

## POLIMEROSOMAS DE POLI(BUTADIENO)–BLOQUE–POLI(ÓXIDO DE ETILENO) CARGADOS CON NANOPARTÍCULAS DE ORO

**Emilio Castro, Pablo Taboada, Víctor Mosquera**

Grupo de Física de Coloides y Polímeros. Departamento de Física de la Materia Condensada. Facultad de Física. Universidad de Santiago de Compostela. 15782. Santiago de Compostela. España. Correo electrónico: [emilio.castro@usc.es](mailto:emilio.castro@usc.es)

*Recibido: Diciembre 2011; Marzo de 2012*

### RESUMEN

Los polimerosomas se presentan como candidatos útiles en la nanomedicina, debido a su tamaño subcelular y su capacidad de cargar moléculas diagnósticas y terapéuticas. Informamos sobre la incorporación selectiva de nanopartículas de oro dentro de la membrana de polimerosomas, según caracterizado por las investigaciones de Microscopía Electrónica de Transmisión y Dispersión de Luz Dinámica. Los polimerosomas, con un diámetro de 147 nm, fueron fabricados a partir de copolímero de dibloque de polibutadieno–*bloque*–poli(óxido de etileno) empleando un proceso de doble emulsión. Los resultados demuestran que la inclusión mecánica durante la evaporación del disolvente orgánico y la interacción hidrófoba entre el 1–mercapto–(trietilenglicol)metiléter de las nanopartículas de oro y el bloque de poli(óxido de etileno) del copolímero es suficiente para guiar la posición de las nanopartículas (con un tamaño promedio de 4,2 nm) dentro de la bicapa del polimerosoma (de espesor 18 nm). El proceso de incorporación de las nanopartículas en el polimerosoma es relevante y permite obtener un control preciso sobre estas nuevas nanoestructuras de nanopartículas integradas en polimerosomas, las cuales tienen una aplicación potencial en el suministro de medicamentos, junto con capacidades de formación de imágenes.

**Palabras clave:** Oro, nanopartícula, vesícula, copolímero dibloque, polimerosoma

### ABSTRACT

Polymersomes are presented as useful candidates in nanomedicine because of their subcellular size and ability to load diagnostic and therapeutic molecules. We report the selective incorporation of gold nanoparticles into the membrane of polymersomes as characterized by Transmission Electron Microscopy and Dynamic Light Scattering investigations. Polymersomes of 147 nm in diameter were fabricated from the diblock copolymer polybutadiene–*block*–poly(ethylene oxide) using a double emulsion process. Results show that the mechanical entrapment during the evaporation of the organic solvent and the hydrophobic interaction between the 1–Mercapto–(triethylene glycol) methyl ether of the gold nanoparticles and the poly(ethylene oxide) block of the copolymer is enough to guide the location of the nanoparticles (average size 4.2 nm) inside the bilayer (18 nm thickness) of the polymersome. The process of the incorporation of the nanoparticles into the polymersome is relevant and allows a fine control over these new polymersome–embedded nanoparticle nanostructures that has potential application in drug delivery coupled with imaging capabilities.

**Keywords:** gold, nanoparticle, vesicle, diblock copolymer, polymersome

## 1. INTRODUCCIÓN

Uno de los campos de investigación más activos en el ámbito de la materia condensada se refiere al ensamblaje de complejos y sistemas funcionales. Las observaciones del autoensamblaje de materia blanda han mostrado que los copolímeros de bloque tienen propiedades interesantes. La combinación de un bloque hidrófilo con un segundo bloque hidrófobo les confiere propiedades interesantes y útiles, tales como actividad superficial y agregación en disolución diluida, así como gelificación en disoluciones concentradas. La variación de los parámetros característicos del copolímero, tales como la longitud o la arquitectura de los bloques, permite un control preciso de

las propiedades; pudiéndose controlar la formación de micelas esféricas o cilíndricas [1]. Observaciones recientes en el autoensamblaje de materia blanda han demostrado que la formación de vesículas puede ocurrir en muchos sistemas. Las vesículas son estructuras esféricas que comprenden una bicapa de moléculas anfifílicas, que pueden ser copolímeros de bloque [2]. Dependiendo de los parámetros del copolímero tales como la fracción de volumen de cada bloque, o la energía de interacción entre los monómeros en los bloques, la membrana de la bicapa puede cerrarse espontáneamente en una vesícula, en lugar de formar una estructura laminar plana [3]. Los primeros trabajos sobre vesículas de copolímeros de bloque fueron publicados por *Zhang* y colaboradores [4,5]. Ellos observaron vesículas entre otras morfologías estables diferentes en agregados de copolímeros de poliestireno–*bloque*–poli(ácido acrílico) altamente asimétricos. *Disher* y colaboradores [6] acuñaron la notación de polimerosomas (vesículas basadas en polímeros) cuando estudiaron el copolímero de poli(óxido de etileno)–*bloque*–polietilileno (PEO<sub>40</sub>–*b*–PEE<sub>37</sub>).

