό υποκατάστασης στις πρωτοταγείς αμινομάδες 30%, 50% και 80%, προκειμένου να μελετηθούν ως προς τις αντιβακτηριακές τους ιδιότητες.

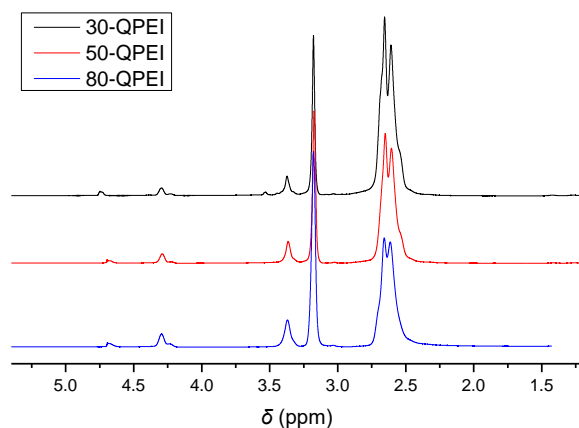
5.2.1.1 Σύνθεση και χαρακτηρισμός των παραγώγων της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης που φέρουν τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα

Η σύνθεση των παραγώγων της PEI που φέρουν τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα (QPEIs) με τρεις διαφορετικούς βαθμούς υποκατάστασης πραγματοποιήθηκε, ακολουθώντας γνωστή από τη βιβλιογραφία πορεία [92, 93]. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη μοριακού βάρους 25 KDa έχει αναλογία πρωτοταγών:δευτεροταγών:τριτοταγών αμινομάδων, 1.00:1.18:1.01 και ο μέσος αριθμός των πρωτοταγών αμινομάδων είναι 183 ανά μόριο [94], πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή ομάδων χλωριούχου N,N,N-τριμέθυλο-N-(β-υδρόξυ-πρόπυλο) αμμωνίου στις πρωτοταγείς αμινομάδες της PEI σε βασικό υδατικό περιβάλλον, σύμφωνα με την αντίδραση της Εικόνας 5.18. Έτσι ελήφθησαν τα τελικά παράγωγα της PEI που φέρουν ομάδες τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων με βαθμό υποκατάστασης στις πρωτοταγείς αμινομάδες 30% (30-QPEI), 50% (50-QPEI) και 80% (80-QPEI). Η επιτυχής σύνθεση τους και ο βαθμός υποκατάστασης τους πιστοποιήθηκε με φασματοσκοπίες ^1H και ^{13}C NMR.



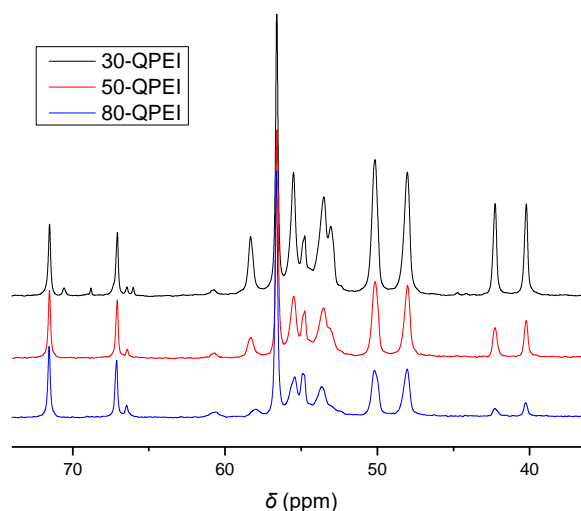
Εικόνα 5.18: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης των παραγώγων της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης που φέρουν τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα (QPEIs).

Αρχικά, στο Σχήμα 5.36 δίνονται τα φάσματα ^1H NMR των παραγώγων 30-QPEI, 50-QPEI και 80-QPEI σε D_2O .



Σχήμα 5.36: Φάσματα ^1H NMR των 30-QPEI, 50-QPEI και 80-QPEI σε D_2O .

Αναλυτικά, η επιτυχής εισαγωγή των ομάδων χλωριούχου N,N,N-τριμεθυλο-N-(β-υδροξυ-πρόπυλο) αμμωνίου στη PEI πιστοποιήθηκε από την πολλαπλή κορυφή στα 4.25 ppm που αποδίδεται στα πρωτόνια των υποκαταστημένων με την υδροξυλομάδα μεθυλενίων, η οποία σχηματίζεται μετά το άνοιγμα του εποξειδικού δακτυλίου, από την τριπλή κορυφή στα 3.45 ppm που αποδίδεται στα πρωτόνια των α-μεθυλενίων ως προς τα τεταρτοταγή άζωτα και από την απλή κορυφή στα 3.25 ppm που αντιστοιχεί στα πρωτόνια των μεθυλίων των ομάδων του τριμέθυλο αμμωνίου, όπως φαίνονται στα φάσματα ^1H NMR του Σχήματος 5.36. Επιπλέον, στην περιοχή των 2.50-2.70 ppm φαίνεται μια πολλαπλή κορυφή που αποδίδεται στα πρωτόνια των μεθυλενίων του σκελετού της PEI. Ολοκληρώνοντας τις κορυφές στα 3.45 ppm και 2.70-2.50 ppm, προσδιορίστηκε ο βαθμός υποκατάστασης των πρωτοταγών αμινομάδων της PEI και βρέθηκε ότι είναι 30%, 50% και 80% για τα 30-QPEI, 50-QPEI και 80-QPEI, αντίστοιχα.



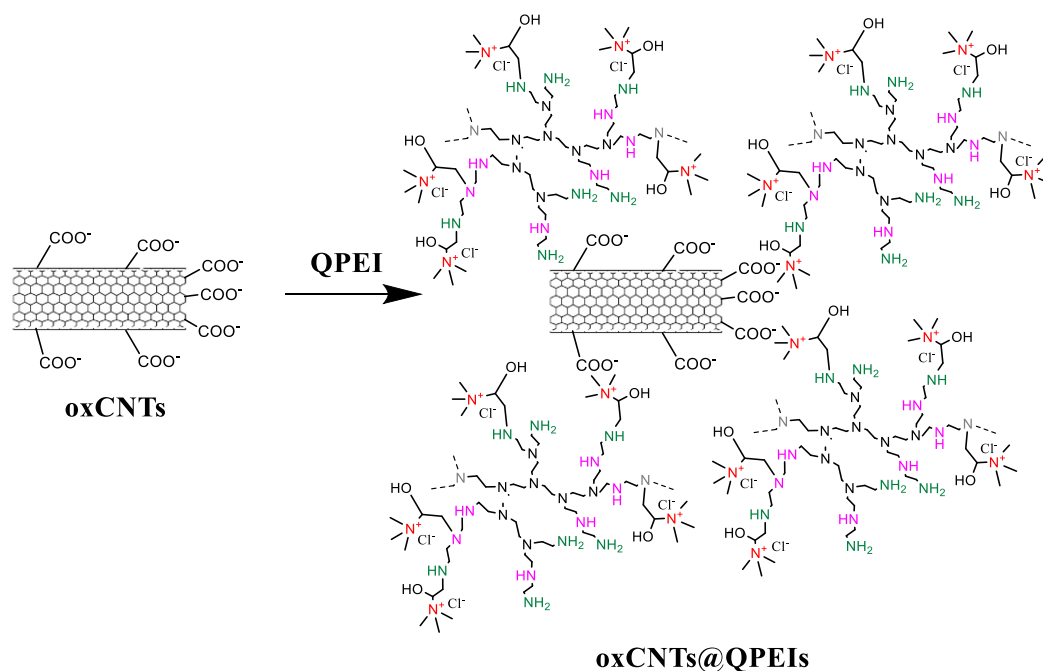
Σχήμα 5.37: Φάσματα ^{13}C NMR των 30-QPEI, 50-QPEI και 80-QPEI σε D_2O .

Επιπλέον, πληροφορίες για τη δομή των QPEIs λαμβάνονται και με φασματοσκοπία ^{13}C NMR. Στο Σχήμα 5.37 δίνονται τα φάσματα ^{13}C NMR των παραγώγων 30-QPEI, 50-QPEI και 80-QPEI σε D_2O . Από τις κορυφές στα 51.0 και 48.0 ppm (Σχήμα 5.37) βεβαιώνεται ο δεσμός των ομάδων χλωριούχου N,N,N-τριμεθυλο-N-(β-υδροξυ-πρόπυλο) αμμωνίου (Q) με τις πρωτοταγείς αμινομάδες της PEI, οι οποίες αποδίδονται στους άνθρακες του α-μεθυλενίου ως προς τις πρωτοταγείς αμινομάδες της PEI που υποκαταστάθηκαν ($\text{CH}_2\text{-NH-Q}$) και βρίσκεται δίπλα στις δευτεροταγείς (γνωστός ως $\text{C}_{1,2}$) και τριτοταγείς (γνωστός ως $\text{C}_{1,3}$) αμινομάδες, αντίστοιχα. Επιπλέον, η εισαγωγή των ομάδων χλωριούχου N,N,N-τριμεθυλο-N-(β-υδροξυ-πρόπυλο) αμμωνίου στην PEI επιβεβαιώνεται από τις κορυφές στα 71.5 και 57.0 ppm που αποδίδονται στους άνθρακες των α-μεθυλενίων και των μεθυλίων που είναι συνδεδεμένοι με τα τεταρτοταγή άζωτα, αντίστοιχα, καθώς και από την κορυφή στα 67.5 ppm που αντιστοιχεί στους α-άνθρακες των υποκαταστημένων με την υδροξυλομάδα μεθυλενίων (CH-OH).

5.2.1.2 Σύνθεση και χαρακτηρισμός των oxCNTs@30-QPEI, oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI

Όπως αναφέρεται και στο κεφάλαιο 5.1.1, πρώτα πραγματοποιήθηκε η οξείδωση των νανοσωλήνων άνθρακα (oxCNTs) ακολουθώντας τη γνωστή μέθοδο Staudenmaier [9], οι οποίοι στη συνέχεια τροποποιήθηκαν μη ομοιοπολικά με τα παρασκευασθέντα παράγωγα της PEI που φέρουν ομάδες τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.19. Συγκεκριμένα, τα θετικώς φορτισμένα παράγωγα της PEI αλληλεπιδρούν με τα αρνητικώς φορτισμένα oxCNTs μέσω ηλεκτροστατικών δεσμών, ενώ ο σκελετός της PEI προσροφάται στα πλευρικά τοιχώματα των oxCNTs μέσω van der Waals [10-13] δυνάμεων, δίνοντας τα υβριδικά υλικά oxCNTs@30-QPEI, oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI.

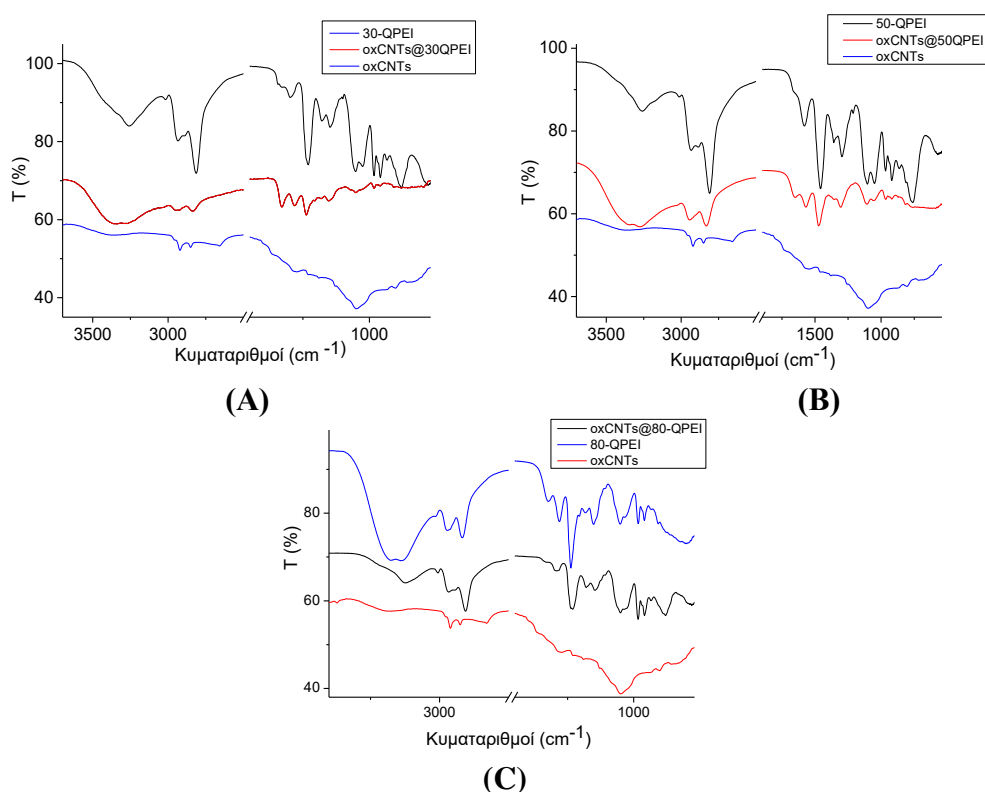
Τα υλικά αυτά χαρακτηρίστηκαν φυσικοχημικά με φασματοσκοπία FTIR, όπου πιστοποιήθηκε η επιτυχής σύνδεση των oxCNTs με τα QPEIs, ενώ με φασματοσκοπία Raman μελετήθηκε η δομή τους. Το ποσοστό των πολυμερών στα υβριδικά υλικά υπολογίζεται με θερμοβαρυμετρική και στοιχειακή ανάλυση. Επίσης, τα υβριδικά υλικά oxCNTs@QPEIs χαρακτηρίστηκαν μορφολογικά με μικροσκοπίες SEM, TEM και AFM.



Εικόνα 5.19: Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης των υβριδικών υλικών oxCNTs@QPEIs.

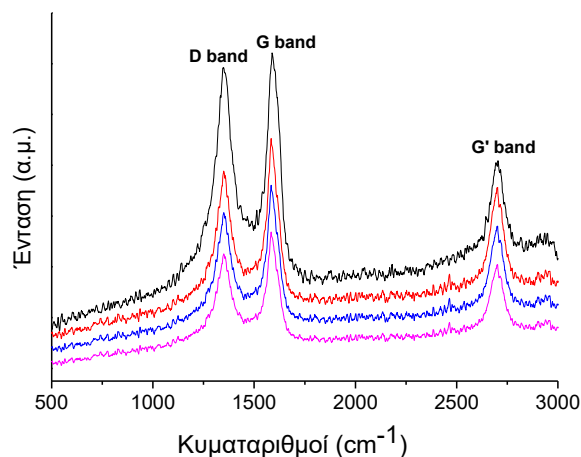
Η επιτυχής εισαγωγή των QPEIs στην επιφάνεια των oxCNTs μελετήθηκε αρχικά με φασματοσκοπία FTIR και τα αντίστοιχα φάσματα δίνονται στο Σχήμα 5.38. Αναλυτικά, στο Σχήμα 5.38 παρουσιάζονται τα φάσματα FTIR των oxCNTs@QPEIs μαζί με αυτά των οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα και των QPEIs για συγκριτικούς λόγους. Στο φάσμα των οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα φαίνονται όλες οι κορυφές που οφείλονται τόσο στη γραφιτική δομή των νανοσωλήνων όσο και στην παρουσία των οξυγονούχων ομάδων (καρβοξυλικών, καρβονυλικών, υδροξυλικών και εποξειδικών ομάδων) στην επιφάνεια των νανοσωλήνων όπως ήδη έχουν αναφερθεί αναλυτικά στο κεφάλαιο 5.1.1. Από την άλλη πλευρά, στα φάσματα των QPEIs παρατηρούμε ότι συμπεριλαμβάνονται και όλες οι χαρακτηριστικές δονήσεις των PEI, όπως είναι οι κορυφές στα 3360 και 3270 cm^{-1} που αποδίδονται στις δονήσεις έκτασης των πρωτοταγών και δευτεροταγών αμινομάδων, οι κορυφές στα 2940 και 2835 cm^{-1} που αντιστοιχούν στις αντισυμμετρικές και συμμετρικές δονήσεις του CH_2 καθώς και οι κορυφές στα 1600 και 1560 cm^{-1} που αποδίδονται στην παραμόρφωση της ομάδας NH των πρωτοταγών και δευτεροταγών αμινομάδων, αντίστοιχα. Τέλος, οι κορυφές στα 1455 και 760 cm^{-1} στα φάσματα των QPEIs αντιστοιχούν στις δονήσεις κάμψης και αιώρησης του CH_2 , αντίστοιχα, ενώ οι κορυφές στα 1115 και 1050 cm^{-1} αποδίδονται στις αντισυμμετρικές και συμμετρικές δονήσεις έκτασης του C-N [95]. Επιπλέον, παρατηρούνται οι κορυφές στα 3030 cm^{-1}

και 1485 cm^{-1} που αποδίδονται σε δονήσεις έκτασης και παραμόρφωσης των ομάδων CH_3 του τριμέθυλο αμμωνίου ($(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$) καθώς και οι αντισυμμετρικές δονήσεις έκτασης ολόκληρης της ομάδας $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$ στα 970 cm^{-1} , ενώ οι δονήσεις έκτασης της ομάδας C-OH παρατηρούνται στα 1100 cm^{-1} [96]. Συγκρίνοντας τα φάσματα των oxCNTs και των QPEIs με τα αυτά των υβριδικών υλικών oxCNTs@QPEIs είναι εμφανής η ύπαρξη των χαρακτηριστικών κορυφών τόσο των oxCNTs όσο και των QPEIs στα φάσματα των τελικών προϊόντων, υποδηλώνοντας την επιτυχή αλληλεπίδρασή τους.



Σχήμα 5.38: Φάσματα FTIR (A) των oxCNTs, 30-QPEI, και oxCNTs@30-QPEI, (B) των oxCNTs, 50-QPEI, και oxCNTs@50-QPEI και (C) των oxCNTs, 80-QPEI, και oxCNTs@80-QPEI.

Στη συνέχεια, η δομή των τροποποιημένων oxCNTs με τα QPEIs μελετήθηκε με φασματοσκοπία Raman και τα αντίστοιχα φάσματα δίνονται στο Σχήμα 5.39.

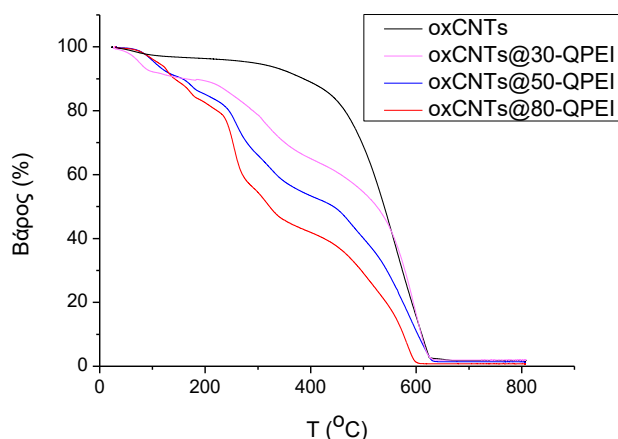


Σχήμα 5.39: Φάσματα Raman των oxCNTs (μαύρο), oxCNTs@30-QPEI (κόκκινο), oxCNTs@50-QPEI (μπλέ) και oxCNTs@80-QPEI (μώβ).

Συγκεκριμένα, τα φάσματα των oxCNTs και των τροποποιημένων oxCNTs με τα QPEIs εμφανίζουν τις δύο χαρακτηριστικές γραφίτικές ταινίες στα 1585 cm^{-1} (ταινία G) και 1345 cm^{-1} (ταινία D), που αποδίδονται τόσο στη δόνηση των sp^2 ατόμων άνθρακα στο γραφίτικό πλέγμα όσο και στα ελαττώματα που εμφανίζονται στην επιφάνεια των νανοσωλήνων, λόγω της μετατροπής των ατόμων άνθρακα από sp^2 σε sp^3 υβριδισμό, αντίστοιχα. Επίσης, παρατηρείται η ταινία στα $\sim 2700\text{ cm}^{-1}$ (ταινία G') που αποδίδεται στη δευτέρας τάξης αρμονική της D-ταινίας. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.39 δεν υπάρχουν αλλαγές στις κορυφές των φασμάτων των υβριδικών υλικών σε σχέση με τους οξειδωμένους νανοσωλήνες άνθρακα. Αυτό υποδηλώνει ότι η γραφίτική δομή των oxCNTs δεν έχει αλλάξει μετά την τροποποίησή τους με τα QPEIs. Το μόνο που αλλάζει είναι η τιμή του λόγου της έντασης των ταινιών D προς G (I_D/I_G) που όπως έχει αναφερθεί αποτελεί μέτρο για τον προσδιορισμό της έκτασης των ατελειών στο γραφίτικό πλέγμα που μπορεί να προκύψουν μετά από την χημική ή φυσική τροποποίηση του [16]. Συγκεκριμένα, ο λόγος των εντάσεων αυξάνεται ελαφρώς από 1.03 (oxCNTs) σε 1.16 (oxCNTs@80-QPEIs), γεγονός που υποδηλώνει την επιτυχή πρόσδεση των QPEIs γύρω από τα πλευρικά τοιχώματα των oxCNTs [97]. Σε ανάλογες μελέτες όπου νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων τροποποιήθηκαν ομοιοπολικά με το τρίτης γενιάς πολυ(αμιδο άμινο) δενδριμερές ή με αμφιφιλικά πολυ(προπυλενο ίμινο) δενδριμερή, αναφέρθηκε ότι ο λόγος των εντάσεων των ταινιών D προς G (I_D/I_G) αυξήθηκε σημαντικά μετά την τροποποίηση, υποδεικνύοντας ότι αυτή προκάλεσε σημαντικές ατέλειες στο γραφίτικό πλέγμα των νανοσωλήνων [98, 99]. Αντιθέτως, στην παρούσα μελέτη τα oxCNTs

τροποποιήθηκαν μη ομοιοπολικά με τα QPEI και έτσι διατήρησαν τη γραφική δομή τους σχεδόν άθικτη.

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται θερμοβαρυστική ανάλυση (TGA) από όπου λαμβάνονται περαιτέρω πληροφορίες για τα παρασκευασθέντα νανοϋλικά. Στο Σχήμα 5.40 παρουσιάζονται οι καμπύλες των τροποποιημένων και μη οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα.



Σχήμα 5.40: Καμπύλες θερμοβαρυστικής ανάλυσης (TGA) των oxCNTs και των oxCNTs@QPEIs.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.12, στην καμπύλη απώλειας βάρους των oxCNTs παρατηρούνται δύο περιοχές θερμοκρασιών όπου ανιχνεύεται απώλεια βάρους. Συγκεκριμένα, παρατηρείται μια απώλεια βάρους ~4% σε σχέση με το αρχικό στο θερμοκρασιακό εύρος 180–400 °C, το οποίο οφείλεται στη θερμική υποβάθμιση, λόγω καύσης των οξυγονούχων λειτουργικών ομάδων που υπάρχουν στην επιφάνεια των oxCNTs, ενώ η θερμική υποβάθμιση σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 400 °C αποδίδεται στη θερμική αποδόμηση του γραφίτικού πλέγματος. Από την άλλη πλευρά, στις καμπύλες TGA των υβριδικών υλικών, παρατηρείται αρχικά μια απώλεια βάρους της τάξης του 10-20% σε θερμοκρασίες μέχρι 250 °C, λόγω τόσο της απομάκρυνσης των οξυγονούχων ομάδων των oxCNTs, όσο και της μερικής θερμικής αποδόμηση του σκελετού της PEI. Στη συνέχεια στην περιοχή των 250-500 °C παρατηρείται μια σημαντική απώλεια βάρους σε σχέση με την αντίστοιχη περιοχή των oxCNTs (μέγιστο 60% στην περίπτωση του oxCNTs@80-QPEIs), η οποία οφείλεται στη θερμική αποδόμηση τόσο του γραφίτικού πλέγματος των oxCNTs, όσο των QPEIs από αυτό. Τέλος, σε θερμοκρασίες πάνω από τους 500 °C παρατηρείται μια απότομη απώλεια βάρους, η οποία δείχνει την ολική αποδόμηση του γραφίτικού πλέγματος, όπως και στην περίπτωση των αρχικών νανοσωλήνων. Από τα ανωτέρω

αποτελέσματα, είναι εμφανές ότι η παρουσία των QPEIs στην επιφάνεια oxCNTs αλλάζει το ρυθμό της θερμικής αποδόμησης των νανοσωλήνων άνθρακα, γεγονός που αποτελεί άλλη μια απόδειξη της επιτυχούς τροποποίησης των oxCNTs με τα QPEIs.

Επίσης, όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 5.1.1, με τη χρήση της θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί το ποσοστό των QPEIs στα υβριδικά υλικά, παρά μόνο να εξάγουμε ποιοτικά αποτελέσματα, διότι λαμβάνει χώρα ταυτόχρονη θερμική αποδόμηση τόσο των oxCNTs όσο και των QPEIs. Προκειμένου λοιπόν να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα των QPEIs στα υβριδικά υλικά, πραγματοποιήθηκε στοιχειακή ανάλυση. Λαμβάνοντας υπόψη, όπως και στην περίπτωση των oxCNTs@QPEIs, ότι το ποσοστό του αζώτου στα τροποποιημένα oxCNTs προέρχεται σχεδόν αποκλειστικά από τα QPEIs, προσδιορίστηκε η ποσότητα των QPEIs πάνω στους οξειδωμένους νανοσωλήνες, χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο:

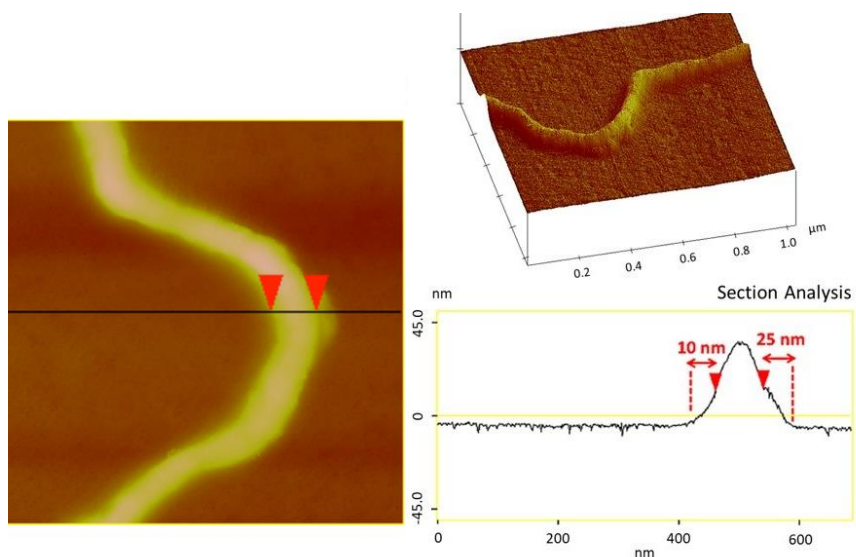
$$\text{QPEI (\% w/w)} = (N_s - N_{\text{CNTs}}) / (N_{\text{QPEI}} - N_{\text{CNTs}}) \times 100$$

όπου, N_s , N_{QPEI} και N_{CNTs} είναι το κλάσμα στοιχειακής μάζας του αζώτου στα oxCNTs@QPEIs, τα QPEIs και τα oxCNTs, αντίστοιχα [18]. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.3. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, το ποσοστό των QPEIs στα oxCNTs@30-QPEI, oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI υπολογίστηκε ότι είναι 16.05%, 19.92% και 23.23%, αντίστοιχα.

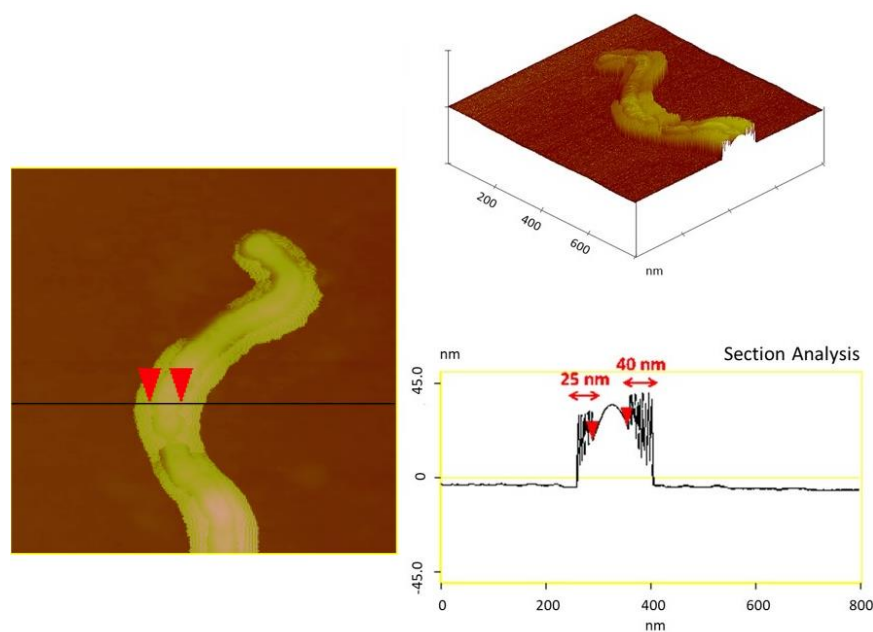
Πίνακας 5.3: Αποτελέσματα στοιχειακής ανάλυσης των oxCNTs, QPEIs και oxCNTs@QPEIs και υπολογισμός εξ αυτών των ποσοστών QPEI στα oxCNTs.

Υλικό	Στοιχειακή ανάλυση / wt%			QPEI (% w/w)
	C	H	N	
oxCNTs	94.48	0.44	0.18	
30-QPEI	51.62	11.06	23.54	
oxCNTs@30-QPEI	80.38	1.96	3.93	16.05 %
50-QPEI	51.49	11.87	24.48	
oxCNTs@50-QPEI	81.67	2.99	5.02	19.92 %
80-QPEI	50.98	12.74	25.57	
oxCNTs@80-QPEI	82.19	3.23	6.08	23.23 %

Στη συνέχεια μελετάται η μορφολογία των νανοϋλικών με μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM), ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) και ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM). Αρχικά, η μορφολογία των oxCNTs@QPEIs μελετήθηκε με AFM, όπως φαίνεται στις Εικόνες 5.20 και 5.21.



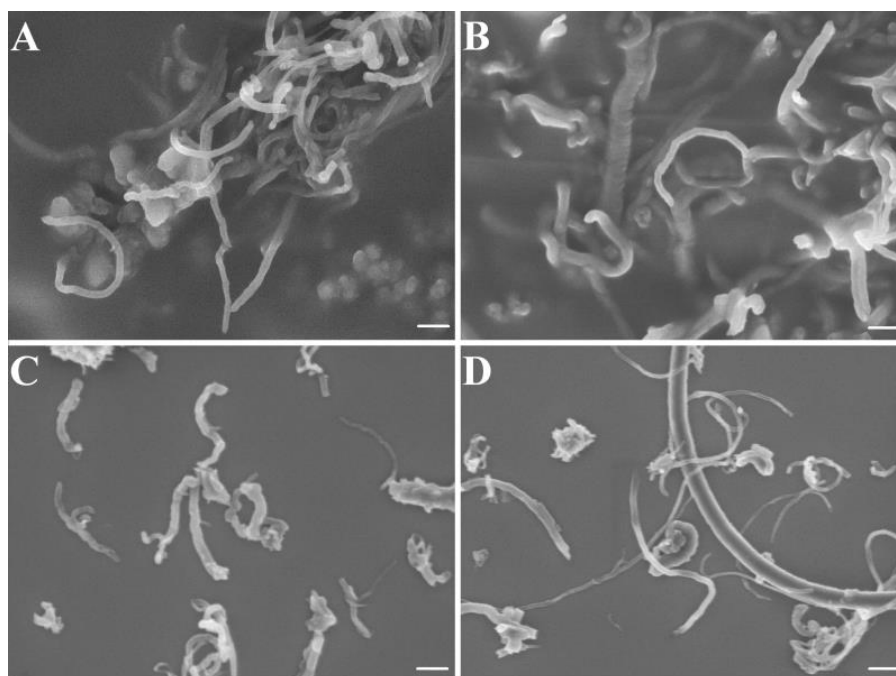
Εικόνα 5.20: Εικόνες AFM της μορφολογίας των oxCNTs@50-QPEI.



Εικόνα 5.21: Εικόνες AFM της μορφολογίας των oxCNTs@80-QPEI.

Οι εικόνες AFM για τα υβριδικά υλικά oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI ελήφθησαν μετά την εναπόθεση τους πάνω σε υπόστρωμα πυριτίου, ώστε να μελετηθούν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των oxCNTs μετά την τροποποίησή τους με τα πολυμερή στη νανοκλίμακα. Όπως προκύπτει από την τοπογραφική

ανάλυση, παρατηρείται μια επικάλυψη σε κάθε πλευρά των νανοσωλήνων, η οποία στην περίπτωση των oxCNTs@50-QPEI (Εικόνα 5.20) είναι της τάξεως των 10–25 nm, ενώ στην περίπτωση των oxCNTs@80-QPEI είναι αρκετά μεγαλύτερη, της τάξεως των 25–40 nm (Εικόνα 5.21). Επιπλέον, προσδιορίστηκε η μέση διάμετρος των oxCNTs@QPEIs και βρέθηκε ότι είναι 40–50 nm, δηλαδή πολύ μεγαλύτερη από αυτή που υπολογίστηκε για τα oxCNTs (15–25 nm) στο κεφάλαιο 5.1.1, υποδηλώνοντας την επιτυχή πρόσδεση των πολυμερών στα τοιχώματα των oxCNTs. Επίσης, από τις παραπάνω εικόνες βεβαιώνεται ότι τα πολυμερή έχουν επιτυχώς περιτυλιχτεί γύρω από τα τοιχώματα των οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα. Στη συνέχεια η μορφολογία των υλικών μελετήθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης και οι εικόνες δίνονται στην Εικόνα 5.22.

