



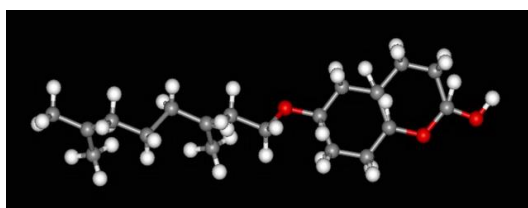
**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**

**Τομέας (I) Χημικών Επιστημών**  
**Εργαστήριο Οργανικής Χημείας**

**ΓΑΛΑΝΗ ΓΕΩΡΓΙΑ**

*«Σύνθεση 7-γερανυλοξυ-κουμαρινών με αντιοξειδωτική και  
αντιφλεγμονώδη δράση και εγκλεισμός αυτών σε  
νανοσωματίδια βιοδιασπώμενου πολυμερούς»*

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**



**ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ:**

**Αναστασία Δέτση, Επικ. Καθηγήτρια ΕΜΠ**

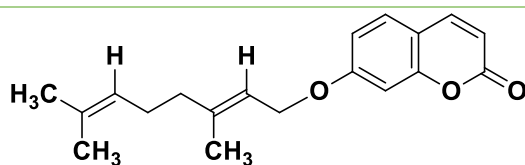
**Αθήνα 2015**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

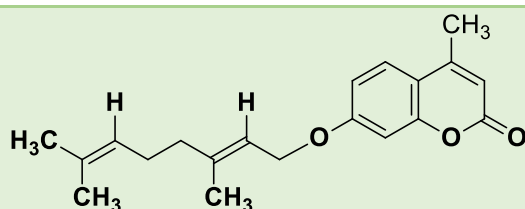
Τα οξυ-πρενυλιωμένα φυσικά προϊόντα (ισοπεντενυλοξυ-, γερανυλοξυ- και οι λιγότερο διαδεδομένες φαρνεσυλοξυ-ενώσεις και τα παράγωγά τους) αντιπροσωπεύουν μια οικογένεια δευτερογενών μεταβολιτών που θεωρούνται για χρόνια ως βιοσυνθετικά ενδιάμεσα των παραγώγων που έχουν πρενυλιωμένο άνθρακα. Μόλις την τελευταία δεκαετία αυτά τα φυσικά προϊόντα έχουν αναγνωρισθεί ως ενδιαφέρουσες και βιολογικώς δραστικές φυτοχημικές ενώσεις.

Οι πρενυλοξυ-κουμαρίνες αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες που βρίσκονται συνήθως σε διάφορα φυτά των οικογενειών Rutaceae και Umbelliferae. Ορισμένες από τις κουμαρίνες αυτές παρουσιάζουν αξιόλογες φαρμακευτικές ιδιότητες. Μεταξύ αυτών, η ωραπτίνη (7-γερανυλοξυ-κουμαρίνη) που έχει απομονωθεί από τη νεραντζιά [*Citrus aurantium* L. (Rutaceae)], αναφέρεται ότι έχει χημειοπροστατευτικές επιδράσεις ενάντια στην χημικώς προκαλούμενη καρκινογένεση και επιπλέον παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιείται η σύνθεση του φυσικού προϊόντος, ωραπτίνη, καθώς και το ανάλογο αυτής, η 7-γερανυλοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη. Οι ενώσεις αξιολογήθηκαν *in vitro* για την αντιοξειδωτική τους δράση, καθώς και για την ικανότητά τους να αναστέλλουν την λιποξυγονάση σόγιας, ως ένδειξη της αντιφλεγμονώδους δράσης τους.



(Ωραπτίνη)



(7-γερανυλοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη)

Ο νανοεγκλεισμός των βιοδραστικών ενώσεων παρέχει προστασία έναντι της ανεπιθύμητης αποικοδόμησης και επίσης βελτιώνει την βιοδιαθεσιμότητά τους. Προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα ενίσχυσης της σταθερότητας των παραγόμενων γερανυλοξυ-κουμαρινών κατά της οξειδωσης από το φως ή τον αέρα, καθώς και για να τροποποιηθεί η διαλυτότητά τους στο νερό μιας και είναι υδρόφοβες ενώσεις, πραγματοποιείται ο εγκλεισμός των γερανυλοξυ-κουμαρινών σε βιοαποικοδομήσιμα από πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA) νανοσωματίδια.

Ο εγκλεισμός σε PLA νανοσωματίδια επιτεύχθηκε μέσω της τεχνικής γαλακτωματοποίησης/εξάτμισης του οργανικού διαλύτη. Το μέγεθος, ο δείκτης πολυδιασποράς και το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων μετρήθηκαν με τη μέθοδο Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS) και η ικανότητα εγκλεισμού (EE) προσδιορίστηκε έμμεσα, χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία UV-vis.

- *Επιστημονική Περιοχή:* Οργανική σύνθεση βιοδραστικών φυσικών προϊόντων και νανοεγκλεισμός
- *Λέξεις Κλειδιά:* Γερανυλοξυ-κουμαρίνες, αντιοξειδωτική δράση, αντιφλεγμονώδης δράση, πολυ(γαλακτικό οξύ) PLA, νανοεγκλεισμός

---

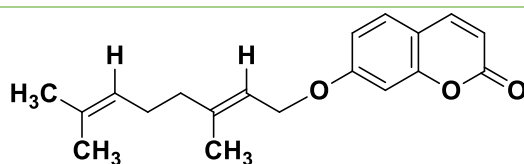
## ABSTRACT

---

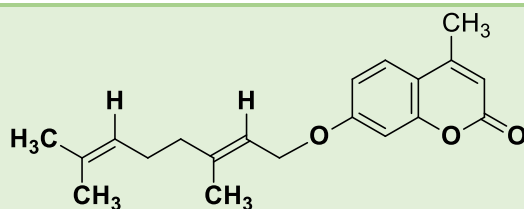
Oxyprenylated natural products (isopentenyl-, geranyl-, and the less spread farnesyl- compounds and their biosynthetic derivatives) represent a family of secondary metabolites that have been considered for years just as biosynthetic intermediates of C-prenylated derivatives. Only in the last decade these natural products have been recognized as interesting and valuable biologically active phytochemicals.

Prenyloxycoumarins are secondary metabolites commonly present in plants belonging to the families of Rutaceae and Umbelliferae. Several of these coumarins were shown to possess valuable pharmacological properties. Among them, auraptene (7-geranylloxycoumarin) which is isolated from *Citrus aurantium* L. (Rutaceae) has been reported to have chemopreventive effects on chemically induced carcinogenesis and possess antioxidant activity.

In this work, the synthesis of the natural product auraptene as well as its analogue, 4-methyl-7-geranylloxycoumarin will be presented. The compounds were evaluated *in vitro* for their antioxidant activity as well as for their ability to inhibit soybean lipoxygenase, as an indication of their potential anti-inflammatory activity.



(Auraptene)



(4-methyl-7-geranylloxycoumarin)

Nanoencapsulation of bioactive compounds can provide protection against unwanted degradation and also improve their bioavailability and delivery properties. In order to

investigate the possibility of enhancing the stability of the synthesized prenyloxycoumarins against photo- and air-oxidation as well as modifying their aqueous solubility, the compounds were encapsulated in biodegradable poly(lactic acid) (PLA) nanoparticles. Encapsulation in PLA nanoparticles was achieved via the emulsification-solvent evaporation technique. Size, polydispersity index and  $\zeta$ -potential of the nanoparticles were measured by Dynamic Light Scattering method whereas the Encapsulation Efficiency (EE) was determined indirectly, using UV-Vis spectroscopy.

- *Scientific Area:* Organic synthesis of bioactive natural products and nanoencapsulation
- *Keywords:* Geranyloxy-coumarins, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, poly (lactic acid) PLA, nanoencapsulation

---

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

---

Η εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου κατά το ακαδημαϊκό έτος 2014-2015, υπό την επίβλεψη της Επίκουρου Καθηγήτριας Αναστασίας Δέτση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά:

Την υπεύθυνη καθηγήτρια κα Α. Δέτση για την εμπιστοσύνη της και την βοήθειά της στην συγγραφή της εργασίας, τις συμβουλές και την καθοδήγησή της σε εργαστηριακό και γνωστικό επίπεδο.

Την υποψήφια διδάκτορα στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Ελένη Καβέτσου, για την ουσιαστική καθοδήγησή της κατά την διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών και για την συγγραφή της διπλωματικής εργασίας.

Την Ανδρομάχη Τζάνη, υποψήφια διδάκτορα στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας, για την άποψη συνεργασία και για την λήψη και αποτίμηση των φασμάτων NMR.

Τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, την Αναπληρώτρια καθηγήτρια κα Ε. Παυλάτου και την Επίκουρο καθηγήτρια κα Σ. Βουγιούκα για την τιμή που μου κάνουν να συμμετέχουν στην εξεταστική επιτροπή.

Τέλος, την καθηγήτρια Δήμητρα Χατζηπαύλου – Λίτινα, στον Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτέλειου Πανεπιστήμιου Θεσσαλονίκης, για την διεξαγωγή των *in vitro* βιοδοκιμασιών για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης των παραγόμενων ενώσεων.

---

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

---

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

1.1 Εισαγωγή.....σελ.14	σελ.14
1.2 Ταξινόμηση των κουμαρινών.....σελ.16	σελ.16
1.2.1 Απλές κουμαρίνες.....σελ.16	σελ.16
1.2.2 Φουρανοκουμαρίνες.....σελ.17	σελ.17
1.2.3 Πυρανοκουμαρίνες.....σελ.17	σελ.17
1.2.4 Κουμαρίνες υποκατεστημένες στον πυρανικό δακτύλιο.....σελ.18	σελ.18
1.3 Κυριότερες μέθοδοι σύνθεσης κουμαρινών.....σελ.19	σελ.19
1.3.1 Μέθοδος Perkin.....σελ.19	σελ.19
1.3.2 Μέθοδος Pechmann.....σελ.20	σελ.20
1.3.3 Προσθήκη Michael.....σελ.23	σελ.23
1.3.4 Αντίδραση Knoevenagel.....σελ.24	σελ.24
1.3.5 Αντίδραση Wittig.....σελ.25	σελ.25
1.4 Βιολογική δράση των κουμαρινών.....σελ.25	σελ.25
1.4.1 Αντιμικροβιακή δράση.....σελ.26	σελ.26
1.4.2 Αντι-ική δράση.....σελ.27	σελ.27
1.4.3 Αντικαρκινική δράση.....σελ.28	σελ.28
1.4.4 Δράση ως αναστολείς ενζύμων.....σελ.29	σελ.29
1.4.5 Αντιφλεγμονώδης δράση.....σελ.29	σελ.29
1.4.6 Αντιοξειδωτική δράση.....σελ.32	σελ.32
1.5 Γερανυλοξυ-κουμαρίνες.....σελ.34	σελ.34

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>

2.1 Σχεδιασμός των ενώσεων.....σελ.38	σελ.38
2.2 Φασματοσκοπική μελέτη.....σελ.41	σελ.41

2.3 Αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των ενώσεων.....σελ.45	
2.3.1 Αντιοξειδωτική Δράση των ενώσεων.....σελ.45	
2.3.2 Αντιφλεγμονώδης Δράση των ενώσεων.....σελ.48	

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>**

3.1 Εισαγωγή.....σελ.51	
3.2 Μέθοδοι σύνθεσης πολυμερικών νανοσωματιδίων.....σελ.52	
3.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων.....σελ.59	
3.4 Πλεονεκτήματα νανοσωματιδίων.....σελ.60	
3.5 Εφαρμογές νανοεγκλεισμού.....σελ.61	
3.6 Μηχανισμοί απελευθέρωσης φαρμακευτικών ενώσεων.....σελ.61	
3.7 Πολυμερή που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή νανοσωματιδίων.....σελ.62	

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>**

4.1 Συσκευές και όργανα εργαστηρίου.....σελ.68	
4.2 Υλικά.....σελ.69	
4.3 Συνθετική πορεία βιοδραστικών ενώσεων.....σελ.70	
4.4 Σχηματισμός νανοσωματιδίων PLA και εγκλεισμός των ενώσεων.....σελ.73	
4.5 Χαρακτηρισμός νανοσωματιδίων.....σελ.76	
4.6 Αποτελέσματα - Μέγεθος, Δείκτης Πολυδιασποράς, Z-Δυναμικό νανοσωματιδίων.....σελ.79	
4.7 Απόδοση εγκλεισμού βιοδραστικών ενώσεων.....σελ.88	

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>**

5.1 Συμπεράσματα και προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....σελ.103	
--	--



---

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

---

Σχήμα 1.....	σελ.15
Σχήμα 2.....	σελ.16
Σχήμα 3.....	σελ.17
Σχήμα 4.....	σελ.17
Σχήμα 5.....	σελ.18
Σχήμα 6.....	σελ.18
Σχήμα 7.....	σελ.19
Σχήμα 8.....	σελ.19
Σχήμα 9.....	σελ.20
Σχήμα 10.....	σελ.21
Σχήμα 11.....	σελ.21
Σχήμα 12.....	σελ.22
Σχήμα 13.....	σελ.22
Σχήμα 14.....	σελ.24
Σχήμα 15.....	σελ.24
Σχήμα 16.....	σελ.25
Σχήμα 17.....	σελ.26
Σχήμα 18.....	σελ.27
Σχήμα 19.....	σελ.28
Σχήμα 20.....	σελ.30
Σχήμα 21.....	σελ.31
Σχήμα 22.....	σελ.31
Σχήμα 23.....	σελ.33
Σχήμα 24.....	σελ.34
Σχήμα 25.....	σελ.35
Σχήμα 26.....	σελ.35

Σχήμα 27.....	σελ.36
Σχήμα 28.....	σελ.36
Σχήμα 29.....	σελ.36
Σχήμα 30.....	σελ.38
Σχήμα 31.....	σελ.39
Σχήμα 32.....	σελ.40
Σχήμα 33.....	σελ.40
Σχήμα 34.....	σελ.42
Σχήμα 35.....	σελ.44
Σχήμα 36.....	σελ.45
Σχήμα 37.....	σελ.46
Σχήμα 38.....	σελ.47
Σχήμα 39.....	σελ.47
Σχήμα 40.....	σελ.48
Σχήμα 41.....	σελ.64
Σχήμα 42.....	σελ.66
Σχήμα 43.....	σελ.67