La mayoría de los métodos tradicionales para la formación de polimerosomas implican el uso de disolventes orgánicos tales como el tetrahidrofurano, la N, N'-dimetilformamida o el dioxano que requieren extensos procesos de purificación, los cuales pueden resultar muy consumidores de tiempo y problemáticos cuando el objetivo son las aplicaciones biomédicas [7]. Otro enfoque para la formación de polimerosomas, empleado en el presente trabajo, consiste en usar el así llamado método de doble emulsión [7,8]. En dicho método, la concentración de polímero en la fase orgánica es una variable clave: si la misma es menor que la cantidad requerida para revestir completamente las interfases oleosas de la emulsión, los polimerosomas no serán estables. En la práctica, es conveniente trabajar con un exceso de concentración; de hecho, esta concentración puede ser utilizada para ajustar el espesor y la estructura de las paredes del polimerosoma a través de la formación de interfases de copolímero de capas múltiples [7].

Por otra parte, las partículas metálicas ultra finas han recibido gran atención recientemente, debido a sus características ópticas y optoelectrónicas especiales. Más concretamente, se pueden usar nanopartículas de oro (Au NPs) como agente marcador en histoquímica y citoquímica, o como catalizadores para la formación de hidrógeno o en procesos de oxidación. Las nanopartículas, con un diámetro situado en el rango de tamaños entre 1 y 100 nm, tienen una mayor energía superficial que el material masivo equivalente. Por lo tanto, las nanopartículas tienen propiedades físico-químicas únicas en comparación con su material masivo, prometiendo una amplia gama de nuevas aplicaciones en el campo de la nanotecnología que se encuentra en un proceso de rápido desarrollo.

La inclusión de nanopartículas metálicas dentro de cápsulas artificiales de forma, tamaño y morfología definida, es un tema importante en la ciencia médica, la nanotecnología y la industria, ofreciendo una extensa gama de aplicaciones en catálisis, suministro de medicamentos y tecnología

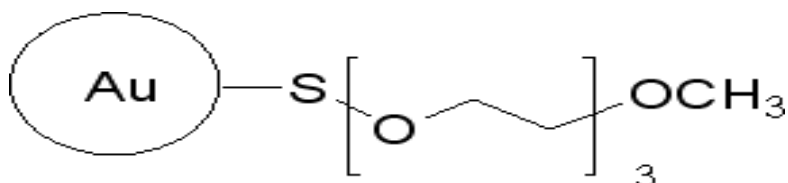
de sensores. Las propiedades ópticas de los nanocompuestos, por ejemplo, es muy sensible a la ubicación específica de las nanopartículas dentro de la matriz y la separación en microfases de los copolímeros de bloque, puede utilizarse con grandes ventajas [9,10]. Entre muchos tipos de cápsulas, las membranas artificiales tales como aquellas derivadas de liposomas o polimerosomas son sistemas modelo bien definidos para proporcionar propiedades hidrófilas en su interior hueco, así como propiedades hidrófobas dentro de su membrana, haciendo posible así que se pueda guiar la ubicación de las nanopartículas hacia dentro de sus respectivos compartimientos a través de procesos de autoensamblaje, principalmente por vía de interacciones interfaciales. Mientras que las vesículas lípidas se construyen a partir de pequeñas moléculas lípidas, la membrana de los polimerosomas consiste de copolímeros di- y tribloque, en donde las dimensiones y las propiedades químicas de la membrana pueden ser ajustadas dentro de un rango mucho más amplio que en el caso de las membranas lípidas [11]. Los polimerosomas son de interés debido a su capacidad de carga y liberación de ingredientes activos. Ellos ofrecen una estabilidad mayor y una menor permeabilidad en comparación con las vesículas lípidas; y la versatilidad de la química polimérica sintética proporciona la capacidad de ajustar propiedades tales como el espesor de la membrana, la funcionalidad superficial y la cinética de degradación [12]. Los estudios sobre la manera de guiar la ubicación de las nanopartículas hacia dentro de las membranas vesiculares han mostrado dos enfoques diferentes [13,14]: (a) la formación *in situ* de nanopartículas dentro de un compartimiento específico de la vesícula, bien sea dentro del interior hidrófilo de la vesícula o directamente dentro de su membrana, y (b) la incorporación de nanopartículas durante la formación de la estructura vesicular. Este último enfoque es más compatible con los argumentos de termodinámica de equilibrio y no presenta las restricciones de los medios químicos *in situ* para la síntesis de nanopartículas. Debido a su relevancia tecnológica para los materiales de ingeniería de alto rendimiento y su aplicabilidad a una variedad mucho mayor de nanopartículas importantes (magnéticas, puntos cuánticos, etc.), nos concentraremos en dicho segundo enfoque. El proceso de coensamblaje auto-organizado implica la interacción entre el tamaño y forma de las nanopartículas en relación al tamaño y forma de los dominios hospedantes, la configuración de la cadena copolimérica, la funcionalización de las nanopartículas, así como las interacciones nanopartícula-nanopartícula, al igual que las interacciones nanopartícula-copolímero [14].