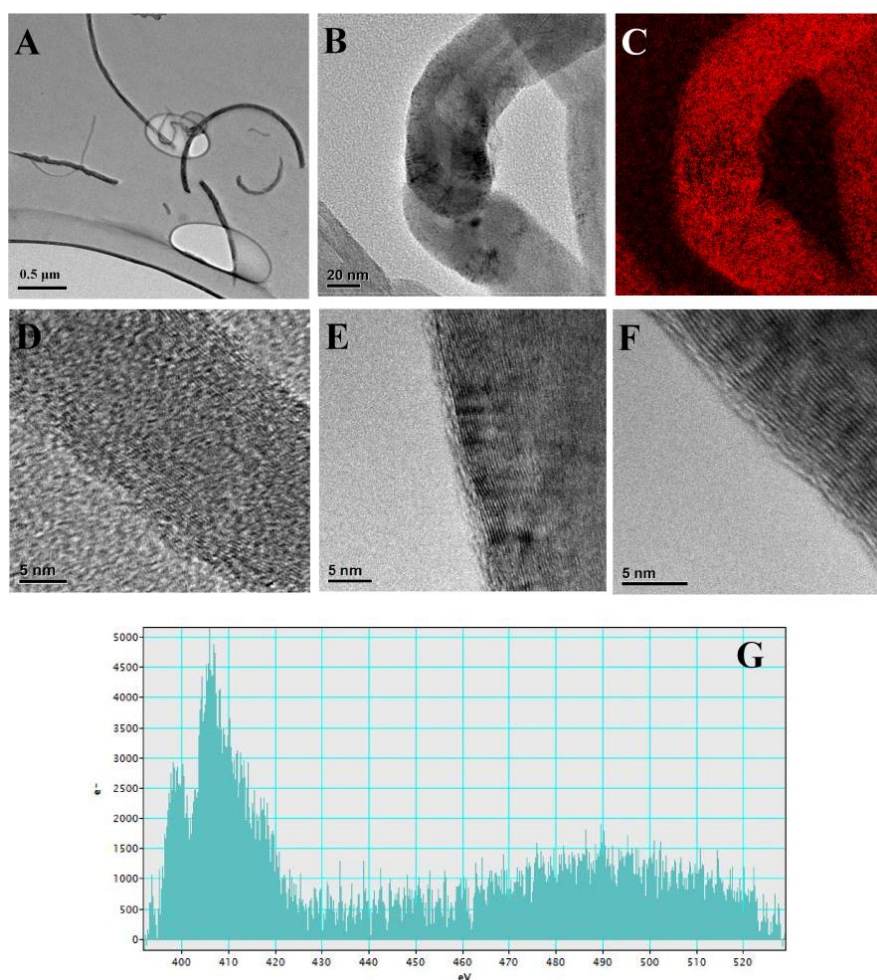


Εικόνα 5.22: Εικόνες SEM των (A) oxCNTs@30-QPEI, (B) oxCNTs@50-QPEI και (C, D) oxCNTs@80-QPEI. Η κλίμακα είναι 100 nm.

Από την Εικόνα 5.22 είναι σαφές πως μετά την τροποποίηση των νανοσωλήνων άνθρακα με τα πολυμερή δεν αλλάζει σημαντικά η μορφολογία των oxCNTs. Επιπλέον, φαίνεται ότι τα oxCNTs@QPEIs είναι πολύ καλά διεσπαρμένα και δεν παρατηρούνται συσσωματώματα, όπως παρατηρήθηκε στην περίπτωση των oxCNTs (Κεφάλαιο 5.1.1). Ειδικά, τα oxCNTs μετά την τροποποίηση με το 80-QPEI δείχνουν καλύτερα διεσπαρμένα σε σχέση με τα άλλα δύο υβριδικά υλικά. Επίσης, η επιφάνεια των τοιχωμάτων των υβριδικών υλικών δεν φαίνεται να είναι τόσο λεία, όσο στην

περίπτωση των oxCNTs, αποδεικνύοντας την επιτυχή τροποποίηση των πλευρικών τοιχωμάτων των νανοσωλήνων με τα πολυμερή.

Τέλος, η μορφολογία των υβριδικών υλικών, αλλά και η παρουσία των QPEIs πάνω στους οξειδωμένους νανοσωλήνες αξιολογήθηκαν με μικροσκοπία TEM, με φασματοσκοπία απώλειας ενέργειας ηλεκτρονίων (EELS), καθώς και συνδυάζοντας εικόνες TEM υψηλής ανάλυσης συνοδευόμενες από τις εικόνες χαρτογράφησης κατανομής αζώτου των αντίστοιχων περιοχών, όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 5.23.



Εικόνα 5.23: Εικόνα TEM των (A) oxCNTs@50-QPEI. Εικόνα φωτεινού πεδίου (B) συνοδευόμενη από την εικόνα χαρτογράφησης κατανομής αζώτου (κόκκινο) της αντίστοιχης περιοχής (C). Εικόνες HRTEM του oxCNTs@80-QPEI (D-F) καθώς και ένα τυπικό φάσμα EELS αζώτου των oxCNTs@80-QPEI (G).

Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.23A, οι τροποποιημένοι νανοσωλήνες άνθρακα δείχνουν να είναι καλά διεσπαρμένοι και χωρίς να συσσωματώνονται, όπως και στις εικόνες SEM. Στις εικόνες HRTEM παρατηρείται η γραφική δομή των

τοιχωμάτων των oxCNTs που είναι πλήρως καλυμμένα από ένα άμορφο στρώμα πολυμερούς (Εικόνες 5.23 D και E). Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε η χωρική κατανομή του αζώτου από τις εικόνες χαρτογράφησης κατανομής στοιχείων (Εικόνα 5.23 C) των αντίστοιχων εικόνων φωτεινού πεδίου των oxCNTs (Εικόνες 5.23 B). Είναι προφανές ότι η ένταση του αζώτου (κόκκινο) προέρχεται αποκλειστικά από τα 50-QPEI και συνεπώς αποδεικνύεται πως οι οξειδωμένοι νανοσωλήνες άνθρακα επικαλύπτονται ομοιόμορφα από το πολυμερές. Επιπλέον, σε ένα τυπικό φάσμα EELS του oxCNTs@80-QPEI (Εικόνα 5.23 G) καταγράφονται οι γραμμές K του αζώτου, ως απόδειξη της παρουσίας του αζώτου στο υβριδικό υλικό, το οποίο προέρχεται αποκλειστικά 80-QPEI. Από τα παραπάνω αποτελέσματα, βεβαιώνεται η επιτυχής σύνδεση των QPEIs με τα γραφίτικά τοιχωμάτα των oxCNTs.

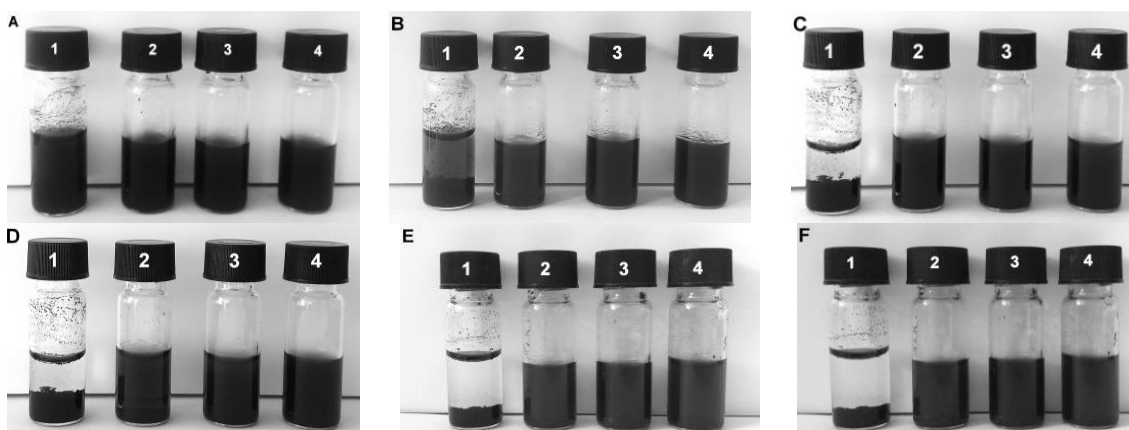
5.2.1.3 Χαρακτηρισμός των υδατικών διασπορών των υβριδικών υλικών oxCNTs@30-QPEI, oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI

Η σταθερότητα των υδατικών διασπορών των υβριδικών υλικών μελετήθηκε αρχικά με οπτική παρατήρηση και στη συνέχεια με φασματοσκοπία UV-vis και με μετρήσεις ζ-δυναμικού και δυναμική σκέδαση φωτός. Έτσι αρχικά παρασκευάστηκαν υδατικές διασπορές των oxCNTs και των oxCNTs@QPEIs σε συγκέντρωση 1.0 mg/mL και παρατηρήθηκαν επί 12 μήνες. Στην Εικόνα 5.24 παρουσιάζονται οι υδατικές διασπορές αμέσως μετά από έκθεση σε υπερήχους (A), καθώς και έπειτα από παραμονή σε ηρεμία για διάστημα 1 μήνα (B), 3 μηνών (C), 6 μηνών (D), 12 μηνών (E) και 18 μηνών (F).

Είναι προφανές ότι η υδατική σταθερότητα των oxCNTs είναι χαμηλή, καθώς τα oxCNTs έχουν αρχίσει να συσσωματώνονται ένα μήνα μετά από τη διαδικασία κατεργασίας με υπερήχους, ενώ μετά από 6 μήνες παρατηρείται ότι έχουν πλήρως καταβυθιστεί. Η συμπεριφορά αυτή οφείλεται, όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, στην έντονη τάση τους να συσσωματώνονται στο νερό, λόγω της υψηλής επιφανειακής ενέργειας τους, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να διασπαρθούν σε υδατικά μέσα, σχηματίζοντας συσσωματώματα [20].

Στην παρούσα εργασία, θετικώς φορτισμένα, παράγωγα της PEI που φέρουν ομάδες τεταρτοταγών αλάτων χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να τροποποιήσουν τους αρνητικώς φορτισμένους νανοσωλήνες άνθρακα μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και δυνάμεων van der Waals, λαμβάνοντας έτσι oxCNTs διακοσμημένα με θετικά φορτισμένες ομάδες, τα οποία μπορούν να διασπαρθούν

επιτυχώς σε υδατικά μέσα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.24 οι υδατικές διασπορές όλων των υβριδικών υλικών παραμένουν σταθερές μετά από 18 μήνες από τη διαδικασία κατεργασίας με υπερήχους, εφόσον δεν παρατηρείται σχηματισμός συσσωματωμάτων, αλλά ούτε και καθίζηση.

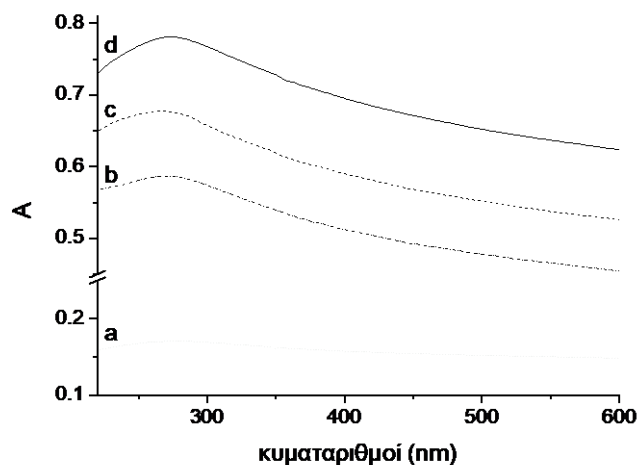


Εικόνα 5.24: Υδατικές διασπορές των oxCNTs (1), oxCNTs@30-QPEI (2) oxCNTs@50-QPEI (3) και oxCNTs@80-QPEI (4) σε νερό (1 mg/mL) αμέσως μετά τους υπερήχους (A), μετά από ηρεμία: 1 μήνα (B), 3 μηνών (C), 6 μηνών (D), 12 μηνών (E) και 18 μηνών(F).

Η βελτιωμένη ιδιότητα διασποράς των υβριδικών υλικών αποδίδεται στην παρουσία των ομάδων των τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων στην επιφάνεια των οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα, οι οποίες ενισχύουν την υδροφιλικότητα των νανοσωλήνων, παρέχοντας υψηλή υδατική συμβατότητα, με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η συσσωμάτωση των oxCNTs, λόγω ηλεκτροστατικών απωθήσεων. Συνεπώς, τα παραγόμενα υβριδικά υλικά (oxCNTs@QPEIs) διασπείρονται ομοιόμορφα σε υδατικά μέσα, λόγω της παρουσίας των υδρόφιλων ομάδων στην επιφάνεια των οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα, γεγονός που αποτελεί άλλη μια απόδειξη της επιτυχούς τροποποίησης των oxCNTs.

Επιπλέον, η ικανότητα διασποράς των oxCNTs@QPEIs μελετήθηκε με φασματοσκοπία UV-vis, λαμβάνοντας υπόψη, όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 5.1.1, ότι τα καλώς διασπαρμένα CNTs, σε αντίθεση με τα συσσωματωμένα CNTs, απορροφούν στην περιοχή UV-vis, εμφανίζοντας μια χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης στα 263 nm [100]. Στο Σχήμα 5.41 δίνονται τα φάσματα των υδατικών διασπορών των oxCNTs@QPEIs συγκέντρωσης 1 mg/mL, όπου φαίνεται η χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης στα 263 nm. Επίσης είναι γνωστό ότι όσο πιο καλά διασπαρμένοι είναι οι νανοσωλήνες άνθρακα τόσο υψηλότερη είναι η ένταση

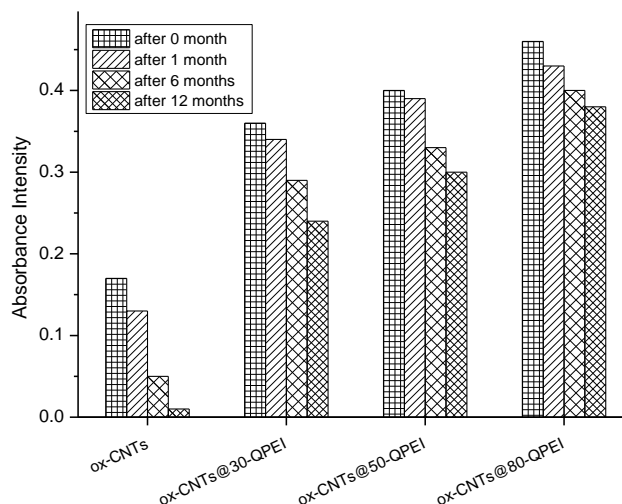
της κορυφής αυτής [27]. Από το Σχήμα 5.41 είναι εμφανές ότι όλα τα oxCNTs@QPEIs εμφανίζουν βελτιωμένη ικανότητα διασποράς σε σύγκριση με τα oxCNTs, με βέλτιστο το oxCNTs@80-QPEI.



Σχήμα 5.41: Φάσματα UV-vis των υδατικών διασπορών των oxCNTs (a), oxCNTs@30-QPEI (b), oxCNTs@50-QPEI (c) και oxCNTs@80-QPEI (d).

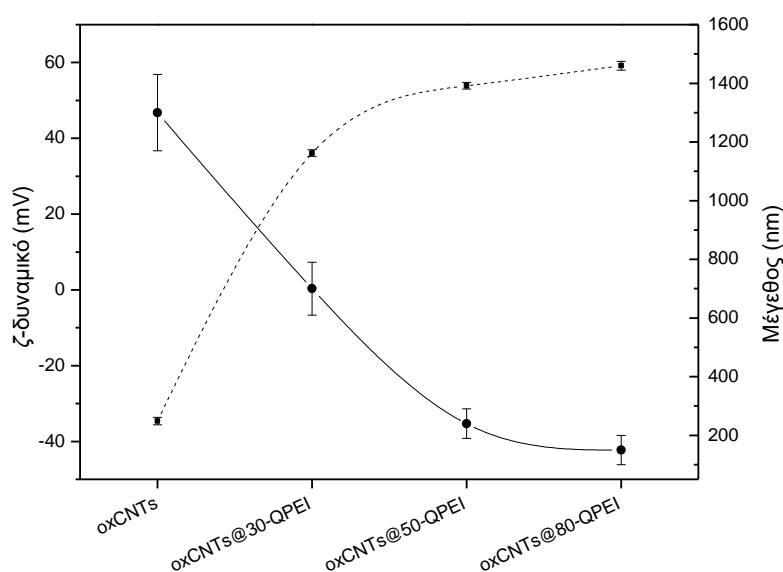
Επιπλέον, με φασματοσκοπία UV-vis μελετήθηκε η σταθερότητα των υδατικών διασπορών των oxCNTs@QPEIs, εκμεταλλευόμενοι και πάλι την ένταση της απορρόφησης των oxCNTs στα 263 nm. Έτσι παρασκευάστηκαν υδατικές διασπορές των oxCNTs και των oxCNTs@QPEIs σε συγκέντρωση 1.0 mg/mL και καταγράφηκαν τα φάσματα UV-vis σε τακτά χρονικά διαστήματα επί 12 μήνες. Στο Σχήμα 5.42 παρουσιάζονται οι εντάσεις απορρόφησης στα 263 nm των υδατικών διασπορών των σκέτων oxCNTs αλλά και των τροποποιημένων με τα QPEIs μετά από έκθεση σε υπερήχους (χρόνος 0) και έπειτα από παραμονή σε ηρεμία για διάστημα 1 μήνα, 6 μηνών και 12 μηνών. Από το Σχήμα 5.42 είναι προφανές ότι οι υδατικές διασπορές των υβριδικών υλικών είναι σταθερές για τουλάχιστον 12 μήνες αφού η ένταση της απορρόφησης μειώνεται κατά 10-20%, σε σχέση με την αρχική. Αντιθέτως, η ένταση της απορρόφησης των oxCNTs μειώνεται κατά 90% μετά από 12 μήνες ηρεμίας. Η μείωση αυτή, οφείλεται στη σταδιακή δημιουργία συσσωματωμάτων, τα οποία στη συνέχεια συνενώνονται και τελικώς καταβυθίζονται. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα της Εικόνας 5.24 και του Σχήματος 5.41. Επιπλέον, φαίνεται πως η διασπορά των oxCNTs@80-QPEI είναι η πιο σταθερή αφού η ένταση της απορρόφησης της διασποράς τους μειώνεται μόλις 10% μετά από 12 μήνες ηρεμίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι η σταθερότητα των υδατικών διασπορών των oxCNTs@QPEIs που επιτεύχθηκε είναι μία από τις

υψηλότερες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία και έχει τεράστια σημασία, εφόσον η υδατική σταθερότητα τέτοιων υβριδικών νανοϋλικών αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την τελική χρήση τους σε διάφορες βιομηχανικές εφαρμογές.



Σχήμα 5.42: Μελέτη σταθερότητας των υδατικών διασπορών (1 mg/mL) των oxCNTs, oxCNTs@30-QPEI, oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI μετά από έκθεση σε υπεριώδες (χρόνος 0) και έπειτα από παραμονή σε ημερία για διάστημα 1 μήνα, 6 μηνών και 12 μηνών.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS) και ζ-δυναμικού, προκειμένου να προσδιοριστεί το μέγεθος και το επιφανειακό φορτίο των υλικών. Σημειώνεται ότι, παρόλο που μετρήσεις DLS είναι κατάλληλες για τον προσδιορισμό της διαμέτρου σφαιρικών σωματιδίων, έχουν χρησιμοποιηθεί και για τον προσδιορισμό της υδροδυναμικής διαμέτρου των νανοσωλήνων άνθρακα, βασιζόμενοι στην υπόθεση ότι μία ισοδύναμη υδροδυναμική διάμετρος μιας σφαίρας (D_h) έχει ίδιες ιδιότητες διάχυσης με τα CNTs [101]. Με αυτόν τον τρόπο, παρόλο που δεν μπορούν να υπολογιστούν απόλυτες τιμές μεγέθους, μπορεί να επιτευχθεί σύγκριση σχετικού μεγέθους για παρόμοιου σχήματος υλικά [102]. Έτσι συγκρίνοντας τα μεγέθη των oxCNTs και των oxCNTs@QPEIs, είναι προφανές ότι μετά την τροποποίηση των oxCNTs με τα QPEIs αποφεύγεται η συσσωμάτωσή τους, αφού η τιμή της υδροδυναμικής διαμέτρου των oxCNTs μειώθηκε από 1300 nm σε 150 nm στην περίπτωση του 80-QPEI (Σχήμα 5.43).



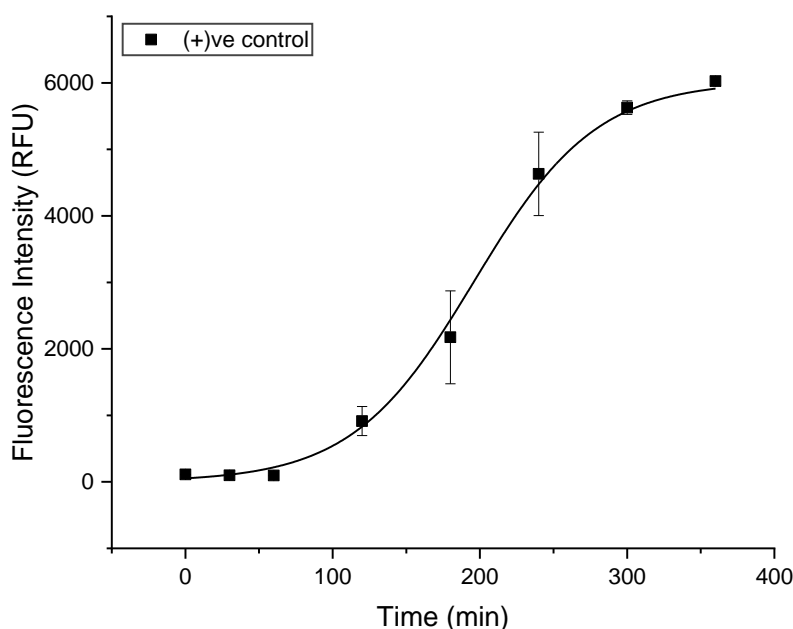
Σχήμα 5.43: Μέση υδροδυναμική διάμετρος και τιμές ζ-δυναμικού oxCNTs@QPEIs σε υδατική διασπορά 0.05 mg/mL και pH = 7.0.

Επίσης, στο Σχήμα 5.43 δίνονται και οι τιμές του ζ-δυναμικού των υλικών σε pH = 7.0. Όπως ήταν αναμενόμενο τα oxCNTs έχουν τιμή ζ-δυναμικού -34 mV, λόγω των επιφανειακών αρνητικών φορτίων που υπάρχουν στην επιφάνεια τους. Αντιθέτως, μετά την τροποποίηση, οι τιμές του ζ-δυναμικού των υδατικών διασπορών των oxCNTs@QPEIs αυξήθηκαν σε υψηλά θετικές τιμές, με το oxCNTs@80-QPEI να έχει τη μεγαλύτερη, τιμή $+60$ mV. Η αύξηση των τιμών υποδηλώνει την επιτυχή τροποποίηση των oxCNTs με τις θετικά φορτισμένες ομάδες των τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων. Όπως έχει αναφερθεί και στο κεφάλαιο 5.1.1, οι διασπορές που έχουν τιμές ζ-δυναμικού μεγαλύτερες από $+30$ mV, είναι πολύ σταθερά εναιωρήματα, λόγω της ηλεκτροστατικής απόθησης που προκαλείται από το πολύ υψηλό επιφανειακό φορτίο, το οποίο εμποδίζει τη συσσωμάτωση των σωματιδίων, όπως στην περίπτωση μας με τα oxCNTs@QPEIs [28].

5.2.1.4 Μελέτη της αντιβακτηριακής δράσης των oxCNTs@30-QPEI, oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI

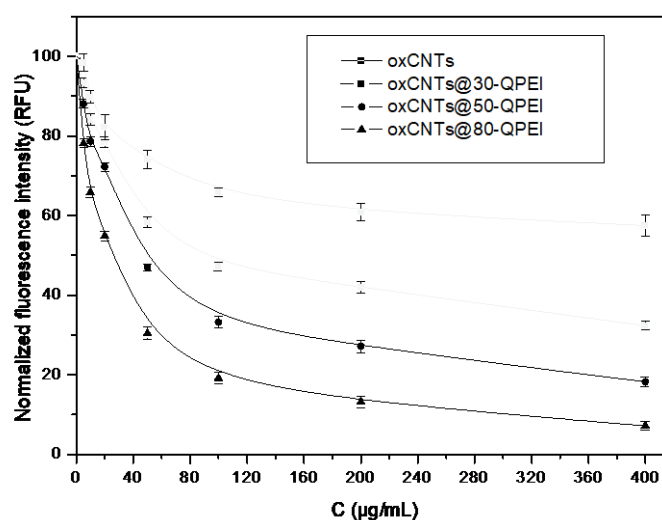
Η μελέτη της βακτηριοκτόνου δράσης των oxCNTs@QPEIs πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα, μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο pDsRwd2-N1 που κωδικοποιεί την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (RFP), gram (-) βακτήρια *Escherichia coli* XL1-blue. Η ανάπτυξη των *E. coli* στους 37 °C μελετήθηκε παρακολουθώντας τη μεταβολή της έντασης του φθορισμού της RFP ($\lambda_{em} = 590$ nm, $\lambda_{ex} = 545$ nm), η οποία εκφράζεται μόνο από τα ζωντανά βακτήρια. Έτσι, μείωση της έντασης φθορισμού

συνεπάγεται μείωση βιωσιμότητας των βακτηρίων. Σημειώνεται ότι στην περίπτωση των oxCNTs@QPEIs δεν ήταν δυνατόν να εφαρμοστούν οι κοινές μέθοδοι προσδιορισμού αντιβακτηριακής δράσης, οι οποίες στηρίζονται σε μετρήσεις οπτικής πυκνότητας (OD) των βακτηριακών εναιωρημάτων. Αυτό συμβαίνει λόγω της υψηλής τους ικανότητας να διασπείρονται σε υδατικά μέσα και να δίνουν εξαιρετικά σταθερές υδατικές διασπορές (μεγάλες τιμές OD, ειδικά στις μεγαλύτερες χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις, που συμβάλλουν στην τελική μέτρηση). Έτσι, οι αντιβακτηριακές ιδιότητες των oxCNTs@QPEIs προσδιορίστηκαν με ακρίβεια, χρησιμοποιώντας το φθορισμό της πρωτεΐνης RFP, η οποία παράγεται κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων. Αρχικά προσδιορίστηκε ο βέλτιστος χρόνος επώασης των βακτηρίων κατά τον οποίο η ένταση φθορισμού της RFP φτάνει τη μέγιστη τιμή της. Από το Σχήμα 5.44 φαίνεται η μεταβολή της έντασης φθορισμού RFP κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων που είχαν επωαστεί μόνο με το θρεπτικό μέσο (μάρτυρας-control) και βρέθηκε ότι ο βέλτιστος χρόνος επώασης ήταν 6 h. Στη συνέχεια, η βακτηριακή ανάπτυξη προσδιορίστηκε συγκρίνοντας την ένταση φθορισμού κάθε βακτηριακού εναιωρήματος σε σχέση με την ένταση φθορισμού του μάρτυρα (100% ένταση φθορισμού).



Σχήμα 5.44: Μεταβολή της έντασης φθορισμού RFP στα 590 nm ($\lambda_{ex}= 545$ nm) κατά την ανάπτυξη των *E. coli* XL1-blue.

Στο Σχήμα 5.45 παρουσιάζεται η ανάπτυξη των *E. coli*, μετά από 6 ώρες επώασης παρουσία των oxCNTs και oxCNTs@QPEIs σε διάφορες συγκεντρώσεις από 5 μέχρι 400 µg/mL, ως συνάρτηση της έντασης φθορισμού της RFP, κανονικοποιημένη ως προς την ένταση φθορισμού του μάρτυρα. Από το Σχήμα 5.45 παρατηρούμε ότι η ένταση φθορισμού των βακτηρίων που είχαν επωαστεί παρουσία των oxCNTs@QPEIs μειώνεται με δόσοεξαρτώμενο τρόπο σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από ότι τα oxCNTs.



Σχήμα 5.45: Κυτταροτοξικότητα μετά από 6 h επώαση του gram (-) *E. coli* XL1-blue βακτηρίου παρουσία των oxCNTs και oxCNTs@QPEIs για συγκεντρώσεις 5-400 µg/mL. Η ένταση φθορισμού της RFP μετράται στα 590 nm (διέγερση: 545 nm).

Με βάση τα διαγράμματα του Σχήματος 5.45, υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των oxCNTs και των oxCNTs@QPEIs που απαιτούνται για να θανατωθεί το 50% του αρχικού πληθυσμού των βακτηρίων (EC_{50}). Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι για τα oxCNTs@30-QPEI, oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI οι τιμές είναι 93.2 µg/mL, 50.1 µg/mL και 28.4 µg/mL, αντίστοιχα, ενώ για τα oxCNTs η τιμή είναι μεγαλύτερη από 400 µg/mL (Πίνακα 5.4). Συμπεραίνουμε δηλαδή ότι τα oxCNTs εμφανίζουν πολύ χαμηλή βιοκτόνο δράση, γεγονός που είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία [34], ενώ τα υβριδικά υλικά εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερη δράση. Συγκρίνοντας την αντιβακτηριακή δράση των oxCNTs@QPEIs είναι εμφανές ότι αυτή αυξάνεται όσο αυξάνεται και ο βαθμός υποκατάστασης της PEI από 30% στα 80%. Ειδικότερα, το oxCNTs@80-QPEI εμφανίζει τη βέλτιστη δράση (EC_{50} =28.4 µg/mL), η οποία οφείλεται αφενός στην υψηλότερη περιεκτικότητα σε θετικά

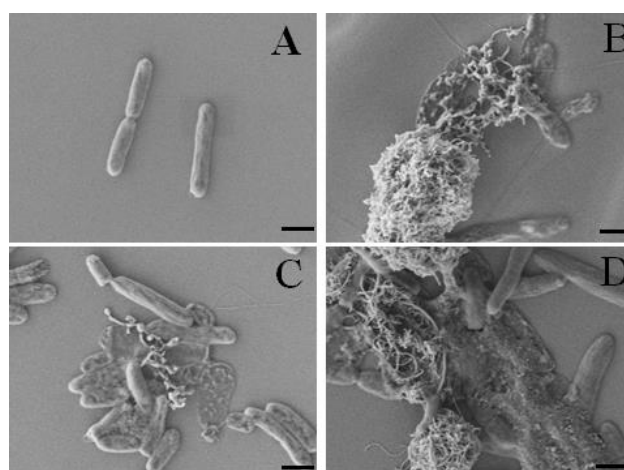
φορτισμένες ομάδες και αφετέρου στη μεγαλύτερη ικανότητα διασποράς του σε υδατικά μέσα.

Πίνακας 5.4: Πίνακας τιμών EC_{50} των $oxCNTs@QPEIs$ στα βακτήρια *Escherichia coli* XL1-blue.

Υλικά	EC_{50} ($\mu g/mL$)
$oxCNTs$	>400
$oxCNTs@30-QPEI$	93.2
$oxCNTs@50-QPEI$	50.1
$oxCNTs@80-QPEI$	28.4

5.2.1.5 Έλεγχος της μορφολογίας των βακτηρίων *Escherichia coli* XL1-blue με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM) παρουσία των $oxCNTs@30-QPEI$, $oxCNTs@50-QPEI$ και $oxCNTs@80-QPEI$

Η μορφολογία των βακτηρίων *Escherichia coli* μετά από επώαση με τα υβριδικά υλικά μελετήθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM). Συγκεκριμένα, τα βακτήρια, μετά από επώαση 6 ωρών στους 37 °C παρουσία των $oxCNTs@30-QPEI$, $oxCNTs@50-QPEI$ και $oxCNTs@80-QPEI$ σε συγκεντρώσεις ίσες με το EC_{50} , μονιμοποιήθηκαν με γλουταραλδεΐδη και μεταφέρθηκαν σε καλυπτρίδες επικαλυμμένες με πολυλυσίνη. Τέλος, τα βακτήρια αφού αφυδατώθηκαν με διαδοχικές εκπλύσεις με διαλύματα νερού/αιθανόλης, επιχρυσώθηκαν προκειμένου να ληφθούν οι εικόνες SEM (Εικόνα 5.25).



Εικόνα 5.25: Εικόνες SEM των *Escherichia coli* βακτηρίων μετά από επώαση με θρεπτικό μέσο (A) και με συγκέντρωση ίση με το EC_{50} των $oxCNTs@30-QPEI$ (B), $oxCNTs@50-QPEI$ (C) και $oxCNTs@80-QPEI$ (D). Η κλίμακα είναι 1 μm .

Στην Εικόνα 5.25 παρουσιάζονται οι εικόνες των βακτηρίων που ελήφθησαν με μικροσκοπία SEM. Στην Εικόνα 5.25A φαίνεται η μορφολογία των βακτηρίων (*E. coli*), τα οποία αναπτύχθηκαν χωρίς την παρουσία των υβριδικών νανοϋλικών (control), όπου τα υγιή βακτήρια διατηρούν το σχήμα τους και τη δομή τους, ενώ η επιφάνειά τους εμφανίζεται λεία, χωρίς καμία αλλοίωση. Από την άλλη μεριά, στις εικόνες των βακτηρίων *E. coli* (Εικόνα 5.25 B και C), που επώαστηκαν παρουσία των oxCNTs@QPEIs, παρατηρούνται συσσωματώματα βακτηρίων-CNTs καθώς και σημαντικές δομικές αλλαγές στη μορφολογία τους. Συγκεκριμένα, τα βακτήρια χάνουν την αρχική τους μορφολογία και τα τοιχώματά τους φαίνονται πιο τραχιά και κατεστραμμένα (Εικόνες 5.25 B-D). Επίσης, φαίνεται να έχει προκληθεί ρήξη της κυτταρικής τους μεμβράνης και να έχει εκτεθεί το ενδοκυτταρικό περιεχόμενο, καθώς παρατηρούνται ιζήματα τα οποία πιθανώς ανήκουν στα οργανίδια του βακτηριακού κυττάρου. Επιπλέον, στην Εικόνα 5.25 D φαίνεται πως το oxCNTs@80-QPEI επιδρά πιο αποτελεσματικά στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα, αλλά και τη μεμβράνη. Η αποδόμηση της κυτταρικής μεμβράνης και η έκθεση των ενδοκυττάρων οργανιδίων πιθανώς να οφείλεται στη λύση των βακτηρίων, λόγω της παρουσίας των υβριδικών νανοϋλικών.