---

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

---

Εικόνα 1.....	σελ.14
Εικόνα 2.....	σελ.30
Εικόνα 3.....	σελ.33
Εικόνα 4.....	σελ.41
Εικόνα 5.....	σελ.43
Εικόνα 6.....	σελ.44
Εικόνα 7.....	σελ.49
Εικόνα 8.....	σελ.51
Εικόνα 9.....	σελ.53
Εικόνα 10.....	σελ.55
Εικόνα 11.....	σελ.56
Εικόνα 12.....	σελ.57
Εικόνα 13.....	σελ.59
Εικόνα 14.....	σελ.60
Εικόνα 15.....	σελ.69
Εικόνα 16.....	σελ.69
Εικόνα 17.....	σελ.74
Εικόνα 18.....	σελ.77
Εικόνα 19.....	σελ.88
Εικόνα 20.....	σελ.91
Εικόνα 21.....	σελ.94
Εικόνα 22.....	σελ.97

---

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

---

Πίνακας 1.....	σελ.65
Πίνακας 2.....	σελ.79
Πίνακας 3.....	σελ.80
Πίνακας 4.....	σελ.81
Πίνακας 5.....	σελ.82
Πίνακας 6.....	σελ.83
Πίνακας 7.....	σελ.85
Πίνακας 8.....	σελ.86
Πίνακας 9.....	σελ.89
Πίνακας 10.....	σελ.90
Πίνακας 11.....	σελ.91
Πίνακας 12.....	σελ.93
Πίνακας 13.....	σελ.94
Πίνακας 14.....	σελ.96
Πίνακας 15.....	σελ.98
Πίνακας 16.....	σελ.99
Πίνακας 17.....	σελ.101

---

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

---

Διάγραμμα 1.....	σελ.80
Διάγραμμα 2.....	σελ.81
Διάγραμμα 3.....	σελ.82
Διάγραμμα 4.....	σελ.83
Διάγραμμα 5.....	σελ.84
Διάγραμμα 6.....	σελ.84
Διάγραμμα 7.....	σελ.85
Διάγραμμα 8.....	σελ.86
Διάγραμμα 9.....	σελ.87
Διάγραμμα 10.....	σελ.87
Διάγραμμα 11.....	σελ.89
Διάγραμμα 12.....	σελ.92
Διάγραμμα 13.....	σελ.95
Διάγραμμα 14.....	σελ.98

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

## ΟΙ ΚΟΥΜΑΡΙΝΕΣ

### 1.1 Εισαγωγή

Η μελέτη των κουμαρινών ξεκίνησε πριν από 200 χρόνια περίπου. Το όνομα αυτής της χημικής οικογένειας προέρχεται από το φυτό *Coumarouna odorata Aube* (*tonka bean*, *Dipteryx odorata*) από το οποίο απομονώθηκε για πρώτη φορά το απλούστερο μέλος αυτής της κατηγορίας, η ίδια η κουμαρίνη. <sup>[1],[2]</sup>

Πολλά παράγωγα κουμαρίνης έχουν επίσης ανιχνευθεί σε φρούτα (π.χ. μύρτιλλο, βατομουριά), στο πράσινο τσάι και σε άλλα τρόφιμα, όπως τα ραδίκια και υπάρχουν τόσο σε ελεύθερη κατάσταση όσο και ως γλυκοζίτες. <sup>[3]</sup> Η απλή κουμαρίνη βρίσκεται ευρέως ως δευτερογενής μεταβολίτης σε διάφορες οικογένειες φυτών, όπως Umbelliferae, Rutaceae και Compositae και σε έλαια, ενώ επίσης έχει χρησιμοποιηθεί ως άρωμα σε τρόφιμα και σε καλλυντικά προϊόντα. <sup>[1]</sup>

Το γενικό όριο κουμαρίνης στα τρόφιμα και τα μη αλκοολούχα ποτά είναι 2 mg / kg. Ωστόσο, στα αλκοολούχα ποτά και σε ορισμένα είδη ζαχαροπλαστικής το επιτρεπόμενο όριο είναι 10 mg / kg και στις τσίγλες είναι 50 mg / kg. <sup>[3]</sup>



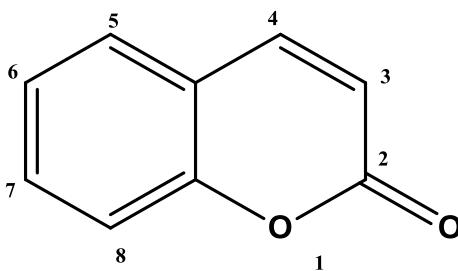
Εικόνα 1. Φασόλια tonka

Η κουμαρίνη και τα κουμαρινικά παράγωγα υπάρχουν στο γρασίδι, στο οποίο δίνουν τη χαρακτηριστική μυρωδιά φρεσκοκομμένου χόρτου, και στο καλαμπόκι, και εμφανίζουν εντομοαπωθητική δράση.

Επιπλέον, οι κουμαρίνες παράγονται κατά την διάρκεια του μαρασμού των φυτών ή όταν αυτά ξεραίνονται. <sup>[4]</sup>

Σύμφωνα με τη συστηματική ονοματολογία κατα IUPAC, η ονομασία της απλής κουμαρίνης είναι βενζο-α-πυρόνη ή αλλιώς 2H-1-βενζοπυραν-2-όνη (Σχήμα 1). <sup>[1]</sup>

Ωστόσο, η κουμαρίνη αποτελεί το εμπειρικό όνομα της ένωσης και χρησιμοποιείται ευρέως, ενώ επίσης εναλλακτικές ονομασίες είναι οι εξής: 2-οξο-1,2-βενζο-πυράν, 5,6-βενζο-α-πυρόνη, 5,6-βενζο-2-πυρόνη, 1,2-βενζοπυρόνη, 2H-1-βενζοπυραν-2-όνη, 2H-βενζο[b]-πυραν-2-όνη, κουμαρινικός ανυδρίτης και 2H-χρωμεν-2-όνη. <sup>[4]</sup>



Σχήμα 1. Δομή της βενζο-α-πυρόνης

Γενικά, οι κουμαρίνες ανήκουν σε μια ομάδα ενώσεων, γνωστές ως βενζοπυρόνες, οι οποίες αποτελούνται από έναν βενζολικό δακτύλιο ενωμένο μέσω συμπύκνωσης με μια πυρόνη (εξαμελής ετεροκυκλικός δακτύλιος με ένα άτομο οξυγόνου και πέντε άνθρακες που συνδέονται με δεσμούς  $sp^2$ ). <sup>[4]</sup>

Έλεγχος της δομής της απλής κουμαρίνης καταδεικνύει ότι υποκατάσταση μπορεί να συμβεί σε πολλές θέσεις. Υπάρχουν πολλές πιθανές παραλλαγές που προσφέρονται από την υποκατάσταση και τη σύζευξη, και αυτό εξηγεί γιατί τόσες πολλές από αυτές τις ουσίες απαντώνται στη φύση.

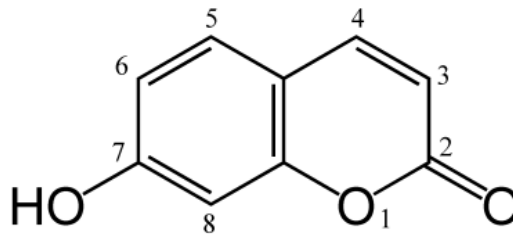
Ωστόσο, μέχρι σήμερα, οι περισσότερες από τις φαρμακολογικές και βιοχημικές μελέτες έχουν γίνει στην απλή κουμαρίνη και στον μεταβολίτη της, την 7-υδροξυ-κουμαρίνη. <sup>[5]</sup>

## 1.2 Ταξινόμηση των κουμαρινών

Η δομική ποικιλομορφία που παρουσιάζει αυτή η οικογένεια των ενώσεων οδήγησε στην υποδιαίρεση τους στις ακόλουθες κατηγορίες:

### 1.2.1 Απλές Κουμαρίνες

Η κατηγορία αυτή αποτελείται από τα υδροξυ-, αλκοξυ- και αλκυλο-υποκατεστημένα - (στον αρωματικό δακτύλιο) - παράγωγα της κουμαρίνης και από αντίστοιχους γλυκοζίτες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα μιας απλής κουμαρίνης αποτελεί η 7-υδροξυκουμαρίνη (Σχήμα 2).<sup>[4]</sup>



Σχήμα 2. Δομή της 7-υδροξυ-κουμαρίνης (umbelliferone)

Η *ουμπελιφερόνη* ή αλλιώς 7-υδροξυ-κουμαρίνη (7-HC) είναι μία φυσική βενζοπυρόνη, η οποία αποτελεί κύριο ανθρώπινο μεταβολίτη και υπάρχει ως αντιοξειδωτικό στη διατροφή του ανθρώπου, αφού βρίσκεται κυρίως σε φυτά, φρούτα και λαχανικά, όπως είναι τα μήλα, τα πικρά πορτοκάλια, τα καρότα, ο κόλιανδρος.<sup>[6], [7]</sup>

Διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο καθώς έχει μια πληθώρα βιολογικών δράσεων: μειώνει τα οιδήματα στον άνθρωπο, έχει αντι-υπεργλυκεμικές και βρογχοδιασταλτικές δράσεις σε ποντίκια, ενώ επίσης παρουσιάζει αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.

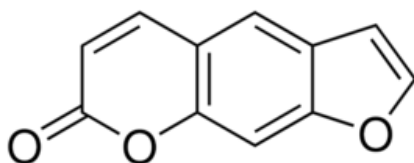
Αυτή η ένωση αναστέλλει τη μετανάστευση των ουδετερόφιλων, την αποκοκκίωση των μαστοκυττάρων, την απελευθέρωση NO από τα μακροφάγα, τη βιοσύνθεση της προσταγλανδίνης και τη δράση της 2-κυκλοοξυγονάσης (COX-2) και της 5-λιποξυγονάσης (5-LOX). Επιπλέον, η 7-υδροξυ-κουμαρίνη ενεργοποιεί τις προστατευτικές ανοσοαποκρίσεις έναντι του ιού της γρίπης και της *Salmonella typhimurium*.<sup>[7]</sup>



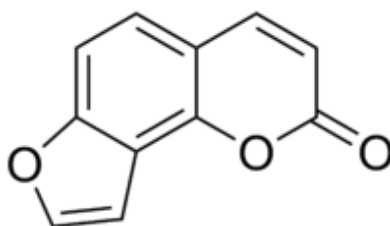
### 1.2.2 Φουρανοκουμαρίνες

Αυτές οι ενώσεις περιλαμβάνουν έναν πενταμελή φουρανικό δακτύλιο συμπυκνωμένο στον πυρήνα της κουμαρίνης, τον βενζολικό δακτύλιο. Τα περισσότερα μέλη αυτής της ομάδας είναι παράγωγα της κουμαρίνης γραμμικού τύπου, που ονομάζεται ψωραλλένιο (Σχήμα 3), ή της πιο σταθερής ισομερούς ένωσης της, γωνιακού τύπου, που ονομάζεται αγγελικίνη (Σχήμα 4).

Οι όροι γραμμικός και γωνιακός αναφέρονται στον προσανατολισμό του φουρανικού δακτυλίου σε σχέση με το μόριο της κουμαρίνης. <sup>[4]</sup>



Σχήμα 3. Ψωραλλένιο (psoralen)



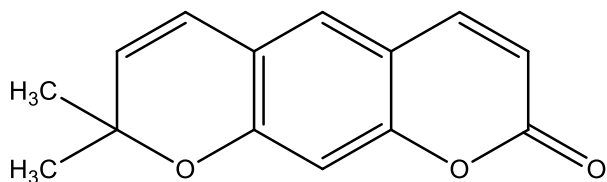
Σχήμα 4. Αγγελικίνη (angelicin)

Οι διϋδροφουρανοκουμαρίνες και οι διϋδροπυρανοκουμαρίνες ανήκουν επίσης στην κατηγορία αυτή. <sup>[4]</sup>

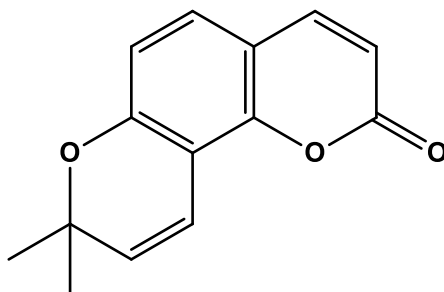
### 1.2.3 Πυρανοκουμαρίνες

Μέλη αυτής της κατηγορίας είναι ενώσεις ανάλογες με τις φουρανοκουμαρίνες, με τη διαφορά ότι διαθέτουν έναν εξαμελή δακτύλιο συμπυκνωμένο στον πυρήνα της κουμαρίνης.

Και εδώ υπάρχουν ενώσεις γραμμικού τύπου, όπως η ξανθυλετίνη (Σχήμα 5) και γωνιακού τύπου, όπως η σεσελίνη (Σχήμα 6).<sup>[4]</sup>



Σχήμα 5. Ξανθυλετίνη (xanthyletin)

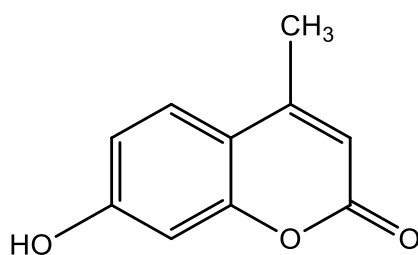


Σχήμα 6. Σεσελίνη (seselin)

#### **1.2.4 Κουμαρίνες υποκατεστημένες στον πυρανικό δακτύλιο**

Παραδείγματα αυτής της κατηγορίας είναι η 4-υδροξυκουμαρίνη και οι 3-μεθυλο-4-υδροξυκουμαρίνες. Γενικά περιλαμβάνονται οι υποκατεστημένες κουμαρίνες στην 3-ή στην 4-θέση ή και στις δύο θέσεις, καθώς και 3,4-συμπυκνωμένες κουμαρίνες.