En el presente trabajo hemos utilizado puntos cuánticos metálicos inertes basados en nanopartículas de oro funcionalizadas con 1-mercapto-(trietilenglicol)-metiléter. La naturaleza metálica de las nanopartículas de oro ofrece suficiente contraste para la formación de imágenes mediante microscopía electrónica [15,16]. El uso de Au NPs en lugar de fluoróforos circunvala las desventajas del fotoblanqueo y la intermitencia. Informamos aquí sobre las estructuras formadas por

un copolímero dibloque de poli(butadieno)–*bloque*–poli(óxido de etileno), PB<sub>172</sub>–*b*–PEO<sub>208</sub>, y Au NPs funcionalizadas en disolución acuosa. Entre las estructuras híbridas, se encuentran vesículas huecas esféricas [17–23]. Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se han encapsulado nanopartículas de oro de 5 nm dentro del polimerosomas formados por doble emulsión con un copolímero dibloque.

## 2. SECCIÓN EXPERIMENTAL

El copolímero dibloque polibutadieno–*bloque*–poli(óxido de etileno) (PB<sub>172</sub>–*b*–PEO<sub>208</sub>) [ $M_n = 10.500$  g/mol y  $M_w/M_n = 1,05$ ] fue comprado a *Polymer Source (Dorval, Quebec, Canadá)*. Una disolución en etanol al 2% p/v de nanopartículas de oro funcionalizadas con 1–mercapto–(trietilenglicol)–metiléter fue obtenida de *Sigma Aldrich* (Esquema 1). Las imágenes de TEM de las nanopartículas de Au funcionalizadas con 1–mercapto–(trietilenglicol)–metiléter mostraron un diámetro promedio de las partículas de  $4,2 \pm 2,2$  nm en etanol. Todas las disoluciones fueron preparadas con agua doblemente destilada y desionizada, etanol de grado analítico y cloroformo.



Esquema 1. Nanopartículas de oro funcionalizadas con 1–mercapto–(trietilenglicol)–metiléter

Los experimentos de dispersión de luz dinámica (DLS) se realizaron usando un goniómetro ALV con un láser de He–Ne polarizado linealmente (632,8 nm) de 22 mW y un correlador digital múltiple ALV– 5000/EPP con un tiempo de muestreo inicial de 125 ns. Todas las mediciones se llevaron a cabo a una temperatura constante de 25 °C. Los datos fueron adquiridos mediante un software de control de ALV y el tiempo de conteo fue fijado para cada muestra en 300 s. Las distribuciones de tiempo de relajación,  $A(\tau)$ , fueron obtenidas usando el análisis *Cumulant* para la función de autocorrelación,  $C(q, t)$ . El radio hidrodinámico fue derivado de la relación de *Stokes–Einstein* [3]:

$$r_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_{ap}} \quad (1)$$

donde  $k_B$  es la constante de *Boltzmann*,  $T$  es la temperatura absoluta,  $\eta$  es la viscosidad de la disolución, y  $D_{ap}$  es el coeficiente de difusión aparente.