Είναι γνωστό ότι οι νανοσωλήνες άνθρακα, όταν είναι καλά διασπαρμένοι σε υδατικά διαλύματα, είναι δυνατόν να αλληλεπιδρούν αποτελεσματικά με τα βακτήρια μέσω δυνάμεων van der Waals, σχηματίζοντας συσσωματώματα βακτηρίων-CNTs [72, 103]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το βακτηριακό θάνατο, είτε λόγω της αναστολής μεταφοράς διαμεμβρανικών ηλεκτρονίων, είτε της διείσδυσής τους διαμέσου των κυτταρικών τοιχωμάτων και μεμβρανών που οδηγεί σε ρήξη ή παραμόρφωση τους, τροποποιώντας έτσι τις μεταβολικές τους διεργασίες [104]. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι νανοσωλήνες άνθρακα που έχουν τροποποιηθεί είτε ομοιοπολικά με θετικά φορτισμένες ομάδες, όπως αμίνες, λυσίνες και αργινίνες [105, 106], είτε μη-ομοιοπολικά με τασιενεργά μόρια όπως βρωμιούχο δεκαεξαδέκυλο-τριμέθυλο αμμώνιο, triton X-100, δωδέκυλο θειικό νάτριο και δίοκτυλο σουλφοηλεκτρικό νάτριο [23, 107], εμφάνισαν ενισχυμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες σε σχέση με τα αρχικά CNTs. Αυτό αποδόθηκε στις ενισχυμένες αλληλεπιδράσεις τους με τις βακτηριακές μεμβράνες, καθώς και στη βελτιωμένη ικανότητά τους να διασπείρονται σε υδατικά μέσα, δίνοντας σταθερές διασπορές. Αντίστοιχη αντιβακτηριακή συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των τροποποιημένων με QPEI oxCNTs λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε θετικά φορτισμένες ομάδες, όπως είναι

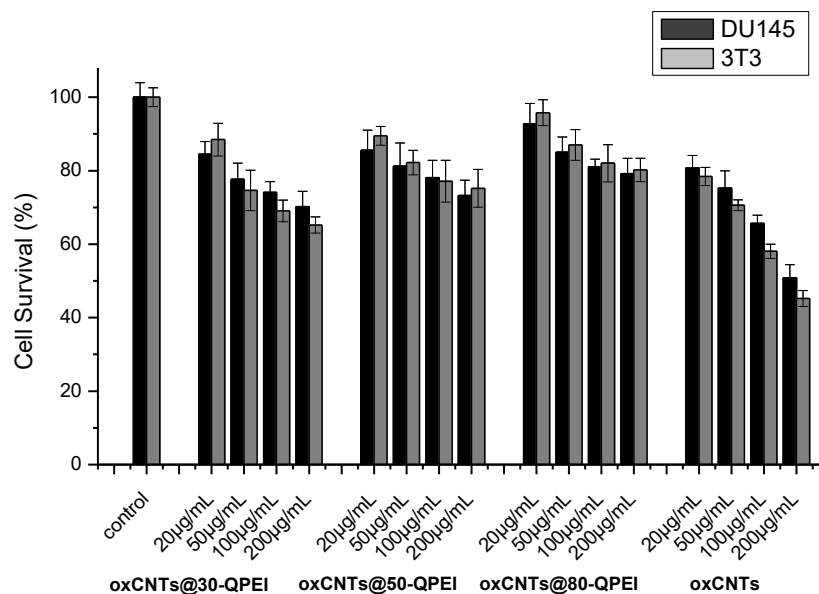
οι ομάδες των τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων. Συγκεκριμένα, αυτές οι θετικές ομάδες, όπως και στην περίπτωση των τασιενεργών μορίων ή των άλλων θετικών λειτουργικών ομάδων, όχι μόνο βελτίωσαν την ικανότητα των οxCNTs να διασπαρθούν σε υδατικά μέσα, γεγονός που ευνοεί την ισχυρή αλληλεπίδραση τους με τα βακτήρια, αλλά ενίσχυσαν την ικανότητα τους να διαπερνούν τα τοιχώματα και τις μεμβράνες των βακτηρίων, με αποτέλεσμα να προκαλούν κυτταρική λύση και τελικά το θάνατο.

Από την άλλη πλευρά, είναι γνωστό ότι οι ομάδες των τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων αλληλεπιδρούν αποτελεσματικά με τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες των βακτηριακών τοιχωμάτων και/ή τις κυτταροπλασματικές μεμβράνες, κυρίως μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων, προκαλώντας δυσλειτουργία των κυτταρικών διεργασιών οδηγώντας τα στο θάνατο [108]. Έχει βρεθεί ότι λειτουργικά πολυμερή με υψηλή υποκατάσταση σε ομάδες τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων εμφανίζουν καλύτερες αντιβακτηριακές ιδιότητες από τα χαμηλότερης υποκατάστασης ανάλογά τους, καθώς αλληλεπιδρούν αποτελεσματικότερα με τα αρνητικά φορτισμένα τοιχώματα των βακτηρίων, λόγω του υψηλότερου θετικού τους φορτίου [109]. Για παράδειγμα, τα πολυ(προπυλενο ίμινο) δενδριμερή που φέρουν 16 ομάδες τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων ανά μόριο βρέθηκε ότι εμφανίζουν δύο τάξεις μεγέθους ισχυρότερη αντιβακτηριακή δράση σε σχέση με τα δενδριτικά ανάλογα τους που φέρουν μόνο μία ομάδα ανά μόριο [110]. Σε συμφωνία με αυτό, το παράγωγο 80-QPEI που έχει τη μεγαλύτερη υποκατάσταση σε ομάδες τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων σε σχέση με τα άλλα παράγωγα QPEIs. Έτσι, προσδίδει το μεγαλύτερο θετικό φορτίο στα οxCNTs, με αποτέλεσμα πιθανώς να προκαλεί την ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τα βακτήρια και κατ' επέκταση τη μεγαλύτερη ικανότητα να διαπερνά τα τοιχώματα και τις μεμβράνες αυτών. Για το λόγο αυτό, το οxCNTs@80-QPEI εμφάνισε τη ισχυρότερη αντιβακτηριακή δράση έναντι των βακτηρίων *E. coli* σε σχέση με τα άλλα υβριδικά υλικά (οxCNTs@30-QPEI και οxCNTs@50-QPEI).

5.2.1.6 Μελέτη κυτταροτοξικότητας σε καρκινικά και ευκαρυωτικά κύτταρα παρουσία των οxCNTs@30-QPEI, οxCNTs@50-QPEI και οxCNTs@80-QPEI

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη τοξικότητας των υβριδικών υλικών σε δύο κυτταρικές σειρές, στα ανθρώπινα DU145 καρκινικά κύτταρα προστάτη και στα 3T3 κύτταρα εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικού, ακολουθώντας την ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο του MTT. Για τον κυτταροτοξικό έλεγχο, και οι δύο

κυτταρικές σειρές επώστηκαν παρουσία των oxCNTs και oxCNTs@QPEIs σε συγκεντρώσεις κάτω και πάνω από τις τιμές EC₅₀ (20 - 200 µg/mL). Η επιβίωση των κυττάρων προσδιορίστηκε μετά από 24 ώρες επώασης και τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικότητας δίνονται στο Σχήμα 5.46.



Σχήμα 5.46: Κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων DU145 και 3T3. Τα κύτταρα επώστηκαν παρουσία των oxCNTs και oxCNTs@QPEIs για 24 h.

Είναι εμφανές ότι όλα τα υβριδικά υλικά oxCNTs@QPEIs είναι σημαντικά λιγότερο τοξικά σε σχέση με τα oxCNTs, ενώ δεν εμφανίζουν σχεδόν καμία τοξικότητα σε συγκεντρώσεις ίσες με τις EC₅₀ τιμές (>80%). Αναλυτικότερα, σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (100–200 µg/mL) μόνο το oxCNTs@30-QPEI εμφανίζει μια μικρή τοξικότητα, όπου η βιωσιμότητα των κυττάρων είναι στο ~70%, ενώ αντιθέτως τα oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI δεν εμφανίζουν σχεδόν καμία τοξικότητα. Συγκεκριμένα, στη μεγαλύτερη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση των 200 µg/mL, η οποία είναι πολύ μεγαλύτερη από τις EC₅₀ τιμές και των δύο υλικών, η βιωσιμότητα των κυττάρων είναι ~80%.

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι όλα τα υβριδικά υλικά oxCNTs@QPEIs παρουσίασαν, ταυτόχρονα, χαμηλή κυτταροτοξικότητα, αλλά και ενισχυμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες και επομένως είναι ελπιδοφόρα συστήματα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές ως ασφαλή, αντιβακτηριακά υλικά.

5.2.2 Αντιβακτηριακή μελέτη των υβριδικών υλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K

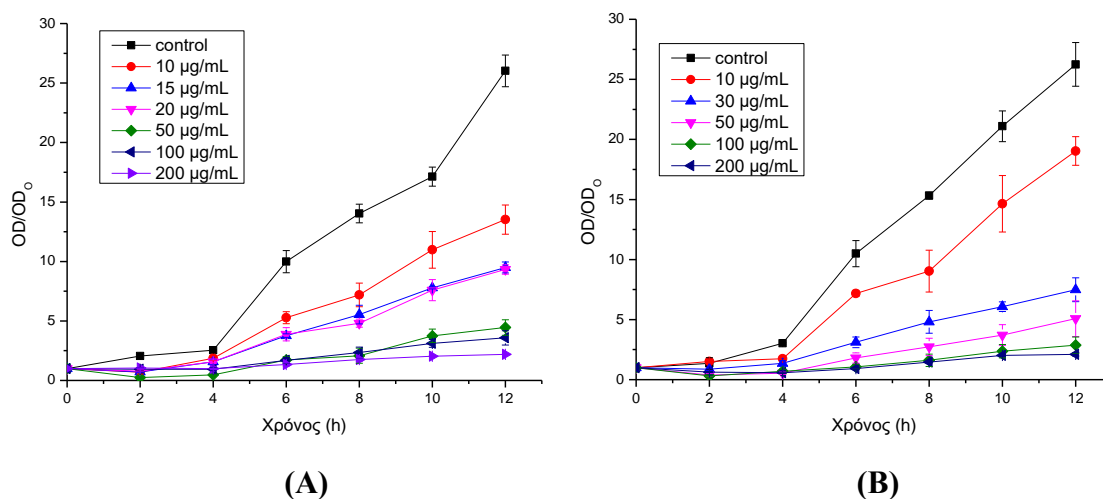
Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι νανοϋλικά με βάση νανοδομημένους άνθρακες καθώς και πολυμερή που φέρουν κατάλληλες θετικά φορτισμένες ομάδες, όπως τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα, ομάδες γουανιδίνης, αργινινικές ομάδες, κοκ., εμφανίζουν σημαντικές αντιβακτηριακές ιδιότητες [70, 71]. Συνεπώς, συνδυάζοντας και τις δύο προαναφερθείσες κατηγορίες υλικών αναμένεται η δημιουργία υλικών να εμφανίζει ισχυρή αντιβακτηριδιακή δράση. Ιδιαίτερα, τα δενδριτικά πολυμερή που φέρουν υψηλή πυκνότητα θετικού φορτίου, εμφανίζουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν ισχυρά με τη μεμβράνη των βακτηρίων, η οποία είναι αρνητικά φορτισμένη, μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, καθιστώντας τα πολύ αποτελεσματικά [89-91].

Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, ο συνδυασμός νανοϋλικών άνθρακα με τα δενδριτικά πολυμερή αναμένεται να έχει ελπιδοφόρα αποτελέσματα σε αντιβακτηριακές μελέτες. Με βάση την προηγούμενη μελέτη των τροποποιημένων νανοσωλήνων άνθρακα με τα QPEIs, τα οποία εμφάνισαν καλές αντιβακτηριακές ιδιότητες, δόθηκε η ιδέα για περαιτέρω μελέτη ως προς την αντιβακτηριακή τους δράση των ήδη παρασκευασθέντων υλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, τα οποία αναπτύχθηκαν στο Κεφάλαιο 5.1.1 και μελετήθηκαν ως φορείς φαρμάκων. Για την αντιβακτηριακή μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη βακτηρίων, ένα θετικό κατά gram, το *Staphylococcus aureus*, και ένα αρνητικό κατά gram, το *Escherichia coli*.

5.2.2.1 Κινητική μελέτη της ανάπτυξης των δύο βακτηριακών στελεχών παρουσία των GPEIs και μελέτη της βακτηριοκτόνου δράση τους

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η πολυαιθυλενιμίνη εμφανίζει εκλεκτική αντιβακτηριακή δράση έναντι των gram (+) βακτηρίων π.χ. έναντι των *S. aureus* σε σχέση με τα gram (-) βακτήρια π.χ. τα *E. coli* [111]. Η εκλεκτικότητα αυτή αποδίδεται στην διαφορετική δομή του κυτταρικού τοιχώματος των gram (-) βακτηρίων σε σχέση με τα gram (+) βακτήρια. Συγκεκριμένα, το τοίχωμα των gram (-) βακτηρίων, εκτός από το στρώμα πεπτιδογλυκανών, περιβάλλεται και από μια δεύτερη εξωτερική μεμβράνη, η οποία ελέγχει τη μεταφορά ενώσεων προς την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Από την άλλη πλευρά, είναι γνωστό ότι αμφιφιλικά πεπτίδια πλούσια σε γουανιδινικές ομάδες εμφανίζουν βελτιωμένες αντιβακτηριακές

ιδιότητες σε σχέση με τα αντίστοιχα άμινο παράγωγα τους [112, 113]. Αυτό οφείλεται στην ικανότητά τους να διαπερνούν ή να διασπών αποτελεσματικότερα όχι μόνο την κυτταρική μεμβράνη αλλά και την κυτταροπλασματική μεμβράνη και στη συνέχεια να δεσμεύονται με τα κυτταροπλασματικά ένζυμα και το DNA/RNA, παρεμποδίζοντας την ομαλή ανάπτυξη των βακτηρίων, με αποτέλεσμα να τα οδηγούν στο θάνατο. Με βάση τα παραπάνω, αρχικά μελετήθηκε η αντιβακτηριακή δράση των GPEIs στα θετικά κατά gram βακτήρια *S. aureus* και στα αρνητικά κατά gram βακτήρια *E. coli* προκειμένου να αποδειχθεί αν η εισαγωγή των γουανιδινικών ομάδων στην PEI βελτιώνει τις αντιβακτηριακές ιδιότητες της. Έτσι, τα δύο στελέχη των βακτηρίων επώαστηκαν παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων των GPEI5K και GPEI25K στους 37 °C υπό συνεχή ανάδευση. Παρατηρήθηκε η ανάπτυξη των βακτηρίων παρουσία των GPEIs μετρώντας την οπτική πυκνότητα (OD) του κάθε δείγματος στα 500 nm ανά 2 ώρες επώασης για τα *E. coli* και ανά 1 ώρα επώασης για τα *S. aureus*. Συγκεκριμένα, βακτήρια με συγκέντρωση 10^4 CFU/mL, επώαστηκαν παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων των γουανιδιωμένων πολυμερών, ενώ ως μάρτυρες (control) χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια που είχαν επωαστεί μόνο παρουσία θρεπτικού μέσου. Στα Σχήματα 5.47 και 5.48 παρουσιάζονται τα διαγράμματα της καμπύλης ανάπτυξης των βακτηρίων *E. coli* και *S. aureus*, αντίστοιχα.

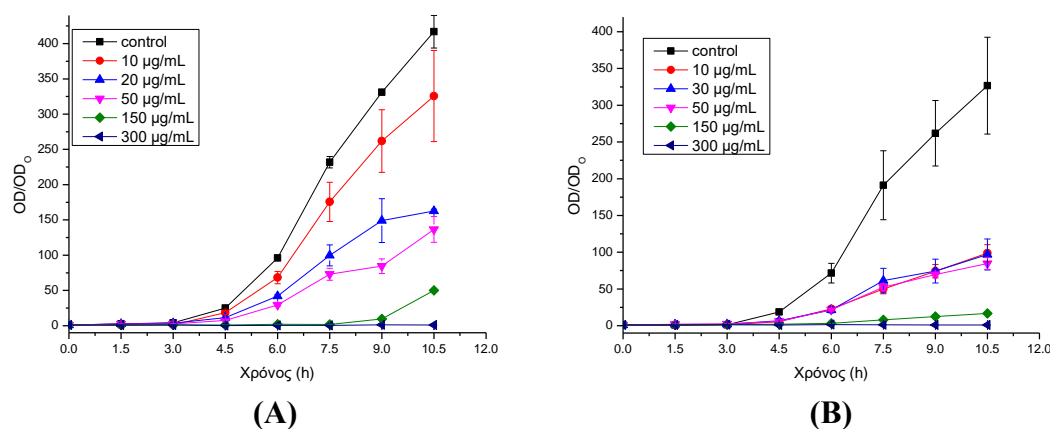


Σχήμα 5.47: Καμπύλες ανάπτυξης των βακτηρίων *E. coli* παρουσία των GPEI5K (A) και GPEI25K (B).

Στο Σχήμα 5.47, δίνονται οι καμπύλες ανάπτυξης των βακτηρίων *E. coli* παρουσία των δύο γουανιδιωμένων παραγώγων, GPEI5K και GPEI25K. Αναλυτικά, στο Σχήμα 5.47(A) μελετήθηκε η ανάπτυξη των βακτηρίων *E. coli* παρουσία του GPEI5K, με

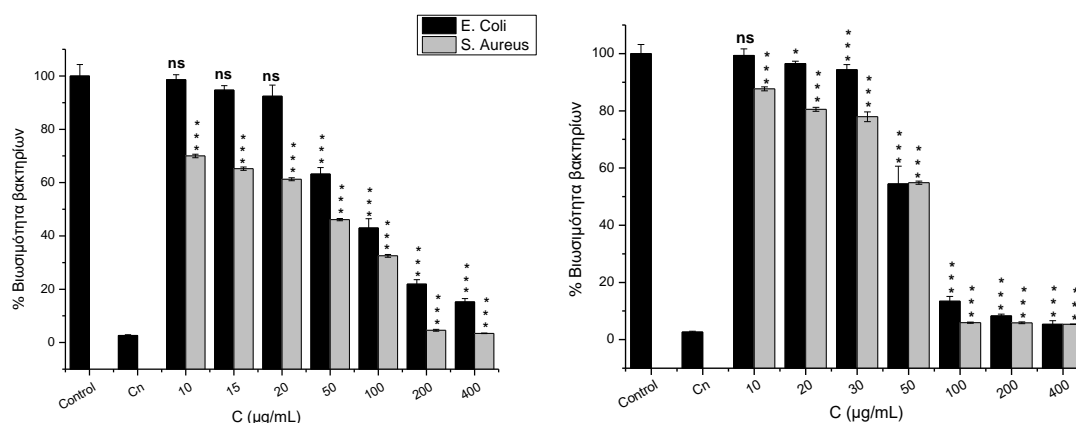
συγκεντρώσεις 0 (control), 10, 15, 20, 50, 100 και 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Από τις καμπύλες ανάπτυξης των βακτηρίων παρατηρούμε ότι παρουσία $\sim 10 \mu\text{g}/\text{mL}$ GPEI5K η ανάπτυξη των βακτηρίων *E. coli* αναστέλλεται κατά ποσοστό 50% (half-maximal inhibitory concentration, IC_{50}), ενώ για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GPEI5K παρατηρείται πλήρης αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης (minimum inhibitory concentration, MIC). Ανάλογη συμπεριφορά εμφανίζει και το GPEI25K, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.47(B). Συγκεκριμένα, τα βακτήρια *E. coli* επώαστηκαν παρουσία του GPEI25K σε συγκεντρώσεις 0 (control), 10, 30, 50, 100 και 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και βρέθηκε πως η τιμή IC_{50} του GPEI25K είναι $\sim 20 \mu\text{g}/\text{mL}$, ενώ η τιμή MIC είναι $\sim 150 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Στο Σχήμα 5.48 δίνονται οι καμπύλες ανάπτυξης των βακτηρίων *S. aureus*, παρουσία των GPEI5K και GPEI25K. Στο Σχήμα 5.48(A) τα βακτήρια επώαστηκαν παρουσία του GPEI5K σε συγκεντρώσεις 0 (control), 10, 20, 50, 150 και 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Από τις καμπύλες ανάπτυξης παρατηρείται ότι παρουσία $\sim 20 \mu\text{g}/\text{mL}$ GPEI5K η ανάπτυξη των βακτηρίων *S. aureus* αναστέλλεται κατά ποσοστό 50% (IC_{50}), ενώ για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (MIC) υπάρχει πλήρης αναστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων. Ανάλογα, στο Σχήμα 5.48(B) δίνονται οι καμπύλες ανάπτυξης των *S. aureus*, όταν αυτά επώαστηκαν παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων GPEI25K (0 (control), 10, 30, 50, 150 και 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$), όπου υπολογίστηκε ότι η τιμή IC_{50} του GPEI25K είναι $\sim 10 \mu\text{g}/\text{mL}$, ενώ η τιμή MIC είναι $\sim 150 \mu\text{g}/\text{mL}$. Από τα ανωτέρω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι και τα δύο πολυμερή αναστέλλουν την ανάπτυξη και των δύο τύπων βακτηρίων κατά ανάλογο τρόπο.



Σχήμα 5.48: Καμπύλες ανάπτυξης των βακτηρίων *S. aureus* παρουσία των GPEI5K (A) και GPEI25K (B).

Ωστόσο επειδή η αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης δεν σημαίνει απαραίτητα και βακτηριακό θάνατο, ακολούθησε μελέτη της βακτηριοκτόνου δράσης των γουανιδιωμένων πολυμερών GPEI5K και GPEI25K, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ρεσαζουρίνης (Resazurin Assay). Η ρεσαζουρίνη είναι μια χρωστική ουσία που είναι ευαίσθητη σε οξειδοαναγωγικό περιβάλλον και χρησιμοποιείται για το προσδιορισμό της βιωσιμότητας των βακτηρίων [114]. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη μετατροπή της ρεσαζουρίνης, η οποία δεν φθορίζει, στη φθορίζουσα ουσία ρεσορουφίνη. Νεκρά βακτήρια δεν είναι ικανά να ανάγουν τη ρεσαζουρίνη υποδηλώνοντας τον κυτταρικό θάνατο. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε και στα δύο στελέχη βακτηρίων, τα οποία είχαν συγκέντρωση 10^4 CFU/mL. Συγκεκριμένα, τα βακτήρια *E. coli* (gram (-)) και *S. aureus* (gram (+)) επώαστηκαν παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων GPEI5K και GPEI25K, υπό συνεχή ανάδευση για 24 h στους 37 °C. Αναλυτικά, τα βακτήρια *E. coli* και *S. aureus* επώαστηκαν παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων GPEI5K (10, 15, 20, 50, 100, 200 και 400 $\mu\text{g/mL}$) και GPEI25K (10, 20, 30, 50, 100, 200 και 400 $\mu\text{g/mL}$). Στη συνέχεια, σε κάθε δείγμα βακτηρίων προστέθηκαν 5 μL υδατικού διαλύματος ρεσαζουρίνης συγκέντρωσης 6.75 $\mu\text{g/mL}$ και αφέθηκαν για επώαση για άλλες 4 h στους 37 °C.



Σχήμα 5.49: Βιωσιμότητα των *E. coli* και *S. aureus* βακτηρίων, τα οποία είχαν επωαστεί με διάφορες συγκεντρώσεις GPEI5K (αριστερά) και GPEI25K (δεξιά).

Η επιβίωση των βακτηρίων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της ρεσαζουρίνης μετά από 24 ώρες επώασης. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$ και χωρίς στατιστική σημασία (ns), $p > 0.05$.**

Τέλος, μετρήθηκε ο φθορισμός της παραγόμενης ρεσορουφίνης ($\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$ και $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$) και τα αποτελέσματα της βιωσιμότητας των βακτηρίων παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.49. Με σκοπό τη σύγκριση των αποτελεσμάτων αλλά και τον έλεγχο της

εγκυρότητας της μεθόδου, έγινε θετικός και αρνητικός έλεγχος. Για το θετικό έλεγχο (control), τα βακτήρια (συγκέντρωσης 10^4 CFU/mL) επωάστηκαν χωρίς την προσθήκη των GPEIs, μόνο με το θρεπτικό μέσο LB (για τα *E. coli*) ή TSB (για τα *S. aureus*), ενώ για τον αρνητικό έλεγχο τα θρεπτικά μέσα LB ή TSB δεν εμβολιάστηκαν με βακτήρια.

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 5.49, στην περίπτωση του θετικού ελέγχου (control), η τιμή της βιωσιμότητας των βακτηρίων είναι στο 100% ενώ στην περίπτωση του αρνητικού ελέγχου (Cn) η βιωσιμότητα των κυττάρων είναι ελάχιστη ~2%. Επίσης, στα βακτήρια *E. coli* η βιωσιμότητα των βακτηρίων αρχίζει να μειώνεται αισθητά από τη συγκέντρωση των 50 $\mu\text{g/mL}$ και για τα δύο πολυμερή. Το ίδιο φαίνεται να ισχύει και στα βακτήρια *S. aureus* για τα δύο πολυμερή, ενώ στη συγκέντρωση των 400 $\mu\text{g/mL}$ η βιωσιμότητα των βακτηρίων σχεδόν μηδενίζεται. Με βάση τις μετρήσεις φθορισμού της ρεσορουφίνης υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των GPEI5K και GPEI25K που απαιτούνται για να θανατωθεί το 50% του αρχικού πληθυσμού των βακτηρίων τιμές (EC_{50}), για τους δύο τύπους βακτηρίων και οι οποίες συνοψίζονται στον Πίνακα 5.5. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά των κινητικών μελετών (Σχήματα 5.47 και 5.48) όπου φαίνεται σαφώς ότι τα γουανιδιωμένα πολυμερή είναι πιο τοξικά στο στέλεχος *Staphylococcus aureus* σε σχέση με το *Escherichia coli*. Επίσης, παρατηρείται ότι στα *E. coli* το GPEI25K είναι ελαφρώς πιο τοξικό από ότι το GPEI5K, ενώ στο *S. aureus* και τα δύο πολυμερή εμφανίζουν ανάλογη τοξικότητα.

Πίνακας 5.5: Πίνακας τιμών EC_{50} των GPEI5K και GPEI25K στα βακτήρια *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus*.

Υλικά	<i>Escherichia coli</i> EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Staphylococcus aureus</i> EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
GPEI5K	60	35
GPEI25K	50	40

Συγκρίνοντας τις τιμές αυτές με τις ανάλογες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία και έχουν επιβεβαιωθεί στο εργαστήριο για τα αρχικά PEI (EC_{50} του PEI5K για τα *E. coli* είναι ~250 $\mu\text{g/mL}$, ενώ για τα *S. aureus* ~50 $\mu\text{g/mL}$, EC_{50} του PEI25K για τα *E. coli* είναι ~200 $\mu\text{g/mL}$, ενώ για τα *S. aureus* ~50 $\mu\text{g/mL}$ [111, 115]), παρατηρείται ότι η εισαγωγή των γουανιδινικών ομάδων στην PEI βελτίωσε κατά πολύ τις

αντιβακτηριακές της ιδιότητες κυρίως στα κατά Gram αρνητικά *E. coli* βακτήρια, τα οποία είναι γνωστό ότι εμφανίζουν ανθεκτικότητα στους αντιβακτηριακούς παράγοντες [116]. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και στη βιβλιογραφία όπου η εισαγωγή γουανιδικών ομάδων στις πρωτοταγείς αμινομάδες πολυμερών βελτίωσε τις αντιβακτηριακές τους ιδιότητες [117]. Αυτό αποδόθηκε στο γεγονός ότι παρότι και τα δύο είδη πολυμερών ήταν ικανά να διαπεράσουν την εξωτερική μεμβράνη των *E. coli* και να εισέλθουν στον περιπλασματικό χώρο, αυτό δεν αρκούσε για να οδηγήσει τα βακτήρια στο θάνατο. Αποδείχθηκε ότι τα γουανιδινικά παράγωγα ήταν ικανά να αλληλεπιδράσουν αποτελεσματικότερα με τα λιπιδικά παράγωγα της φωσφατιδυλογλυκερόλης που περιέχονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη από ότι τα άμινο παράγωγα με αποτέλεσμα να τη διαταράξουν, οδηγώντας τελικά τα βακτήρια στο θάνατο. Έτσι μπορούμε να υποθέσουμε ότι πιθανότατα κάτι ανάλογο συμβαίνει και στην περίπτωση των παρασκευασθέντων GPEIs. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, τα δύο γουανιδιωμένα παράγωγα GPEI5K και GPEI25K χρησιμοποιήθηκαν στην τροποποίηση των οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα και στη συνέχεια των οξειδωμένων νανοδίσκων άνθρακα προκειμένου να ληφθούν νέα υβριδικά υλικά με ενισχυμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες.

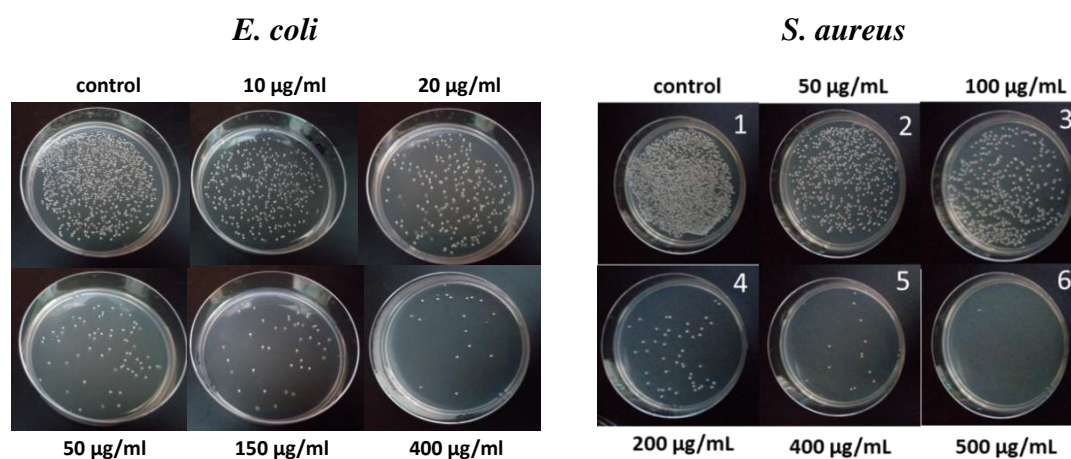
5.2.2.2 Μελέτη της ανάπτυξης των δύο βακτηριακών στελεχών παρουσία των oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K

Η αντιβακτηριακή δράση των υβριδικών υλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K μελετήθηκε αρχικά με τη μέθοδο διασποράς σε στερεό θρεπτικό μέσο (spread plate) χρησιμοποιώντας δύο βακτηριακά στελέχη τα *E. coli* (gram (-)) και τα *S. aureus* (gram (+)). Για συγκριτικούς λόγους, αντίστοιχη μελέτη πραγματοποιήθηκε και στους οξειδωμένους νανοσωλήνες άνθρακα. Έτσι, και τα δύο είδη βακτηρίων επώαστηκαν παρουσία των oxCNTs@GPEI5K, oxCNTs@GPEI25K και oxCNTs σε διάφορες συγκεντρώσεις στους 37 °C για 24 h υπό συνεχή ανάδευση. Τα *E. coli* επώαστηκαν παρουσία 10, 20, 50, 150 και 400 µg/mL oxCNTs, ενώ τα *S. aureus* παρουσία 50, 100, 200, 400 και 500 µg/mL. Στην περίπτωση των υβριδικών υλικών (oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K) τα *E. coli* επώαστηκαν παρουσία 50, 100, 200, 400 και 500 µg/mL, ενώ τα *S. aureus* παρουσία 20, 50, 100, 200, 400, 500 και 600 µg/mL. Αφού αναπτυχθούν τα βακτήρια, με βάση την οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας ρυθμίζεται η τελική συγκέντρωσή τους στα 10⁻¹ cfu/mL. Στη συνέχεια, τρυβλία επιστρωμένα με άγαρ εμβολιάζονται με κάθε εναιώρημα

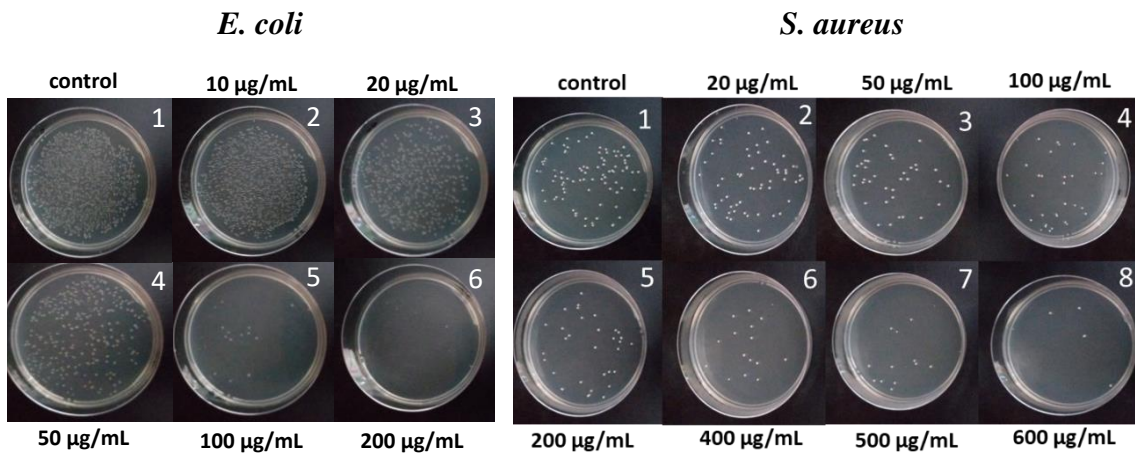
βακτηρίων επωασμένων με τα νανοϋλικά, σε διπλά τρυβλία για την κάθε συγκέντρωση και αφήνονται στους 37 °C για 16 h επώαση. Ως μάρτυρες (control) χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια που είχαν επωαστεί μόνο με το θρεπτικό μέσο. Μετά το πέρας της επώασης πραγματοποιείται καταμέτρηση των αποικιών που αναπτύχθηκαν από τα δύο τρυβλία της ίδιας αραίωσης και λαμβάνεται ο μέσος όρος τους. Στις Εικόνες 5.26, 5.27 και 5.28 φαίνονται οι αποικίες των βακτηρίων που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία παρουσία των οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα και των υβριδικών υλικών, ενώ στο Σχήμα 5.50 δίνονται τα ποσοστά αναστολής ανάπτυξης των βακτηρίων σε σχέση με το μάρτυρα (control), τα οποία υπολογίστηκαν με την βοήθεια της Εξίσωσης 5.1:

$$\% \text{ αναστολή ανάπτυξης βακτηρίων} = \frac{N_{\text{control}} - N_{\text{sample}}}{N_{\text{control}}} * 100 \quad [5.1]$$

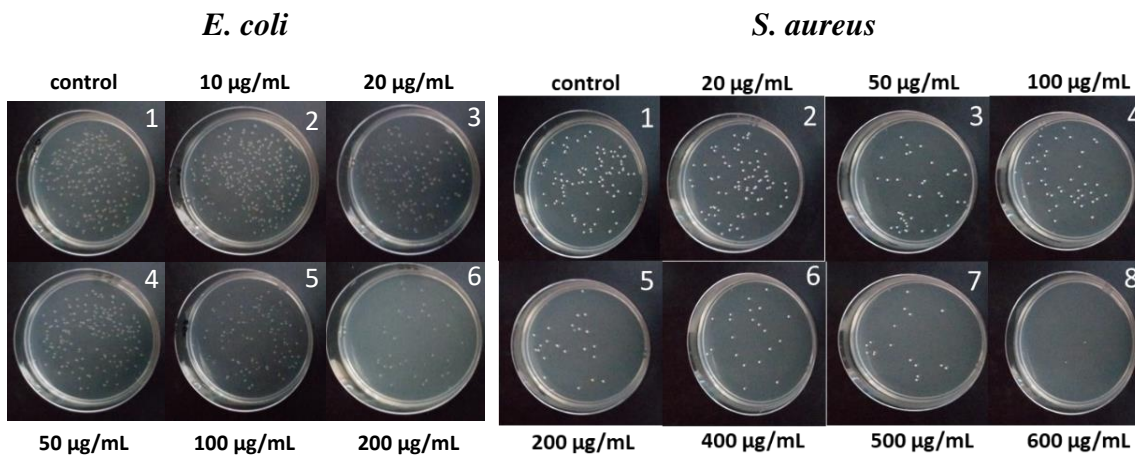
Όπου, N_{control} και N_{sample} είναι ο αριθμός των ορατών βακτηριακών αποικιών που αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο-μάρτυρα (control) και στα τρυβλία με τα εξεταζόμενα δείγματα (oxCNTs@GPEI5K, oxCNTs@GPEI25K και oxCNTs), αντίστοιχα.