Τα μέλη της κατηγορίας έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί ως φθοροφόρες ενώσεις. Οι 4-μεθυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνες (Σχήμα 7) συνήθως χρησιμοποιούνται για την παραγωγή σήματος φθορισμού σε δοκιμασίες για την ανίχνευση βακτηριακής μόλυνσης.<sup>[4]</sup>



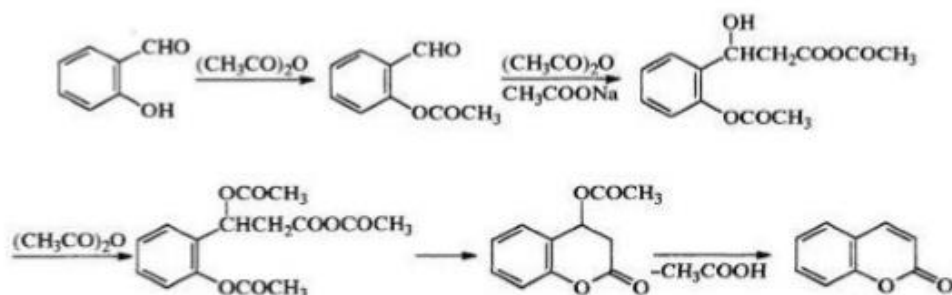
Σχήμα 7. Δομή της 4-μεθυλο-7-υδροξυκουμαρίνης (4-methyl-7- hydroxycoumarin)

## 1.3 Κυριότερες μέθοδοι σύνθεσης κουμαρινών

Οι πολύ ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες των κουμαρινών τις καθιστούν ελκυστικές ενώσεις για οργανική σύνθεση. Η ιστορία της σύνθεσης των κουμαρινών ξεκίνησε από τα μέσα του δέκατου ένατου αιώνα, με την ανακάλυψη της σύνθεσης Perkin και από τότε αρκετές συνθετικές στρατηγικές για την απόκτηση απλών κουμαρινών έχουν αναπτυχθεί. <sup>[1]</sup>

### 1.3.1 Μέθοδος Perkin

Κατά την αντίδραση Perkin πραγματοποιείται η σύνθεση των απλών κουμαρινών μέσω αλδολικής συμπύκνωσης μιας ορθο-υδροξυ-βενζαλδεΐδης και του οξικού ανυδρίτη, παρουσία ενός αλκαλικού άλατος του οξέος (Σχήμα 8). <sup>[8],[9]</sup>



Σχήμα 8. Η αντίδραση Perkin

Η σύνθεση των κουμαρινών με μεθόξυ- ή υδρόξυ- ομάδες γίνεται συνήθως με την αντίδραση Perkin, παρά τις χαμηλές αποδόσεις που προκύπτουν.

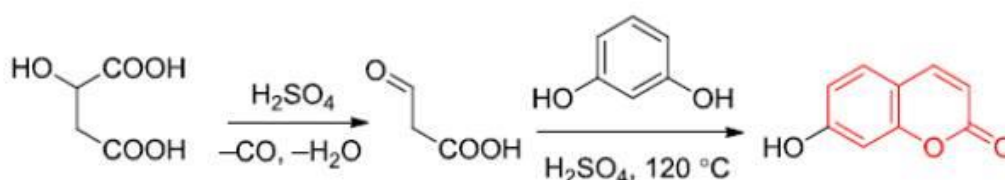
Μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η δυσκολία παρασκευής των απαραίτητων πρώτων υλών (υποκατεστημένες ο-υδροξυβενζαλδεΐδες) και οι χαμηλές αποδόσεις που οφείλονται στο γεγονός ότι οι δραστικές συνθήκες που απαιτούνται (παρατεταμένη θέρμανση στους 150-200 °C) οδηγούν στο σχηματισμό ρητινωδών προϊόντων. <sup>[10]</sup>

### 1.3.2 Μέθοδος Pechmann

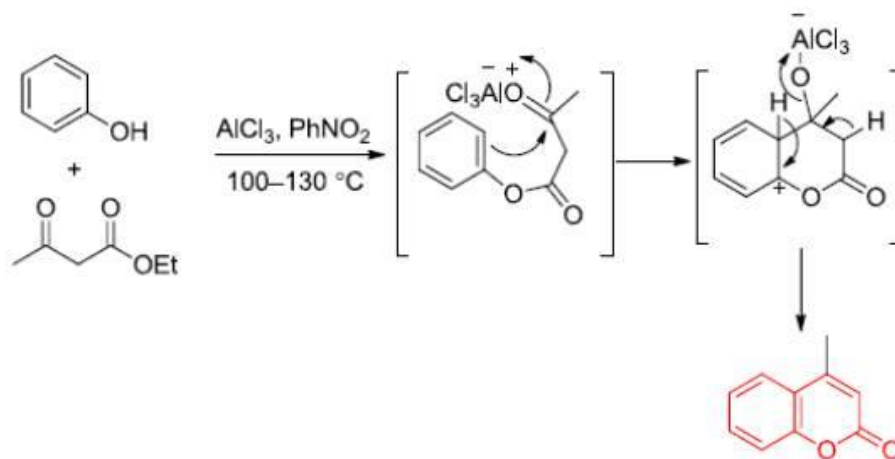
Μια πολύτιμη μέθοδος για τη σύνθεση των κουμαρινών είναι η αντίδραση Pechmann. Το 1883, ένας Γερμανός χημικός, ο Hans von Pechmann ανακάλυψε μια νέα συμπύκνωση που οδηγούσε στην παραγωγή κουμαρινών από την αντίδραση φαινολών με ένα καρβοξυλικό οξύ ή εστέρα που περιέχει μία ομάδα με β-καρβονύλιο. <sup>[11]</sup>

Η αντίδραση Pechmann συνήθως διεξάγεται υπό όξινες συνθήκες. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει μία εστεροποίηση / μετεστεροποίηση, η οποία έπεται από προσβολή του ενεργοποιημένου καρβονυλίου στην *ορθο*-θέση με το οξυγόνο, με σκοπό να δημιουργήσουν ένα νέο δακτύλιο. Το τελικό βήμα είναι η αφυδάτωση, ακολουθούμενη από αλδολική συμπύκνωση. <sup>[11]</sup>

Πραγματοποιείται με την καταλυτική δράση ισχυρών οξέων Bronsted, όπως είναι το θειικό οξύ (Σχήμα 9) ή οξέων κατά Lewis (Σχήμα 10). <sup>[12], [13]</sup>

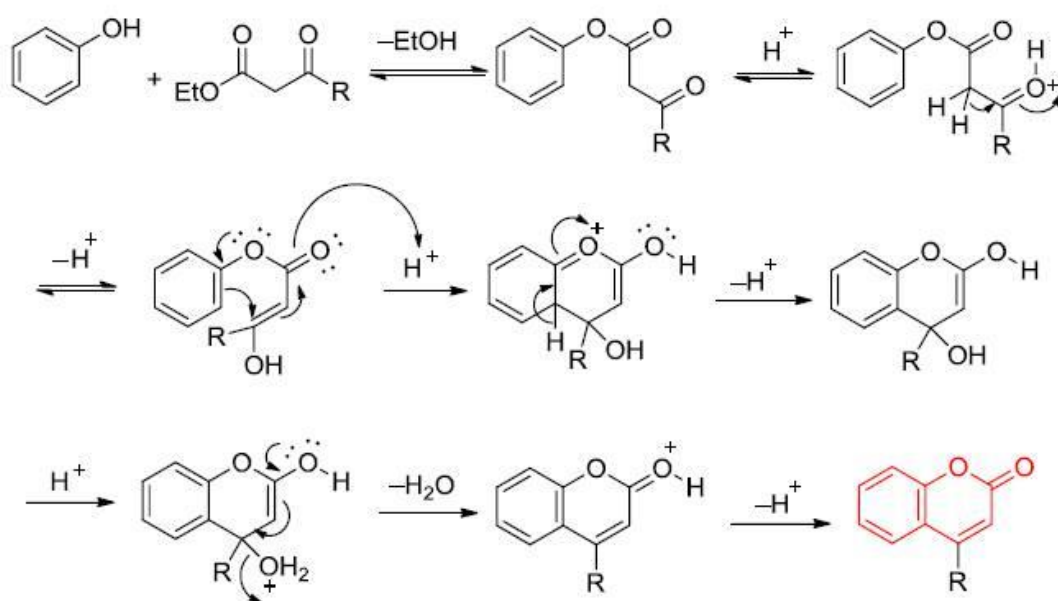


Σχήμα 9. Η αντίδραση Pechmann με καταλύτη θειικό οξύ



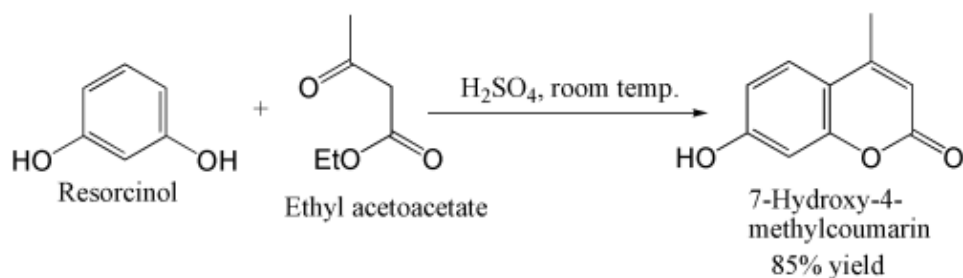
Σχήμα 10. Η αντίδραση Pechmann με καταλύτη  $\text{AlCl}_3$

Γενικά, ο μηχανισμός της αντίδρασης Pechmann περιγράφεται ακολούθως (Σχήμα 11).



Σχήμα 11. Ο μηχανισμός της αντίδρασης Pechmann

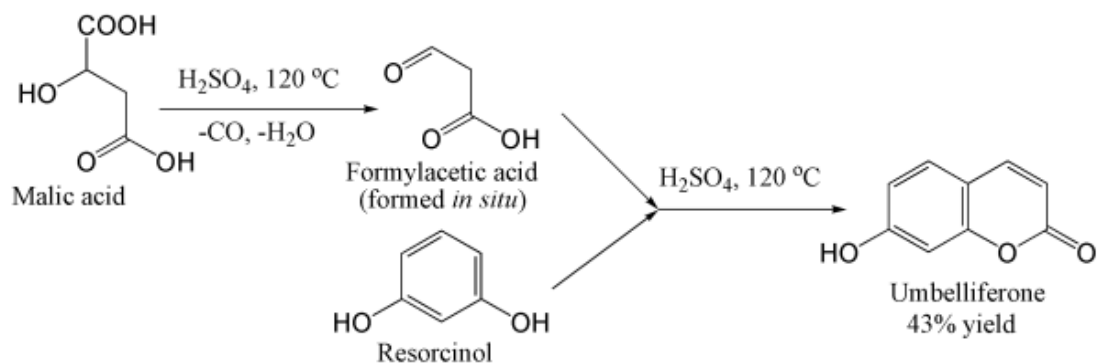
Με εξαιρετικά ενεργοποιημένες φαινόλες, όπως η ρεσορκινόλη, η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί κάτω από πολύ πιο ήπιες συνθήκες. Αυτό εξασφαλίζει μια χρήσιμη οδό για τον σχηματισμό πολλών παραγώγων συμπελιφερόνης (Σχήμα 12).<sup>[11]</sup>



Σχήμα 12. Σχηματισμός ενός παραγώγου της ουμπελιφερόνης

Για κουμαρίνες που είναι μη υποκατεστημένες στην 4-θέση, η μέθοδος απαιτεί την χρήση φορμυλ-ακετοξικού οξέος ή εστέρα. Αυτές είναι ασταθείς ενώσεις και δεν είναι διαθέσιμες στο εμπόριο, αλλά το οξύ μπορεί να παραχθεί επί τόπου από το μηλικό οξύ καιθειικό οξύ άνω των 100 °C. Μόλις σχηματιστεί, το φορμυλο-ακετοξικό οξύ εκτελείται η συμπύκνωση Pechmann.

Στο παράδειγμα που παρουσιάζεται, παράγεται η ίδια η 7-υδροξυ-κουμαρίνη (ουμπελιφερόνη) σε χαμηλή όμως απόδοση (Σχήμα 13).<sup>[11]</sup>



Σχήμα 13. Σχηματισμός της ουμπελιφερόνης

Η αντίδραση Pechmann, που ως κλασική συνθετική πορεία για την παραγωγή κουμαρινών χρησιμοποιεί συνήθως τοθειικό οξύ ως καταλύτη, παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα, όπως είναι ο χρόνος της αντίδρασης, η παραγωγή παραπροϊόντων και οι χαμηλές αποδόσεις σε προϊόν.

Γι' αυτό, έχουν γίνει πολλές προσπάθειες να βρεθούν συνθετικές οδοί ετερογενώς καταλυόμενες και φιλικές προς το περιβάλλον. Η χρήση ετερογενών οξέων ως καταλύτες βελτιώνουν τις συνθήκες λειτουργίας, μειώνουν την διάβρωση του εξοπλισμού, ελαχιστοποιούν την πιθανότητα μόλυνσης και έχουν τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του καταλύτη.