Los experimentos de SANS fueron realizados en el laboratorio *Leon Brillouin* (reactor *Orphée, Saclay*) en el espectrómetro PACE. La muestra, una disolución de PEO<sub>172</sub>-*b*-PB<sub>208</sub> a 10 mg/ml en D<sub>2</sub>O, fue introducida en una cubeta de cuarzo rectangular con espesor de 5 mm. El blanco utilizado fue D<sub>2</sub>O puro. El tratamiento de los datos se realizó con el software *Pasidur* (LLB).

El espectrofotómetro *SPECTRAmax M2e* utilizado es de *Molecular Devices GmbH* (*Múnich, Alemania*). Los monocromadores duales permitieron escaneos de longitud de onda entre 200–1.000 nm. Todas las mediciones se hicieron a temperatura ambiente (25 °C).

Una gota de disolución (volumen de  $\approx 20 \mu\text{L}$ ) a razón de 0,1 mg/ml de la disolución acuosa de copolímero de dibloque fue depositada sobre una rejilla de cobre de malla 200 revestida con película *Formvar*. Se dejó que el disolvente se evaporara, a temperatura ambiente y presión atmosférica. Finalmente, las muestras fueron teñidas con una disolución acuosa de ácido fosfotúngstico (1% en peso). Las observaciones mediante TEM fueron hechas con un microscopio *Hitachi H-7650* trabajando a 100 kV.

Para la formación de las vesículas de copolímero dibloque anfifílico empleamos una técnica que usa emulsiones dobles monodispersas con una estructura de núcleo–corteza como plantillas. En el primer paso, se utilizó un dispositivo de microfluidica para generar una doble emulsión de agua en aceite en agua con una fase de aceite volátil (cloroformo) que contiene tanto el copolímero dibloque como también las nanopartículas de oro hidrófobas [24]. Debido al parecido de las estructuras de núcleo–corteza con las vesiculares, las técnicas basadas en plantillas de doble emulsión deben ser robustas y directas. La disolución de copolímero anfifílico forma la corteza de las dobles emulsiones de agua en aceite en agua (W/O/W). Estas gotas de doble emulsión W/O/W estabilizadas por copolímero fueron usadas como compartimientos similares a vesículas para la encapsulación de las nanopartículas de oro. En el segundo paso, la formación de los polimerosomas se obtuvo mediante la remoción de la fase de disolvente en aceite a través de evaporación con ultrasonidos a 20 kHz. A medida que se evapora el cloroformo, ocurre una distribución de la fase de aceite sobre la superficie de la fase acuosa continua. La gota interior acuosa restante de la gota de doble emulsión produce la vesícula. El mecanismo de dispersión resulta en una formación extremadamente rápida de la vesícula [25]. Las fuerzas de depleción generadas por el exceso de moléculas de copolímero en el disolvente orgánico durante la evaporación inducen un fenómeno de deshumectación [26].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La dispersión de neutrones a bajo ángulo (SANS) ha demostrado la formación de vesículas a través del método de doble emulsión y nos permite determinar el espesor de la bicapa que forma la

membrana del polimerosoma. La curva de SANS medida, representada en la Figura 1, tiene una pendiente característica  $q^{-2}$  a valores de  $q$  bajos, indica por la línea recta en el gráfico, lo cual es típico para nanoestructuras en forma de bicapa.