Εικόνα 5.26: Αποικίες ανάπτυξης βακτηρίων *E. coli* και *S. aureus* παρουσία των oxCNTs.



Εικόνα 5.27: Αποικίες ανάπτυξης βακτηρίων *E. coli* και *S. aureus* παρουσία των oxCNTs@GPEI5K.



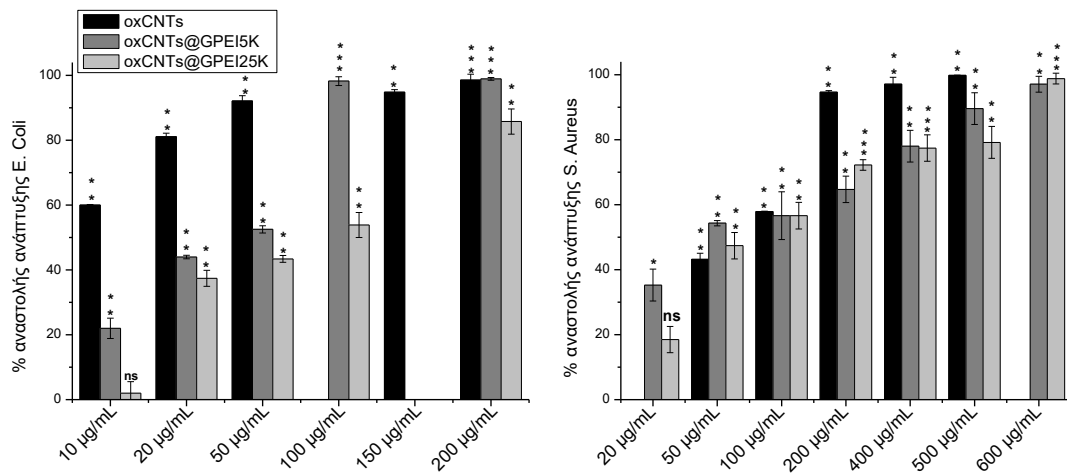
Εικόνα 5.28: Αποικίες ανάπτυξης βακτηρίων *E. coli* και *S. aureus* παρουσία των oxCNTs@GPEI25K.

Στην Εικόνα 5.26 όπου απεικονίζονται οι αποικίες των *E. coli* που αναπτύχθηκαν παρουσία των οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα, παρατηρείται ότι από την συγκέντρωση των 50 µg/mL υπάρχει σημαντική μείωση της βακτηριακής ανάπτυξης, ενώ αντίστοιχη αναστολή των *S. aureus* (Εικόνα 5.26, δεξιά) παρατηρείται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις oxCNTs (> 100 µg/mL). Η διαφοροποίηση αυτή ανάμεσα στα δύο στελέχη βακτηρίων, καταδεικνύει ότι τα βακτήρια *Staphylococcus aureus* είναι πιο ανθεκτικά από ότι τα *Escherichia coli*, παρουσία των oxCNTs, παρόλο που έχει ήδη αναφερθεί τα *E. coli* εμφανίζουν πιο μεγάλη ανθεκτικότητα στους αντιβακτηριακούς παράγοντες από τα *S. aureus* [116]. Ανάλογη συμπεριφορά έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία όπου τα CNTs, τροποποιημένα και μη, είναι πιο τοξικά στα gram (-) από ότι στα gram (+) βακτήρια [118-121]. Οι αιτίες που οφείλεται αυτή η συμπεριφορά δεν έχουν διασαφηνιστεί επακριβώς. Οι Zhu et al. πρότειναν ότι

η διαφοροποίηση στην τοξικότητα των CNTs μεταξύ των gram (-) και gram (+) βακτηρίων οφείλεται στο διαφορετικό ζ-δυναμικό και στη ρευστότητα των κυτταρικών τους μεμβρανών καθώς και στη σύσταση τους [121]. Από την άλλη πλευρά κάποιες άλλες ομάδες υποστηρίζουν ότι η διαφοροποίηση αυτή οφείλεται στο διαφορετικό πάχος του στρώματος των πεπτιδογλυκανών, καθώς στα gram (-) βακτήρια είναι λεπτότερο από αυτό των gram (+) βακτηρίων [120, 122].

Όσον αφορά τα υβριδικά υλικά oxCNTs@GPEI5K (Εικόνα 5.27) και oxCNTs@GPEI25K (Εικόνα 5.28), παρατηρείται ότι και στους δύο τύπους βακτηρίων, η βακτηριακή ανάπτυξη μειώνεται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 100 µg/mL, με το oxCNTs@GPEI5K να είναι πιο τοξικό από το oxCNTs@GPEI25K, κυρίως στα *E. coli*. Αναλυτικότερα, με βάση τα διαγράμματα του Σχήματος 5.50 διαπιστώνεται πως η ανάπτυξη των βακτηρίων *E. coli* αναστέλλεται κατά ποσοστό 50% σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις oxCNTs ($IC_{50} < 10$ µg/mL) σε σχέση με τα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K ($IC_{50} \approx 50$ και 100 µg/mL, αντίστοιχα). Αντίστοιχα, για τα *S. aureus*, το 50% της αναστολής της ανάπτυξης τους επιτυγχάνεται σε συγκεντρώσεις ~100 µg/mL oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, ίσες με αυτές των oxCNTs ($IC_{50} = 100$ µg/mL). Σημειώνεται ότι για την πλήρη αναστολή της ανάπτυξης (~95%) των *E. coli* απαιτείται συγκέντρωση oxCNTs περίπου 50 µg/mL, ενώ ανάλογη αναστολή παρατηρείται παρουσία των oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K σε συγκεντρώσεις 100 και 200 µg/mL, αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά, και τα δύο υβριδικά υλικά oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K εμφανίζουν ανάλογη επίδραση στα *S. aureus*. Συγκεκριμένα, παρατηρείται πλήρης αναστολή (90%) όταν τα βακτήρια *S. aureus* επωαστήκαν παρουσία συγκέντρωσης ~600 µg/mL, αρκετά μεγαλύτερη από αυτή των oxCNTs (~200 µg/mL).

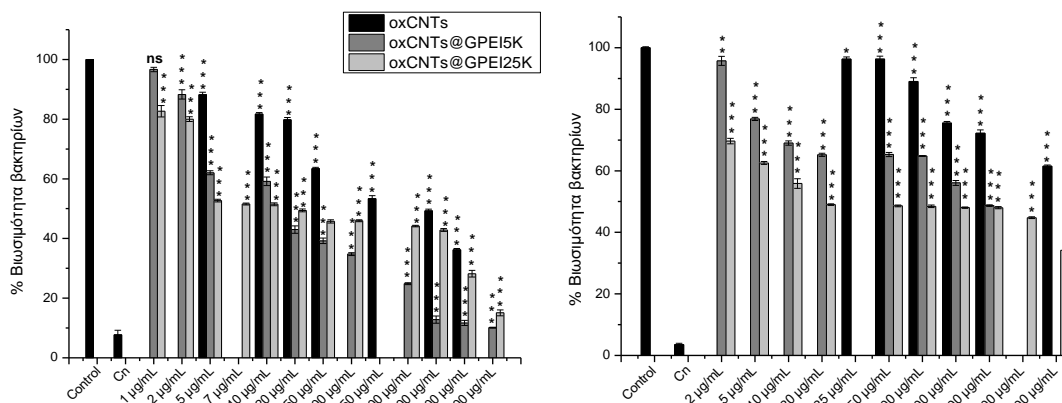
Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι και τα δύο υβριδικά υλικά προκαλούν βακτηριακή αναστολή, με το oxCNTs@GPEI5K να είναι ελαφρώς πιο τοξικό από το oxCNTs@GPEI25K στα *E. coli* [123].



Σχήμα 5.50: Ποσοστό αναστολής ανάπτυξης των βακτηρίων *E. coli* (αριστερά) και *S. aureus* (δεξιά) παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων oxCNTs, oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$ και χωρίς στατιστική σημασία (ns), $p > 0.05$.**

5.2.2.3 Μελέτη της βακτηριοκτόνου δράσης των oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K (Resazurin Assay)

Όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, η αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης δεν σημαίνει απαραίτητα και βακτηριακό θάνατο, για αυτό ακολούθησε μελέτη της βακτηριοκτόνου δράσης των υβριδικών υλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, η οποία αξιολογήθηκε με τον προσδιορισμό της τοξικότητας τους, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ρεσαζουρίνης (Resazurin Assay). Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε και στα δύο στελέχη βακτηρίων (συγκέντρωσης 10^4 cfu/mL). Συγκεκριμένα, βακτήρια *E. coli* και *S. aureus* επώαστηκαν παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K (1-800 µg/mL), καθώς και για συγκριτικούς λόγους με διάφορες συγκεντρώσεις oxCNTs (5-600 µg/mL). Στη συνέχεια, μετρήθηκε ο φθορισμός της παραγόμενης ρεσορουφίνης ($\lambda_{ex} = 530$ nm, $\lambda_{em} = 590$ nm), ενώ για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων και τον έλεγχο της εγκυρότητας της μεθόδου, πραγματοποιήθηκε θετικός και αρνητικός έλεγχος. Στο θετικό έλεγχο (control), βακτήρια (συγκέντρωσης 10^4 cfu/mL) επώαστηκαν χωρίς την προσθήκη των νανοϋλικών, παρά μόνο με το θρεπτικό μέσο LB (για τα *E. coli*) ή TSB (για τα *S. aureus*), ενώ στον αρνητικό έλεγχο το θρεπτικό μέσο LB ή TSB δεν εμβολιάστηκε με βακτήρια. Τα αποτελέσματα της βιωσιμότητας των υλικών παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.51.



Σχήμα 5.51: Βιωσιμότητα των *E. coli* (αριστερά) και *S. aureus* (δεξιά) βακτηρίων, τα οποία είχαν επωαστεί με διάφορες συγκεντρώσεις oxCNTs, oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K. Η επιβίωση των βακτηρίων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της ρεσαζουρίνης μετά από 24 ώρες επώασης. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου * $p<0.05$, ** $p<0.01$, * $p<0.001$ και χωρίς στατιστική σημασία (ns), $p> 0.05$.**

Με βάση το διάγραμμα της βιωσιμότητας των *E. coli* (Σχήμα 5.51), φαίνεται ότι τα oxCNTs μετά από επώαση 24 ωρών δεν παρουσιάζουν σημαντική τοξικότητα εφόσον στη μεγαλύτερη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση (600 µg/mL), η κυτταροτοξικότητα είναι γύρω στο 60% (40% κυτταρική επιβίωση). Επίσης, παρατηρείται ότι η βιοκτόνος δράση των oxCNTs στα *S. aureus* είναι μικρότερη από αυτή στα *E. coli*, αφού στη μεγαλύτερη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση (600 µg/mL), η κυτταροτοξικότητα είναι μόλις 40% (60% κυτταρική επιβίωση). Παρατηρείται δηλαδή ότι παρόλο που τα oxCNTs αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων σε χαμηλές συγκεντρώσεις, για να επιτευχθεί ο θάνατος τους απαιτούνται πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις, γεγονός που είναι σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία [124]. Αυτό αποδόθηκε στην ικανότητα των CNTs να αλληλεπιδρούν ισχυρά με τα βακτήρια μέσω ηλεκτροστατικών ή/και van der Waals δυνάμεων, σχηματίζοντας συσσωματώματα κυττάρων-CNTs τροποποιώντας έτσι το μεταβολισμό τους [104] και αναστέλλοντας την ανάπτυξή τους [123]. Με την αύξηση της συγκέντρωσης τους παρατηρήθηκε ότι αυξάνεται η βακτηριοκτόνος δράση τους είτε λόγω αναστολής της μεταφοράς των διαμεμβρανικών ηλεκτρονίων, είτε λόγω διείσδυσης τους μέσω των κυτταρικών τοιχωμάτων και μεμβρανών, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε ρήξη ή παραμόρφωση τους [125]. Αξιοσημείωτο είναι ότι παρουσία των υβριδικών υλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K η βιωσιμότητα των *E. coli* μειώνεται σημαντικά με τρόπο εξαρτώμενο της συγκέντρωσης, υποδηλώνοντας μεγαλύτερη

βιοκτόνο δράση από τα oxCNTs. Αντίστοιχα, όταν τα *S. aureus* επώαστηκαν παρουσία των υβριδικών υλικών, παρατηρήθηκε μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας σε σχέση με τα oxCNTs, με το oxCNTs@GPEI25K να εμφανίζεται περισσότερο τοξικό από ότι το oxCNTs@GPEI5K.

Με βάση τα διαγράμματα του Σχήματος 5.51, υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των oxCNTs, oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K που απαιτούνται για να θανατωθεί το 50% του αρχικού πληθυσμού των βακτηρίων (EC_{50}), οι οποίες βρέθηκαν ότι για το oxCNTs@GPEI5K είναι 15 $\mu\text{g/mL}$ (*E. coli*) και 200 $\mu\text{g/mL}$ (*S. aureus*), ενώ για το oxCNTs@GPEI25K είναι ~25 $\mu\text{g/mL}$ και 20 $\mu\text{g/mL}$, αντίστοιχα. Σημειώνεται ότι οι αντίστοιχες τιμές του oxCNTs είναι μεγαλύτερες από 600 $\mu\text{g/mL}$ και για τα δύο βακτηριακά στελέχη (Πίνακα 5.6). Παρατηρείται λοιπόν ότι τα oxCNTs εμφανίζουν μικρή βιοκτόνο δράση έναντι των *E. coli*, ενώ μετά την τροποποίησή τους με τα GPEIs ενισχύεται η δράση τους σημαντικά. Συγκεκριμένα, το oxCNTs@GPEI5K εμφανίζει λίγο μεγαλύτερη δράση στα *E. coli*, ενώ αντίθετα στα *S. aureus* μεγαλύτερη δράση εμφανίζει το oxCNTs@GPEI25K. Είναι προφανές ότι αυτή οφείλεται αποκλειστικά στην παρουσία των GPEIs στα υβριδικά υλικά που βοηθάει στην αποτελεσματική πρόσληψη τους από τα βακτήρια. Συγκεκριμένα, τα GPEIs, κατά ανάλογο τρόπο με αντίστοιχα γουανιδιωμένα πολυμερή που αναφέρονται στη βιβλιογραφία [112, 113, 117], πιθανότατα καθιστούν τα oxCNTs ικανά, αρχικά, να αλληλεπιδράσουν ισχυρά με την εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων, να σχηματίσουν συσσωματώματα κυττάρων-CNTs και να τη διαταράξουν. Στη συνέχεια αφού την διαπεράσουν, εισέρχονται στο εσωτερικό των βακτηρίων, οδηγώντας τα τελικά στο θάνατο. Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι μικρότερα, μοριακού βάρους, γουανιδιωμένα πολυμερή εμφανίζουν μεγαλύτερη βακτηριοκτόνο δράση σε σχέση με τα μεγαλύτερα μοριακού βάρους ανάλογά τους, πιθανότατα λόγω αποτελεσματικότερης πρόσληψής τους από τα gram (-) βακτήρια [117]. Από την άλλη πλευρά, και δύο υβριδικά υλικά εμφανίζουν μεγαλύτερη βακτηριοκτόνο δράση έναντι των *S. aureus* σε σχέση με τα oxCNTs, με το oxCNTs@GPEI25K να εμφανίζει σε χαμηλές συγκεντρώσεις (~20 $\mu\text{g/mL}$) ικανοποιητική βιοκτόνο δράση. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στη μεγαλύτερη περιεκτικότητα του oxCNTs@GPEI25K σε πολυμερές.

Πίνακας 5.6: Πίνακας τιμών EC₅₀ των oxCNTs, oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K στα βακτήρια *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus*.

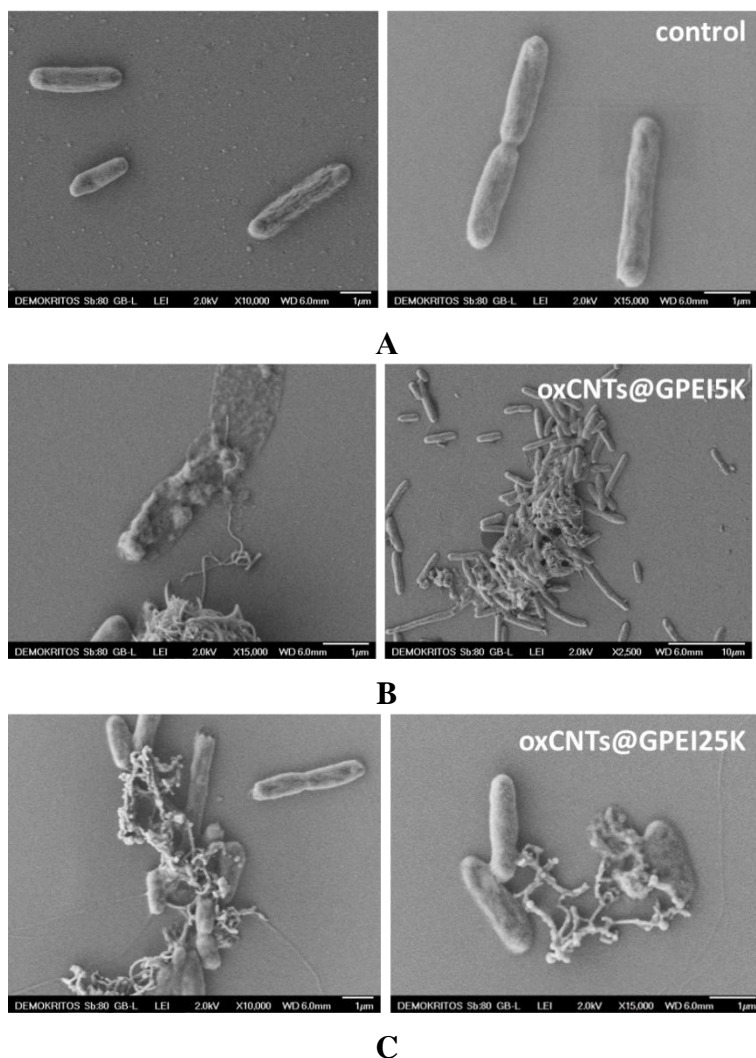
Υλικό	EC ₅₀ (μg/mL)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
oxCNTs	400	>700
oxCNTs@GPEI5K	15	300
oxCNTs@GPEI25K	25	20

Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα αυτά με εκείνα της μεθόδου διασποράς σε στερεό θρεπτικό μέσο, συμπεραίνουμε ότι στα *E. coli* τα oxCNTs εμφανίζουν μόνο βακτηριοστατική δράση, ενώ εμφανίζουν μικρή βακτηριοκτόνο δράση. Αντιθέτως, τα oxCNTs τροποποιημένα με τα GPEIs εμφανίζουν ενισχυμένη βακτηριοκτόνο δράση σε σχέση με τα oxCNTs, ενώ η βακτηριοστατική τους δράση δεν βελτιώνεται με την εισαγωγή των GPEIs. Συγκρίνοντας τις ιδιότητες των δύο υβριδικών υλικών, παρατηρείται ότι το oxCNTs@GPEI5K είναι πιο δραστικό στα *E. coli* από το oxCNTs@GPEI25K, εφόσον εμφανίζει ανάλογη βακτηριοκτόνο δράση με τα oxCNTs@GPEI25K, αλλά μεγαλύτερη βακτηριοστατική δράση. Από την άλλη πλευρά, τα oxCNTs εμφανίζουν ικανοποιητική βακτηριοστατική δράση έναντι των *S. aureus* βακτηρίων, η οποία δεν ενισχύεται μετά την τροποποίηση τους με τα GPEIs. Επιπλέον, τα oxCNTs εμφανίζουν μικρή βακτηριοκτόνο δράση, η οποία ενισχύεται μετά την τροποποίηση τους με τα GPEIs και κυρίως με το GPEI25K. Συμπερασματικά καταλήγουμε ότι και τα δύο υβριδικά υλικά, με βέλτιστο το oxCNTs@GPEI5K, εμφανίζουν βελτιωμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες και ιδιαίτερα έναντι των κατά gram (-) *E. coli* βακτηρίων, γεγονός πολύ σημαντικό, εφόσον, όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι γνωστό ότι εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε διάφορους αντιβακτηριακούς παράγοντες [116].

5.2.2.4 Έλεγχος της μορφολογίας των βακτηρίων *Escherichia coli* με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM) παρουσία των oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K

Η μορφολογία των βακτηρίων *Escherichia coli* μετά από επώαση με τα υβριδικά υλικά oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K μελετήθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM). Συγκεκριμένα, τα βακτήρια, μετά από επώαση 24 ωρών στους 37 °C παρουσία της υποδιπλάσιας τιμής EC₅₀ των oxCNTs@GPEI5K (7.5 μg/mL) και oxCNTs@GPEI25K (12.5 μg/mL), μονιμοποιήθηκαν με

γλουταραλδεΐδη και μεταφέρθηκαν σε καλυπτρίδες επικαλυμμένες με πολυλυσίνη. Τέλος, τα βακτήρια αφού αφυδατώθηκαν με διαδοχικές εκπλύσεις με διαλύματα νερού/αιθανόλης, επιχρυσώθηκαν προκειμένου να ληφθούν οι εικόνες SEM (Εικόνα 5.29).



Εικόνα 5.29: Εικόνες SEM των *Escherichia coli* βακτηρίων μετά από επώαση με θρεπτικό μέσο (A) και με συγκέντρωση ίση με το ήμισυ του EC₅₀ των oxCNTs@GPEI5K (B) και oxCNTs@GPEI25K (C). Η κλίμακα των εικόνων είναι 1 µm, εκτός της B (δεξιά) που είναι 10 µm.

Στην Εικόνα 5.29 παρουσιάζονται οι εικόνες των βακτηρίων που ελήφθησαν με μικροσκοπία SEM. Στην πρώτη Εικόνα 5.29A φαίνεται η μορφολογία των βακτηρίων (*E. coli*), τα οποία αναπτύχθηκαν χωρίς την παρουσία των υβριδικών νανοϋλικών (control), όπου τα υγιή βακτήρια διατηρούν το σχήμα τους και τη δομή τους και δεν παρουσιάζουν αλλοιώσεις. Από την άλλη μεριά, στις εικόνες των βακτηρίων *E. coli* (Εικόνα 5.29B και C), που επώαστηκαν παρουσία των νανοϋλικών (oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K), παρατηρούνται συσσωματώματα

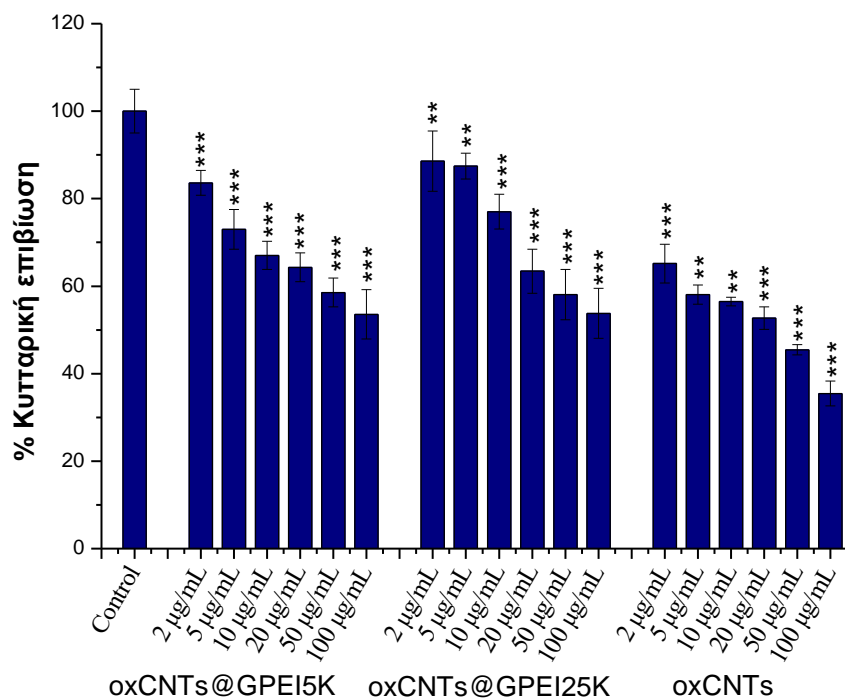
βακτηρίων-CNTs καθώς και σημαντικές δομικές αλλαγές στη μορφολογία τους. Συγκεκριμένα, στα βακτήρια φαίνεται να έχει προκληθεί ρήξη της κυτταρικής τους μεμβράνης και να έχει εκτεθεί το ενδοκυτταρικό περιεχόμενο, καθώς παρατηρούνται ιζήματα τα οποία πιθανώς ανήκουν στα οργανίδια του βακτηριακού κυττάρου. Η αποδόμηση της κυτταρικής μεμβράνης και η έκθεση των ενδοκυττάρων οργανιδίων πιθανώς να οφείλεται στη λύση των βακτηρίων, λόγω της παρουσίας των υβριδικών νανοϋλικών. Συγκεκριμένα, οι θετικά φορτισμένες γουανιδινικές ομάδες των υβριδικών υλικών αλληλεπιδρούν με την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη των *E. coli* με αποτέλεσμα να τις διαπερνούν ή να τους προκαλούν ρήξη, προκαλώντας την έκθεση των ενδοκυττάρων οργανιδίων, οδηγώντας τελικά το κύτταρο στο θάνατο.

5.2.2.5 Μελέτη κυτταροτοξικότητας σε ευκαρυωτικά κύτταρα παρουσία των oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη τοξικότητας των υβριδικών υλικών σε ευκαρυωτικά κύτταρα HEK293, τα οποία έχουν προέλευση ανθρώπινο εμβρυϊκό νεφρικό ιστό, ακολουθώντας την ευρέως χρησιμοποιούμενη, από τη βιβλιογραφία, μέθοδο του MTT. Για τον κυτταροτοξικό έλεγχο, τα κύτταρα HEK293 επώαστηκαν παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων oxCNTs, oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K. Η επιβίωση των κυττάρων προσδιορίστηκε μετά από 24 ώρες επώασης. Οι συγκεντρώσεις των υβριδικών νανοϋλικών (oxCNTs, oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K) που χρησιμοποιήθηκαν κυμαινόταν από 2 έως 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικότητας δίνονται στο Σχήμα 5.52.

Στο Σχήμα 5.52 παρουσιάζεται η μελέτη της κυτταροτοξικότητας των υβριδικών νανοϋλικών στη φυσιολογική κυτταρική σειρά HEK293. Παρατηρείται πως η κυτταρική επιβίωση των HEK293 μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης των νανοϋλικών, με τα υβριδικά υλικά να παρουσιάζουν σημαντικά λιγότερη τοξικότητα από ότι τα oxCNTs. Συγκεκριμένα το EC_{50} και των δύο υβριδικών υλικών στα HEK293 κύτταρα είναι $<100 \mu\text{g}/\text{mL}$, ενώ των oxCNTs είναι $\sim 50 \mu\text{g}/\text{mL}$. Σημειώνεται επίσης ότι τα δύο oxCNTs@GPEIs, στα ανθρώπινα μη καρκινικά κύτταρα, δεν εμφανίζουν σημαντική τοξικότητα (κυτταρική επιβίωση $>60\%$) για συγκεντρώσεις αρκετά μεγαλύτερες από τις τιμές EC_{50} τους ($>50 \mu\text{g}/\text{mL}$), ενώ σε συγκεντρώσεις ίσες

με τις τιμές EC₅₀ (15-25 μg/mL) εμφανίζουν ακόμα μικρότερη τοξικότητα (κυτταρική επιβίωση >70%).



Σχήμα 5.52: Κυτταρική βιωσιμότητα των ευκαρυωτικών κυττάρων HEK293. Τα κύτταρα επώαστηκαν παρουσία των oxCNTs, oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$.**

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι και τα δύο oxCNTs@GPEIs παρουσίασαν ταυτόχρονα τόσο χαμηλή κυτταροτοξικότητα, όσο και ενισχυμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες και επομένως είναι ελπιδοφόρα συστήματα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές ως ασφαλή, αντιβακτηριακά υλικά.

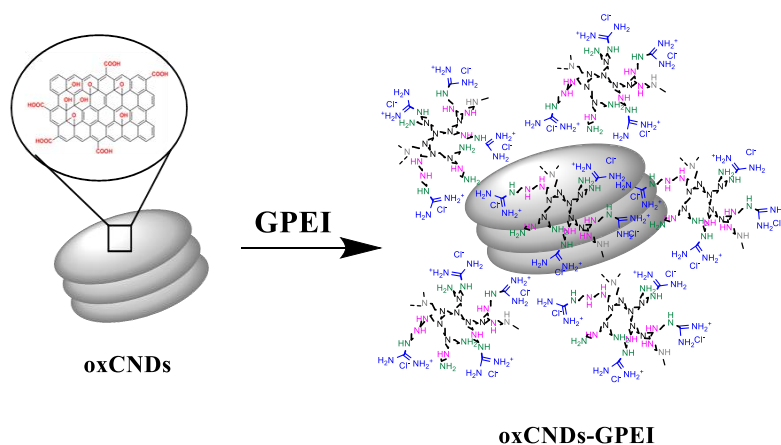
5.2.3 Αντιβακτηριακή μελέτη των υβριδικών υλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K

Βασιζόμενοι στα θετικά αποτελέσματα που προέκυψαν από την αντιβακτηριακή μελέτη των oxCNTs@GPEIs στο προηγούμενο κεφάλαιο αλλά και της διαπίστωσης ότι τα GPEIs παίζουν σημαντικό ρόλο στις αντιβακτηριακές ιδιότητες των υλικών, αντίστοιχη μελέτη πραγματοποιήθηκε και με τους τροποποιημένους νανοδίσκους άνθρακα (oxCNTs). Έτσι, τα oxCNTs τροποποιήθηκαν με γουανιδιωμένα παράγωγα της PEI με μοριακά βάρη 5000 και 25000 Da, δίνοντας τα υβριδικά νανοϋλικά oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, τα οποία στη συνέχεια μελετήθηκαν ως προς τις αντιβακτηριακές τους ιδιότητες. Για την αντιβακτηριακή μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη βακτηρίων, ένα θετικό κατά gram, το *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), και ένα αρνητικό κατά gram, το *Escherichia coli* (*E. coli*).

5.2.3.1 Σύνθεση και χαρακτηρισμός των oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K

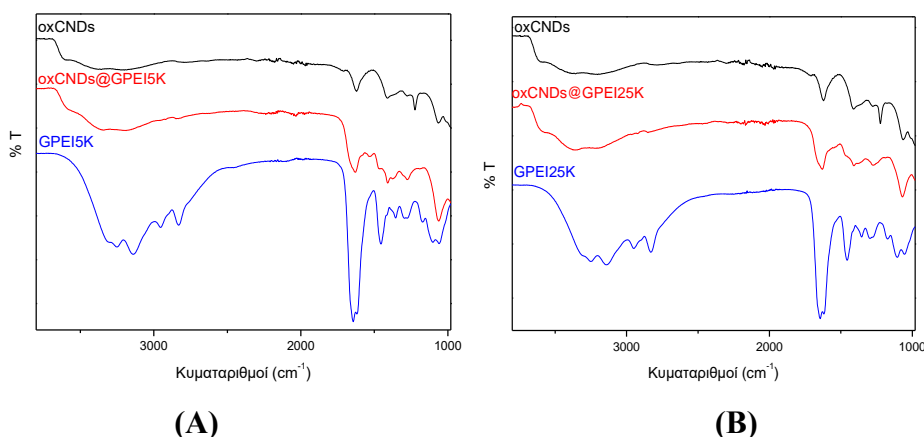
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η οξείδωση νανοδίσκων άνθρακα σε ισχυρά όξινο περιβάλλον, λαμβάνοντας τροποποιημένους νανοδίσκους με διάφορες λειτουργικές πολικές ομάδες, όπως υδροξυλικές, καρβοξυλικές και εποξειδικές ομάδες, όπως αναλύθηκε στο Κεφάλαιο 5.1.2. Επίσης συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν γουανιδιωμένα παράγωγα της PEI με μοριακά βάρη 5000 και 25000 Da (GPEI5K και GPEI25K), όπως περιγράφηκε ήδη στο Κεφάλαιο 5.1.1. Όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, η δομή των οξειδωμένων νανοδίσκων είναι ανάλογη με αυτή του οξειδίου του γραφενίου [57], το οποίο αντιδρά μέσω ομοιοπολικών και ετεροπολικών δεσμών με δενδριτικά πολυμερή πλούσια σε αμινομάδες, όπως η υπερδιακλαδισμένη πολυαιθυλενιμίνη [126] και τα διάμινο βουτάνιο πολυ(προπυλένο ίμινο) δενδριμερή [127]. Έτσι, οι οξειδωμένοι νανοδίσκοι άνθρακα (oxCNTs), αντέδρασαν με τα γουανιδιωμένα παράγωγα της PEI σε αλκαλικό περιβάλλον (pH=9) μέσω τόσο ομοιοπολικών όσο και ετεροπολικών δεσμών, δίνοντας τα υβριδικά υλικά oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K (Εικόνα 5.30). Συγκεκριμένα, όπως στην περίπτωση των oxCNTs, οι θετικώς φορτισμένες γουανιδινικές ομάδες των GPEI αλληλεπιδράσαν με τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες των oxCNTs μέσω διπλών δεσμών υδρογόνου και ηλεκτροστατικών δυνάμεων [1, 2, 48], ενώ ο σκελετός της PEI προσροφάται στη γραφιτική επιφάνεια των oxCNTs μέσω δεσμών van der

Waals [10-13]. Παράλληλα, οι αμινομάδες των GPEIs αντέδρασαν με ομοιοπολικό δεσμό με τις εποξειδικές ομάδες των oxCNDs [126, 127]. Τα παρασκευασθέντα υβριδικά νανοϋλικά χαρακτηρίστηκαν φυσικοχημικά με φασματοσκοπίες FTIR και XPS, όπου πιστοποιήθηκε η επιτυχής πρόσδεση των πολυμερών πάνω στους οξειδωμένους νανοδίσκους, ενώ το ποσοστό των πολυμερών στα υβριδικά υλικά προσδιορίστηκε με φασματοσκοπία ^1H NMR χρησιμοποιώντας ως εσωτερικό πρότυπο το μηλεϊνικό οξύ. Επιπλέον, η δομή των υλικών μελετήθηκε με περίθλαση ακτίνων-X, TGA και φασματοσκοπία Raman, ενώ τα υβριδικά υλικά oxCNDs@GPEIs χαρακτηρίστηκαν μορφολογικά με μικροσκοπίες SEM και TEM.