Nafion-H, ζεόλιθος H-BEA, Amberlyst 15 και άλλα στερεά οξέα έχουν χρησιμοποιηθεί με σκοπό να βελτιώσουν την αντίδραση Pechmann.<sup>[14]</sup> Συγκρίνοντας τον καταλύτη Amberlyst 15 με τον ζεόλιθο H-BEA, ο τελευταίος θα μπορούσε πιο εύκολα να αναγεννηθεί, ενώ όταν χρησιμοποιηθεί ο Amberlyst 15 πρέπει η αντίδραση να επιταχύνεται με τη βοήθεια της ακτινοβολίας των μικροκυμάτων.<sup>[15]</sup>

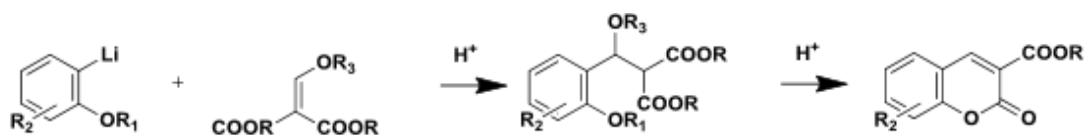
Ένας εναλλακτικός καταλύτης για την αντίδραση Pechmann σε τολουόλιο μπορεί να είναι τα προσφάτως ανεπτυγμένα νανοσύνθετα Nafion ρητίνης / διοξειδίου του πυριτίου. Το καθαρό Nafion είναι ένα ιονομερές, με χημικά ανθεκτικό πολυμερή σκελετό με εξαιρετικά όξινες σουλφονικές ομάδες, ενώ διαθέτει και υδρόφοβες (-CF<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>-), και υδρόφιλες περιοχές (-SO<sub>3</sub>H).<sup>[16],[17]</sup>

Η δραστηριότητα του υλικού αυτού σε διαλύτες ή στην αέρια φάση είναι πολύ χαμηλή, λόγω της πολύ μικρής επιφάνειας. Το γεγονός αυτό έχει περιορίσει τη χρήση του καθαρού Nafion ως καταλύτη. Για να αυξηθεί η προσβασιμότητα των οξέων, νανοσύνθετα Nafion ρητίνης/σίλικας παρήχθησαν με παγίδευση του μεγέθους νανομέτρου Nafion ρητίνης σε ένα εξαιρετικά πορώδες δίκτυο πυριτίου. Τα ανεπτυγμένα νανοσύνθετα Nafion ρητίνης/σίλικας έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές εφαρμογές για να βελτιώσουν την καταλυτική δραστηριότητα και επιλεκτικότητα της αντίδρασης.<sup>[14]</sup>

### 1.3.3 Προσθήκη Michael

Κατά την προσθήκη Michael πραγματοποιείται προσθήκη ο-λιθιο-φαινολικού αιθέρα σε αλκοξυ-μεθυλενικό μηλονικό εστέρα ή αλκοξυ-μεθυλενοακετοξικό εστέρα.

Η κατεργασία με οξύ προκαλεί απομάκρυνση της φαινολικής προστατευτικής ομάδας, λακτονοποίηση και απόσπαση μορίου αλκοόλης προς σχηματισμό οξυγονομένων κουμαρινών (Σχήμα 14).<sup>[18]</sup>

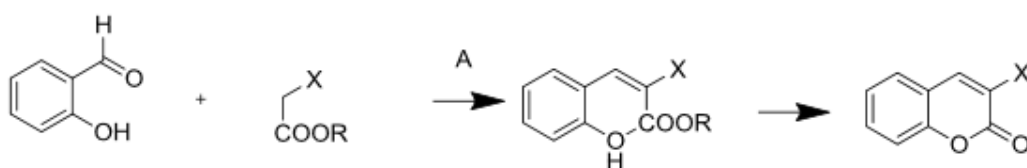


Σχήμα 14. Συμπύκνωση με προσθήκη Michael

### 1.3.4 Αντίδραση Knoevenagel

Η κυκλοσυμπύκνωση ο-υδροξυβενζαλδευδών με δραστικές μεθυλενικές ενώσεις (μηλονικούς εστέρες, κυανοξικούς εστέρες, μηλονονιτρίλια) υπό την παρουσία αμμωνίας ή αμινών, είναι μια αντίδραση γνωστή ως Knoevenagel.

Συνήθως, η αντίδραση καταλύεται από ασθενείς βάσεις ή από κατάλληλους συνδυασμούς των αμινών και καρβοξυλικών ή κατά Lewis οξέων υπό ομοιογενείς συνθήκες (Σχήμα 15).<sup>[19]</sup>



A: Ακτινοβολία

Σχήμα 15. Ο μηχανισμός της αντίδρασης Knoevenagel

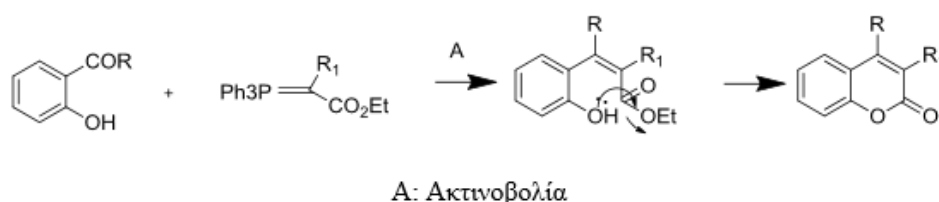
Ένας μεγάλος αριθμός κουμαρινών έχει συντεθεί με τη χρήση αυτής της μεθόδου, όπως είναι οι αμινοκουμαρίνες, οι αλκυλαμινοκουμαρίνες και οι 3-ακετυλο-κουμαρίνες.

Η συνθετική αυτή μέθοδος έχει το πλεονέκτημα ότι λαμβάνει χώρα κάτω από ηπιότερες συνθήκες αντίδρασης σε σχέση με τη μέθοδο Perkin.<sup>[18]</sup>



### 1.3.5 Αντίδραση Wittig

Οι *ορθο*-υδροξυβενζαλδεΐδες αντιδρούν με εστέρες του φωσφορανίου προς σχηματισμό κουμαρινικών παραγώγων (Σχήμα 16). Οι υψηλές αποδόσεις και η έλλειψη παραπροϊόντων, σε συνδυασμό με την απλή κατεργασία των προϊόντων και τις ήπιες συνθήκες της αντίδρασης, την καθιστούν μια πολύ ικανοποιητική μέθοδο σύνθεσης. <sup>[20], [21]</sup>



Σχήμα 16. Ο μηχανισμός της αντίδρασης Wittig

## 1.4 Βιολογική δράση των κουμαρινών

Οι κουμαρίνες αποτελούν μια κατηγορία ενώσεων που βρίσκονται στη φύση και έχουν θεραπευτικές προοπτικές. Από τις πιο απλές κουμαρίνες μέχρι και τις πιο υποκατεστημένες κουμαρίνες, οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία με τα φλαβονοειδή, όλες εμφανίζουν βιολογική δράση που σχετίζεται συνήθως με κάποιο ποσοστό τοξικότητας. <sup>[22], [23]</sup>

Η σκοπολετίνη και η εσκουλετίνη αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα φυσικών κουμαρινών με αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση. <sup>[22]</sup>

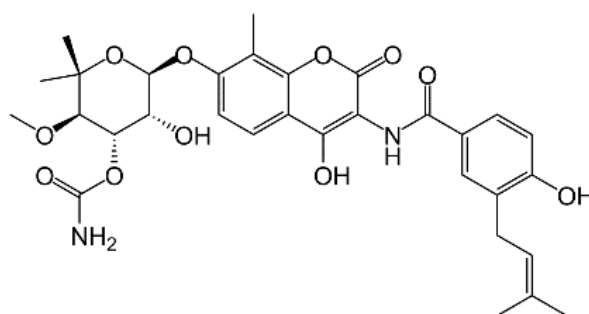
Ακόμη, πολλές κουμαρίνες έχουν προταθεί για χρήση στην κλινική ιατρική λόγω των ανοσορρυθμιστικών ικανοτήτων τους και των βιοχημικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν, όπως η ικανότητά τους να ενεργοποιούν τα μακροφάγα. <sup>[24]</sup> Η κουμαρίνη υποβάλλεται σε κλινικές δοκιμές για την θεραπεία του λεμφοειδήματος που ακολουθεί την θεραπεία του καρκίνου του στήθους, καθώς επίσης εξετάζεται για τη θεραπεία του καρκινώματος του πνεύμονα και των νεφρών. <sup>[25]</sup>

Μεταξύ των βιολογικών δράσεων που έχουν αποδοθεί στις απλές κουμαρίνες και στα ανάλογά τους είναι η αντιμικροβιακή δράση, η αντι-ική δράση, η αντικαρκινική, η

δράση αναστολής ενζύμου, η αντιφλεγμονώδης, η αντιοξειδωτική και η αντιπηκτική δράση. <sup>[1]</sup>

#### 1.4.1 ANTIMΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ

Ο αριθμός των βακτηρίων που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα σε πολλά φάρμακα είναι μεγάλος. Πολλά αντιβιοτικά από κουμαρίνες φυσικής προέλευσης, όπως είναι το Novobiocin <sup>[28]</sup> (Σχήμα 17), που απομονώθηκε από το *Streptomyces niveus*, και το clorobiocin, δρουν ως αναστολείς ενός ενζύμου του DNA, της γυράσης, και έχουν ένα ευρύ φάσμα έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των ανθεκτικών στη μεθυκυλλίνη στελεχών σταφυλόκοκκου (*Staphylococcus aureus*). <sup>[26]</sup>, <sup>[27]</sup>



Σχήμα 17. Η δομή του αντιβιοτικού Novobiocin

Εξαιτίας ορισμένων περιορισμών αυτών των ενώσεων, ιδιαίτερα όσον αφορά την διαλυτότητα και την τοξικότητα, έχει συντεθεί μία νέα σειρά αναλόγων κουμαρίνης. <sup>[1]</sup>

Τα υβρίδια τριαζόλης-κουμαρίνης φαίνεται να έχουν καλύτερη αντιμικροβιακή δράση από φάρμακα, όπως η ενοξακίνη (*enoxacin*) και η χλωρομικίνη (*chloromycin*). <sup>[29]</sup>

Ο δακτύλιος θειαζολιδίνης που βρίσκεται στην πενικιλίνη προσαρμόζεται στην κουμαρίνη για να σχηματίσει 7-(2-υποκατεστημένες φαινυλο-θειαζολιδιν)-βενζοπυραν-2-όνες, ενώσεις με αντιμικροβιακή δράση συγκρίσιμη με την κiproφλοξακίνη (*ciprofloxacin*).

Αντικατάσταση του φαινολικού δακτυλίου από φουρανικό, μειώνει την αντιμικροβιακή δράση, ενώ η υποκατάσταση στην παρα-θέση (p-θέση) του φαινολικού δακτυλίου ενισχύει τη δράση. <sup>[30]</sup>

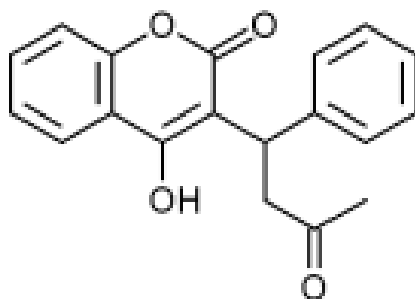
Τα υβρίδια κουμαρίνης-πυραζόλης, οι δι-κουμαρίνες, εμφανίζουν έντονη αντιμικροβιακή δράση ενάντια στα Gram-θετικά βακτήρια *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* και Gram-αρνητικά βακτήρια όπως η σαλμονέλα. <sup>[31]</sup>

### 1.4.2 ANTI-ΪΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Οι ιογενείς λοιμώξεις αποτελούν μεγάλη απειλή για την ανθρώπινη υγεία. Η κλασική θεραπεία περιλαμβάνει χρήση φαρμάκων με διάφορες επιδράσεις. Ετεροκυκλικά μόρια, όπως η ιμιδαζοπυριδίνη, η πουρίνη, η βενζοθειαζόλη και τα νουκλεοσίδιά τους ενωμένα με μόρια κουμαρίνης αποκτούν αντι-ϊικές ιδιότητες. <sup>[32]</sup>

Η αντι-ϊική δραστηριότητα των απλών κουμαρινών εστιάζεται ουσιαστικά στην αναστολή της HIV-1 πρωτεάσης (HIV-PR) και HIV-1 ενσωμάτωσης. Η ανασταλτική δράση των διαφόρων κουμαρινών ως προς την HIV-1 πρωτεάση έχει διερευνηθεί και οι κουμαρίνες αυτές ταξινομούνται σε μια κατηγορία φαρμάκων ως αντι-ϊικοί παράγοντες. <sup>[33], [34]</sup>

Μερικές από αυτές, όπως η βαρφαρίνη (Σχήμα 18) και τα υποκατεστημένα παράγωγα της 4-υδροξυ-2-πυρόνης βρίσκονται στην πρώτη γενιά των αναστολέων HIV-PR. Ορισμένα διμερή κουμαρίνης, επίσης, ιδιαίτερα εκείνα που περιέχουν υδρόφοβες χαρακτηριστικές ομάδες επί του συνδετήρα, εμφανίζουν ισχυρή ανασταλτική δραστηριότητα κατά της HIV-1 ενσωμάτωσης. <sup>[35], [36], [37]</sup>



Σχήμα 18. Η δομή της βαρφαρίνης (warfarin)

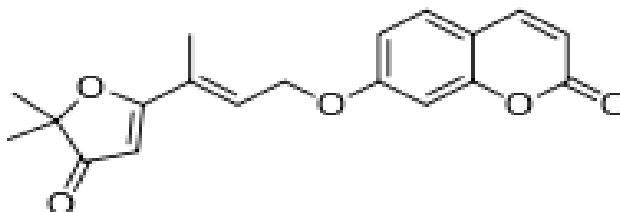
Επιπλέον, μερικά παράγωγα κουμαρίνης εμφανίζουν δραστηριότητα εναντίον του ιού του απλού έρπητα (HSV), ενώ η 5,7,4'-τριυδροξυ-4-στυρυλ-κουμαρίνη έχει βρεθεί ότι παρουσιάζει σημαντική αντι-ϊική δράση. <sup>[38], [39]</sup>

### 1.4.3 ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Τα αντικαρκινικά φάρμακα, επειδή είναι κυτταροτοξικά, έχουν πολύπλευρες επιπτώσεις για τους κανονικά πολλαπλασιαζόμενους ιστούς, όπως το αιμοποιητικό σύστημα.<sup>[40], [41]</sup>

Ο συνδυασμός χημειοθεραπείας, ραδιοθεραπείας και εγχείρισης φαίνεται να αντιμετωπίζει σε ικανοποιητικό βαθμό τις διάφορες μορφές καρκίνου. Ωστόσο γίνεται αναζήτηση για φυσικές ενώσεις με αντικαρκινική δράση.<sup>[22]</sup>

Οι κουμαρίνες ανήκουν στις φυτοχημικές ενώσεις που έχουν την τάση όχι μόνο να θεραπεύουν τον καρκίνο αλλά και να μειώνουν τις επιπτώσεις που προκύπτουν από τη ραδιοθεραπεία.<sup>[42]</sup> Μεταξύ των κουμαρινών που έχουν αντικαρκινική δράση, η πιο αντιπροσωπευτική είναι η geiparvarin (Σχήμα 19), μια φυσική κουμαρίνη που απομονώθηκε από τα φύλλα του φυτού *Geijera parviflora* Lindl με κυτταροστατική δράση.<sup>[43]</sup>



Σχήμα 19. Η δομή της κουμαρίνης geiparvarin

Η 4-υδροξυ-κουμαρίνη φαίνεται να είναι, επίσης, μια ένωση χρήσιμη για την θεραπεία του μελανώματος. Γενικά, έχει αποδειχτεί ότι οι υδροξυκουμαρίνες με την προσθήκη μιας νιτρο-ομάδας(-NO<sub>2</sub>) στον αρωματικό δακτύλιο αποκτούν επιλεκτικές και αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες που μεσολαβούν σε απόπτωση του καρκινώματος των νεφρικών κυττάρων, μέσω της διαφοροποίησης των ενεργοποιημένων πρωτεϊνών, κινασών.