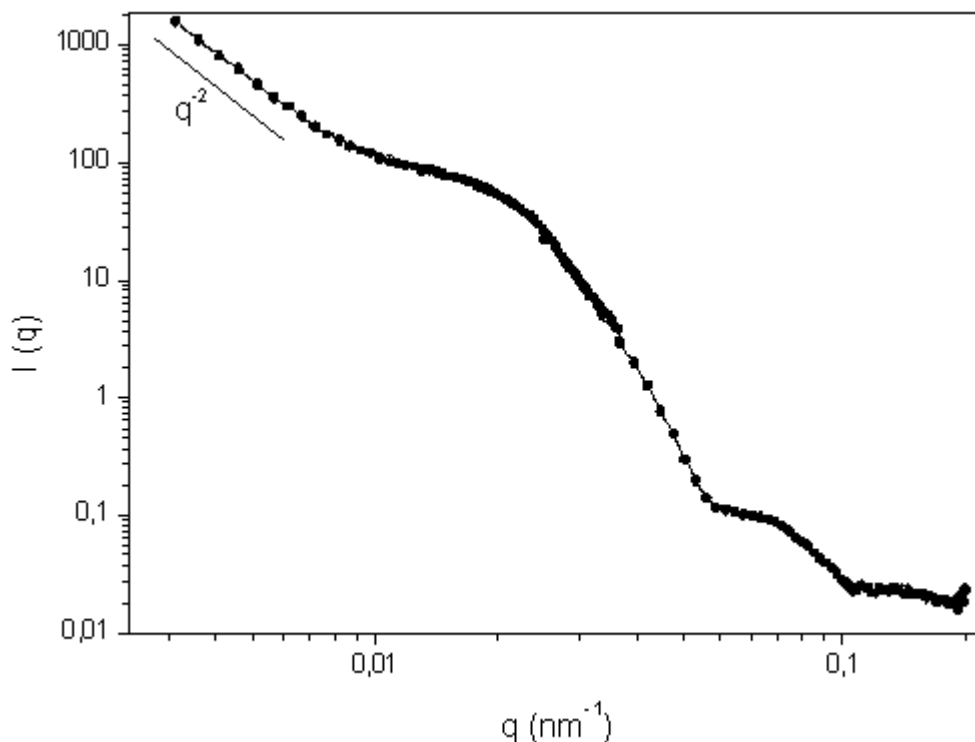


Figura 1. Factor de forma obtenido por SANS para las vesículas PB-*b*-PEO preparadas mediante el método de la doble emulsión (el copolímero fue disuelto en D<sub>2</sub>O a una concentración de 10 mg/ml).

Las imágenes de TEM muestran más detalles estructurales de las vesículas de PB-*b*-PEO (Figura 2). Observamos que el espesor medio de bicapa concuerda bien con los valores obtenidos en los experimentos de SANS.

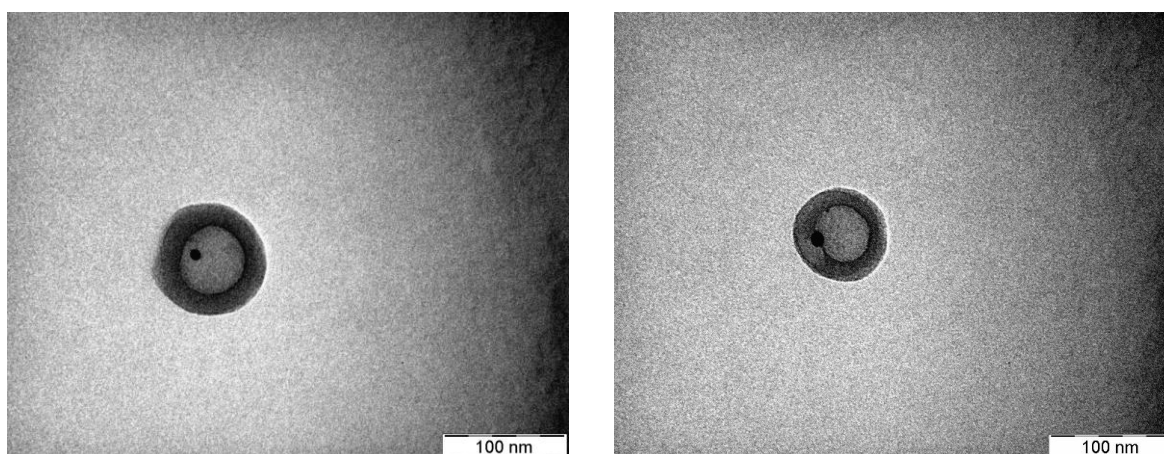


Figura 2. Imágenes de TEM de la encapsulación de nanopartículas de oro dentro de polimerosomas de PB-*b*-PEO (concentración de 10 mg/ml) hechos por el método de la doble emulsión.

Discher y Eisenberg [2] propusieron una ley empírica general en la que se establece que los copolímeros del bloque que poseen una fracción en peso hidrófila mayor que un 50%, probablemente formarán micelas esféricas, mientras que aquellos con menos de un 25% se autoensamblan en micelas inversas. A su vez, predicen que los copolímeros del bloque con una fracción en peso hidrófila situada entre 25–50% formarán polimerosomas. De acuerdo con esto, nuestro copolímero dibloque, con una fracción en peso del 48% de PEO, se autoensamblará preferentemente en forma de vesículas, con una estructura de bicapa.