Εικόνα 5.30: Σχηματική αναπαράσταση της παρασκευής των υβριδικών μορίων oxCNDs@GPEIs.

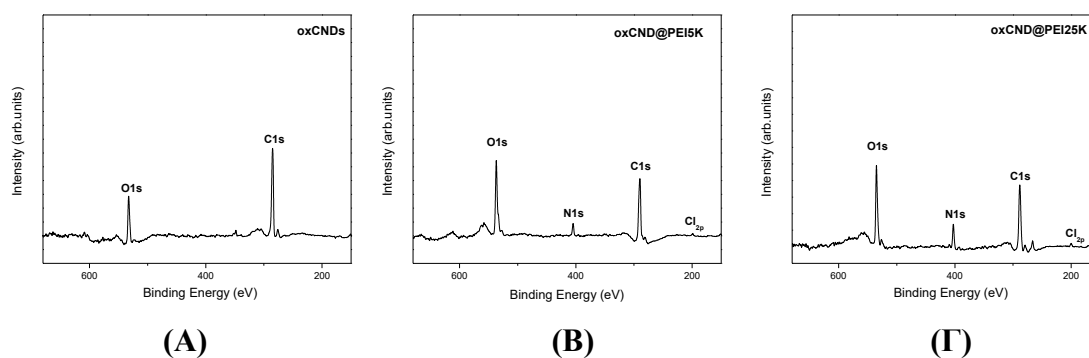
Οι χημικές δομές των GPEIs, oxCNDs και oxCNDs@GPEIs χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία υπερύθρου FTIR, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.53.



Σχήμα 5.53: Φάσματα FTIR (A) των oxCNDs, GPEI5K, και oxCNDs@GPEI5K και (B) των oxCNDs, GPEI25K, και oxCNDs@GPEI25K.

Από το Σχήμα 5.53, στα φάσματα FTIR των oxCNDs@GPEIs, φαίνονται όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές των oxCNDs στα 1630, 1412 και 1063 cm^{-1} , οι οποίες αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης και κάμψης του δεσμού C-O. Επιπλέον, φαίνονται και οι κυριότερες κορυφές των GPEIs: (α) στα 1642 και 1612 cm^{-1} που αποδίδονται σε δονήσεις τάσης του δεσμού C=N και N-H, αντίστοιχα και (β) στα 2950 και 2830 cm^{-1} που αποδίδονται σε δονήσεις τάσης των CH₂ και καθώς στα 1450 cm^{-1} που οφείλεται σε αντισυμμετρική δόνηση κάμψης των CH₂ του σκελετού της PEI. Επιπλέον, η κορυφή των oxCNDs στα 1224 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στις αντισυμμετρικές δονήσεις τάσεις των γεφυρών C-O-C της εποξειδικής ομάδας, δεν εμφανίζεται στα φάσματα των oxCNDs@GPEIs, γεγονός που δηλώνει την επιτυχή αντίδραση των αμινομάδων των GPEIs με τις εποξειδικές ομάδες των δίσκων.

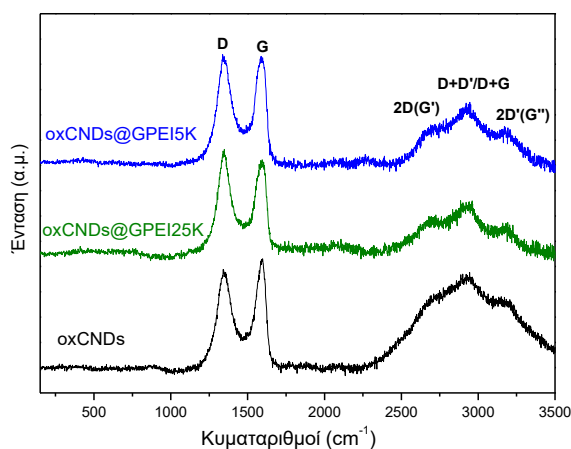
Η επιτυχής εισαγωγή των GPEIs στην επιφάνεια των oxCNDs μελετήθηκε με φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων-X. Χρησιμοποιώντας τη συγκεκριμένη τεχνική εξήχθησαν πληροφορίες σχετικά με τον τύπο των αλληλεπιδράσεων μετά την τροποποίηση των oxCNDs με τα GPEIs. Στο Σχήμα 5.54 παρουσιάζονται τα φάσματα XPS των οξειδωμένων νανοδίσκων άνθρακα αλλά και των δύο υβριδικών υλικών oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K.



Σχήμα 5.54: Φάσματα XPS των oxCNDs (Α), oxCNDs@GPEI5K (Β) και oxCNDs@GPEI25K (Γ).

Αναλυτικά, στα φάσματα XPS των υβριδικών υλικών (Σχήμα 5.54 Β και Γ) παρουσιάζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές O1s και C1s που οφείλονται κυρίως στο γραφιτικό πλέγμα των oxCNDs, αλλά και δύο επιπλέον κορυφές στα ~400 eV και ~200 eV που οφείλονται στα άτομα άζωτου και χλωρίου, αντίστοιχα, τα οποία προέρχονται αποκλειστικά από τα GPEIs, εφόσον δεν υπάρχουν στο αντίστοιχο φάσμα των oxCNDs. Συνεπώς, βεβαιώνεται και με αυτήν την μέθοδο, η παρουσία των GPEI στα τελικά υβριδικά υλικά.

Περαιτέρω οι χημικές δομές των GPEIs, oxCNDs και oxCNDs@GPEIs μελετήθηκαν με φασμοτοσκοπία Raman, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.55. Συγκεκριμένα, σε όλα τα φάσματα, όπως στην περίπτωση των οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα, παρατηρούνται οι εξής κορυφές: η ταινία G στα 1585 cm^{-1} που οφείλεται στις πλεγματικές ταλαντώσεις των δεσμών C–C του γραφιτικού πλέγματος (ατόμων άνθρακα με sp^2 υβριδισμό), η ταινία D στα 1345 cm^{-1} που οφείλεται στην αταξία των ατόμων άνθρακα με sp^2 υβριδισμό και εκφράζει τις ατέλειες που υπάρχουν στο γραφιτικό πλέγμα, αλλά και την ύπαρξη ατόμων άνθρακα με sp^3 υβριδισμό και η 2D ή ταινία G στα 2670 cm^{-1} που αποδίδεται στη δευτέρας τάξης αρμονική της ταινίας D. Εκτός αυτών παρατηρούνται ακόμα δύο ταινίες, η D+D' ή κατά άλλους D+G ταινία στα 2930 cm^{-1} που οφείλεται στις υψηλής τάξης διαταραχές του γραφιτικού πλέγματος (ατόμων άνθρακα με sp^3 υβριδισμό) και η ταινία 2D' ή G' στα $\sim 3200\text{ cm}^{-1}$ που προέρχεται από μια διαδικασία όπου η διατήρηση της ορμής ικανοποιείται από δύο φωτόνια με αντίθετα κυματοδιανύσματα και δεν απαιτούνται ατέλειες στο πλέγμα για την ενεργοποίησή τους [59].

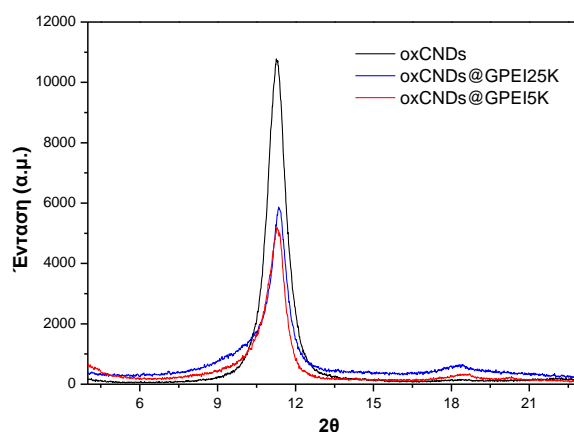


Σχήμα 5.55: Συγκριτικά φάσματα Raman των oxCNDs, oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K.

Συγκρίνοντας τα φάσματα των oxCNDs με εκείνα των oxCNDs@GPEIs, δεν παρατηρούνται αξιόλογες αλλαγές, πράγμα που δηλώνει ότι δεν λαμβάνουν χώρα σημαντικές μεταβολές στη δομή των οξειδωμένων νανοδίσκων κατά τη διάρκεια της σύζευξης. Η μόνη αλλαγή που παρατηρείται σχετίζεται με την τιμή του λόγου των εντάσεων των ταινιών D προς G (I_D/I_G), όπου αυξάνεται από 0.90 στην περίπτωση των oxCNDs σε 1.01 και 1.05 για τα oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K, αντίστοιχα. Όπως προαναφέρθηκε ο λόγος της σχετικής έντασης των ταινιών D και G

(I_D/I_G) χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό της έκτασης των ατελειών του γραφιτικού πλέγματος που μπορεί να προκύψουν μετά από χημική ή φυσική τροποποίηση τέτοιων υλικών καθώς όσο μεγαλύτερος είναι ο λόγος αυτός τόσο περισσότερες ατέλειες υπάρχουν στο γραφιτικό πλέγμα. Επομένως, αυτή η αύξηση του λόγου των εντάσεων που παρατηρείται υποδηλώνει την επιτυχή αλληλεπίδραση των GPEIs με τα oxCNDs.

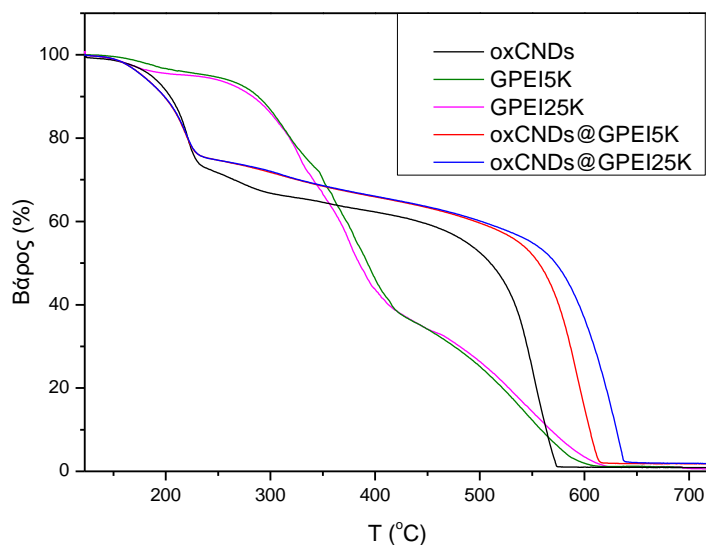
Η δομή των υβριδικών νανοϋλικών μελετάται επίσης και με περίθλαση ακτίνων-X, η οποία χρησιμοποιείται αρκετά στο χαρακτηρισμό φυλλόμορφων υλικών και εφαρμόζοντας το νόμο του Bragg είναι δυνατόν να προσδιοριστεί με ακρίβεια η απόσταση d_{001} .



Σχήμα 5.56: Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων-X των oxCNDs, oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K.

Στο Σχήμα 5.56 παρουσιάζονται τα διαγράμματα περίθλασης ακτίνων-X των oxCNDs και oxCNDs@GPEIs όπου διακρίνεται σαφώς ότι η δομή των oxCNDs δεν έχει επηρεαστεί από την αντίδραση με τα GPEIs. Συγκεκριμένα, στο διάγραμμα XRD του oxCNDs εμφανίζεται μια οξεία κορυφή 001 αντανάκλασης στα 11.4° που αντιστοιχεί σε απόσταση $d_{001}=7.8 \text{ \AA}$. Η κορυφή αυτή μετά την αντίδραση των δίσκων με τα γουανιδιωμένα πολυμερή δεν μεταβάλλεται, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα GPEIs δεν παρεμβάλλονται ανάμεσα στα γραφιτικά στρώματα των νανοδίσκων, αλλά συνδέονται εξωτερικά με αυτά.

Στη συνέχεια τα παρασκευασθέντα υβριδικά υλικά μελετήθηκαν και με θερμοβαρυμετρική ανάλυση, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.57.

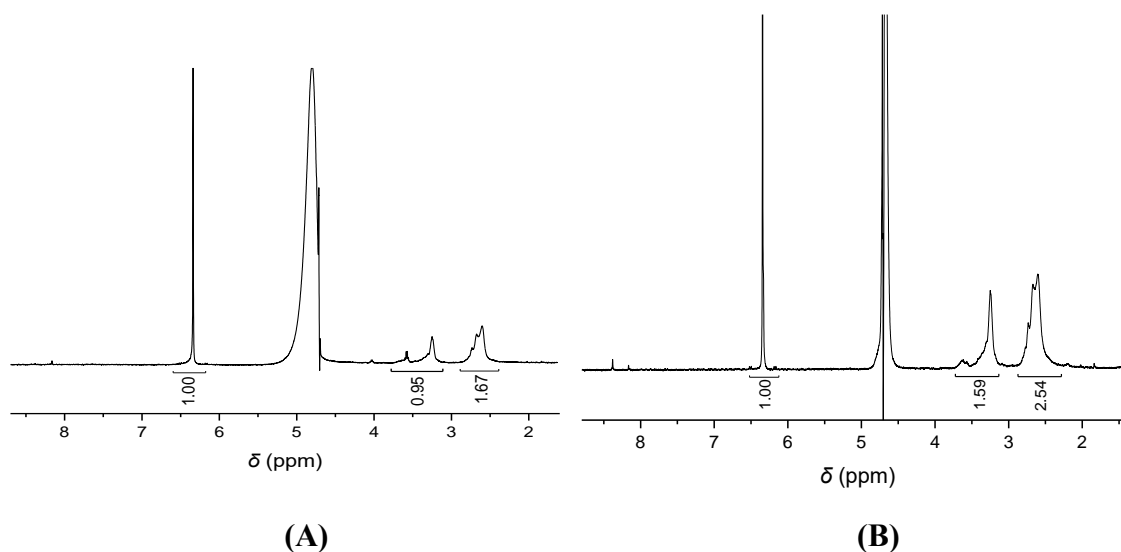


Σχήμα 5.57: Καμπύλες θερμοβαρουμετρικής ανάλυσης (TGA) των oxCNDs, των GPEIs και των oxCNDs@GPEIs.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.57, στην καμπύλη απώλειας βάρους των oxCNDs παρατηρούνται δύο περιοχές απώλειας βάρους. Στην περιοχή θερμοκρασιών 100–200 °C παρατηρείται απώλεια βάρους ~30% που αποδίδεται στη καύση των οξυγονούχων λειτουργικών ομάδων που υπάρχουν πάνω στους οξειδωμένους νανοδίσκους άνθρακα. Η δεύτερη περιοχή απώλειας βάρους στην καμπύλη των oxCNDs βρίσκεται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 400 °C και αποδίδεται στην θερμική αποδόμηση του γραφιτικού πλέγματος. Όσον αφορά στις θερμοβαρουμετρικές καμπύλες των υβριδικών υλικών (oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K), εντοπίζεται μια απώλεια βάρους ~20% σε θερμοκρασίες 100-200 °C καθώς και μια απώλεια βάρους ~10% μέχρι τους 500 °C, οι οποίες οφείλονται στην απομάκρυνση των οξυγονούχων ομάδων των oxCNDs, αλλά και στην μερική αποδόμηση των GPEIs. Τέλος, σε θερμοκρασίες πάνω από τους 500 °C παρατηρείται μια απότομη απώλεια βάρους, η οποία αποδίδεται στην ολική θερμική αποδόμηση του γραφιτικού πλέγματος. Είναι προφανές από το Σχήμα 5.57 ότι η παρουσία των GPEIs στην επιφάνεια oxCNDs καθυστερεί τη θερμική αποσύνθεση των νανοδίσκων άνθρακα, κάτι που αποτελεί άλλη μια απόδειξη της επιτυχούς τροποποίησης των oxCNDs με τα GPEIs.

Στη συνέχεια, λόγω του ότι με τη χρήση της θερμοβαρουμετρικής ανάλυσης δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί ακριβώς η ποσότητα των GPEIs που είναι δεσμευμένη στους νανοδίσκους παρά μόνο να εξάγουμε ποιοτικά αποτελέσματα, όπως και στην περίπτωση των oxCNDs@FCDs, η παρουσία των GPEIs στα υβριδικά υλικά

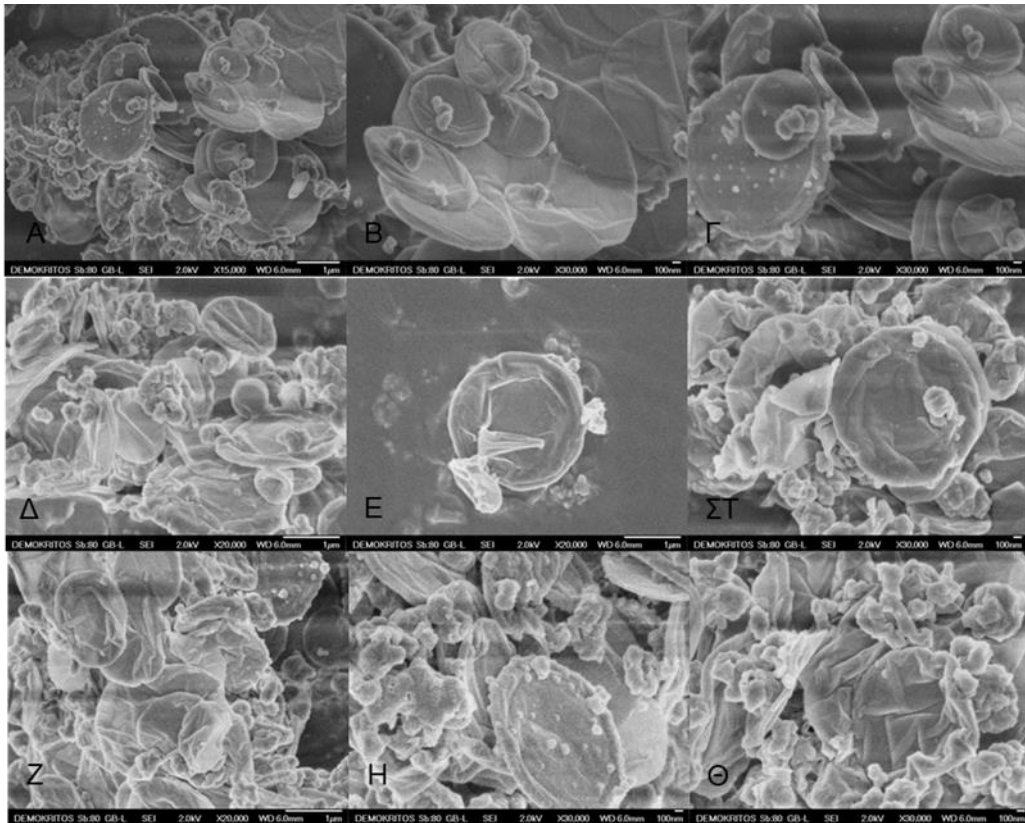
μελετήθηκε με φασματοσκοπία ^1H NMR. Επίσης, το ποσοστό δέσμευσής τους στα τελικά προϊόντα προσδιορίστηκε με την ίδια τεχνική, χρησιμοποιώντας το μηλεϊνικό οξύ ως εσωτερικό πρότυπο.



Σχήμα 5.58: Φάσματα ^1H NMR του (A) oxCNDs@GPEI5K και (B) oxCNDs@GPEI25K σε D_2O .

Από τα φάσματα ^1H NMR των oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K (Σχήμα 5.58) επιβεβαιώνεται η παρουσία των GPEIs στα υβριδικά υλικά όπου παρατηρούνται όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές των GPEIs. Συγκεκριμένα, στα 3.15 ppm βρίσκονται τα πρωτόνια των μεθυλομάδων δίπλα στην γουανιδινική ομάδα, ενώ η ευρεία πολλαπλή κορυφή με κέντρο τα 2.60 ppm αποδίδεται στα πρωτόνια των μεθυλομάδων του πολυμερικού σκελετού. Συγκρίνοντας τα ολοκληρώματα των κορυφών στα: (α) 6.35 ppm, που αποδίδονται στα πρωτόνια των CH ομάδων του μηλεϊνικού οξέος και (β) 2.60 ppm που αποδίδονται στα πρωτόνια των μεθυλομάδων του πολυμερικού σκελετού, βρέθηκε ότι κατά μέσο όρο 0.084 και 0.105 g GPEI5K και GPEI25K, αντίστοιχα, περιέχονται σε 1 g από τα υβριδικά υλικά (8.4 % και 10.5 % w/w GPEI5K και GPEI25K, αντίστοιχα).

Στη συνέχεια, αξιολογήθηκε η μορφολογία των οξειδωμένων νανοδίσκων άνθρακα και των oxCNDs@GPEIs με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) και με ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM).

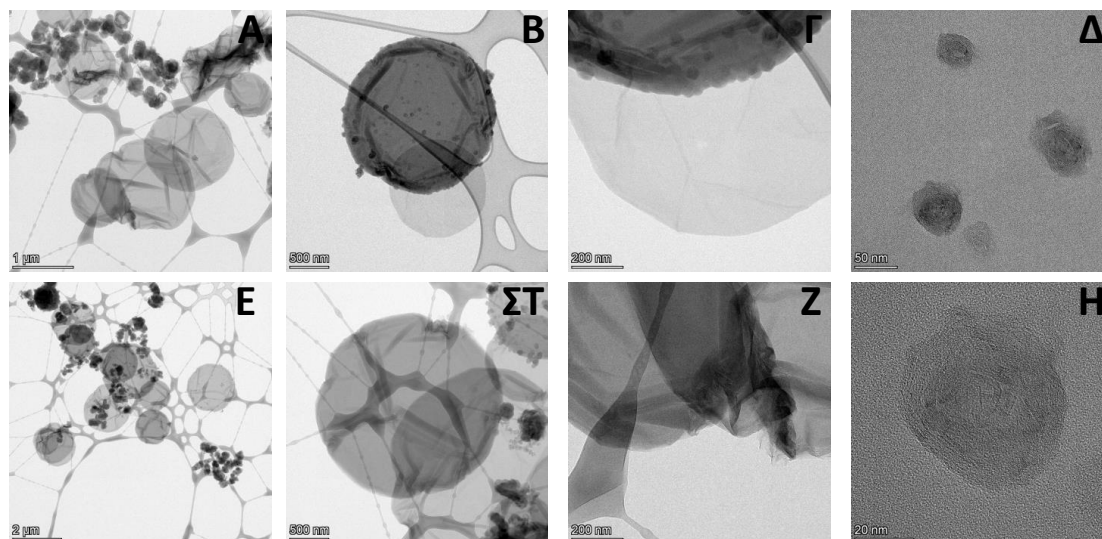


Εικόνα 5.31: Εικόνες SEM των oxCNDs (A,B,Γ), των oxCNDs@GPEI5K (Δ,Ε,ΣΤ) και των oxCNDs@GPEI25K (Ζ,Η,Θ). Η κλίμακα είναι 1 μm στις εικόνες (A,Δ,Ε,Ζ) και 100 nm στις εικόνες (B,Γ,ΣΤ,Η,Θ).

Όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 5.1.2, οι αρχικοί οξειδωμένοι νανοδίσκοι άνθρακα, εμφανίζονται κυρίως με τη μορφή ομοιογενών δίσκων διαμέτρου 1-3 nm, ενώ σε μερικούς από αυτούς υπάρχουν νανοσωματίδια άνθρακα (30-100 nm) ή μεμονωμένα στρώματα γραφενίου (πτυχώσεις) που έχουν αποσπαστεί από τους δίσκους λόγω της ισχυρής όξινης επεξεργασίας (Εικόνα 5.31 A-Γ). Συγκρίνοντας, τις εικόνες SEM των νανοδίσκων με αυτές των υβριδικών υλικών (Εικόνα 5.31), παρατηρούμε πως οι νανοδίσκοι διατηρούν τη δισκοειδή μορφή τους, αλλά εμφανίζονται με περισσότερες πτυχώσεις στην επιφάνειά τους. Αυτό αποτελεί άλλη μια απόδειξη της επιτυχής σύνδεσης των GPEIs με τους δίσκους κατά την οποία πιθανότατα προκαλείται μερική αποφυλλοποίηση.

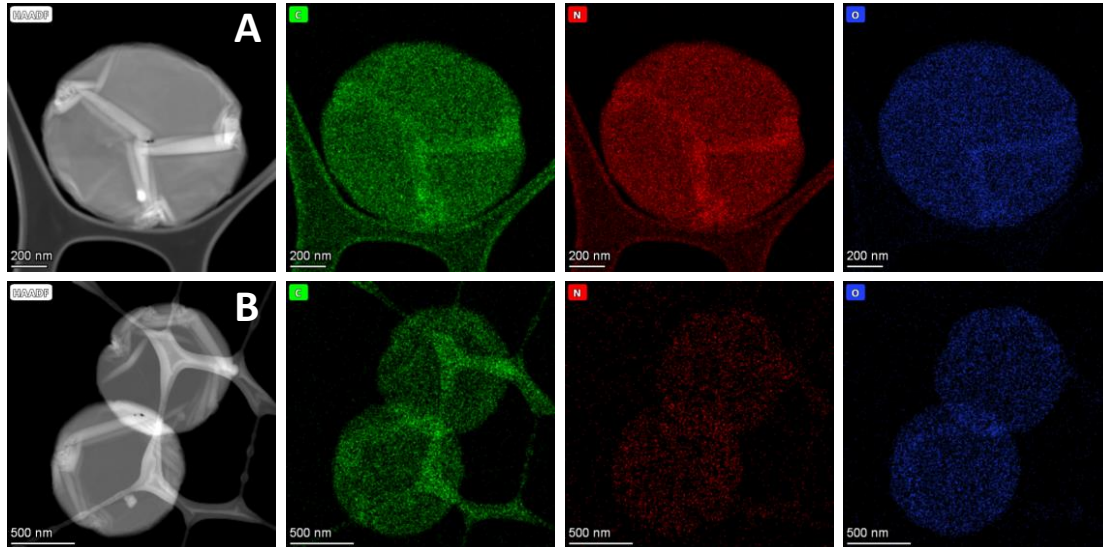
Αντίστοιχα αποτελέσματα διαπιστώνονται και από την μικροσκοπία TEM (Εικόνα 5.32), όπου επιβεβαιώνεται ότι η δομή των νανοδίσκων δεν μεταβάλλεται μετά την τροποποίησή τους με τα GPEIs (Εικόνα 5.32). Συγκεκριμένα, συγκρίνοντας την Εικόνα 5.31 (A,B) με την Εικόνα 5.32 παρατηρούμε ότι μετά την τροποποίησή τους οι νανοδίσκοι άνθρακα παραμένουν ομογενείς, διατηρώντας το αρχικό τους σχήμα και μέγεθος, ενώ παρατηρούνται περισσότερες πτυχώσεις στην επιφάνειά τους λόγω

μερικής αποφυλλοποίησης των δίσκων (Εικόνα 5.32 (B,ΣΤ,Z). Στην Εικόνα 5.32 (B,Γ,ΣΤ) διακρίνονται νανοσωματίδια άνθρακα (30-50 nm) ή/και γραφίτικά φυλλίδια πάνω στους νανοδίσκους, τα οποία είναι πιο ευδιάκριτα στην Εικόνα 5.32(Δ,H). Επίσης στην Εικόνα 5.32(Z) διακρίνονται τα γραφίτικά φύλλα στις άκρες των νανοδίσκων.



Εικόνα 5.32: Εικόνες TEM των oxCNDs@GPEI5K (A-Δ) και των oxCNDs@GPEI25K (E-H). Η κλίμακα είναι 1 μm (A, E), 500 nm (B, ΣΤ), 500 nm(Γ, Z), 50 nm (Δ) και 20 nm (H).

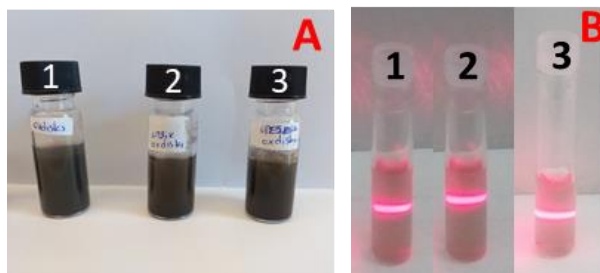
Επίσης, η παρουσία των GPEIs πάνω στους οξειδωμένους νανοδίσκους πιστοποιήθηκε συνδυάζοντας την τεχνική της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης υψηλής ανάλυσης (HRTEM) και τη φασματοσκοπική μέθοδο ενεργειακής διασποράς ακτίνων-X (EDX). Συγκεκριμένα, η παρουσία των GPEIs πάνω στους νανοδίσκους επιβεβαιώνεται συνδυάζοντας εικόνες υψηλής ανάλυσης και σκοτεινού πεδίου συνοδευόμενες από τις εικόνες χαρτογράφησης κατανομής των στοιχείων άνθρακα, οξυγόνου και αζώτου των αντίστοιχων περιοχών. Από την Εικόνα 5.33 είναι προφανές ότι τα GPEIs είναι ομοιόμορφα δεσμευμένα σε όλη την επιφάνεια των oxCNDs, αφού το άζωτο (κόκκινο) που προέρχεται αποκλειστικά από τα GPEIs, είναι ομοιόμορφα κατανομημένο στην ίδια θέση όπου ανιχνεύεται και ο άνθρακας (πράσινο) και το οξυγόνο (μπλε).



Εικόνα 5.33: Εικόνες σκοτεινού πεδίου TEM των oxCNDs@GPEI5K (A) και των oxCNDs@GPEI25K (B), συνοδευόμενες από τις εικόνες χαρτογράφησης κατανομής των στοιχείων άνθρακα (πράσινο), αζώτου (κόκκινο) και οξυγόνου (μπλε) των αντίστοιχων περιοχών. Η κλίμακα είναι 200 nm (A) και 500 nm (B).

5.2.3.2 Χαρακτηρισμός των υδατικών διασπορών των υβριδικών υλικών oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K

Έπειτα, μελετήθηκε η ικανότητα των oxCNDs@GPEIs να διασπαρθούν σε υδατικό μέσο. Έτσι, σε 1 mL νερού διασπάρθηκε 1 mg oxCNDs@GPEIs με τη βοήθεια υπερήχων, λαμβάνοντας ομογενείς και σταθερές υδατικές διασπορές, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.34 A. Για συγκριτικούς λόγους παρασκευάστηκε η υδατική διασπορά των oxCNDs, συγκέντρωσης 1 mg/mL, όπου και αυτή φαίνεται το ίδιο σταθερή και ομογενής, όπως και των oxCNDs@GPEIs, λόγω της παρουσίας των οξυγονούχων ομάδων στην επιφάνεια των νανοδίσκων, όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 5.1.2.2. Απόδειξη της ικανότητας των υβριδικών υλικών να διασπείρονται αποτελεσματικά σε υδατικά μέσα, δίνοντας ομογενείς διασπορές, λαμβάνεται και όταν μια λεπτή δέσμη φωτός, π.χ. η δέσμη φωτός ενός laser, διέρχεται μέσα από αυτά, τότε λόγω της σκέδασης η πορεία της δέσμης μέσα στη διασπορά είναι ορατή (Εικόνα 5.34 B). Το γεγονός αυτό δεν παρατηρείται κατά τη διέλευση της δέσμης μέσα από ένα μη ομογενές διάλυμα (φαινόμενο Tyndall), όπως έχει αναφερθεί στο Κεφάλαιο 5.1.2.2.



Εικόνα 5.34: Φωτογραφίες υδατικών διασπορών των oxCNDs (1), oxCNDs@GPEI5K (2) και oxCNDs@GPEI25K (3): (A) συγκέντρωσης 1 mg/mL αμέσως μετά τους υπερήχους και (B) συγκέντρωσης 0.2 mg/mL που απεικονίζει το φαινόμενο σκέδασης Tyndall.