Η δράση των απλών κουμαρινών κατά της μεταλλαξιγένεσης συνδέεται άμεσα με την παρουσία πολικών ατόμων άνθρακα στις θέσεις 3, 4 και 7.<sup>[44]</sup>

#### **1.4.4 ΔΡΑΣΗ ΩΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΕΝΖΥΜΩΝ**

Οι αναστολείς της μονοξειδάσης, μιας οικογένειας ενζύμων που καταλύουν την οξείδωση των μονοαμινών, χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία μερικών νόσων όπως η κατάθλιψη, η νόσος του Alzheimer και η νόσος του Parkinson. Οι μη εκλεκτικοί και μη αναστρέψιμοι αναστολείς έχουν τον κίνδυνο πρόκλησης υπερτασικών κρίσεων, ενώ οι εκλεκτικοί αναστολείς μπορεί να προκαλέσουν αναταραχή, παραισθήσεις, υπερπυρεξία και σπασμούς. [45], [46]

Ορισμένα φυσικά και συνθετικά παράγωγα υποκατεστημένων κουμαρινών, όπως είναι οι 3-φαινυλο-κουμαρίνες, χρησιμοποιούνται ως επιλεκτικοί και ασφαλείς παράγοντες για την αναστολή των MAO. Το 3',5'-διμεθοξυ-φαινυλο-παράγωγο εμφανίζει την καλύτερη δράση ως αναστολέας, ενώ αύξηση του αριθμού των μεθοξυ-ομάδων μειώνουν τη δράση. Τα αιθερικά ανάλογα επιδεικνύουν MAO-B επιλεκτικότητα, και τα σουλφονικά παράγωγα εστέρα παρουσιάζουν MAO-A επιλεκτικότητα. [47]

Για την αναστολή ενζύμων όπως είναι οι κυκλικές φωσφοδιεστεράσες AMP, η β-γλυκοσιδάση, η β-γλυκουρονιδάση, η 5-λιποξυγονάση και οι κινάσες χρησιμοποιούνται υποκατεστημένες κουμαρίνες που φέρουν τουλάχιστον μία ομάδα υδροξυλίου. [48], [49]

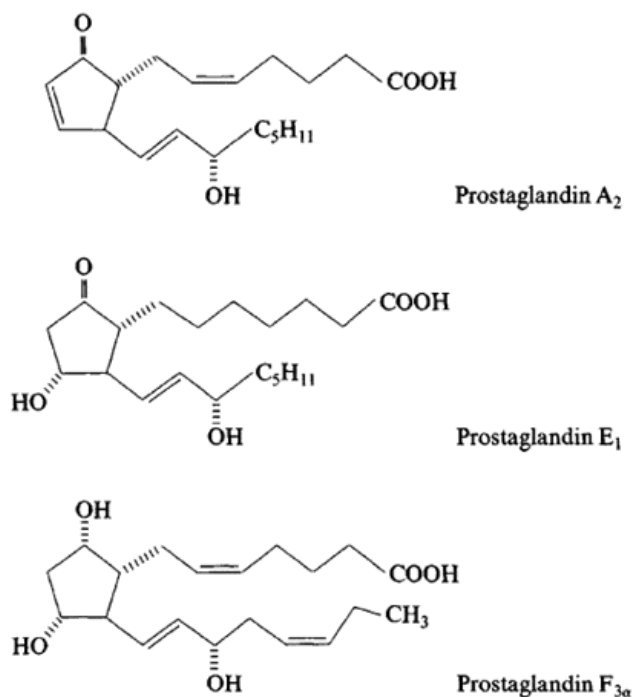
#### **1.4.5 ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΔΡΑΣΗ**

Η φλεγμονή είναι μια παθοφυσιολογική κατάσταση που περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό ασθενειών. Ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα αποτελεί η καρκινογένεση και η ισχαιμία που συμβαίνει στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

Τα φλεγμονώδη κύτταρα, όπως τα λευκοκύτταρα, ενεργοποιούνται με την έναρξη της ισχαιμίας και συσσωρεύονται στον εγκέφαλο που θα τα κατευθύνει στην φλεγμονώδη περιοχή. [50], [51]

Οι κουμαρίνες θεωρούνται μη στεροειδείς ενώσεις που μπορούν να λειτουργήσουν ως αντιφλεγμονώδεις παράγοντες. Ιδιαίτερα αν είναι υποκατεστημένες στους άνθρακες C4 και C7 μπορούν να αναστέλλουν τη βιοσύνθεση των προσταγλανδινών.

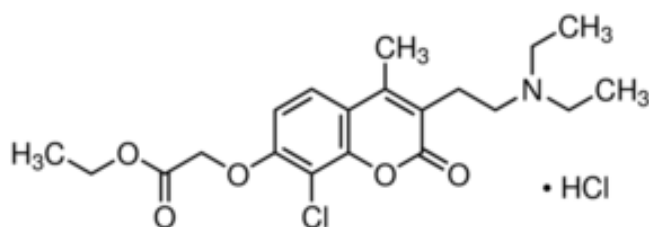
Οι προσταγλανδίνες (prostaglandins, PGs) αποτελούν μια κατηγορία ακόρεστων λιπαρών οξέων με είκοσι άτομα άνθρακα που συμμετέχουν στις διαδικασίες φλεγμονής. [52]



Εικόνα 2. Μερικά παραδείγματα προσταγλανδίνων

Έχει αποδειχτεί ότι πολλά παράγωγα κουμαρινών που εμπεριέχουν στο μόριό τους καρβονυλική ομάδα παρουσιάζουν αξιόλογη αντιφλεγμονώδη συμπεριφορά. <sup>[53]</sup>

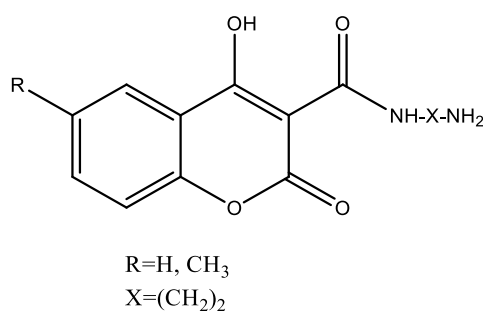
Επίσης, οι κουμαρίνες έχουν χρησιμοποιηθεί ως αναστολείς της λιποξυγονάσης και της κυκλοοξυγονάσης κατά τον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος που βρίσκεται στα φωσφολίπδια της κυτταρικής μεμβράνης. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αντιφλεγμονώδους φαρμάκου αποτελεί η cloricromene (Σχήμα 20) και τα ανάλογα της ένωσης που έχουν αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση. <sup>[54]</sup>



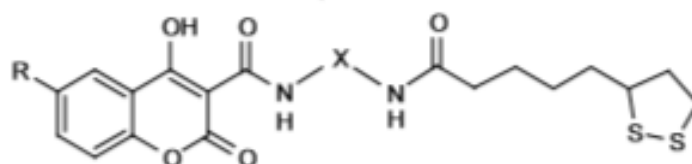
Σχήμα 20. Η δομή της cloricromene

Συχνά η αντιφλεγμονώδης δράση των κουμαρινών «συνυπάρχει» με την αντιοξειδωτική δράση, καθώς οι ελεύθερες δραστικές ρίζες παράγονται από τα μακροφάγα κατά τη φλεγμονώδη διαδικασία. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) εμπλέκονται στην μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε προ-αντιφλεγμονώδη ενδιάμεσα.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα κουμαρινών με αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση είναι τα κουμαρινικά αμινοαμίδια (Σχήμα 21) και τα υβριδικά παράγωγα που συνδυάζουν το μόριο της κουμαρίνης και του φυσικού αντιοξειδωτικού λιποϊκού οξύ σε ένα μόριο (Σχήμα 22).<sup>[55]</sup>



Σχήμα 21. Κουμαρινικό παράγωγο με αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση



Σχήμα 22. Υβριδικό παράγωγο κουμαρίνης και λιποϊκού οξέος

Η πλειοψηφία των αναστολέων λιποξυγονάσης είναι αντιοξειδωτικά ή σαρωτές ελευθέρων ριζών, καθώς η λιποοξυγονώση συμβαίνει μέσω της ρίζας του κεντρικού ατόμου άνθρακα.

Οι αναστολείς αυτοί περιέχουν «μη αιμικό» σίδηρο ανά μόριο στη δραστική θέση του ενζύμου, ως υψηλού σπιν Fe<sup>2+</sup> σε φυσική κατάσταση και ως Fe<sup>3+</sup> στην ενεργοποιημένη κατάσταση. Φαίνεται ότι υπάρχει κάποια σχέση ανάμεσα στους αναστολείς της λιποξυγονάσης και στην ικανότητά τους να μειώνουν το Fe<sup>3+</sup> σε Fe<sup>2+</sup>.<sup>[56]</sup>

#### 1.4.6 ANTIOΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Οι δραστικές ρίζες είναι μια ομάδα ασταθών ενώσεων που μπορεί είτε να παράγονται φυσιολογικά σε χαμηλά ή μέτρια επίπεδα, είτε να είναι αποτέλεσμα κάποιας φλεγμονής ή άλλων παθολογικών καταστάσεων. <sup>[57]</sup>

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS) αναγνωρίζονται ως τα σημαντικότερα δραστικά είδη που παράγονται σε βιολογικά συστήματα. Περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια, των οποίων ενδογενείς πηγές παραγωγής είναι τα μιτοχόνδρια, το σύστημα του κυτοχρώματος P450 και η οξειδάση ξανθίνης (XO).

Τα μιτοχόνδρια είναι σημαντικές πηγές του υπεροξειδίου του υδρογόνου και του ανιόντος υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ). <sup>[58]</sup>

Μεταξύ των διαφόρων δραστικών ειδών, το ανιόν υπεροξειδίου θεωρείται το πρωτογενές ROS, αφού μπορεί να αλληλεπιδράσει με άλλα μόρια που παράγουν δευτερογενή ROS, σύμφωνα με την αντίδραση που καταλύεται από SOD:



Είναι γνωστό ότι άλλα ένζυμα, όπως η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) ενεργούν μαζί με τα ένζυμα SOD, για να καταναλώνουν τα τμήματα του υπεροξειδίου του υδρογόνου. <sup>[59], [60]</sup>

Πολύ δραστικές ελεύθερες ρίζες και είδη οξυγόνου βρίσκονται σε βιολογικά συστήματα και μπορούν να οξειδώσουν νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες, λιπίδια ή DNA. Το κύριο χαρακτηριστικό ενός αντιοξειδωτικού είναι η ικανότητά του να αμύνεται στη δράση των ελευθέρων ριζών. Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις, όπως είναι τα φαινολικά οξέα, οι πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή «σαρώνουν» τις ελεύθερες ρίζες, όπως το υπεροξείδιο, το υδροϋπεροξείδιο ή λιπίδιο υπεροξυλίου και έτσι αναστέλλουν τους οξειδωτικούς μηχανισμούς που οδηγούν σε εκφυλιστικές ασθένειες. <sup>[61]</sup>

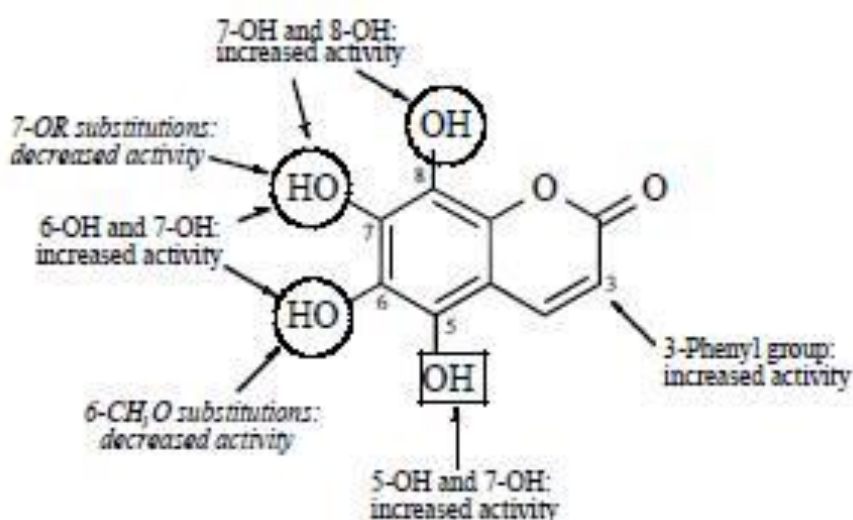
Συγκεκριμένα, οι κουμαρίνες μειώνουν τον σχηματισμό και διεγείρουν τη σάρωση δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS: Reactive Oxygen Species), εκδηλώνοντας έτσι προστατευτικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Η δράση των κουμαρινών ως σαρωτών ελευθέρων ριζών εξαρτάται από την ύπαρξη υδροξυλίων στον κουμαρινικό δακτύλιο. Η θέση και το είδος των υποκαταστατών που συνδέονται στο μόριο με τον αρωματικό δακτύλιο της κουμαρίνης έχουν μεγάλη επίδραση στην αντιοξειδωτική ικανότητα των ενώσεων. <sup>[62]</sup>



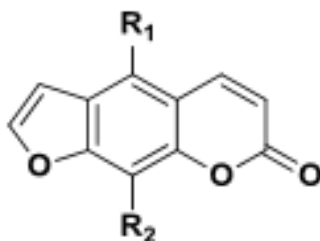
Στο μόριο της διϋδροξυ-4-μεθυλοκουμαρίνης (DHMC), η θέση των δύο ομάδων υδροξυλίου (OH) επηρεάζει σημαντικά την αντιοξειδωτική της δράση. Συγκεκριμένα, όταν ο υποκαταστάτης OH βρίσκεται σε *όρθο*-θέση στο μόριο της DHMC, η κουμαρίνη αποκτά ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση, σε σύγκριση με τα ανάλογα της ίδιας κουμαρίνης που είναι υποκατεστημένα στη θέση *μέτα* (**Εικόνα 3**).