Los resultados para los radios hidrodinámicos,  $r_h$ , y el índice de polidispersidad, *I.P.*, obtenidos mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) se recogen en la Tabla 1. Usando un método de doble emulsión, la dispersión de neutrones a bajo ángulo confirma la formación de vesículas con un espesor de membrana ( $\delta$ ) de 18 nm y con un radio de 147 nm. Tamaños similares a estos han sido descritos previamente para polimerosomas de copolímeros de dibloque de PB-*b*-PEO con diferentes masas molares. Li y colaboradores [26], utilizando copolímeros de PB<sub>33</sub>-*b*-PEO<sub>21</sub> y PB<sub>46</sub>-*b*-PEO<sub>30</sub> en agua y aplicándoles un tratamiento térmico a 60°C durante 5 horas, obtuvieron tamaños de vesícula de  $189 \pm 18$  nm y  $193 \pm 13$  nm, respectivamente. Cheng y Tsourkas [17], con PEO (1300)-*b*-PB (2500) en agua y empleando el método de rehidratación de películas delgadas a 65°C durante 2 horas, obtuvieron polimerosomas de  $125 \pm 3$  nm. Binder y colaboradores [13], con polibutadieno-*bloque*-poli(óxido de etileno) a 60°C y durante 18 horas, obtuvieron polimerosomas en el intervalo de 100–200 nm, mientras que Ghoroghchian y colaboradores [18], con PEO<sub>30</sub>-*b*-PB<sub>46</sub> y usando la técnica de disolución directa en agua a 25°C, obtuvieron polimerosomas con diámetros tan pequeños como 50 nm.

Tabla 1. Concentración de copolímero, *c*, radios hidrodinámicos,  $r_h$ , índice de polidispersidad, *P.I.*, de los polimerosomas del copolímero dibloque PB-*b*-PEO en presencia de 0,02 mg/ml de nanopartículas de oro.

<b>c mg/mL</b>	<b>Sonicado</b>	<b>P.I.</b>	<b><math>r_h</math> (nm)</b>
10	100% amplitud 10 minutos	0,415	124,3 $\pm$ 0,2 (Polimerosomas) 480,1 $\pm$ 0,4 (Agregados de polimerosomas)
10	60% amplitud 30 minutos	0,271	239,4 $\pm$ 0,1 (Polimerosomas) 782,6 $\pm$ 0,3 (Agregados de polimerosomas)

Las nanopartículas de oro fueron cargadas en los polimerosomas usando el método de la doble emulsión con ultrasonidos. En este método, un disolvente orgánico volátil que contiene el copolímero dibloque anfifílico se utiliza como la fase intermedia y los polimerosomas se forman al

evaporarse el disolvente. Esta técnica ofrece las ventajas de una elevada eficiencia de carga, así como tamaños y arquitecturas de vesícula controlables [8]. La Figura 3b muestra cómo la resonancia superficial de plasmón (SPR) en el espectro UV-Vis se desplaza a 530 nm al incorporar las nanopartículas de oro en los polimerosomas. La SPR de las nanopartículas de oro en ausencia de las vesículas (Figura 3a) se sitúa en 511 nm. Las oscilaciones colectivas de los electrones en las nanopartículas de oro individuales dentro de la membrana del polimerosoma desplazaron la SPR debido a la presencia de interacciones internas entre las nanopartículas y la variación asociada al cambio de constante dieléctrica del medio.

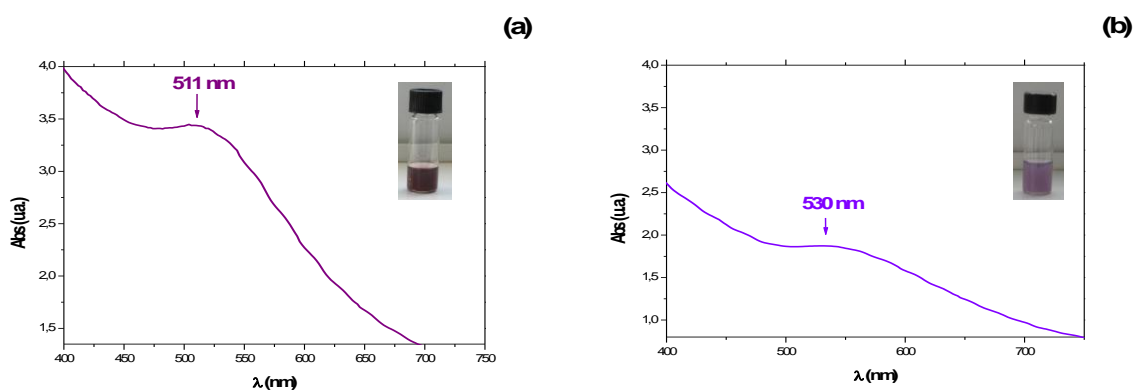


Figura 3. Espectros de absorción mostrando la resonancia superficial de plasmón para a) nanopartículas de oro en disolución acuosa en ausencia de vesículas y b) polimerosomas híbridas de Au@PB-*b*-PEO.