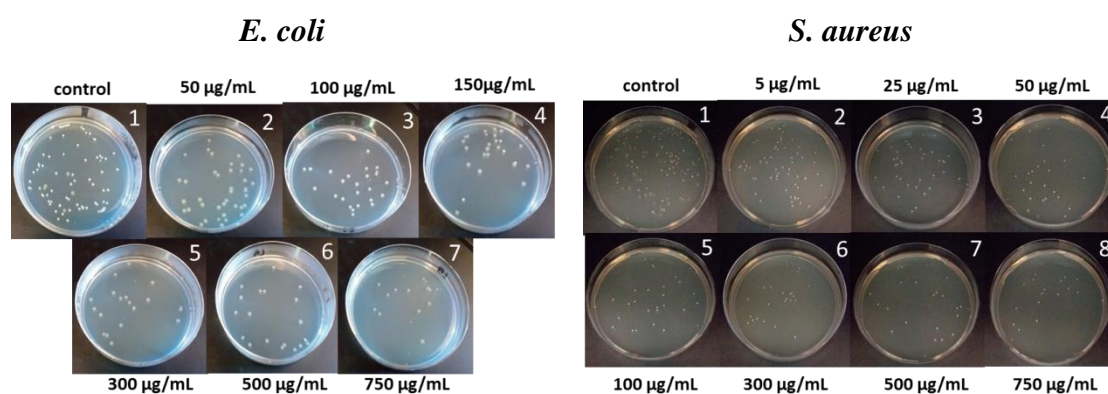
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μέτρηση ζ-δυναμικού των oxCNDs@GPEIs και oxCNDs διασπορών. Όπως προαναφέρθηκε, η τιμή του ζ-δυναμικού της διασποράς των oxCNDs σε pH=7.0 βρέθηκε ίση με -53.2 ± 2.5 mV, λόγω των αρνητικά φορτισμένων οξυγονούχων ομάδων στην επιφάνεια των δίσκων. Μετά την τροποποίηση τους, η τιμή του ζ-δυναμικού της υδατικής διασποράς του oxCNDs@GPEI5K βρέθηκε ότι είναι -10 ± 1.3 mV, ενώ της διασποράς του oxCNDs@GPEI25K -7.9 ± 0.7 mV. Έτσι, η μεταβολή του ζ-δυναμικού σε πιο θετικές τιμές προφανώς οφείλεται στην επιτυχή σύζευξη των oxCNDs με τα γουανιδιωμένα πολυμερή, όπου έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση της επιφάνειας των οξειδωμένων νανοδίσκων με θετικώς φορτισμένες ομάδες.

5.2.3.3 Μελέτη της ανάπτυξης των δύο βακτηριακών στελεχών παρουσία των oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K

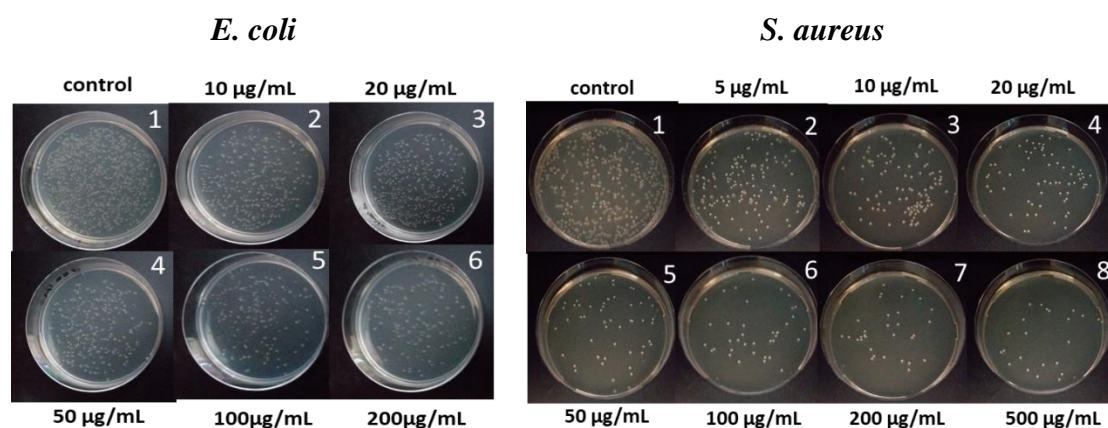
Η αντιβακτηριακή δράση των υβριδικών υλικών oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K μελετήθηκε αρχικά με τη μέθοδο διασποράς σε στερεό θρεπτικό μέσο (spread plate) χρησιμοποιώντας δύο βακτηριακά στελέχη τα *E. coli* (gram (-)) και τα *S. aureus* (gram (+)). Για συγκριτικούς λόγους αντίστοιχη μελέτη πραγματοποιήθηκε και στους οξειδωμένους νανοδίσκους άνθρακα. Έτσι, και τα δύο είδη βακτηρίων επώαστηκαν παρουσία των oxCNDs@GPEI5K, oxCNDs@GPEI25K και oxCNDs σε διάφορες συγκεντρώσεις στους 37 °C για 24 h υπό συνεχή ανάδευση. Οι συγκεντρώσεις των oxCNDs που χρησιμοποιήθηκαν στα *E. coli* ήταν 50, 100, 150, 300, 500 και 750 μg/mL, ενώ στα *S. aureus* ήταν 5, 25, 50, 100, 300, 500 και 750 μg/mL. Οι συγκεντρώσεις των υβριδικών υλικών που χρησιμοποιήθηκαν στα *E. coli* ήταν 10, 20, 50, 100 και 200 μg/mL, ενώ στα *S. aureus* ήταν 5, 10, 20, 50, 100, 200

και 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε διαδικασία ανάλογη με αυτή που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 5.2.2.4.

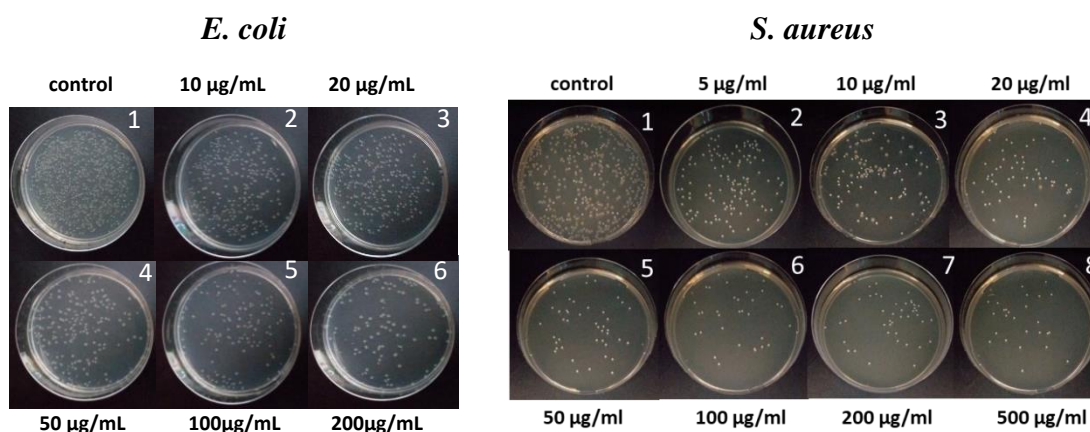
Ως μάρτυρες (control) χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια που είχαν επωαστεί μόνο με το θρεπτικό μέσο. Μετά το πέρας της επώασης πραγματοποιείται καταμέτρηση των αποικιών που αναπτύχθηκαν από τα δύο τρυβλία της ίδιας αραίωσης και λαμβάνεται ο μέσος όρος τους. Στις Εικόνες 5.35, 5.36 και 5.37 φαίνονται οι αποικίες των βακτηρίων που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία για τους οξειδωμένους νανοδίσκους άνθρακα και για τα υβριδικά υλικά παρουσία των δύο βακτηριακών στελεχών, ενώ στο Σχήμα 5.59 δίνονται τα ποσοστά αναστολής ανάπτυξης των βακτηρίων σε σχέση με τους μάρτυρες (control), τα οποία υπολογίστηκαν με την βοήθεια της Εξίσωσης 5.1 (Κεφάλαιο 5.2.2.2).



Εικόνα 5.35: Αποικίες ανάπτυξης βακτηρίων *E. coli* και *S. aureus* παρουσία των oxCNDs.



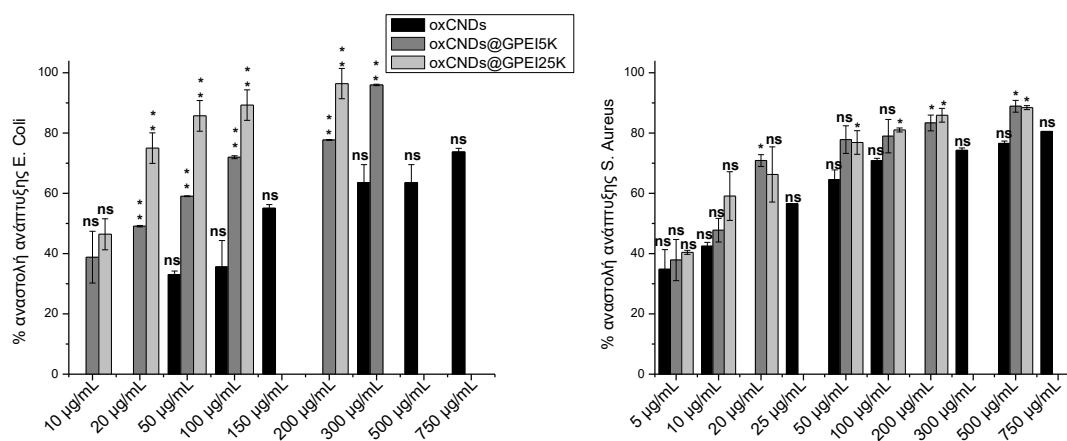
Εικόνα 5.36: Αποικίες ανάπτυξης βακτηρίων *E. coli* και *S. aureus* παρουσία των oxCNDs@GPEI5K.



Εικόνα 5.37: Αποικίες ανάπτυξης βακτηρίων *E. coli* και *S. aureus* παρουσία των oxCNDs@GPEI25K.

Από τις Εικόνες 5.35, 5.36 και 5.37 παρατηρούμε ότι η ανάπτυξη των *E. coli* παρουσία τόσο των υβριδικών υλικών όσο και των oxCNDs αναστέλλεται σημαντικά, κυρίως σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 50-100 µg/mL. Ανάλογη αναστολή παρατηρείται και στην περίπτωση των *S. aureus*, αλλά σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (20-25 µg/mL). Αναλυτικότερα, με βάση τα διαγράμματα του Σχήματος 5.59 διαπιστώνεται πως η ανάπτυξη των βακτηρίων *E. coli* αναστέλλεται κατά ποσοστό 50% σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K ($IC_{50} = 20$ και 10 µg/mL, αντίστοιχα) σε σχέση με το oxCNDs ($IC_{50} = 150$ µg/mL). Αντίστοιχα για τα *S. aureus*, το 50% της αναστολής της ανάπτυξης τους επιτυγχάνεται σε συγκεντρώσεις 10 µg/mL oxCNDs@GPEI5K και 7 µg/mL oxCNDs@GPEI25K, λίγο χαμηλότερες από αυτές των oxCNDs ($IC_{50} = 25$ µg/mL). Σημειώνεται ότι για την πλήρη αναστολή της ανάπτυξης (~90%) των *E. coli* απαιτείται συγκέντρωση oxCNDs μεγαλύτερη των 750 µg/mL, ενώ ανάλογη αναστολή παρατηρείται παρουσία των oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K σε συγκεντρώσεις 300 και 200 µg/mL, αντίστοιχα. Επίσης από το Σχήμα 5.59 φαίνεται ότι το oxCNDs@GPEI25K προκαλεί μεγαλύτερη αναστολή της ανάπτυξης των *E. coli* από ότι το oxCNDs@GPEI5K, πιθανότατα λόγω της μεγαλύτερης τοξικότητας του GPEI25K καθώς και της μεγαλύτερης περιεκτικότητας του oxCNDs@GPEI25K σε πολυμερές. Από την άλλη πλευρά, και τα δύο υβριδικά υλικά oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K εμφανίζουν ανάλογη επίδραση στα *S. aureus*. Συγκεκριμένα, παρατηρείται σχεδόν πλήρης αναστολή (80%) όταν τα βακτήρια *S. aureus* επωαστήκαν παρουσία συγκέντρωσης 50 µg/mL, πολύ μικρότερη από αυτή των oxCNDs (~300 µg/mL).

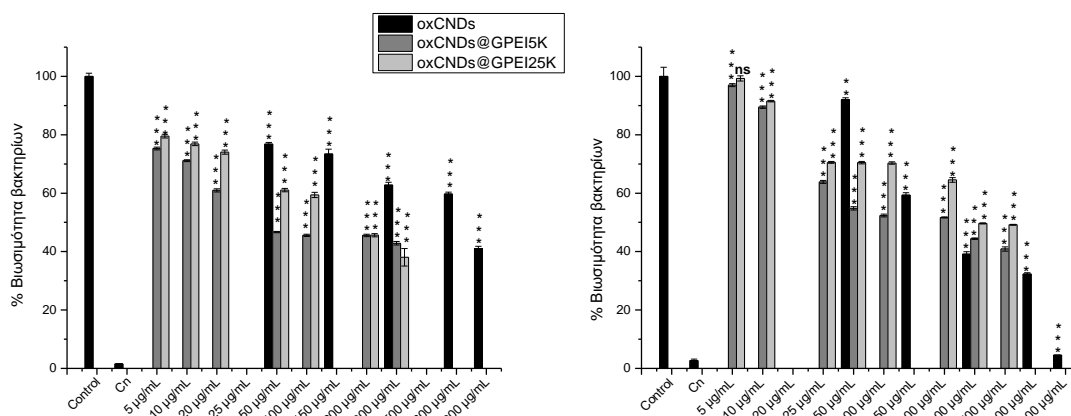
Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι και τα δύο υβριδικά υλικά εμφανίζουν βελτιωμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες σε σχέση με τα oxCNDs, με το oxCNDs@GPEI25K να εμφανίζει μεγαλύτερη τοξικότητα κυρίως στην περίπτωση των κατά gram (-) βακτηρίων *E. coli*.



Σχήμα 5.59: Ποσοστό αναστολής ανάπτυξης των βακτηρίων *E. coli* (αριστερά) και *S. aureus* (δεξιά) παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων oxCNDs, oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$ και χωρίς στατιστική σημασία (ns), $p > 0.05$.**

5.2.3.4 Μελέτη της βακτηριοκτόνου δράσης των oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K (Resazurin Assay)

Επειδή η αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης δεν σημαίνει απαραίτητα και βακτηριακό θάνατο, ακολούθησε μελέτη της αντιβακτηριοκτόνου δράσης των υβριδικών υλικών oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ρεσαζουρίνης (Resazurin Assay). Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε και στα δύο στελέχη βακτηρίων (συγκέντρωσης 10^4 cfu/mL). Συγκεκριμένα, βακτήρια *E. coli* και *S. aureus* επωάστηκαν παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K (5-500 µg/mL), καθώς και για συγκριτικούς λόγους με διάφορες συγκεντρώσεις oxCNDs (50-800 µg/mL) και στη συνέχεια, μετρήθηκε ο φθορισμός της παραγόμενης ρεσορουφίνης ($\lambda_{ex} = 530$ nm, $\lambda_{em} = 590$ nm). Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων και τον έλεγχο της εγκυρότητας της μεθόδου, έγινε θετικός και αρνητικός έλεγχος. Στο θετικό έλεγχο (control), βακτήρια (συγκέντρωσης 10^4 cfu/mL) επωάστηκαν χωρίς την προσθήκη των νανοϋλικών, παρά μόνο με το θρεπτικό μέσο LB (για τα *E. coli*) ή TSB (για τα *S. aureus*), ενώ στον αρνητικό έλεγχο το θρεπτικό μέσο LB ή TSB δεν εμβολιάστηκε με βακτήρια. Τα αποτελέσματα της βιωσιμότητας των υλικών παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.60.



Σχήμα 5.60: Βιωσιμότητα των *E. coli* (αριστερά) και *S. aureus* (δεξιά) βακτηρίων, τα οποία είχαν επωαστεί με διάφορες συγκεντρώσεις oxCNDs, oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K. Η επιβίωση των βακτηρίων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της ρεσαζουρίνης μετά από 24 ώρες επώασης. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$ και χωρίς στατιστική σημασία (ns), $p > 0.05$.**

Με βάση το διάγραμμα της βιωσιμότητας των *E. coli* (Σχήμα 5.60), φαίνεται ότι τα oxCNDs μετά από επώαση 24 ωρών δεν παρουσιάζουν κάποια σημαντική τοξικότητα εφόσον και στις δύο μεγαλύτερες χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις (600 και 800 µg/mL) η κυτταροτοξικότητα είναι γύρω στο 40-60% (60-40% κυτταρική επιβίωση). Αντιθέτως στα *S. aureus*, τα oxCNDs εμφανίζουν μεγαλύτερη βιοκτόνο δράση αφού στη μεγαλύτερη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση (800 µg/mL) η κυτταροτοξικότητα είναι 95% (5% κυτταρική επιβίωση). Η διαφορά ως προς την κυτταροτοξικότητα μεταξύ των δύο στελεχών οφείλεται προφανώς στη διαφορετική δομή του κυτταρικού τοιχώματος των *E. coli* βακτηρίων σε σχέση με τα *S. aureus* βακτήρια [111]. Από την άλλη πλευρά, παρουσία των υβριδικών υλικών oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K η βιωσιμότητα των *E. coli* μειώνεται σημαντικά με τρόπο εξαρτώμενο της συγκέντρωσης, υποδηλώνοντας μεγαλύτερη βιοκτόνο δράση από τα oxCNDs. Αντιθέτως, όταν τα *S. aureus* επώαστηκαν παρουσία των υβριδικών υλικών, δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη διαφοροποίηση ως προς την κυτταρική βιωσιμότητα σε σχέση με τα oxCNDs.

Με βάση τα διαγράμματα του Σχήματος 5.60, υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των oxCNDs, oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K που απαιτούνται για να θανατωθεί το 50% του αρχικού πληθυσμού των βακτηρίων (EC_{50}), οι οποίες βρέθηκαν ότι για το oxCNDs@GPEI5K είναι 35 µg/mL (*E. coli*) και 100 µg/mL (*S. aureus*), ενώ για το oxCNDs@GPEI25K είναι 150 µg/mL και 250 µg/mL, αντίστοιχα.

Σημειώνεται ότι οι αντίστοιχες τιμές του oxCNDs είναι μεγαλύτερες από 800 µg/mL για τα *E. coli*, ενώ για τα *S. aureus* είναι 250 µg/mL (Πίνακα 5.7). Παρατηρείται λοιπόν ότι τα oxCNDs δεν έχουν καμία δράση στα *E. coli*, ενώ μετά την τροποποίησή τους με τα GPEIs ενισχύεται σημαντικά η αντιβακτηριακή τους δράση, με το oxCNDs@GPEI5K να εμφανίζει μεγαλύτερη βακτηριοκτόνο δράση. Είναι προφανές ότι αυτή οφείλεται αποκλειστικά στην παρουσία των GPEIs στα υβριδικά υλικά που βοηθάει στην αποτελεσματική πρόσληψη τους από τα βακτήρια. Συγκεκριμένα, τα GPEIs, κατά ανάλογο τρόπο με αντίστοιχα γουανιδιωμένα πολυμερή που αναφέρονται στη βιβλιογραφία [112, 113, 117], πιθανότατα καθιστούν τα oxCNDs ικανά αρχικά να αλληλεπιδράσουν ισχυρά με τα βακτήρια. Έτσι κατά αναλογία με το οξειδίο του γραφενίου [73], αρχικά τα βακτήρια εναποτίθενται πάνω στα oxCNDs, δεσμεύονται ισχυρά μέσω ηλεκτροστατικών ή/και δυνάμεων van der Waals και δεσμών υδρογόνου, ενώ στη συνέχεια τα υλικά αυτά προκαλούν μεμβρανικό στρες λόγω της διαταραχής και καταστροφής των κυτταρικών μεμβρανών καθώς και οξειδωτικό στρες, οδηγώντας τελικά σε κυτταρικό θάνατο.

Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι μικρότερα μοριακού βάρους γουανιδιωμένα πολυμερή εμφανίζουν μεγαλύτερη βακτηριοκτόνο δράση σε σχέση με τα μεγαλύτερα μοριακού βάρους ανάλογά τους, πιθανότατα λόγω αποτελεσματικότερης πρόσληψής τους από τα gram (-) βακτήρια [117]. Από την άλλη πλευρά, αντίθετη συμπεριφορά παρατηρείται στα *S. aureus* όπου τα oxCNDs εμφανίζουν ικανοποιητική βακτηριοκτόνο δράση, η οποία ενισχύεται ελαφρώς μόνο στην περίπτωση που αυτά τροποποιούνται με το GPEI5K.

Πίνακας 5.7: Πίνακας τιμών EC₅₀ των oxCNDs, oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K στα βακτήρια *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus*.

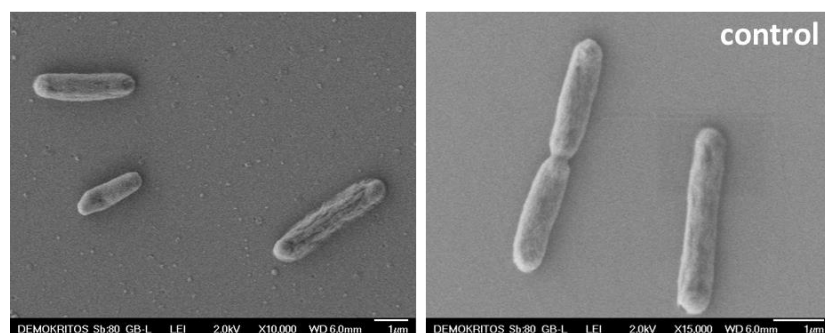
Υλικό	EC ₅₀ (µg/mL)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
oxCNDs	700	250
oxCNDs@GPEI5K	35	100
oxCNDs@GPEI25K	150	250

Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα αυτά με εκείνα της μεθόδου διασποράς σε στερεό θρεπτικό μέσο, συμπεραίνουμε ότι στα *E. coli* τα oxCNDs εμφανίζουν μόνο βακτηριοστατική δράση, ενώ δεν εμφανίζουν καμία βακτηριοκτόνο δράση. Αντιθέτως, τα τροποποιημένα oxCNDs με τα GPEIs εμφανίζουν ενισχυμένες

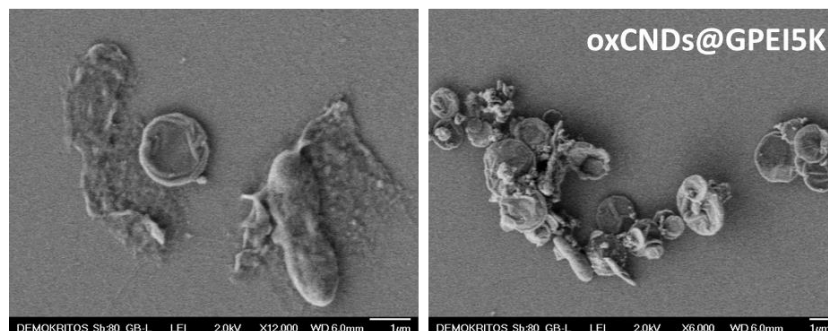
αντιβακτηριακές ιδιότητες που οφείλονται τόσο στη βακτηριοστατική όσο και στη βακτηριοκτόνο δράση τους. Συγκρίνοντας τις ιδιότητες των δύο υβριδικών υλικών, παρατηρείται ότι το oxCNDs@GPEI5K να είναι πιο δραστικό στα *E. coli* από το oxCNDs@GPEI25K, εφόσον εμφανίζει ανάλογη βακτηριοστατική δράση με το oxCNDs@GPEI25K, αλλά μεγαλύτερη βακτηριοκτόνο δράση. Από την άλλη πλευρά, τα oxCNDs εμφανίζουν αρκετή βακτηριοστατική δράση έναντι των *S. aureus* βακτηρίων, η οποία ενισχύεται μετά την τροποποίηση τους με τα GPEIs, ενώ δεν εμφανίζει ιδιαίτερη βακτηριοκτόνο δράση, η οποία ενισχύεται ελαφρώς μόνο μετά την τροποποίηση με το GPEI5K. Συμπερασματικά καταλήγουμε ότι και τα δύο υβριδικά υλικά, με βέλτιστο το oxCNDs@GPEI5K, εμφανίζουν βελτιωμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες και ιδιαίτερα έναντι των κατά gram (-) *E. coli* βακτηρίων, τα οποία, όπως ήδη αναφέρθηκε, εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε διάφορους αντιβακτηριακούς παράγοντες [116].

5.2.3.5 Έλεγχος της μορφολογίας των βακτηρίων *Escherichia coli* με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM) παρουσία των oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K

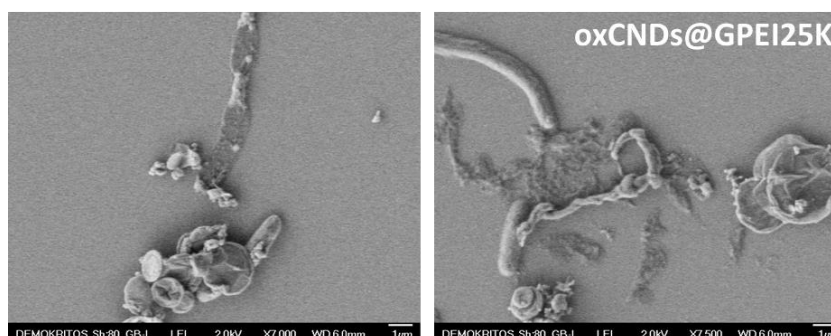
Η μορφολογία των βακτηρίων *Escherichia coli* μετά από επώαση με τα υβριδικά υλικά μελετήθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM). Συγκεκριμένα, τα βακτήρια, μετά 24 h επώασης στους 37 °C παρουσία της υποδιπλάσιας τιμής EC₅₀ των oxCNDs@GPEI5K (17.5 μg/mL) και oxCNDs@GPEI25K (75 μg/mL), μονιμοποιήθηκαν με γλουταραλδεΐδη και μεταφέρθηκαν σε καλυπτρίδες επικαλυμμένες με πολυλυσίνη. Τέλος, τα βακτήρια αφού αφυδατώθηκαν με διαδοχικές εκπλύσεις με διαλύματα νερού/αιθανόλης, επιχρυσώθηκαν προκειμένου να ληφθούν οι εικόνες SEM.



A



B



C

Εικόνα 5.38: Εικόνες SEM των *Escherichia coli* βακτηρίων μετά από επώαση με θρεπτικό μέσο (A) και με συγκέντρωση ίση με το ήμισυ του EC_{50} των oxCNDs@GPEI5K (B) και oxCNDs@GPEI25K (C). Η κλίμακα των εικόνων είναι 1 μ m.

Στην Εικόνα 5.38 παρουσιάζονται οι εικόνες των βακτηρίων που ελήφθησαν με μικροσκοπία SEM. Στην πρώτη Εικόνα 5.38A φαίνεται η μορφολογία των βακτηρίων (*E. coli*), τα οποία αναπτύχθηκαν χωρίς την παρουσία των υβριδικών νανοϋλικών παρά μόνο με θρεπτικό μέσο (control). Όπως φαίνεται στη εικόνα αυτή, τα υγιή βακτήρια διατηρούν το σχήμα τους και τη δομή τους και δεν παρουσιάζουν αλλοιώσεις. Από την άλλη μεριά, στις εικόνες των βακτηρίων (Εικόνα 5.38B και C), τα οποία επώαστηκαν με τα νανοϋλικά (oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K), παρατηρούνται σημαντικές δομικές αλλαγές στη μορφολογία τους. Συγκεκριμένα, στα βακτήρια αυτά φαίνεται να έχει προκληθεί ρήξη της

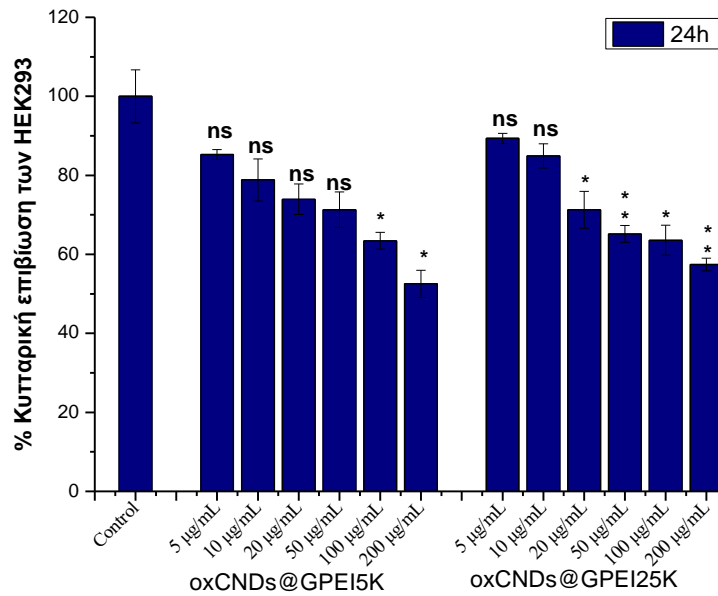
κυτταρικής τους μεμβράνης και να έχει εκτεθεί το ενδοκυτταρικό περιεχόμενο, καθώς παρατηρούνται ιζήματα τα οποία πιθανώς ανήκουν στα οργανίδια του βακτηριακού κυττάρου. Η αποδόμηση της κυτταρικής μεμβράνης και η έκθεση των ενδοκυττάρων οργανιδίων πιθανώς να οφείλεται στη λύση των κυττάρων των βακτηρίων λόγω της παρουσίας των υβριδικών νανοϋλικών. Συγκεκριμένα, τα βακτήρια εναποτίθενται πάνω στις θετικά φορτισμένες γουανιδικές ομάδες των υβριδικών υλικών, τα οποία αλληλεπιδρούν ισχυρά μέσω ηλεκτροστατικών ή/και δυνάμεων van der Waals και δεσμών υδρογόνου με την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα να προκαλούν μεμβρανικό στρες. Στη συνέχεια, είτε την διαπερνούν είτε να της προκαλούν ρήξη με αποτέλεσμα την έκθεση των ενδοκυττάρων οργανιδίων, οδηγώντας τελικά το κύτταρο στο θάνατο.

5.2.3.6 Μελέτη κυτταροτοξικότητας σε ευκαρυωτικά κύτταρα παρουσία των oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μελέτη τοξικότητας των υβριδικών υλικών σε ευκαρυωτικά κύτταρα HEK293, τα οποία έχουν προέλευση ανθρώπινο εμβρυϊκό νεφρικό ιστό, ακολουθώντας την ευρέως χρησιμοποιούμενη, από τη βιβλιογραφία, μέθοδο του MTT. Για τον κυτταροτοξικό έλεγχο, τα κύτταρα HEK293 επώαστηκαν παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K. Η επιβίωση των κυττάρων προσδιορίστηκε μετά από 24 ώρες επώασης. Οι συγκεντρώσεις των υβριδικών νανοϋλικών (oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K) που χρησιμοποιήθηκαν κυμαινόταν από 5 έως 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, κατά πολύ πάνω από τις τιμές EC_{50} των υλικών. Τα αποτελέσματα της κυτταροτοξικότητας δίνονται στο Σχήμα 5.61.

Από το Σχήμα 5.61 φαίνεται ότι και τα δύο oxCNDs@GPEIs στα ανθρώπινα μη καρκινικά κύτταρα δεν εμφανίζουν σημαντική τοξικότητα (κυτταρική επιβίωση $>60\%$) για συγκεντρώσεις αρκετά μεγαλύτερες από τις τιμές EC_{50} τους ($>100 \mu\text{g}/\text{mL}$), ενώ σε συγκεντρώσεις ίσες με τις τιμές EC_{50} (35-150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) δεν εμφανίζουν καμία τοξικότητα (κυτταρική επιβίωση $>80\%$).

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι και τα δύο oxCNDs@GPEIs παρουσίασαν ταυτόχρονα τόσο χαμηλή κυτταροτοξικότητα όσο και ενισχυμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες και επομένως είναι ελπιδοφόρα συστήματα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές ως ασφαλή, αντιβακτηριακά υλικά.



Σχήμα 5.61: Κυτταρική βιωσιμότητα των ευκαρυωτικών κυττάρων HEK293. Τα κύτταρα επώστηκαν παρουσία των oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K για 24 h. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με t-test, όπου * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$.**

Βιβλιογραφία 5^ο Κεφαλαίου

- [1] A. Pantos, I. Tsogas, C.M. Paleos, «Guanidinium group: A versatile moiety inducing transport and multicompartmentalization in complementary membranes», *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1778(4) (2008) 811-823.
- [2] T.A. Theodossiou, A. Pantos, I. Tsogas, C.M. Paleos, «Guanidinylated dendritic molecular transporters: prospective drug delivery systems and application in cell transfection», *ChemMedChem*, 3(11) (2008) 1635-1643.
- [3] I. Tsogas, T. Theodossiou, Z. Sideratou, C.M. Paleos, H. Collet, J.C. Rossi, B. Romestand, A. Commeyras, «Interaction and transport of poly(L-lysine) dendrigrafts through liposomal and cellular membranes: the role of generation and surface functionalization», *Biomacromolecules*, 8(10) (2007) 3263-3270.
- [4] C.V. Bonduelle, E.R. Gillies, «Dendritic guanidines as efficient analogues of cell penetrating peptides», *Pharmaceuticals*, 3(3) (2010) 636-666.
- [5] L.-A. Tziveleka, A.-M.G. Psarra, D. Tsiourvas, C.M. Paleos, «Synthesis and characterization of guanidinylated poly(propylene imine) dendrimers as gene transfection agents», *Journal Controlled Release Society*, 117(1) (2007) 137-146.
- [6] M. Lykogianni, E.A. Papadopoulou, A. Sapalidis, D. Tsiourvas, Z. Sideratou, K.A. Aliferis, «Metabolomics reveals differential mechanisms of toxicity of hyperbranched poly(ethyleneimine)-derived nanoparticles to the soil-borne fungus *verticillium dahliae* kleb», *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 165 (2020) 104535.
- [7] S. Krimm, «The infrared spectra of complex molecules», *Journal of Polymer Science*, v 1 (3rd ed.), 14(2) (1976) 121.
- [8] A.R. Santos, R.K. Blundell, P. Licence, «XPS of guanidinium ionic liquids: a comparison of charge distribution in nitrogenous cations», *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(17) (2015) 11839-11847.
- [9] L. Staudenmaier, «Verfahren zur darstellung der graphitsäure», *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 31(2) (1898) 1481-1487.
- [10] K.C. Etika, M.A. Cox, J.C. Grunlan, «Tailored dispersion of carbon nanotubes in water with pH-responsive polymers», *Polymer*, 51(8) (2010) 1761-1770.
- [11] X. Hu, T. Wang, X. Qu, S. Dong, «In situ synthesis and characterization of multiwalled carbon nanotube/Au nanoparticle composite materials», *Journal of Physical Chemistry B*, 110(2) (2006) 853-857.
- [12] S. Yi, C. Jung, W. Kim, «Synthesis of Pt/PEI-MWCNT composite materials on polyethyleneimine-functionalized MWNTs as supports», *Materials Research Bulletin*, 46 (2011) 2433-2440.
- [13] M. Shim, A. Javey, N.W. Shi Kam, H. Dai, «Polymer functionalization for air-stable n-type carbon nanotube field-effect transistors», *Journal of the American Chemical Society*, 123(46) (2001) 11512-11513.
- [14] L. Stobinski, B. Lesiak, L. Kövér, J. Tóth, S. Biniak, G. Trykowski, J. Judek, «Multiwall carbon nanotubes purification and oxidation by nitric acid studied by the FTIR and electron spectroscopy methods», *Journal of Alloys and Compounds*, 501(1) (2010) 77-84.
- [15] L. Bellamy, «The infra-red spectra of complex molecules», SpringerLink, Netherlands, 1975.
- [16] M.J. Becker, W. Xia, J.-P. Tessonnier, R. Blume, L. Yao, R. Schlögl, M. Muhler, «Optimizing the synthesis of cobalt-based catalysts for the selective growth of multiwalled carbon nanotubes under industrially relevant conditions», *Carbon*, 49(15) (2011) 5253-5264.