Αυτό συμβαίνει λόγω της αυξημένης σταθερότητας των κατεχολικών ριζών στην *όρθο* θέση. Οι κουμαρίνες χωρίς κατεχολικό κομμάτι αναφέρονται ως ασθενή αντιοξειδωτικά. [63]



Εικόνα 3. Η αντιοξειδωτική δραστηριότητα των κουμαρινών ανάλογα με τη θέση του υποκαταστάτη

Μερικά παράγωγα κουμαρινών (Σχήμα 23) εμφανίζουν καλή αντιοξειδωτική δράση, αφού ασκούν προστατευτική επίδραση έναντι της λιπιδικής υπεροξειδωσης, η οποία είναι μια αυτοκαταλυόμενη αλληλεπίδραση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων με μοριακό οξυγόνο.



Σχήμα 23. Παράγωγα κουμαρινών με αντιοξειδωτική δράση

Επίσης, ορισμένα διϋδροξυ παράγωγα κουμαρινών, όπως η εσκουλετίνη και η 4-μεθυλο-εσκουλετίνη (Σχήμα 24), εμφανίζουν παρόμοια αντιοξειδωτική δράση με τις πρότυπες ουσίες, όπως τη βιταμίνη C.



Σχήμα 24. Κουμαρινικά παράγωγα με αντιοξειδωτική δράση παρόμοια με αυτή της βιταμίνης C

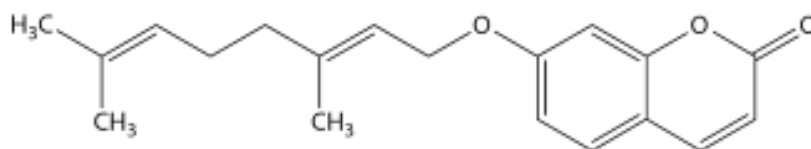
## 1.5 Γερανυλοξυ-κουμαρίνες

Η αλκυλίωση αποτελεί χημική ή ενζυμική προσθήκη μιας υδρόφοβης ομάδας σε μόρια, όπως είναι οι αρωματικές ενώσεις και οι πρωτεΐνες. Ιδιαίτερα, η αλκυλίωση των αρωματικών δευτερογενών μεταβολιτών παίζει σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση πολλών μορίων με αξιόλογες βιολογικές δράσεις.

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που έχουν πρενυλιωθεί από οξέα θεωρούνται για δεκαετίες ως «βιοσυνθετικά ενδιάμεσα» των πρενυλιωμένων στον άνθρακα ενώσεων. Τρεις είναι οι τύποι των πρενυλιωμένων σκελετών άνθρακα που έχουν ταυτοποιηθεί: C<sub>5</sub> (isopentenyl), C<sub>10</sub> (geranyl), C<sub>15</sub> (farnesyl).

Οι ισοπεντενυλοξυ- και οι γερανυλοξυ-αλυσίδες βρίσκονται σε αφθονία στη φύση. <sup>[64]</sup>

Το πρώτο παράδειγμα πρενυλιωμένου δευτερογενή μεταβολίτη αποτελεί η ωραπτίνη ή γερανυλοξυ-κουμαρίνη (auraptene) που απομονώθηκε το 1930 από το φυτό *Citrus aurantium L.* (Rutaceae) και η δομή της αποδόθηκε από τους Kariyone και Matsuno (Σχήμα 25). <sup>[65]</sup>



Σχήμα 25. Δομή της auraptene

Οι φαρμακολογικές δράσεις της ωραπτένης αναφέρονται βιβλιογραφικά από το 1991<sup>[66]</sup> και μέχρι σήμερα, πάνω από 300 οξυπρενυλιωμένα παράγωγα που έχουν συντεθεί ή απομονωθεί παρουσιάζουν ενδιαφέρουσα βιολογική συμπεριφορά.

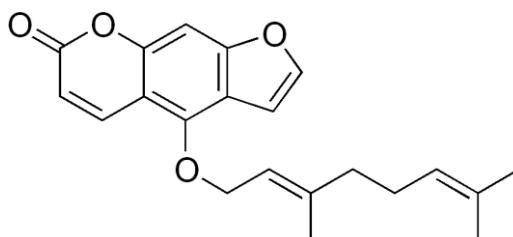
Συγκεκριμένα, η ωραπτένη αποτελεί χημειοπροστατευτικό παράγοντα κατά του δέρματος, της γλώσσας, του οισοφάγου και της καρκινογένεσης του παχέος εντέρου σε τρωκτικά.<sup>[67]</sup>

Η αποτοξίνωση και η αποβολή των καρκινογόνων ουσιών αποτελούν τις σημαντικότερες λειτουργίες της ένωσης για την πρόληψη της καρκινογένεσης. Επιταχύνοντας τη δράση του μεταβολισμού και των ενζύμων, όπως είναι η S-τρανσφεράση γλουταθειόνης, η ωραπτένη εμποδίζει την μετάλλαξη των καρκινικών κυττάρων.<sup>[68]</sup>

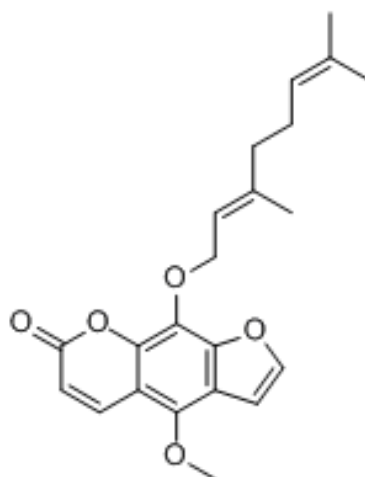
Καθώς η φλεγμονή αποτελεί φυσιολογική απόκριση κατά την καρκινογένεση, η αντιφλεγμονώδης δράση της ωραπτένης έχει αποδειχτεί *in vivo* και *in vitro*.<sup>[69]</sup> Πολλοί παράγοντες φλεγμονής που παράγονται από τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα οδηγούν στην εκδήλωση «διαμεσολαβητών» φλεγμονής, όπως είναι η συνθάση νιτρικού οξειδίου και η 2-κυκλοοξυγονάση. Η κυκλοοξυγονάση εκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα και επιταχύνει τον πολλαπλασιασμό τους.

Η ωραπτένη προκαλεί ισχυρή καταστολή της έκφρασης της επαγόμενης συνθάσης και της 2-κυκλοοξυγονάσης, μειώνοντας τις προσταγλανδίνες E<sub>2</sub> και τον καρκινικό παράγοντα νέκρωσης α<sup>2</sup>.<sup>[70]</sup>

Ενδιαφέρον από βιολογικής άποψης παρουσιάζουν και οι γερανυλοξυφουρανοκουμαρίνες, όπως είναι η bergamottin (Σχήμα 26) και το 8-γερανυλοξυψωραλλένιο (Σχήμα 27), οι οποίες αντιδρούν με τα κυτοχρώματα P450 2B6 και P450 3A5, τα οποία τελικά μεταβολίζουν την γερανυλοξυ-αλυσίδα και αναστέλλεται η δράση τους.<sup>[71]</sup>

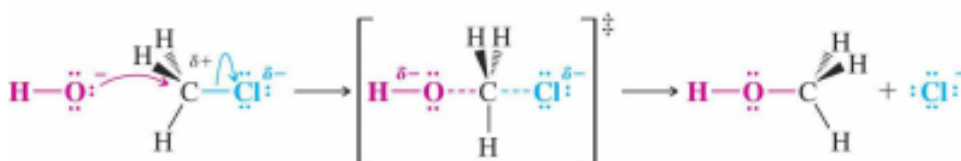


Σχήμα 26. Δομή της bergamottin



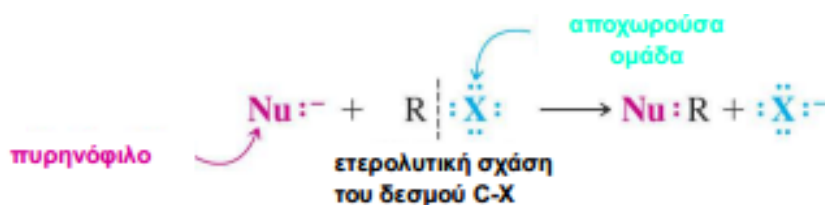
Σχήμα 27. Δομή της 8-geranyloxy-psoralen

Ως αιθέρας, η 7-γερανυλοξυ-κουμαρίνη και τα παράγωγά της μπορούν να συντεθούν χημικά μέσω της αντίδρασης Williamson. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, ένα αλκοξείδιο μετάλλου αντιδρά με ένα πρωτοταγές αλκυλαλογονίδιο ή ένα τοσυλεστέρα, μέσω μηχανισμού S<sub>N</sub>2 (Σχήμα 28).<sup>[72]</sup>



Σχήμα 28. Αντίδραση πυρηνόφιλης υποκατάστασης - Μηχανισμός S<sub>N</sub>2

Οι αντιδράσεις S<sub>N</sub>2 πραγματοποιούνται σε ένα στάδιο, χωρίς ενδιάμεσα, όπου το εισερχόμενο πυρηνόφιλο προσβάλλει το υπόστρωμα από μία κατεύθυνση ακριβώς αντίθετη από εκείνη της αποχωρούσας ομάδας. Καθώς το πυρηνόφιλο πλησιάζει από την μία πλευρά του μορίου και συνδέεται με τον άνθρακα, το ανιόν του αλογόνου αποχωρεί από την άλλη πλευρά, με συνέπεια να αναστρέφεται η στερεοχημική απεικόνιση του μορίου (Σχήμα 28).<sup>[73]</sup>



Σχήμα 29. Παράδειγμα πυρηνόφιλης υποκατάστασης

Κατά τη σύνθεση αιθέρα με τη μέθοδο Williamson, η αντίδραση τίθεται σε κίνηση με την επίθεση από την πίσω πλευρά του πυρηνόφιλου. Αυτό προϋποθέτει ότι το πυρηνόφιλο και το ηλεκτρόφιλο είναι αντιδιαμετρικά.<sup>[74]</sup>

Τα αλκοξειδία που απαιτούνται σε μια σύνθεση Williamson παρασκευάζονται συνήθως από την αντίδραση αλκοολών με ισχυρές βάσεις, όπως το υδρίδιο του νατρίου (NaH). Μεταξύ αλκοόλης και υδριδίου του νατρίου λαμβάνει χώρα αντίδραση οξέος-βάσης προς σχηματισμό του άλατος με νάτριο της αλκοόλης.



Σε μια χρήσιμη παραλλαγή της σύνθεσης Williamson χρησιμοποιείται οξειδίο του αργύρου (Ag<sub>2</sub>O) ως βάση, αντί του υδριδίου του νατρίου. Υπό τις συνθήκες αυτές, η ελεύθερη αλκοόλη αντιδρά απευθείας με το αλκυλαλογονίδιο και δεν χρειάζεται να σχηματιστεί εκ των προτέρων το αλκοξειδίο του μετάλλου.<sup>[72]</sup>

Ως καταλύτες χρησιμοποιούνται επίσης ο χλωριούχος μόλυβδος και το βιομηχανικό θειϊκό οξύ που οδηγούν στη σύνθεση συμμετρικών αιθέρων, ενώ η χρήση νικελίου σε σίλικα βοηθά στη σύνθεση αιθέρων με μικρές αποδόσεις.<sup>[74]</sup>

Με την κατάλληλη επιλογή των αντιδραστηρίων μπορούν να συντεθούν συμμετρικοί και ασύμμετροι αιθέρες. Για την παρασκευή δευτεροταγών και τριτοταγών αλκυλοαιθέρων χρησιμοποιούνται τα αλκοξειδία δευτεροταγών αλκοολών που παρασκευάζονται συνήθως με κάλιο. Η σύνθεση αιθέρων από δυο αλδεϋδες ή κετόνες και πρωτοταγείς ή δευτεροταγείς αλκοόλες γίνεται με καταλύτη Pd/C.<sup>[75]</sup>

Σε μια σύνθεση αιθέρων, τα πρωτοταγή αλκυλαλογονίδια και οι τοσυλεστέρες είναι τα καλύτερα υποστρώματα, επειδή με περισσότερο στερεοχημικά παρεμποδισμένα υποστρώματα, μπορεί να λάβει χώρα ανταγωνιστική απόσπαση της ομάδας HX με μηχανισμό E2.