La encapsulación de las nanopartículas de oro en la membrana hidrófoba del polimerosoma se llevó a cabo con éxito mediante el uso del método de la doble emulsión utilizando ultrasonidos. La imagen de TEM de las nanopartículas de oro cargadas en la membrana del polimerosoma de PB-*b*-PEO, obtenido por el método de la doble emulsión (utilizando una concentración de 10 mg/ml de copolímero y 0,9 mg/ml de nanopartículas de oro, respectivamente) utilizando una tinción negativa con ácido fosfotúngstico, se muestra en la Figura 2. En estas imágenes, el núcleo de las nanopartículas de oro aparece negro oscuro en contraste con el polímero, de un color gris claro en la fotografía. La inclusión de estas nanopartículas de oro dentro de los polimerosomas de PB-*b*-PEO se llevó a cabo mediante inclusión mecánica durante la evaporación del disolvente orgánico y es debida a la interacción hidrófoba entre el 1-mercapto-(trietilenglicol) metiléter de las nanopartículas de oro y el bloque de polibutadieno del copolímero. Este sistema es un ejemplo de carga de la membrana hidrófoba de un polimerosoma debida solamente a las interacciones hidrófobas entre el copolímero y la nanopartícula metálica funcionalizada. La Figura 4 muestra una imagen de TEM de la agregación de dos polimerosomas cargados con Au NPs.



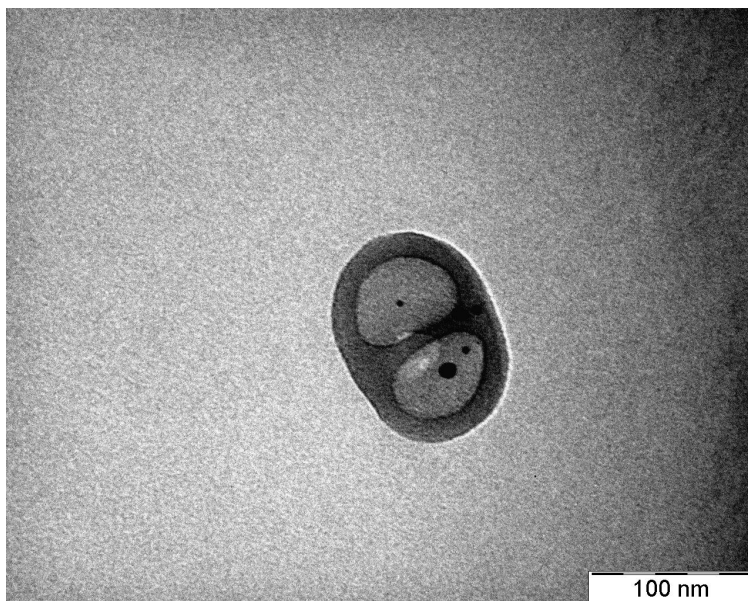


Figura 4. Imágenes de TEM de la fusión de dos polimerosomas de PB-*b*-PEO cargados con nanopartículas de oro.

Un mecanismo comparable ha sido observado experimentalmente para la incorporación de puntos cuánticos de CdSe revestidos con una corteza de ZnS en polimerosomas de PB<sub>130</sub>-*b*-PEO<sub>66</sub> en agua [27]. En este caso, los puntos cuánticos se observaron tanto en el interior del núcleo como también incluidos dentro de la corteza de polimerosomas. En el último caso, se observó como la corteza de la vesícula envuelve a la nanopartícula huésped. En definitiva, aquí presentamos como la combinación de técnicas de dispersión (DLS y SANS) con observaciones directas por TEM nos ha permitido estudiar la estructura de los híbridos Au NP@PB-*b*-PEO en disolución acuosa. Pero lo cierto es que todavía quedan preguntas abiertas para futuros estudios, incluyendo la influencia del tamaño de las nanopartículas de oro y la curvatura de la membrana de la vesícula de copolímero sobre la eficiencia de encapsulación.