- [17] T. Rundlöf, M. Mathiasson, S. Bekiroglu, B. Hakkarainen, T. Bowden, T. Arvidsson, «Survey and qualification of internal standards for quantification by ¹H NMR spectroscopy», *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52(5) (2010) 645-651.
- [18] X. Zhou, Z. Chen, D. Yan, H. Lu, «Deposition of Fe–Ni nanoparticles on polyethyleneimine-decorated graphene oxide and application in catalytic dehydrogenation of ammonia borane», *Journal of Materials Chemistry*, 22(27) (2012) 13506-13516.
- [19] N.S. Heliopoulos, G. Kythreoti, K.M. Lyra, K.N. Panagiotaki, A. Papavasiliou, E. Sakellis, S. Papageorgiou, A. Kouloumpis, D. Gournis, F.K. Katsaros, K. Stamatakis, Z. Sideratou, «Cytotoxicity effects of water-soluble multi-walled carbon nanotubes decorated with quaternized hyperbranched poly(ethyleneimine) Derivatives on autotrophic and heterotrophic gram-negative bacteria», *Pharmaceuticals*, 13(10) (2020).
- [20] N. Zhang, J. Xie, M. Guers, V.K. Varadan, «Chemical bonding of multiwalled carbon nanotubes to SU-8 via ultrasonic irradiation», *Smart Materials and Structures*, 12(2) (2003) 260-263.
- [21] A. Schierz, H. Zänker, «Aqueous suspensions of carbon nanotubes: surface oxidation, colloidal stability and uranium sorption», *Environmental Pollution*, 157(4) (2009) 1088-1094.
- [22] Y. Bai, I.S. Park, S.J. Lee, P.S. Wen, T.S. Bae, M.H. Lee, «Effect of AOT-assisted multi-walled carbon nanotubes on antibacterial activity», *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 89 (2012) 101-107.
- [23] Y. Bai, I.S. Park, S. Lee, T. Bae, F. Watari, M. Uo, M.H. Lee, «Aqueous dispersion of surfactant-modified multiwalled carbon nanotubes and their application as an antibacterial agent», *Carbon*, 49 (2011) 3663-3671.
- [24] J.-T. Sun, C.-Y. Hong, C.-Y. Pan, «Surface modification of carbon nanotubes with dendrimers or hyperbranched polymers», *Polymer Chemistry*, 2(5) (2011) 998-1007.
- [25] D. Tuncel, «Non-covalent interactions between carbon nanotubes and conjugated polymers», *Nanoscale*, 3(9) (2011) 3545-3554.
- [26] R. Soleyman, S. Hirbod, M. Adeli, «Advances in the biomedical application of polymer-functionalized carbon nanotubes», *Biomaterials Science*, 3(5) (2015) 695-711.
- [27] W. Zhang, M. Chen, X. Gong, G. Diao, «Universal water-soluble cyclodextrin polymer–carbon nanomaterials with supramolecular recognition», *Carbon*, 61 (2013) 154-163.
- [28] S. Bhattacharjee, «DLS and zeta potential - What they are and what they are not?», *Journal of the Controlled Release Society*, 235 (2016) 337-351.
- [29] H. Taymaz-Nikerel, M.E. Karabekmez, S. Eraslan, B. Kırdar, «Doxorubicin induces an extensive transcriptional and metabolic rewiring in yeast cells», *Scientific Reports*, 8(1) (2018) 13672.
- [30] A. Ferreira, T. Cunha-Oliveira, R.F. Simões, F.S. Carvalho, A. Burgeiro, K. Nordgren, K.B. Wallace, P.J. Oliveira, «Altered mitochondrial epigenetics associated with subchronic doxorubicin cardiotoxicity», *Toxicology*, 390 (2017) 63-73.
- [31] B. Zhou, L. Zhao, M. Shen, J. Zhao, X. Shi, «A multifunctional polyethylenimine-based nanoplatfor for targeted anticancer drug delivery to tumors in vivo», *Journal of Materials Chemistry B*, 5(8) (2017) 1542-1550.

- [32] C.M. Paleos, D. Tsiourvas, Z. Sideratou, L.A. Tziveleka, «Drug delivery using multifunctional dendrimers and hyperbranched polymers», *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7(12) (2010) 1387-1398.
- [33] C. Fennelly, R.K. Amaravadi, «Lysosomal biology in cancer», *Methods in Molecular Biology*, 1594 (2017) 293-308.
- [34] A. Choucair, P. Lim Soo, A. Eisenberg, «Active loading and tunable release of doxorubicin from block copolymer vesicles», *Langmuir*, 21(20) (2005) 9308-9313.
- [35] X. Cao, L. Tao, S. Wen, W. Hou, X. Shi, «Hyaluronic acid-modified multiwalled carbon nanotubes for targeted delivery of doxorubicin into cancer cells», *Carbohydrate Research*, 405 (2015) 70-77.
- [36] S. Wen, H. Liu, H. Cai, M. Shen, X. Shi, «Targeted and pH-responsive delivery of doxorubicin to cancer cells using multifunctional dendrimer-modified multi-walled carbon nanotubes», *Advanced Healthcare Materials*, 2(9) (2013) 1267-1276.
- [37] Y. Yan, R. Wang, Y. Hu, R. Sun, T. Song, X. Shi, S. Yin, «Stacking of doxorubicin on folic acid-targeted multiwalled carbon nanotubes for in vivo chemotherapy of tumors», *Drug Delivery*, 25(1) (2018) 1607-1616.
- [38] J.P. van Brussel, G.J. van Steenbrugge, J.C. Romijn, F.H. Schröder, G.H. Mickisch, «Chemosensitivity of prostate cancer cell lines and expression of multidrug resistance-related proteins», *European Journal of Cancer*, 35(4) (1999) 664-671.
- [39] G. Theyer, M. Schirmböck, T. Thalhammer, E.R. Sherwood, G. Baumgartner, G. Hamilton, «Role of the MDR-1-encoded multiple drug resistance phenotype in prostate cancer cell lines», *The Journal of Urology*, 150(5 Pt 1) (1993) 1544-1547.
- [40] G.L. David-Beabes, M.J. Overman, J.A. Petrofski, P.A. Campbell, A.M. de Marzo, W.G. Nelson, «Doxorubicin-resistant variants of human prostate cancer cell lines DU145, PC-3, PPC-1, and TSU-PR1: characterization of biochemical determinants of antineoplastic drug sensitivity», *International Journal of Oncology*, 17(6) (2000) 1077-1086.
- [41] E. Tsakalozou, A.M. Eckman, Y. Bae, «Combination effects of docetaxel and doxorubicin in hormone-refractory prostate cancer cells», *Biochemistry Research International*, 2012 (2012) 832059.
- [42] S. Mondal, M. Saha, M. Ghosh, S. Santra, M.A. Khan, K. Das Saha, M.R. Molla, «Programmed supramolecular nanoassemblies: enhanced serum stability and cell specific triggered release of anti-cancer drugs», *Nanoscale Advances*, 1(4) (2019) 1571-1580.
- [43] T. Coccini, E. Roda, D.A. Sarigiannis, P. Mustarelli, E. Quartarone, A. Profumo, L. Manzo, «Effects of water-soluble functionalized multi-walled carbon nanotubes examined by different cytotoxicity methods in human astrocyte D384 and lung A549 cells», *Toxicology*, 269(1) (2010) 41-53.
- [44] Y. Liu, Y. Zhao, B. Sun, C. Chen, «Understanding the toxicity of carbon nanotubes», *Accounts of Chemical Research*, 46(3) (2013) 702-713.
- [45] H.-F. Cui, S.K. Vashist, K. Al-Rubeaan, J.H.T. Luong, F.-S. Sheu, «Interfacing carbon nanotubes with living mammalian cells and cytotoxicity issues», *Chemical Research in Toxicology*, 23(7) (2010) 1131-1147.
- [46] D.J. Mitchell, L. Steinman, D.T. Kim, C.G. Fathman, J.B. Rothbard, «Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers», *The Journal of Peptide Research*, 56(5) (2000) 318-325.
- [47] I. Tsogas, Z. Sideratou, D. Tsiourvas, T.A. Theodossiou, C.M. Paleos, «Interactive transport of guanidinylated poly(propylene imine)-based dendrimers through liposomal and cellular membranes», *ChemBioChem*, 8(15) (2007) 1865-1876.

- [48] J.B. Rothbard, T.C. Jessop, P.A. Wender, «Adaptive translocation: the role of hydrogen bonding and membrane potential in the uptake of guanidinium-rich transporters into cells», *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(4) (2005) 495-504.
- [49] R. Misra, S.K. Sahoo, «Intracellular trafficking of nuclear localization signal conjugated nanoparticles for cancer therapy», *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39(1-3) (2010) 152-163.
- [50] B. Yameen, W.I. Choi, C. Vilos, A. Swami, J. Shi, O.C. Farokhzad, «Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting», *Journal of Controlled Release*, 190 (2014) 485-499.
- [51] K. Kostarelos, L. Lacerda, G. Pastorin, W. Wu, S. Wieckowski, J. Luangsivilay, S. Godefroy, D. Pantarotto, J.-P. Briand, S. Muller, M. Prato, A. Bianco, «Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type», *Nature Nanotechnology*, 2(2) (2007) 108-113.
- [52] P. Boya, G. Kroemer, «Lysosomal membrane permeabilization in cell death», *Oncogene*, 27(50) (2008) 6434-6451.
- [53] M. Borkowska, M. Siek, D.V. Kolygina, Y.I. Sobolev, S. Lach, S. Kumar, Y.-K. Cho, K. Kandere-Grzybowska, B.A. Grzybowski, «Targeted crystallization of mixed-charge nanoparticles in lysosomes induces selective death of cancer cells», *Nature Nanotechnology*, 15(4) (2020) 331-341.
- [54] M. Zimmermann, N. Meyer, «Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes», *Methods in Molecular Biology*, 740 (2011) 57-63.
- [55] N.C.L. Zemruski, V. Stache, W.E. Haefeli, J. Weiss, «7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry», *Analytical Biochemistry*, 429(1) (2012) 79-81.
- [56] A. Krishnan, E. Dujardin, M.M.J. Treacy, J. Hugdahl, S. Lynam, T.W. Ebbesen, «Graphitic cones and the nucleation of curved carbon surfaces», *Nature*, 388(6641) (1997) 451-454.
- [57] P. Zygouri, T. Tsoufis, A. Kouloumpis, M. Patila, G. Potsi, A.A. Sevastos, Z. Sideratou, F. Katsaros, G. Charalambopoulou, H. Stamatis, P. Rudolf, T.A. Steriotis, D. Gournis, «Synthesis, characterization and assessment of hydrophilic oxidized carbon nanodiscs in bio-related applications», *RSC Advances*, 8(1) (2018) 122-131.
- [58] S. Bhattacharyya, F. Ehrat, P. Urban, R. Teves, R. Wyrwich, M. Döblinger, J. Feldmann, A.S. Urban, J.K. Stolarczyk, «Effect of nitrogen atom positioning on the trade-off between emissive and photocatalytic properties of carbon dots», *Nature Communications*, 8(1) (2017) 1401.
- [59] L.G. Cançado, A. Jorio, E.H.M. Ferreira, F. Stavale, C.A. Achete, R.B. Capaz, M.V.O. Moutinho, A. Lombardo, T.S. Kulmala, A.C. Ferrari, «Quantifying defects in graphene via raman spectroscopy at different excitation energies», *Nano Letters*, 11(8) (2011) 3190-3196.
- [60] Y. Song, S. Zhu, S. Zhang, Y. Fu, L. Wang, X. Zhao, B. Yang, «Investigation from chemical structure to photoluminescent mechanism: a type of carbon dots from the pyrolysis of citric acid and an amine», *Journal of Materials Chemistry C*, 3(23) (2015) 5976-5984.
- [61] S.N. Naess, A. Elgsaeter, G. Helgesen, K.D. Knudsen, «Carbon nanocones: wall structure and morphology», *Science and Technology of Advanced Materials*, 10(6) (2009) 065002.
- [62] A. Elaissari, «Colloidal nanoparticles in biotechnology», *Colloidal Nanoparticles in Biotechnology*, (2008).
- [63] M. Shamsipur, A. Barati, A.A. Taherpour, M. Jamshidi, «Resolving the multiple emission centers in carbon dots: from fluorophore molecular states to aromatic

- domain states and carbon-core states», *Journal of Physical Chemistry Letters*, 9(15) (2018) 4189-4198.
- [64] C.-Y. Teng, T.-F. Yeh, K.-I. Lin, S.-J. Chen, M. Yoshimura, H. Teng, «Synthesis of graphene oxide dots for excitation-wavelength independent photoluminescence at high quantum yields», *Journal of Materials Chemistry C*, 3(17) (2015) 4553-4562.
- [65] M. Li, S.K. Cushing, X. Zhou, S. Guo, N. Wu, «Fingerprinting photoluminescence of functional groups in graphene oxide», *Journal of Materials Chemistry*, 22(44) (2012) 23374-23379.
- [66] T.-F. Yeh, W.-L. Huang, C.-J. Chung, I.T. Chiang, L.-C. Chen, H.-Y. Chang, W.-C. Su, C. Cheng, S.-J. Chen, H. Teng, «Elucidating quantum confinement in graphene oxide dots based on excitation-wavelength-independent photoluminescence», *Journal of Physical Chemistry Letters*, 7(11) (2016) 2087-2092.
- [67] A. Sharma, T. Gadly, S. Neogy, S.K. Ghosh, M. Kumbhakar, «Molecular origin and self-assembly of fluorescent carbon nanodots in polar solvents», *Journal of Physical Chemistry Letters*, 8(5) (2017) 1044-1052.
- [68] M. Sudolská, M. Dubecký, S. Sarkar, C.J. Reckmeier, R. Zbořil, A.L. Rogach, M. Otyepka, «Nature of absorption bands in oxygen-functionalized graphitic carbon dots», *Journal of Physical Chemistry C*, 119(23) (2015) 13369-13373.
- [69] Z. Liu, X. Sun, N. Nakayama-Ratchford, H. Dai, Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery, *ACS Nano*, 1(1) (2007) 50-56.
- [70] C.Z. Chen, S.L. Cooper, «Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes», *Biomaterials*, 23(16) (2002) 3359-3368.
- [71] S. Szunerits, R. Boukherroub, «Antibacterial activity of graphene-based materials», *Journal of Materials Chemistry B*, 4(43) (2016) 6892-6912.
- [72] S. Maleki Dizaj, A. Mennati, S. Jafari, K. Khezri, K. Adibkia, «Antimicrobial activity of carbon-based nanoparticles», *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(1) (2015) 19-23.
- [73] S. Liu, T.H. Zeng, M. Hofmann, E. Burcombe, J. Wei, R. Jiang, J. Kong, Y. Chen, «Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: membrane and oxidative stress», *ACS Nano*, 5(9) (2011) 6971-6980.
- [74] S. Liu, L. Wei, L. Hao, N. Fang, M.W. Chang, R. Xu, Y. Yang, Y. Chen, «Sharper and faster "nano darts" kill more bacteria: a study of antibacterial activity of individually dispersed pristine single-walled carbon nanotube», *ACS Nano*, 3(12) (2009) 3891-3902.
- [75] S. Kang, M.S. Mauter, M. Elimelech, «Physicochemical determinants of multiwalled carbon nanotube bacterial cytotoxicity», *Environmental Science & Technology*, 42(19) (2008) 7528-7534.
- [76] S. Kang, M. Pinault, L.D. Pfefferle, M. Elimelech, «Single-walled carbon nanotubes exhibit strong antimicrobial activity», *Langmuir*, 23(17) (2007) 8670-8673.
- [77] F. Vögtle, S. Gestermann, R. Hesse, H. Schwierz, B. Windisch, «Functional dendrimers», *Progress in Polymer Science*, 25(7) (2000) 987-1041.
- [78] D.-L. Jiang, T. Aida, «Bioinspired molecular design of functional dendrimers», *Progress in Polymer Science*, 30(3) (2005) 403-422.
- [79] K. Inoue, «Functional dendrimers, hyperbranched and star polymers», *Progress in Polymer Science*, 25(4) (2000) 453-571.
- [80] M. Fischer, F. Vögtle, «Dendrimers: from design to application—a progress report», *Angewandte Chemie International Edition*, 38(7) (1999) 884-905.
- [81] A. Muñoz-Bonilla, M. Fernández-García, «Polymeric materials with antimicrobial activity», *Progress in Polymer Science*, 37(2) (2012) 281-339.

- [82] M.A. Scorciapino, I. Serra, G. Manzo, A.C. Rinaldi, «Antimicrobial dendrimeric peptides: structure, activity and new therapeutic applications», *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3) (2017).
- [83] M. Tulu, A.S. Ertürk, «Dendrimers as antibacterial agents in a search for antibacterial agents», Yıldız Technical University Turkey, 2012.
- [84] A.R. Maity, D. Stepensky, «Limited efficiency of drug delivery to specific intracellular organelles using subcellularly “targeted” drug delivery systems», *Molecular Pharmaceutics*, 13(1) (2016) 1-7.
- [85] A.R. Maity, D. Stepensky, «Delivery of drugs to intracellular organelles using drug delivery systems: analysis of research trends and targeting efficiencies», *International Journal of Pharmaceutics*, 496(2) (2015) 268-274.
- [86] S.A. Durazo, U.B. Kompella, «Functionalized nanosystems for targeted mitochondrial delivery», *Mitochondrion*, 12(2) (2012) 190-201.
- [87] V. Weissig, «From serendipity to mitochondria-targeted nanocarriers», *Pharmaceutical Research*, 28(11) (2011) 2657.
- [88] S. Biswas, V.P. Torchilin, «Nanopreparations for organelle-specific delivery in cancer», *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66 (2014) 26-41.
- [89] C.Z. Chen, S.L. Cooper, «Recent advances in antimicrobial dendrimers», *Advanced Materials*, 12(11) (2000) 843-846.
- [90] E. Ladd, A. Sheikhi, N. Li, T. van de Ven, A. Kakkar, «Design and synthesis of dendrimers with facile surface group functionalization, and an evaluation of their bactericidal efficacy», *Molecules*, 22(6) (2017) 868.
- [91] Y. Lu, D.L. Slomberg, A. Shah, M.H. Schoenfisch, «Nitric oxide-releasing amphiphilic poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers as antibacterial agents», *Biomacromolecules*, 14(10) (2013) 3589-3598.
- [92] Z. Sideratou, D. Tsiourvas, C.M. Paleos, «Quaternized poly(propylene imine) dendrimers as novel pH-sensitive controlled-release systems», *Langmuir*, 16(4) (2000) 1766-1769.
- [93] A. Sapalidis, Z. Sideratou, K.N. Panagiotaki, E. Sakellis, E.P. Kouvelos, S. Papageorgiou, F. Katsaros, «Fabrication of antibacterial poly(vinyl alcohol) nanocomposite films containing dendritic polymer functionalized multi-walled carbon nanotubes», *Frontiers in Materials*, 5(11) (2018).
- [94] X. Cao, Z. Li, X. Song, X. Cui, P. Cao, H. Liu, F. Cheng, Y. Chen, «Core-shell type multiarm star poly(ϵ -caprolactone) with high molecular weight hyperbranched polyethylenimine as core: synthesis, characterization and encapsulation properties», *European Polymer Journal*, 44 (2008) 1060-1070.
- [95] M. Arkas, D. Tsiourvas, «Organic/inorganic hybrid nanospheres based on hyperbranched poly(ethylene imine) encapsulated into silica for the sorption of toxic metal ions and polycyclic aromatic hydrocarbons from water», *Journal of Hazardous Materials*, 170(1) (2009) 35-42.
- [96] E. Pigorsch, «Spectroscopic characterisation of cationic quaternary ammonium starches», *Starch Stärke Journal*, 61(3-4) (2009) 129-138.
- [97] K.A. Wepasnick, B.A. Smith, J.L. Bitter, D.H. Fairbrother, «Chemical and structural characterization of carbon nanotube surfaces», *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(3) (2010) 1003-1014.
- [98] W. Yuan, G. Jiang, J. Che, X. Qi, R. Xu, M.W. Chang, Y. Chen, S.Y. Lim, J. Dai, M.B. Chan-Park, «Deposition of silver nanoparticles on multiwalled carbon nanotubes grafted with hyperbranched poly(amidoamine) and their antimicrobial effects», *Journal of Physical Chemistry C*, 112(48) (2008) 18754-18759.

- [99] E. Murugan, G. Vimala, «Effective functionalization of multiwalled carbon nanotube with amphiphilic poly(propyleneimine) dendrimer carrying silver nanoparticles for better dispersability and antimicrobial activity», *Journal of Colloid and Interface Science*, 357(2) (2011) 354-365.
- [100] J. Yu, N. Grossiord, C.E. Koning, J. Loos, «Controlling the dispersion of multi-wall carbon nanotubes in aqueous surfactant solution», *Carbon*, 45(3) (2007) 618-623.
- [101] Y.K. Moon, J. Lee, J.K. Lee, T.K. Kim, S.H. Kim, «Synthesis of length-controlled aerosol carbon nanotubes and their dispersion stability in aqueous solution», *Langmuir*, 25(3) (2009) 1739-1743.
- [102] I. Schwyzer, R. Kaegi, L. Sigg, B. Nowack, «Colloidal stability of suspended and agglomerate structures of settled carbon nanotubes in different aqueous matrices», *Water Research*, 47(12) (2013) 3910-3920.
- [103] S. Kang, M. Herzberg, D.F. Rodrigues, M. Elimelech, «Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter!», *Langmuir*, 24(13) (2008) 6409-6413.
- [104] D. Liu, Y. Mao, L. Ding, «Carbon nanotubes as antimicrobial agents for water disinfection and pathogen control», *Journal of Water and Health*, 16(2) (2018) 171-180.
- [105] H.Z. Zardini, A. Amiri, M. Shanbedi, M. Maghrebi, M. Baniadam, «Enhanced antibacterial activity of amino acids-functionalized multi walled carbon nanotubes by a simple method», *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 92 (2012) 196-202.
- [106] H.Z. Zardini, M. Davarpanah, M. Shanbedi, A. Amiri, M. Maghrebi, L. Ebrahimi, «Microbial toxicity of ethanolamines—multiwalled carbon nanotubes», *Journal of Biomedical Materials Research*, 102(6) (2014) 1774-1781.
- [107] Y. Baia, S.J. Lee, P.S. Wen, T.S. Bae, M.H. Lee, «Effect of AOT-assisted multi-walled carbon nanotubes on antibacterial activity», *Colloids and Surfaces Biointerfaces*, 89 101– 107 (2012).
- [108] B. Gottenbos, H.C. van der Mei, F. Klatter, P. Nieuwenhuis, H.J. Busscher, «In vitro and in vivo antimicrobial activity of covalently coupled quaternary ammonium silane coatings on silicone rubber», *Biomaterials*, 23(6) (2002) 1417-23.
- [109] M. Tamayo-Belda, M. González-Pleiter, G. Pulido-Reyes, K. Martin-Betancor, F. Leganés, R. Rosal, F. Fernández-Piñas, «Mechanism of the toxic action of cationic G5 and G7 PAMAM dendrimers in the cyanobacterium *anabaena* sp. PCC7120», *Environmental Science: Nano*, 6(3) (2019) 863-878.
- [110] C.Z. Chen, N.C. Beck-Tan, P. Dhurjati, T.K. van Dyk, R.A. LaRossa, S.L. Cooper, «Quaternary ammonium functionalized poly(propylene imine) dendrimers as effective antimicrobials: structure–activity studies», *Biomacromolecules*, 1(3) (2000) 473-480.
- [111] K.A. Gibney, I. Sovadinova, A.I. Lopez, M. Urban, Z. Ridgway, G.A. Caputo, K. Kuroda, «Poly(ethylene imine)s as antimicrobial agents with selective activity», *Macromolecular Bioscience*, 12(9) (2012) 1279-1289.
- [112] K. Andreev, C. Bianchi, J.S. Laursen, L. Citterio, L. Hein-Kristensen, L. Gram, I. Kuzmenko, C.A. Olsen, D. Gidalevitz, «Guanidino groups greatly enhance the action of antimicrobial peptidomimetics against bacterial cytoplasmic membranes», *Biochimica et Biophysica Acta*, 1838(10) (2014) 2492-2502.
- [113] J. Wang, C. Lu, Y. Shi, X. Feng, B. Wu, G. Zhou, G. Quan, X. Pan, J. Cai, C. Wu, «Structural superiority of guanidinium-rich, four-armed copolypeptides: role of multiple peptide–membrane interactions in enhancing bacterial membrane perturbation and permeability», *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(16) (2020) 18363-18374.

- [114] Y. He, S. Ingudam, S. Reed, A. Gehring, T.P. Strobaugh, P. Irwin, «Study on the mechanism of antibacterial action of magnesium oxide nanoparticles against foodborne pathogens», *Journal of Nanobiotechnology*, 14(1) (2016) 54.
- [115] K.N. Παναγιωτάκη, «Μελέτη αντιβακτηριακών ιδιοτήτων νανοσωματιδίων με βάση τροποποιημένα δενδριτικά πολυμερή», Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2016.
- [116] F.F. Reinthaler, J. Posch, G. Feierl, G. Wüst, D. Haas, G. Ruckenbauer, F. Mascher, E. Marth, «Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge», *Water Research*, 37(8) (2003) 1685-1690.
- [117] I. Heredero-Bermejo, J.M. Hernández-Ros, L. Sánchez-García, M. Maly, C. Verdú-Expósito, J. Soliveri, F. Javier de la Mata, J.L. Copa-Patiño, J. Pérez-Serrano, J. Sánchez-Nieves, R. Gómez, «Ammonium and guanidine carbosilane dendrimers and dendrons as microbicides», *European Polymer Journal*, 101 (2018) 159-168.
- [118] J.H. Adawiya, R.M. Mohammed, S.A. Duha, «Influence of functionalization MWCNTs using acid treatment on gram negative and gram positive bacteria», *Iraqi Journal of Applied Physics*, 10(3) (2014) 29-33.
- [119] M. Olivi, E. Zanni, G. De Bellis, C. Talora, M.S. Sarto, C. Palleschi, E. Flahaut, M. Monthieux, S. Rapino, D. Uccelletti, S. Fiorito, «Inhibition of microbial growth by carbon nanotube networks», *Nanoscale*, 5(19) (2013) 9023-9029.
- [120] S.E. Abo-Neima, H.A. Motaweh, E.M. Elsehly, «Antimicrobial activity of functionalised carbon nanotubes against pathogenic microorganisms», *IET Nanobiotechnology*, 14(6) (2020) 457-464.
- [121] B. Zhu, X. Xia, N. Xia, S. Zhang, X. Guo, «Modification of fatty acids in membranes of bacteria: implication for an adaptive mechanism to the toxicity of carbon nanotubes», *Environmental Science & Technology*, 48(7) (2014) 4086-4095.
- [122] M.J. Hajipour, K.M. Fromm, A. Akbar Ashkarran, D. Jimenez de Aberasturi, I.R.d. Larramendi, T. Rojo, V. Serpooshan, W.J. Parak, M. Mahmoudi, «Antibacterial properties of nanoparticles», *Trends in Biotechnology*, 30(10) (2012) 499-511.
- [123] A. Al-Jumaili, S. Alancherry, K. Bazaka, M.V. Jacob, «Review on the antimicrobial properties of carbon nanostructures», *Materials*, 10(9) (2017) 1066.
- [124] S. Baek, S.H. Joo, C. Su, M. Toborek, «Antibacterial effects of graphene- and carbon-nanotube-based nanohybrids on *escherichia coli*: implications for treating multidrug-resistant bacteria», *Journal of Environmental Management*, 247 (2019) 214-223.
- [125] T. Mocan, C.T. Matea, T. Pop, O. Mosteanu, A.D. Buzoianu, S. Suciuc, C. Puia, C. Zdrehus, C. Iancu, L. Mocan, «Carbon nanotubes as anti-bacterial agents», *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(19) (2017) 3467-3479.
- [126] T. Tsoufis, F. Katsaros, Z. Sideratou, B.J. Kooi, M.A. Karakassides, A. Siozios, «Intercalation study of low-molecular-weight hyperbranched polyethyleneimine into graphite oxide», *Chemistry*, 20(26) (2014) 8129-8137.
- [127] T. Tsoufis, F. Katsaros, Z. Sideratou, G. Romanos, O. Ivashenko, P. Rudolf, B.J. Kooi, S. Papageorgiou, M.A. Karakassides, «Tailor-made graphite oxide-DAB poly(propylene imine) dendrimer intercalated hybrids and their potential for efficient CO₂ adsorption», *Chemical Communications*, 50(75) (2014) 10967-10970.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ

ΕΡΓΑΣΙΑ

6.1 Γενικά συμπεράσματα

6.1.1 Τροποποιημένοι νανοσωλήνες άνθρακα με δενδριτικούς διαμεμβρανικούς μεταφορείς ως φορείς φαρμάκων

Στο πρώτο τμήμα της διατριβής δόθηκε έμφαση στην τροποποίηση νανοσωλήνων άνθρακα με δενδριτικούς διαμεμβρανικούς μεταφορείς για εφαρμογές ως φορείς φαρμάκων. Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκαν υβριδικά υλικά με βάση τους οξειδωμένους νεροσωλήνες άνθρακα (oxCNTs) και λειτουργικά δενδριτικά πολυμερή, παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης (PEI) δύο διαφορετικών μέσων μοριακών βαρών 5000 και 25000, των οποίων οι πρωτοταγείς αμινομάδες είχαν υποκατασταθεί ποσοτικά (~100%) με ομάδες γουανιδίνης (GPEI5K και GPEI25K). Οι θετικώς φορτισμένες γουανιδινικές ομάδες των GPEIs αλληλεπιδράσαν με τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες των oxCNTs μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων, αλλά και μέσω δεσμών υδρογόνου, ενώ ο σκελετός της PEI προσροφήθηκε στα πλευρικά τοιχώματα των oxCNTs μέσω δεσμών van der Waals, δίνοντας τα υβριδικά υλικά oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K. Η επιτυχής πρόσδεση των πολυμερών πάνω στους νανοσωλήνες βεβαιώθηκε με χρήση διαφόρων φυσικοχημικών τεχνικών όπως ^1H και ^{13}C NMR, FTIR, Raman, XPS, TGA και XRD. Τα ποσοστά των GPEIs στα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K προσδιορίστηκαν τόσο με φασματοσκοπία ^1H NMR με χρήση εσωτερικού προτύπου όσο και με μετρήσεις στοιχειακής ανάλυσης και βρέθηκε ότι ήταν 22.7 και 27.5% w/w, αντίστοιχα. Επιπλέον, η μορφολογία τους μελετήθηκε με μικροσκοπίες SEM, TEM και AFM, όπου βρέθηκε ότι τα πολυμερή δεσμεύονται επιτυχώς γύρω από τα τοιχώματα των νανοσωλήνων. Η ικανότητα διασποράς των νανοϋλικών σε υδατικά μέσα καθώς και η σταθερότητα των υδατικών τους διασπορών αξιολογήθηκε οπτικά, αλλά και με φασματοσκοπία UV-vis και μετρήσεις ζ-δυναμικού. Η βελτιωμένη ιδιότητα διασποράς των υβριδικών υλικών αποδίδεται στην παρουσία των ομάδων της γουανιδίνης, οι οποίες ενισχύουν την υδροφιλικότητα των νανοσωλήνων, παρέχοντας υψηλή υδατική συμβατότητα, με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η συσσωμάτωση των oxCNTs, λόγω ηλεκτροστατικών αποθήσεων. Κατά συνέπεια, τα παραγόμενα

υβριδικά υλικά (oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K) διασπείρονται ομοιόμορφα σε υδατικά μέσα, δίνοντας υδατικές διασπορές που παραμένουν σταθερές για τουλάχιστον 6 μήνες.