Οι μη συμμετρικοί αιθέρες παρασκευάζονται με αντίδραση του περισσότερο παρεμποδισμένου αλκοξειδίου και του λιγότερο παρεμποδισμένου αλκυλαλογονιδίου.<sup>[72]</sup>

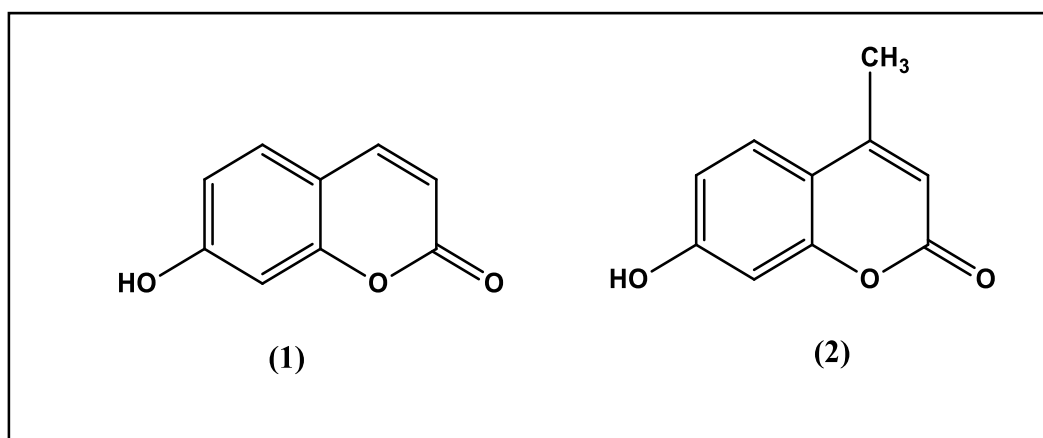
# ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ, ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

## 2.1 Σχεδιασμός των ενώσεων

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε με στόχο την σύνθεση 7-γερανυλοξυ-κουμαρινών, οι οποίες θα εξεταστούν για πιθανή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.

Για τον σχεδιασμό και την σύνθεση των κουμαρινικών αναλόγων χρησιμοποιήθηκαν οι ενώσεις **1**, **2** (Σχήμα 30) ως ενώσεις-οδηγοί. Η ένωση **1** αντιστοιχεί στην 7-υδροξυ-κουμαρίνη ή αλλιώς ουμπελιφερόνη και η ένωση **2** αντιστοιχεί στην 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη.

Οι ενώσεις αυτές αποτελούν μέρος της τρέχουσας ερευνητικής δραστηριότητας του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ΕΜΠ, και εμφανίζουν αξιόλογη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, όπως αυτή εκφράζεται με την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια.



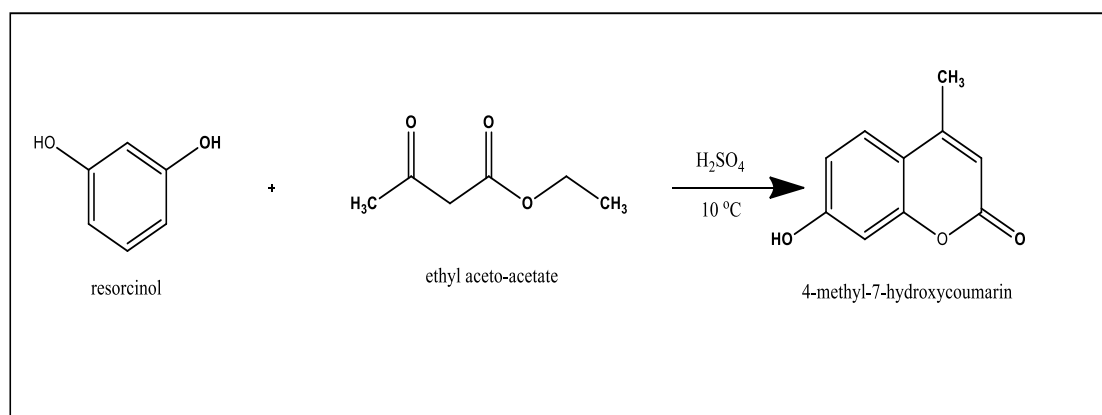
Σχήμα 30. Κουμαρινικά ανάλογα με αξιόλογη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης και έπειτα με αλκυλίωση αυτής και της 7-υδροξυ-κουμαρίνης σχηματίστηκαν οι γερανυλοξυ-κουμαρίνες:

➤ *Σύνθεση της 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης (2) μέσω της αντίδρασης Pechmann*

Η σύνθεση της 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης πραγματοποιείται μέσω συμπύκνωσης της ρεσορκινόλης με τον ακετοξικό αιθυλεστέρα υπό την επίδραση πυκνού θειϊκού οξέος, σύμφωνα με την αντίδραση Pechmann (Σχήμα 31).

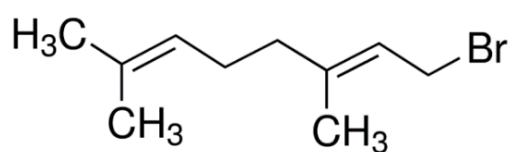
Η αντίδραση ξεκινάει με ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση στη φαινόλη και συγκεκριμένα σε ο-θέση ως προς το υδροξύλιο, από τον άνθρακα της καρβονυλικής ομάδας του β-κετοεστέρα, προς σχηματισμό των ενδιάμεσων. Ακολουθεί λακτονοποίηση με απόσπαση νερού και αιθανόλης, για τον σχηματισμό του κουμαρινικού συστήματος



Σχήμα 31. Συνθετική πορεία της 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης (2)

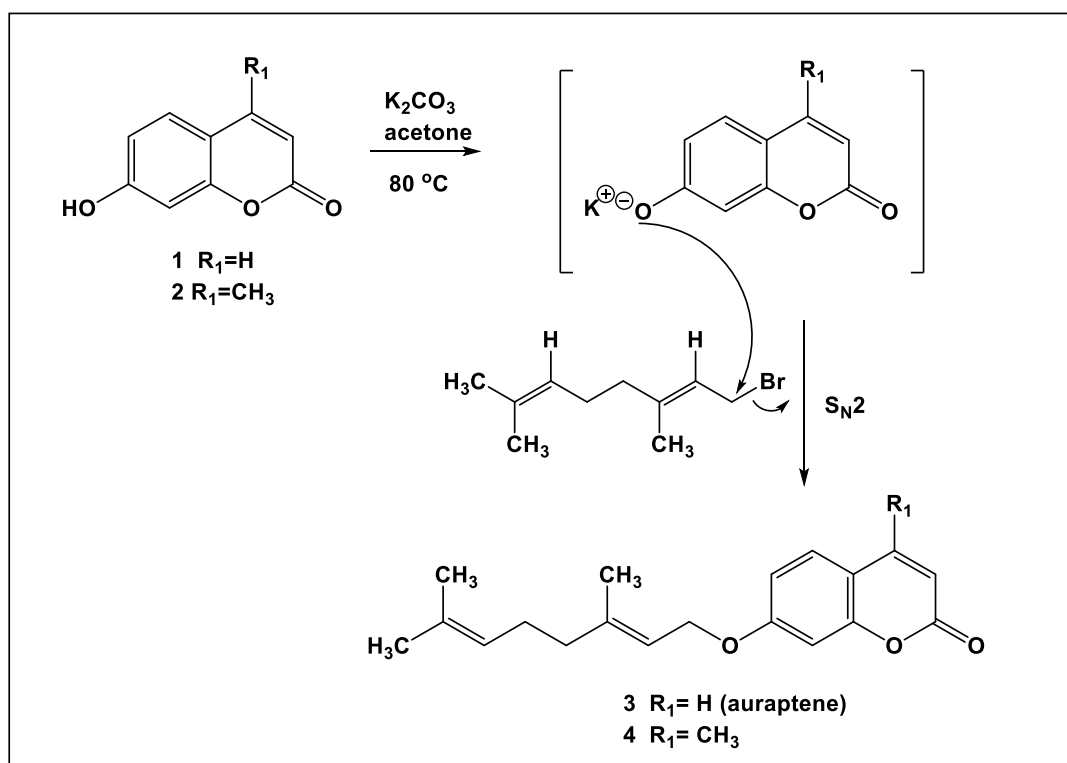
➤ *Σύνθεση των γερανυλοξυ-κουμαρινών*

Η σύνθεση των δύο γερανυλοξυ-κουμαρινών **3** και **4** πραγματοποιείται μέσω της αντίδρασης Williamson, με μηχανισμό S<sub>N</sub>2 ενός σταδίου. Η κατάλληλη κουμαρίνη **1** και **2** αντιδράει με το γερανυλο-βρωμίδιο (Σχήμα 32) σε βασικό περιβάλλον.



Σχήμα 32. Δομή του geranyl bromide

Συγκεκριμένα, το όξινο υδρογόνο του φαινολικού υδροξυλίου αντιδρά με τη βάση  $\text{K}_2\text{CO}_3$  και σχηματίζεται το ανιόν φαινοξειδίου το οποίο προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του βρωμιδίου με αποτέλεσμα τον σχηματισμό του αιθερικού προϊόντος (μηχανισμός  $\text{S}_{\text{N}}2$ ). Η αντίδραση παρουσιάζεται συνοπτικά ακολούθως (Σχήμα 33) :



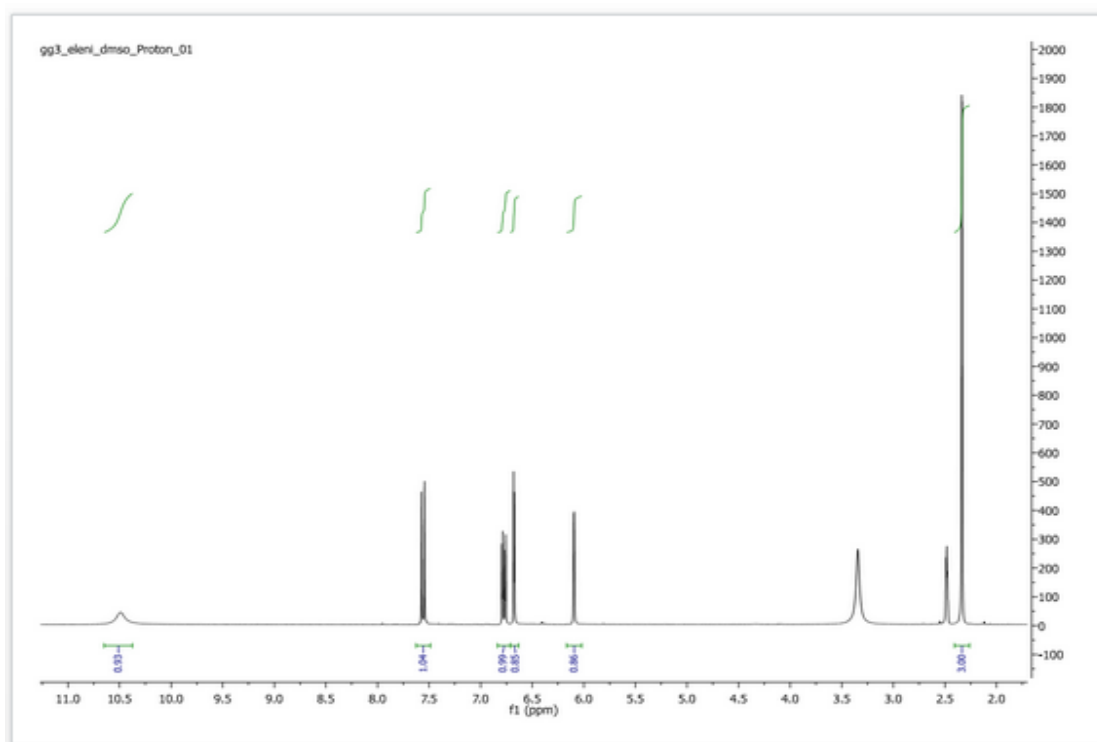
Σχήμα 33. Συνθετική πορεία των γερανυλοξυ-κουμαρινών



## 2.2 Φασματοσκοπική Μελέτη

Η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός της δομής των παραγόμενων ενώσεων πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία NMR ( $^1\text{H}$  NMR), τα οποία ελήφθησαν στο Φασματογράφο NMR Varian 300 MHz του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

### 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη (2)



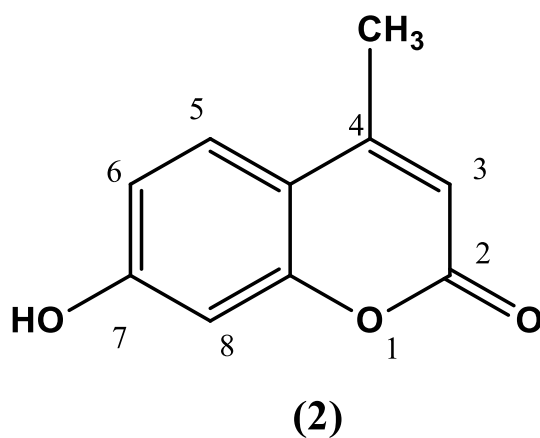
Εικόνα 4. Φάσμα πρωτονίου  $^1\text{H}$  NMR (300MHz, DMSO- $d_6$ ) της κουμαρίνης 2

Στην Εικόνα 4 παρουσιάζεται το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της κουμαρίνης 2 (Σχήμα 34) σε διαλύτη δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO -  $d_6$ ).