## CONCLUSIONES

En resumen, hemos desarrollado un método de encapsulación en el que se pueden utilizar copolímeros dibloque anfifílicos de butadieno y óxido de etileno. En el híbrido resultante, la membrana minimiza el impacto de las nanopartículas, ya sean estas metálicas, magnéticas o puntos cuánticos, sobre el sistema biológico objetivo. Este copolímero forma una membrana gruesa, a la que las biomoléculas se pueden unir con facilidad. Usando este método, pequeñas nanopartículas de oro (con un tamaño promedio entre 4,8 y 6,6 nm) fueron cargadas con buen rendimiento (sólo un 4% de nanopartículas de oro quedaron sin encapsular), obteniéndose en algunos casos tres o más

nanopartículas de oro por vesícula de copolímero. También se ha observado algunas fusiones de vesículas, con únicamente sus capas exteriores en contacto.

**Agradecimientos.** Los autores agradecen al *Ministerio de Ciencia e Innovación* la financiación de este trabajo a través del proyecto de investigación MAT2007–61604. *Emilio Castro* además quiere expresar su agradecimiento a la *Xunta de Galicia (España)*, y al *Fondo Social Europeo*, por su contrato dentro del programa *Ángeles Alvarinho*.

#### BIBLIOGRAFÍA

- [1] Booth C, Attwood D, *Macromol. Rapid Commun.*, **21**, 501 (2000)
- [2] Disher DE, Eisenberg A, *Science*, **297**, 967 (2002)
- [3] Hamley W, *Soft Matter*, **1**, 36 (2005)
- [4] Zhang LF, Eisenberg A, *Science*, **268**, 1728 (1995)
- [5] Zhang LF, Yu K, Eisenberg A, *Science*, **268**, 1777 (1996)
- [6] Disher BM, Won YY, Ege DS, Lee JCM, Bates FS, Disher DE, Hamer DA, *Science*, **284**, 1143 (1999)
- [7] Hayward RC, Utada AS, Dan N, Weitz DA, *Langmuir*, **22**(10), 4457 (2006)
- [8] Robertson D, Tiersch B, Kosmella S, Koetz J, *J. Colloid Interface Sci.*, **305**, 345 (2007)
- [9] Balazs AC, Emrick T, Russel TP, *Science*, **314**, 1107 (2006)
- [10] Bockstaller MR, Thomas EL, *Phys. Rev. Lett.*, **93**, 166106–1–166106–4 (2004)
- [11] Le–Meins JF, Sandre O, Lecommandoux S, *Eur. Phys. J. E*, **34**, 14 (2011)
- [12] Regev O, Backov R, Faure C, *Chem. Mater.*, **16**, 5280 (2004)
- [13] Binder WH, Sachsenhofer R, Farniq D, Blaas D, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **9**, 6435 (2007)
- [14] Bockstaller MR, Mickiewicz RA, Thomas EL, *Adv. Mater.*, **17**, 1331 (2005)
- [15] Pengo P, Pasquato L, Scrimin P, *J. Supramol. Chem.*, **2**, 305 (2002)
- [16] Templeton AC, Pietron JJ, Murria RW, Mulvaney P, *J. Phys. Chem. B*, **104**, 564 (2000)
- [17] Cheng Z, Tsourkas A, *Langmuir*, **24**, 8164 (2008)
- [18] Ghoroghchian PP, Frail PR, Susumu K, Park TH, Wu SP, Uyeda HT, Hammer DA, Therien MJ, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 15388 (2005)
- [19] Maskos M, *Polymer*, **47**, 1172 (2006)
- [20] Li S, Byrne B, Welsh J, Palmer AF, *Biotechnol. Prog.*, **23**, 278 (2007)
- [21] Maskos M, Harris JR, *Macromol. Rapid Commun.*, **22**, 271 (2001)
- [22] Li S, Palmer AF, *Macromolecules*, **38**, 5686 (2005)
- [23] Jain S, Bates FS, *Macromolecules*, **37**, 1511 (2004)
- [24] Shum HC, Lee D, Yoon I, Kodger T, Weitz DA, *Langmuir*, **24**, 7651 (2008)
- [25] Foster T, Dorfman KD, Davis HT, *Langmuir*, **26**, 9666 (2010)
- [26] Li Y, Smith AE, Lokitz BS, McCornick CL, *Macromolecules*, **40** (24), 8524 (2007)
- [27] Mueller W, Koynov K, Fisher K, Hartmann S, Pierrat S, Bashé T, Maskos M, *Macromolecules*, **42**, 357 (2009)