Στη συνέχεια, για την αξιολόγηση και τη μελέτη των υβριδικών νανοϋλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K ως νανοφορείς αντικαρκινικών φαρμάκων δεσμεύτηκε σε αυτά η δοξορουβικίνη (DOX), ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο αντικαρκινικό φάρμακο της ομάδας των ανθρακυκλινών. Το ποσοστό δέσμευσης της DOX ήταν 44 και 52% w/w, ενώ η απόδοση της δέσμευσης ήταν 99.5% και 98.6%, για τα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K, αντίστοιχα. Ακολούθησε μελέτη της αποδέσμευσης της DOX από τα υβριδικά υλικά σε δύο διαφορετικές συνθήκες pH, 7.4 και 5.5, με σκοπό την προσομοίωση των φυσιολογικών συνθηκών και του λυσοσωμικού περιβάλλοντος, αντίστοιχα. Βρέθηκε ότι στο όξινο περιβάλλον η DOX αποδεσμεύεται από τα νανοϋλικά με πιο γρήγορο ρυθμό από ότι στο φυσιολογικό pH, καθώς και ότι η DOX αποδεσμεύεται από το oxCNTs@GPEI25K με σημαντικά ταχύτερο ρυθμό σε σχέση με το oxCNTs@GPEI5K και στα δύο εξεταζόμενα pH. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η αντικαρκινική δράση της δεσμευμένης DOX στα oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K σε δύο ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές του προστάτη, τις DU145 και PC3, οι οποίες είναι γνωστό ότι εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην DOX, καθώς και στη μη καρκινική κυτταρική σειρά HEK293, η οποία έχει ως προέλευση ανθρώπινο εμβρυϊκό νεφρικό ιστό. Μελετήθηκε επίσης, η κυτταρική πρόσληψη της δεσμευμένης DOX καθώς και ο μηχανισμός της αντικαρκινικής δράσης της μέσω του προσδιορισμού του ποσοστού απόπτωσης/νέκρωσης των κυττάρων. Βρέθηκε ότι και τα δύο συστήματα ενισχύουν την αντικαρκινική δράση της DOX σε σύγκριση με την ελεύθερη μορφή της. Συγκεκριμένα, το σύστημα oxCNTs@GPEI5K/DOX εμφανίζει αυξημένη και εκλεκτική τοξικότητα στα καρκινικά κύτταρα σε αντίθεση με τα μη καρκινικά, ενώ αντιθέτως το σύστημα oxCNTs@GPEI25K/DOX εμφανίζει σημαντικά μεγάλη τοξικότητα, ανεξάρτητα από τον τύπο των κυττάρων. Αυτή η διαφοροποιημένη συμπεριφορά αποδόθηκε αφενός στην αυξημένη κυτταρική πρόσληψη του φορέα oxCNTs@GPEI25K, σε σχέση με αυτή του oxCNTs@GPEI5K, παρουσιάζοντας έτσι μεγαλύτερη τοξικότητα, και αφετέρου στο σημαντικά ταχύτερο ρυθμό απελευθέρωσης της DOX από το oxCNTs@GPEI25K, σε σχέση με το oxCNTs@GPEI5K. Τέλος, βρέθηκε ότι και τα δύο συστήματα δρουν μέσω ενός νεκρωτικού, γρήγορου και καταστροφικού θανάτου

από τον οποίο τα καρκινικά κύτταρα δεν μπορούν να ανακάμψουν. Συμπερασματικά, μεταξύ των δύο νανοφορέων, το oxCNTs@GPEI5K είναι πιο αποτελεσματικό σύστημα μεταφοράς της DOX, το οποίο παρουσιάζει σημαντική εκλεκτική τοξικότητα έναντι των καρκινικών κυττάρων, αποτελώντας ένα ελπιδοφόρο σύστημα για περαιτέρω μέλετη στη θεραπεία του καρκίνου.

6.1.2 Τροποποιημένοι νανοδίσκοι άνθρακα με φθορίζουσες νανοτελείες άνθρακα για ταυτόχρονη ανίχνευση και μεταφορά φαρμάκων

Στο δεύτερο τμήμα της διατριβής, πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη ενός νέου υβριδικού υλικού (oxCNDs@FCDs) με βάση τους τροποποιημένους νανοδίσκους άνθρακα, οι οποίοι αντιπροσωπεύουν μια εναλλακτική προσέγγιση του κλασικού γραφενίου, με φθορίζουσες τελείες άνθρακα προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως ένα σύστημα ταυτόχρονης ανίχνευσης και μεταφοράς φαρμάκων (theranostics).

Συγκεκριμένα, οι νανοδίσκοι άνθρακα (oxCNDs) αρχικά οξειδώθηκαν μέσω της γνωστής μεθόδου Staudenmaier, ενώ στη συνέχεια παρασκευάστηκαν φθορίζουσες νανοτελείες άνθρακα (FCDs) μέσω ακτινοβόλησης υδατικού διαλύματος οργανικών ενώσεων (PEI μοριακού βάρους 1300 Da και γλυκερόλη) με μικροκύματα. Ακολούθως, οι πρωτοταγείς ομάδες των FCDs αντέδρασαν με τις λειτουργικές ομάδες των νανοδίσκων σε αλκαλικό περιβάλλον, λαμβάνοντας ένα νέο φθορίζον υβριδικό νανοϋλικό, το oxCNDs@FCDs. Το προκύπτον υλικό χαρακτηρίστηκε φυσικοχημικά με φασματοσκοπίες φθορισμού, ¹H NMR, FTIR και XPS, ενώ η δομή του χαρακτηρίστηκε με XRD και TGA. Η μορφολογία του μελετήθηκε με μικροσκοπίες SEM και TEM. Από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν συμπεραίνεται ότι οι φθορίζουσες νανοτελείες άνθρακα είναι ομοιόμορφα δεσμευμένες σε όλη την επιφάνεια των oxCNDs σε ποσοστό 23% w/w, χωρίς να προκαλέσουν σημαντική μεταβολή της γραφιτικής δομής τους. Επιπλέον, μελετήθηκε η ικανότητά τους να διασπείρονται αποτελεσματικά σε υδατικά μέσα, ενώ με φασματοσκοπία φθορισμού αποδείχθηκε ότι εμφανίζουν ισχυρό μπλε φθορισμό μετά από διέγερση στην περιοχή UV. Ακολούθως το νέο υβριδικό υλικό μελετήθηκε ως προς τη δυνατότητα του να χρησιμοποιηθεί ως αποτελεσματικό σύστημα ταυτόχρονης ανίχνευσης και μεταφοράς φαρμάκων. Αποδείχθηκε ότι η DOX δεσμεύεται επιτυχώς στο oxCNDs@FCDs κυρίως μέσω π-π αλληλεπιδράσεων, σε ποσοστό ~41% w/w. Στη συνέχεια μελετήθηκε η αντικαρκινική δράση της δεσμευμένης DOX στα oxCNDs@FCDs σε

δύο ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές του προστάτη, τις DU145 και PC3, αλλά και στα μη καρκινικά κύτταρα HEK293. Πειράματα κυτταροτοξικότητας έδειξαν ότι τα oxCNDs@FCDs εμφανίζουν χαμηλή τοξικότητα κυρίως έναντι των μη καρκινικών κυττάρων ακόμα και μετά από 72 h επώασης, ενώ αντίθετα η δεσμευμένη DOX στα oxCNDs@FCDs φαίνεται να είναι πιο τοξική, ακόμα και σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις DOX (0.25 μ M), κυρίως έναντι των καρκινικών κυττάρων, σε σχέση με την ελεύθερη DOX. Συνεπώς, η δεσμευμένη DOX στα oxCNDs@FCDs φαίνεται να είναι πιο δραστική σε σχέση με την ελεύθερη DOX και να εμφανίζει εκλεκτικότητα στα καρκινικά κύτταρα. Στη συνέχεια, εκμεταλλευόμενοι το φθορισμό των oxCNDs@FCDs και της DOX, μελετήθηκε η ενδοκυττάρια κατανομή τους σε καρκινικά DU145 κύτταρα με συνεστιακή μικροσκοπία. Βρέθηκε πως η ελεύθερη DOX εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων, όπως ήταν αναμενόμενο, ενώ τα oxCNDs@FCDs εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Από την άλλη πλευρά, η δεσμευμένη DOX στα oxCNDs@FCDs εντοπίζεται τόσο στο πυρήνα των κυττάρων όσο και στο κυτταρόπλασμα, χωρίς υπάρχει σαφής συνεντοπισμός της DOX και των φθορίζουσών νανοτελειών άνθρακα, γεγονός που δηλώνει ότι η DOX αποδεσμεύεται σταδιακά από το φορέα, ο οποίος εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, για να καταλήξει στον πυρήνα του κυττάρου, διατηρώντας, έτσι, τη δραστικότητα της. Επιπλέον, από τα πειράματα κυτταρομετρίας ροής στα DU145 κύτταρα βρέθηκε ότι η DOX εισέρχεται, μετά από 24 h επώασης, πέντε φορές περισσότερο όταν είναι δεσμευμένη στα νανοϋλικά από ότι όταν είναι ελεύθερη, γεγονός που επιβεβαιώνει την αυξημένη δραστικότητα της δεσμευμένης DOX στα oxCNDs@FCDs σε σχέση με αυτή της ελεύθερης μορφής. Τέλος, μελετήθηκε η δράση της δεσμευμένης δοξορουβικίνης στο φορέα μέσω του προσδιορισμού του ποσοστού απόπτωσης/νέκρωσης των κυττάρων. Βρέθηκε ότι το σύστημα oxCNDs@FCDs/DOX μετά από 5 h επώασης προκαλεί υψηλότερα ποσοστά νέκρωσης (80% νέκρωση) από ότι η ελεύθερη DOX (7% απόπτωση και 5% νέκρωση), ενώ μετά από επώαση 24 h προκαλεί 100% νέκρωση ενώ η ελεύθερη DOX προκαλεί 88% νέκρωση. Επιπλέον, παρατηρώντας ότι απουσιάζουν κύτταρα σε πρώιμο αποπτωτικό στάδιο, ενώ τα όψιμα αποπτωτικά κύτταρα είναι ελάχιστα, συμπεραίνεται ότι λαμβάνει χώρα ένας έντονος και ανεξέλεγκτος νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος, ο οποίος αποδίδεται στην ταχύτερη ενδοκύττωση και ενδοκυτταρική αποδέσμευση της DOX από τα oxCNDs@FCDs. Συνεπώς, η δεσμευμένη DOX στο νανοφορέα είναι ικανή να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο μέσω

νέκρωσης, με το σύστημα oxCNDs@FCDS/DOX να είναι πολύ πιο τοξικό στα κύτταρα σε σύγκριση με την ελεύθερη DOX.

Εν κατακλείδι, συμπεραίνεται ότι οι τροποποιημένοι νανοδίσκοι άνθρακα με φθορίζουσες νανοτελείες άνθρακα, οι οποίοι εμφανίζουν χαμηλή τοξικότητα, εκλεκτική μεταφορά της DOX στα καρκινικά κύτταρα και δυνατότητα εντοπισμού στα κύτταρα λόγω της ιδιότητας τους να φθορίζουν, είναι δυνατόν να μελετηθούν περαιτέρω για να χρησιμοποιηθούν ως ένα ασφαλές και αποτελεσματικό σύστημα αντίχενωσης και μεταφοράς φαρμάκων με εκλεκτικότητα στα καρκινικά κύτταρα.

6.1.3 Τροποποιημένοι νανοσωλήνες άνθρακα με παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης, που φέρουν τεταρτοταγείς αμμωνιακές ομάδες ως αντιβακτηριακά υλικά

Στο δεύτερο μέρος της διατριβής αναπτύχθηκαν υβριδικά υλικά, τα οποία μελετήθηκαν ως τις αντιβακτηριακές τους ιδιότητες. Από την βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι νανοϋλικά με βάση νανοδομημένους άνθρακες καθώς και πολυμερή που φέρουν κατάλληλες θετικά φορτισμένες ομάδες, όπως τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα, ομάδες γουανιδίνης, αργινινικές ομάδες, κοκ., εμφανίζουν σημαντικές αντιβακτηριακές ιδιότητες. Ως εκ τούτου, παρασκευάστηκαν οξειδωμένοι νανοσωλήνες άνθρακα με παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης, που φέρουν τεταρτοταγείς αμμωνιακές ομάδες (QPEIs). Συγκεκριμένα, συντέθηκαν παράγωγα της PEI που φέρουν τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα με βαθμούς υποκατάστασης των πρωτοταγών αμινομάδων 30% (30-QPEI), 50% (50-QPEI) και 80% (80-QPEI). Στη συνέχεια, τα oxCNTs τροποποιήθηκαν μη ομοιοπολικά με τα παρασκευασθέντα παράγωγα QPEIs. Συγκεκριμένα, τα θετικώς φορτισμένα παράγωγα της PEI αλληλεπιδρούν με τα αρνητικώς φορτισμένα oxCNTs μέσω ηλεκτροστατικών δεσμών, ενώ ο σκελετός της PEI προσροφάται στα πλευρικά τοιχώματα των oxCNTs μέσω δυνάμεων van der Waals, δίνοντας τα υβριδικά υλικά oxCNTs@30-QPEI , oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI . Η δομή των υβριδικών υλικών καθώς και η επιτυχής πρόσδεση των πολυμερών πάνω στην επιφάνεια των νανοσωλήνων αξιολογήθηκε με FTIR, Raman και TGA, ενώ με μετρήσεις στοιχειακής ανάλυσης υπολογίστηκε ότι το ποσοστό των QPEIs στα oxCNTs@30-QPEI , oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI είναι 16%, 20% και 23% w/w, αντίστοιχα. Επίσης, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους μελετήθηκαν με μικροσκοπίες SEM, TEM και AFM, οι οποίες επιβεβαιώνουν ότι τα πολυμερή

περιβάλλουν τα τοιχώματα των οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ικανότητα να διασπαρθούν σε υδατικά μέσα καθώς και η σταθερότητα των υδατικών τους διασπορών. Βρέθηκε ότι οι υδατικές τους διασπορές παραμένουν σταθερές για τουλάχιστον 18 μήνες, γεγονός που αποδίδεται στην παρουσία των ομάδων των τεταρτοταγών αμμωνιακών αλάτων στην επιφάνεια των οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα, οι οποίες ενισχύουν την υδροφιλικότητα, παρέχοντας υψηλή υδατική συμβατότητα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αποφεύγεται η συσσωμάτωση των oxCNTs, λόγω ηλεκτροστατικών απώσεων. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι η σταθερότητα των υδατικών διασπορών των oxCNTs@QPEIs που επιτεύχθηκε είναι μία από τις υψηλότερες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία και έχει τεράστια σημασία, επειδή η ιδιότητα αυτή είναι καθοριστικός παράγοντας για την τελική χρήση τους σε διάφορες βιομηχανικές εφαρμογές.

Ακολούθησε αντιβακτηριακή μελέτη των oxCNTs@QPEIs σε μετασχηματισμένα gram (-) βακτήρια *Escherichia coli* XL1-blue (*E. coli*) που εκφράζουν την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (RFP). Η ανάπτυξη των *E. coli* παρουσία των νανοϋλικών μελετήθηκε παρακολουθώντας τη μεταβολή της έντασης του φθορισμού της RFP, η οποία εκφράζεται μόνο από τα ζωντανά βακτήρια. Διαπιστώθηκε πως η ένταση φθορισμού των βακτηρίων που είχαν επωαστεί παρουσία των oxCNTs@QPEIs μειώνεται με δόσοεξαρτώμενο τρόπο σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από ότι όταν επωάζονται παρουσία oxCNTs. Υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις των oxCNTs και των oxCNTs@QPEIs που απαιτούνται για να θανατωθεί το 50% του αρχικού πληθυσμού των βακτηρίων (EC_{50}) και βρέθηκε ότι για τα oxCNTs@30-QPEI, oxCNTs@50-QPEI και oxCNTs@80-QPEI οι τιμές είναι 93 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$, αντίστοιχα, ενώ για τα oxCNTs η τιμή είναι μεγαλύτερη από 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Επίσης βρέθηκε ότι η αντιβακτηριακή δράση των oxCNTs@QPEIs αυξάνεται όσο αυξάνεται και ο βαθμός υποκατάστασης της PEI από 30% στα 80%. Ειδικότερα, το oxCNTs@80-QPEI εμφανίζει τη βέλτιστη δράση ($EC_{50}=28 \mu\text{g}/\text{mL}$), η οποία οφείλεται αφενός στην υψηλότερη περιεκτικότητα σε θετικά φορτισμένες ομάδες και αφετέρου στη μεγαλύτερη ικανότητα διασποράς του σε υδατικά μέσα, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα να προκαλούν την ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τα βακτήρια και κατ' επέκταση τη μεγαλύτερη ικανότητα να διαπερνά τα τοιχώματα και τις μεμβράνες αυτών. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν μελέτες κυτταροτοξικότητας στα καρκινικά κύτταρα DU145 και σε 3T3 κύτταρα από ινοβλάστες ποντικών, οι οποίες έδειξαν ότι όλα τα υβριδικά υλικά oxCNTs@QPEIs είναι σημαντικά λιγότερο τοξικά σε σχέση

με τα oxCNTs, ενώ δεν εμφανίζουν σχεδόν καμία τοξικότητα (κυτταρική επιβίωση >80%) σε συγκεντρώσεις ίσες με τις τιμές EC₅₀. Συνεπώς, όλα τα υβριδικά υλικά oxCNTs@QPEIs παρουσίασαν, ταυτόχρονα, χαμηλή κυτταροτοξικότητα και ενισχυμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες και συνεπώς είναι ελπιδοφόρα συστήματα τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές ως ασφαλή, αντιβακτηριακά υλικά.

6.1.4 Τροποποιημένοι νανοσωλήνες άνθρακα με γουανιδιωμένα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης, ως αντιβακτηριακά υλικά

Στην συνέχεια, λαμβάνοντας υπόψη ότι η πολυαιθυλενιμίνη εμφανίζει εκλεκτική αντιβακτηριακή δράση έναντι των gram (+) βακτηρίων σε σχέση με τα gram (-) βακτήρια, αλλά και ότι αμφιφιλικά πεπτίδια πλούσια σε γουανιδινικές ομάδες εμφανίζουν βελτιωμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες σε σχέση με τα αντίστοιχα άμινο παράγωγα τους, μελετήθηκε η αντιβακτηριακή δράση των GPEIs στα gram (+) *S. aureus* βακτήρια και στα gram (-) *E. coli* βακτήρια. Βρέθηκε ότι και τα δύο γουανιδιωμένα παράγωγα είναι πιο τοξικά στο στέλεχος *S. aureus* σε σχέση με το *E. coli*, με το GPEI25K να είναι ελαφρώς πιο τοξικό στα *E. coli* από ότι το GPEI5K, ενώ στα *S. aureus* και τα δύο πολυμερή εμφανίζουν ανάλογη τοξικότητα. Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα αυτά μελετήθηκε στη συνέχεια η αντιβακτηριακή δράση των υβριδικών υλικών oxCNTs@GPEI5K και oxCNTs@GPEI25K στα δύο στελέχη βακτηρίων, *E. coli* και *S. aureus*. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε μελέτη της αναστολής της βακτηριακής ανάπτυξης με τη μέθοδο διασποράς σε στερεό θρεπτικό μέσο, μελέτη της βακτηριοκτόνου δράσης με τη μέθοδο της ρεσαζουρίνης και παρατηρήθηκε η μορφολογία των βακτηρίων παρουσία των νανοϋλικών με SEM. Από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, συμπεραίνεται ότι στα *E. coli* τα oxCNTs εμφανίζουν μόνο βακτηριοστατική δράση αλλά μικρή βακτηριοκτόνο δράση. Αντιθέτως, τα oxCNTs τροποποιημένα με τα GPEIs εμφανίζουν ενισχυμένη βακτηριοκτόνο δράση σε σχέση με τα μη τροποποιημένα oxCNTs, ενώ η βακτηριοστατική τους δράση δεν βελτιώνεται με την εισαγωγή των GPEIs. Συγκρίνοντας τις ιδιότητες των δύο υβριδικών υλικών, παρατηρείται ότι το oxCNTs@GPEI5K είναι πιο δραστικό στα *E. coli* από το oxCNTs@GPEI25K, εφόσον εμφανίζει ανάλογη βακτηριοκτόνο δράση με τα oxCNTs@GPEI25K, αλλά μεγαλύτερη βακτηριοστατική δράση. Από την άλλη πλευρά, τα oxCNTs εμφανίζουν

ικανοποιητική βακτηριοστατική δράση έναντι των *S. aureus* βακτηρίων, η οποία δεν ενισχύεται μετά την τροποποίηση τους με τα GPEIs. Επιπλέον, τα oxCNTs έναντι των *S. aureus* βακτηρίων εμφανίζουν μικρή βακτηριοκτόνο δράση, η οποία ενισχύεται μετά την τροποποίηση τους με τα GPEIs και κυρίως με το GPEI25K. Αυτό αποδίδεται στην αλληλεπίδραση των θετικά φορτισμένων των υβριδικών υλικών με την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη των *E. coli* με αποτέλεσμα να σχηματίσουν συσσωματώματα κυττάρων-CNTs, προκαλώντας μεμβρανικό στρες. Στη συνέχεια, είτε την διαπερνούν και εισέρχονται στο εσωτερικό των βακτηρίων, είτε προκαλούν την ρήξη της με αποτέλεσμα την έκθεση των ενδοκυττάρων οργανιδίων, οδηγώντας τελικά το κύτταρο στο θάνατο. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν μελέτες κυτταροτοξικότητας σε ευκαρυωτικά κύτταρα HEK293, που έδειξαν ότι τα υβριδικά υλικά παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένη τοξικότητα σε σχέση με τα oxCNTs. Συγκεκριμένα το EC₅₀ και των δύο υβριδικών υλικών στα HEK293 κύτταρα είναι <100 µg/mL, ενώ των oxCNTs είναι ~50 µg/mL. Σημειώνεται ότι σε συγκεντρώσεις ίσες με τις EC₅₀ τιμές τους στα βακτήρια (15-25 µg/mL) εμφανίζουν χαμηλή τοξικότητα (κυτταρική επιβίωση >70%).

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι και τα δύο υβριδικά υλικά, με βέλτιστο το oxCNTs@GPEI5K, εμφανίζουν βελτιωμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες ιδιαίτερα έναντι των κατά gram (-) *E. coli* βακτηρίων, γεγονός πολύ σημαντικό, αφού όπως είναι γνωστό τα gram (-) εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε διάφορους αντιβακτηριακούς παράγοντες. Ταυτόχρονα παρουσίασαν χαμηλή κυτταροτοξικότητα σε αυτές τις συγκεντρώσεις και επομένως θεωρούνται ελπιδοφόρα συστήματα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές ως ασφαλή, αντιβακτηριακά υλικά.

6.1.5 Τροποποιημένοι νανοδίσκοι άνθρακα με γουανιδιωμένα παράγωγα της υπερδιακλαδισμένης πολυαιθυλενιμίνης, ως αντιβακτηριακά υλικά

Βασιζόμενοι στα θετικά αποτελέσματα που προέκυψαν από την αντιβακτηριακή μελέτη των oxCNTs@GPEIs αλλά και της διαπίστωσης ότι τα GPEIs παίζουν σημαντικό ρόλο στις αντιβακτηριακές ιδιότητες των υλικών, τροποποιήθηκαν οξειδωμένοι νανοδίσκοι άνθρακα (oxCNDs) με τα γουανιδιωμένα δενδριτικά πολυμερή μοριακού βάρους 5000 Da και 25000 Da (GPEI5K & GPEI25K), προκειμένου να μελετηθεί η αντιβακτηριακή τους δράση. Συγκεκριμένα, οι οξειδωμένοι νανοδίσκοι άνθρακα (oxCNDs), αντέδρασαν με τα γουανιδιωμένα

παράγωγα της PEI σε αλκαλικό περιβάλλον μέσω τόσο ομοιοπολικών όσο και ετεροπολικών δεσμών, δίνοντας τα υβριδικά υλικά oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K. Αναλυτικά, όπως στην περίπτωση των oxCNTs, οι θετικώς φορτισμένες γουανιδινικές ομάδες των GPEI αλληλεπιδράσαν με τις αρνητικώς φορτισμένες ομάδες των oxCNDs μέσω διπλών δεσμών υδρογόνου και ηλεκτροστατικών δυνάμεων, ενώ ο σκελετός της PEI προσροφάται στη γραφιτική επιφάνεια των oxCNDs μέσω δεσμών van der Waals. Παράλληλα, οι γουανιδινικές ομάδες των GPEIs συνδέονται μέσω ομοιοπολικού δεσμού με τις εποξειδικές ομάδες των oxCNDs. Τα παρασκευασθέντα υβριδικά νανοϋλικά, oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K, χαρακτηρίστηκαν φυσικοχημικά με φασματοσκοπίες FTIR και XPS και πιστοποιήθηκε η επιτυχής πρόσδεση των πολυμερών πάνω στους οξειδωμένους νανοδίσκους, ενώ η δομή τους μελετήθηκε με φασματοσκοπία Raman, περίθλαση ακτίνων-X και TGA. Το ποσοστό των πολυμερών στα υβριδικά υλικά υπολογίστηκε με φασματοσκοπία ^1H NMR χρησιμοποιώντας εσωτερικό πρότυπο και βρέθηκε ότι είναι 8.4% και 10.5% για τα oxCNDs@GPEI5K και oxCNDs@GPEI25K, αντίστοιχα. Επιπλέον, η μορφολογία τους μελετήθηκε με μικροσκοπίες SEM και TEM που έδειξαν ότι οι νανοδίσκοι διατηρούν τη δισκοειδή μορφή τους μετά την τροποποίηση τους, αλλά εμφανίζουν περισσότερες πτυχώσεις στην επιφάνειά τους. Αυτό αποδίδεται στην επιτυχή σύνδεση των GPEIs με τους δίσκους κατά την οποία λαμβάνει χώρα μερική αποφυλλοποίηση τους. Επιπλέον, η παρουσία των GPEIs πάνω στους νανοδίσκους επιβεβαιώνεται συνδυάζοντας εικόνες TEM υψηλής ανάλυσης και σκοτεινού πεδίου συνοδευόμενες από τις εικόνες χαρτογράφησης κατανομής των στοιχείων άνθρακα, οξυγόνου και αζώτου των αντίστοιχων περιοχών και συμπεραίνεται ότι τα GPEIs είναι ομοιόμορφα δεσμευμένα σε όλη την επιφάνεια των oxCNDs.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε η αντιβακτηριακή μελέτη των νανοϋλικών στα gram (-) βακτήρια *E. coli* και στα gram (+) βακτήρια *S. aureus*. Πραγματοποιήθηκε μελέτη της αναστολής της βακτηριακής ανάπτυξης με τη μέθοδο διασποράς σε στερεό θρεπτικό μέσο, μελέτη της βακτηριοκτόνου δράσης με τη μέθοδο της ρεσαζουρίνης και παρατηρήθηκε η μορφολογία των βακτηρίων παρουσία των νανοϋλικών με SEM. Από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, συμπεραίνεται ότι στα *E. coli* τα oxCNDs εμφανίζουν μόνο βακτηριοστατική δράση, ενώ δεν εμφανίζουν καμία βακτηριοκτόνο δράση. Αντιθέτως, τα τροποποιημένα oxCNDs με τα GPEIs εμφανίζουν ενισχυμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες που οφείλονται τόσο στη βακτηριοστατική όσο και στη

βακτηριοκτόνο δράση τους. Συγκρίνοντας τις ιδιότητες των δύο υβριδικών υλικών, προκύπτει ότι το oxCNDs@GPEI5K είναι πιο δραστικό στα *E. coli* από το oxCNDs@GPEI25K, εφόσον εμφανίζει ανάλογη βακτηριοστατική δράση αλλά μεγαλύτερη βακτηριοκτόνο δράση. Από την άλλη πλευρά, τα oxCNDs εμφανίζουν ικανοποιητική βακτηριοστατική δράση έναντι των *S. aureus* βακτηρίων, η οποία ενισχύεται μετά την τροποποίηση τους με τα GPEIs, ενώ δεν εμφανίζει ιδιαίτερη βακτηριοκτόνο δράση, η οποία ενισχύεται ελαφρώς μόνο μετά την τροποποίηση με το GPEI5K. Από τις εικόνες SEM βακτηρίων *E. coli*, συμπεραίνεται ότι η παρουσία των υβριδικών νανοϋλικών προκαλεί αποδόμηση της κυτταρικής μεμβράνης και έκθεση των ενδοκυττάρων οργανιδίων λόγω λύσης των βακτηρίων. Αναλυτικότερα, τα βακτήρια εναποτίθενται πάνω στα θετικά φορτισμένα υβριδικά υλικά, τα οποία αλληλεπιδρούν ισχυρά μέσω ηλεκτροστατικών ή/και δυνάμεων van der Waals και δεσμών υδρογόνου με την αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα να προκαλούν μεμβρανικό στρες. Στη συνέχεια, είτε την διαπερνούν είτε της προκαλούν ρήξη με αποτέλεσμα την έκθεση των ενδοκυττάρων οργανιδίων, οδηγώντας τελικά το κύτταρο στο θάνατο.

Συμπερασματικά καταλήγουμε ότι και τα δύο υβριδικά υλικά, με βέλτιστο το oxCNDs@GPEI5K, εμφανίζουν βελτιωμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες ιδιαίτερα έναντι των κατά gram (-) *E. coli* βακτηρίων, τα οποία, όπως ήδη αναφέρθηκε, εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε διάφορους αντιβακτηριακούς παράγοντες. Επιπλέον, η μελέτη τοξικότητας των υβριδικών υλικών σε ευκαρυωτικά κύτταρα HEK293 σε συγκεντρώσεις ίσες με τις τιμές EC₅₀ (35-150 μg/mL) έδειξε ότι δεν εμφανίζουν καμία κυτταροτοξικότητα (κυτταρική επιβίωση >80%). Συνεπώς, και τα δύο oxCNDs@GPEIs είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές ως ασφαλή, αντιβακτηριακά υλικά εφόσον παρουσιάζουν ταυτόχρονα χαμηλή κυτταροτοξικότητα και ενισχυμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες.

6.2 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής, προτείνεται τα υβριδικά υλικά oxCNTs@GPEI5K και oxCNDs@FCDs θα πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω ώστε να διαπιστωθεί που οφείλεται η νέκρωση και η απόπτωση που προκαλούν τόσο οι φορείς όσο και οι φορείς με την δοξορουβικίνη. Συγκεκριμένα, να μελετηθεί ο ενδοκυττάριος εντοπισμός των υλικών με και χωρίς την δοξορουβικίνη

στα μιτοχόνδρια και στα λυσοσώματα των κυττάρων. Επιπλέον, για τα υλικά αυτά προτείνεται να μελετηθούν περαιτέρω ως φορείς και άλλων αντικαρκινικών φαρμάκων, όπως η μεθοτρεξάτη, η ταξόλη κ.α., προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα τους να μεταφέρουν και άλλα κυτταροστατικά εκλεκτικά στα καρκινικά κύτταρα. Τέλος, προτείνεται η μελέτη να στραφεί σε *in vivo* πειράματα για να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα τους προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε κλινική εφαρμογή για την αντιμετώπιση του καρκίνου.

Από την άλλη πλευρά, τα παρασκευασθέντα υβριδικά υλικά με βάση τους νανοσωλήνες άνθρακα ή τους νανοδίσκους άνθρακα που εμφάνισαν ενισχυμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες προτείνεται να μελετηθούν ως νανοπληρωτικά υλικά (nanofillers) για την ανάπτυξη καινοτόμων νανοσύνθετων πολυμερικών υλικών, τα οποία, όπως είναι γνωστό, χρησιμοποιούνται ευρέως σε πληθώρα εφαρμογών, από υλικά συσκευασίας σε μεμβράνες καθαρισμού νερού, αλλά και σε βιοϊατρικές εφαρμογές.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

Δημοσιεύσεις σε Διεθνή Επιστημονικά Περιοδικά με Κριτές

Στα πλαίσια της εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκαν οι εξής δημοσιεύσεις:

1. **K.M. Lyra**, A. Kaminari, K.N. Panagiotaki, K. Spyrou, S. Papageorgiou, E. Sakellis, F.K. Katsaros and Z. Sideratou, «Multi-Walled Carbon Nanotubes Decorated with Guanidinylated Dendritic Molecular Transporters: An Efficient Platform for the Selective Anticancer Activity of Doxorubicin», *Pharmaceutics*, 2021, 13 (6), pp 858. **doi: 10.3390/pharmaceutics13060858**
2. N. S. Heliopoulos, G. Kythreoti, **K.M. Lyra**, K.N. Panagiotaki, A. Papavasiliou, E. Sakellis, S. Papageorgiou, A. Kouloumpis, D. Gournis, F.K. Katsaros, K. Stamatakis and Z. Sideratou, «Cytotoxicity Effect of Water-Soluble Multi-Walled Carbon Nanotubes Decorated with Quaternized Hyperbranched Poly(ethyleneimine) Derivatives on Autotrophic and Heterotrophic Gram⁻ Negative Bacteria», *Pharmaceutics*, 2020, 13 (10), pp 293. **doi:10.3390/ph13100293**

Άλλες δημοσιεύσεις:

1. «Enzymatic Conversion of Oleuropein to Hydroxytyrosol Using Immobilized β -Glucosidase on Porous Carbon Cuboids», *Nanomaterials*, 2019, 9, pp 1166. **doi:10.3390/nano9081166**
2. «Antibacterial and Algicidal Effects of Porous Carbon Cuboid Nanoparticles», *ACS Omega ACS Omega*, 2019, 4 (3), pp 4991–5001. **doi: 10.1021/acsomega.8b02018**
3. «Polymorphism with Conformational Isomerism and Incomplete Crystallization in Solid Ethanolamine», *ACS Publication*, 2019, 19 (11), pp 6360-6369. **doi.org/10.1021/acs.cgd.9b00836**
4. «Hybrid Nanomaterials of Magnetic Iron Nanoparticles and Graphene Oxide as Matrices for the Immobilization of β -Glucosidase: Synthesis, Characterization and Biocatalytic Properties», *Frontiers in Materials*, 2018, 5 (25). **doi: 10.3389/fmats.2018.00025**

Ανακοινώσεις σε Συνέδρια με Κριτές

1. Συμμετοχή με παρουσίαση (poster), 12^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Χημικής Μηχανικής, 29-30 Μαΐου 2019, Αθήνα. «Highly Efficient Traceable Drug Delivery System Based on Carbon Nanodisks Decorated with Fluorescent Carbon Dots for Cancer Therapy»
2. Συμμετοχή με παρουσίαση (poster), 11^ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοϋλικών, 23-25 Νοεμβρίου 2018, Αθήνα. «Hybrid nanomaterials based on carbon nanotubes and functional dendritic polymers as drug delivery systems»
3. Συμμετοχή με παρουσίαση (poster), 12^ο Διεθνές Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Πολυμερών, 30 Σεπτέμβρη - 3 Οκτώβρη 2018, Ιωάννινα. «Multiwall Nanotubes Decorated with Guanidinylated Hyperbranched Polyethylenimine as Effective Drug Delivery Systems»
4. Συμμετοχή με παρουσίαση (poster), XXXIII Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικής Στερεάς Κατάστασης και Επιστήμης Υλικών, 17-19 Σεπτέμβρη 2018, Λευκωσία. «Carbon Nanodisks Decorated with Fluorescent Carbon Dots as Traceable Drug Delivery System»

Βραβεία

- Βραβείο καλύτερης αναρτημένης εργασίας «Highly efficient traceable drug delivery system based on carbon nanodisks decorated with fluorescent carbon dots for cancer therapy» στην Θεματική Περιοχή «Υλικά-Νανοτεχνολογία» του 12^{ου} Πανελλήνιου Επιστημονικού Συνεδρίου Χημικής Μηχανικής, Ίδρυμα Ευγενίδου, 29-31 Μαΐου 2019
- Βραβείο καλύτερης αναρτημένης «Υβριδικά νανοϋλικά με βάση νανοσωλήνες άνθρακα και λειτουργικά δένδριτικά πολυμερή ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων» παρουσίασης στο 11^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοϋλικών, 23-24 Νοεμβρίου 2018