Το φάσμα αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας απλής κορυφής (s, 1H, OH) στα 10,49 ppm που οφείλεται στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 7 του βενζοπυρανικού δακτυλίου. Άλλη μια απλή κορυφή (s, 1H, H-3) παρουσιάζεται στα 6,09 ppm και οφείλεται στο πρωτόνιο της θέσης 3 του δακτυλίου, ενώ επίσης χαρακτηριστική είναι η απλή κορυφή (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) στα 2,34 ppm λόγω της παρουσίας

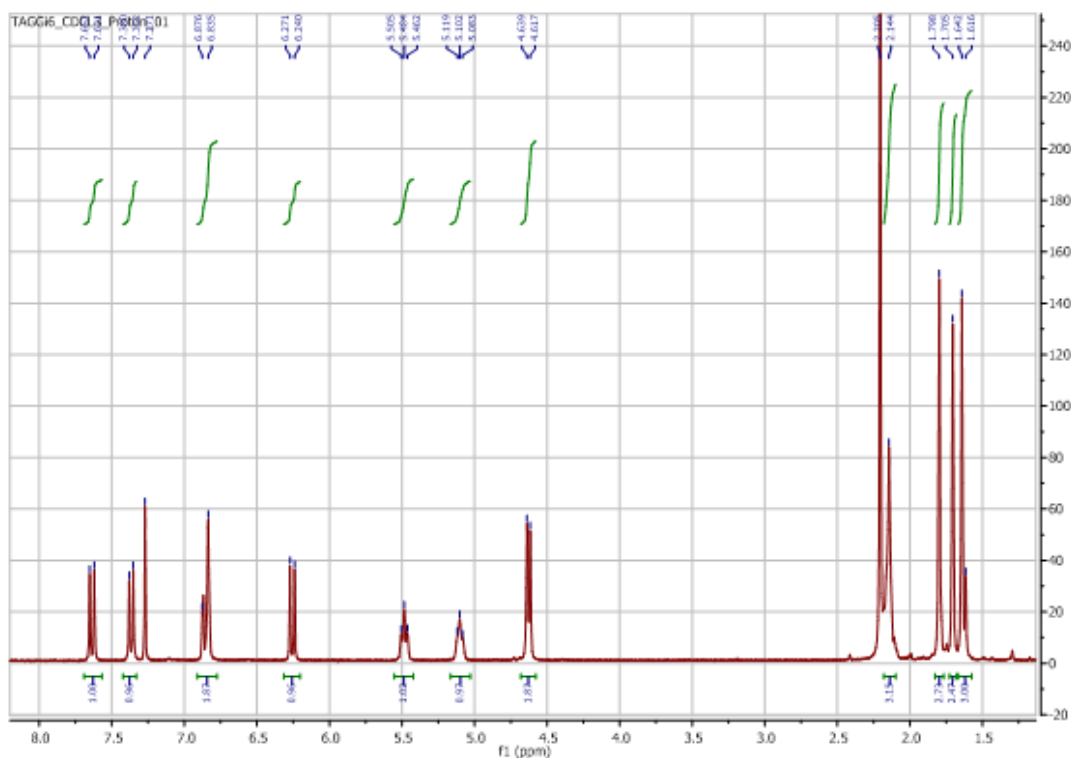
των τριών πρωτονίων της μεθυλο-ομάδας στην θέση 4 του μορίου. Ακόμη, δύο διπλές κορυφές παρουσιάζονται στα 7,55 ppm (d,  $J=8,7$  Hz, H-5) και στα 6,68 ppm (d,  $J=2,4$  Hz, H-3), η πρώτη οφείλεται στο πρωτόνιο της θέσης 5 του μορίου και η δεύτερη οφείλεται στην παρουσία του πρωτονίου στη θέση 8.

Υπάρχει επίσης μια κορυφή στα 6,77 ppm (dd,  $J=8,7$  Hz,  $J=2,4$  Hz, H-6) που οφείλεται στο πρωτόνιο στην θέση 6 της ένωσης **2**.



Σχήμα 34. 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**2**)

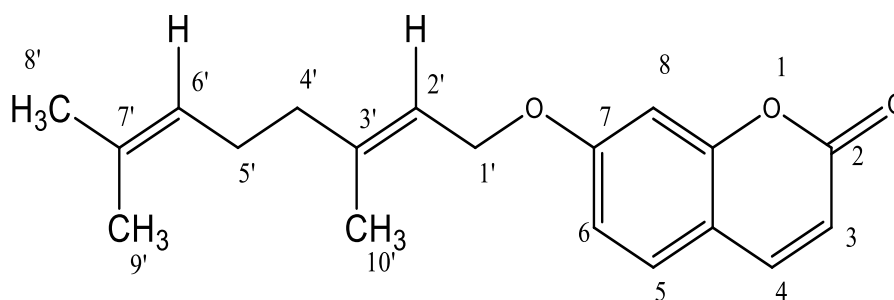
### 7-γερανυλοξο-κουμαρίνη (3)



Εικόνα 5. Φάσμα πρωτονίου  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) της κουμαρίνης **3**

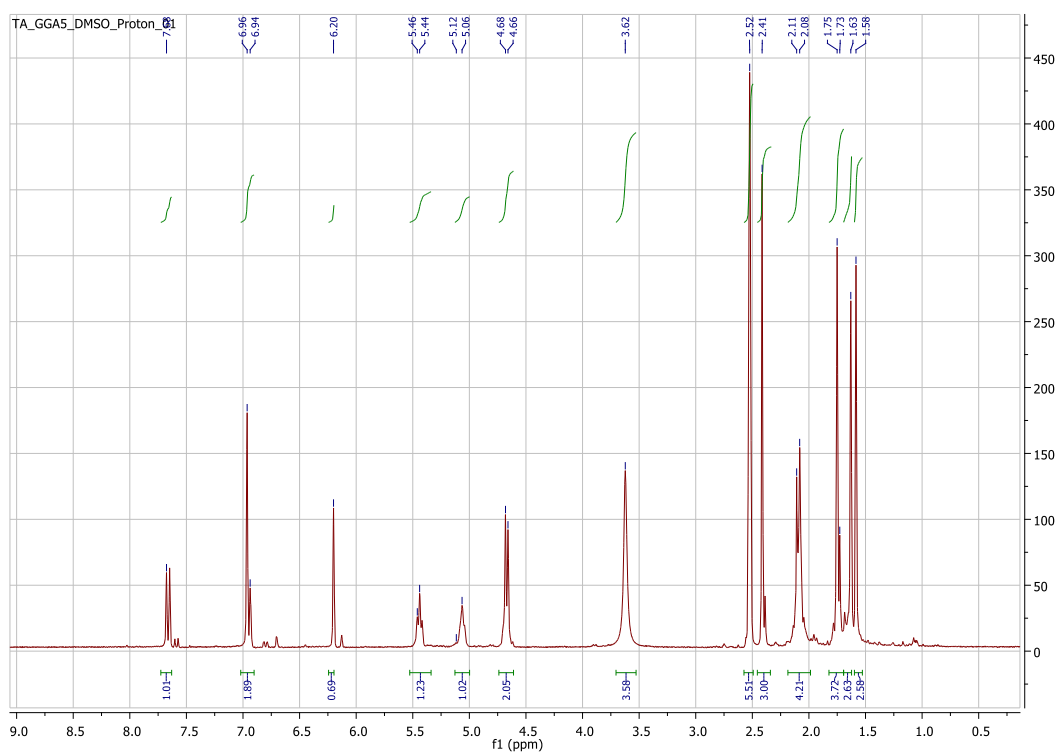
Στην Εικόνα 5 παρουσιάζεται το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της κουμαρίνης **3** (Σχήμα 35) σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ( $\text{CDCl}_3$ ).

Το φάσμα αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία τριών απλών κορυφών στα 1,64 ppm (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), στα 1,71 ppm (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) και στα 1,80 ppm (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) που οφείλονται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια των μεθυλο ομάδων στις θέσεις 8', 9' και 10' του βενζοπυρανικού δακτυλίου. Χαρακτηριστικές επίσης είναι οι διπλές κορυφές στα 7,64 ppm (d,  $J=9.3$  Hz, H-4), στα 7,37 ppm (d,  $J=8.4$  Hz, H-5), στα 6,25 ppm (d,  $J=9.3$  Hz, H-3) και στα 4,63 ppm (d,  $J=6.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2-1'$ ), καθώς επίσης οι τριπλές κορυφές στα 5,48 ppm (t,  $J=6.3$  Hz, H-2') και στα 5,10 ppm (t,  $J=5.7$  Hz, H-6') οι οποίες οφείλονται στα πρωτόνια στις θέσεις 2' και 6' του μορίου αντίστοιχα.



Σχήμα 35. 7-γερανυλοξυ-κουμαρίνη (3)

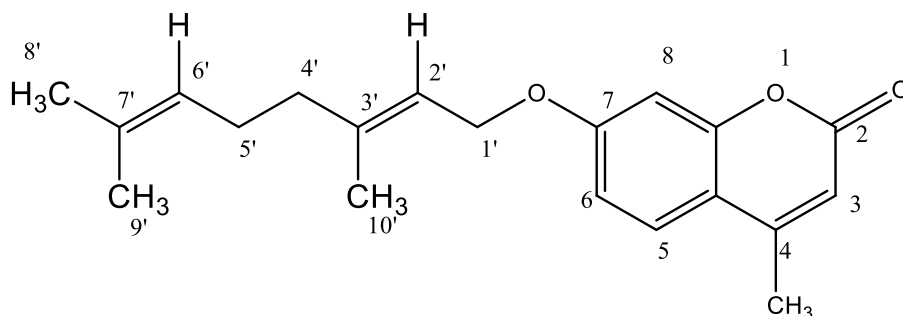
### 7-γερανυλοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη (4)



Εικόνα 6. Φάσμα πρωτονίου  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) της κουμαρίνης 4

Στην Εικόνα 6 παρουσιάζεται το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της κουμαρίνης 4 (Σχήμα 36) σε διαλύτη δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο ( $\text{DMSO-d}_6$ ).

Για το φάσμα αυτό ισχύουν όσα αναφέρθηκαν για το φάσμα  $^1\text{H NMR}$  της κουμαρίνης **3** με τη μόνη διαφορά ότι στα 2,34 ppm (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) υπάρχει μια απλή κορυφή που οφείλεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της μεθυλο ομάδας της θέσης 4 του βενζοπυρανικού δακτυλίου.



Σχήμα 36. 7-γερανυλοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**4**)

## 2.3 Αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των ενώσεων

### **2.3.1 Αντιοξειδωτική Δράση των ενώσεων**

Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των ενώσεων πραγματοποιείται μέσω δύο μεθόδων:

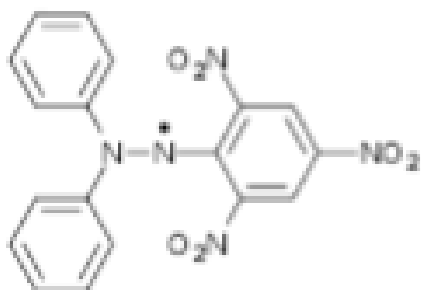
1. Την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH
2. Την ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης του λινολεϊκού οξέος που επάγεται από τη ρίζα AAPH.

## Η μέθοδος DPPH

Μία απλή μέθοδος που έχει αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων ενώσεων, χρησιμοποιεί την σταθερή ρίζα 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζιλής (DPPH).

Η DPPH δεν αποσυντίθεται και δεν διμερίζεται, ούτε αντιδρά με το οξυγόνο και είναι χρήσιμη σε ενέργειες όπως η αναστολή του πολυμερισμού ή η χημεία ριζών, στον προσδιορισμό αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων αμινών, φαινολών ή άλλων φυσικών ενώσεων (βιταμινών, εκχυλίσματα φυτών, ιατρικών φαρμάκων).

Η δομή του DPPH παρουσιάζεται στο Σχήμα 37. <sup>[76]</sup>



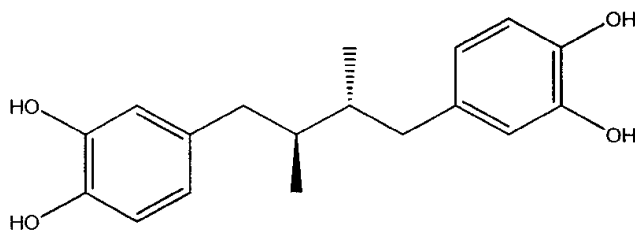
Σχήμα 37. Η δομή του DPPH.

Η ρίζα 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζιλής (DPPH) είναι μια χρωμογόνος ένωση που αντιδράει με τις αντιοξειδωτικές ενώσεις. Μετά την αντίδραση, η συγκέντρωση της χρωμογόνου ένωσης που έχει απομείνει προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά ή χρωμομετρικά. Στις ακόλουθες εξισώσεις (1) και (2) φαίνεται ο τρόπος που αντιδρά η ρίζα DPPH με μια αντιοξειδωτική ένωση (AH) και με μια ελεύθερη ρίζα (R):



Κάθε ουσία (αντιοξειδωτικό) που μπορεί να δώσει ένα άτομο υδρογόνου στο διάλυμα του DPPH μπορεί να υποβιβάσει τη σταθερή ελεύθερη ρίζα σε DPPH-H και να αλλάξει το χρώμα του διαλύματος από ιώδες σε υποκίτρινο. Η ρίζα του DPPH που δεν αντιδρά δίνει απορρόφηση στο ορατό φάσμα, στα 517-518 nm, ενώ ο αποχρωματισμός που προκύπτει είναι στοιχειομετρικός και εξαρτάται από τον αριθμό των ηλεκτρονίων που προστίθενται. <sup>[77]</sup>

Ως ένωση αναφοράς για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο του DPPH χρησιμοποιείται η αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης ένωση *NDGA* (Nordihydroguaiaretic acid).



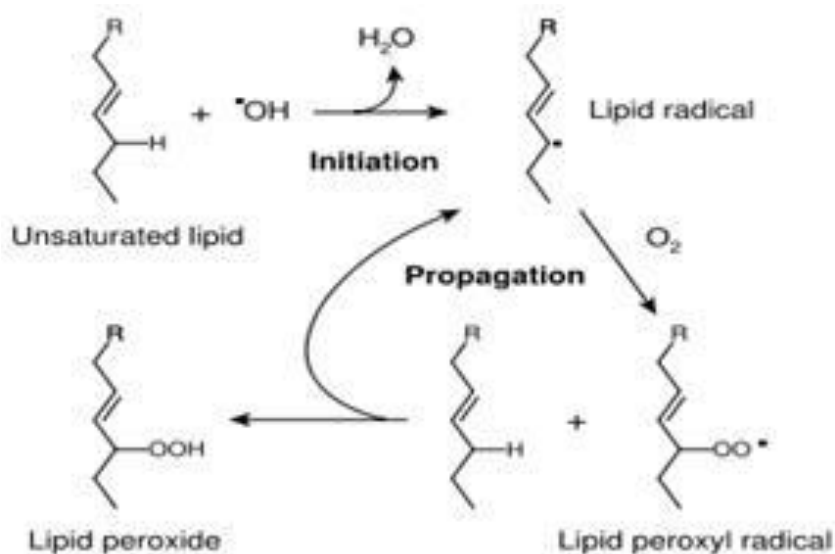
Σχήμα 38. Η δομή του NDGA

### Αναστολή της λιπιδικής υπεροξείδωσης

Τα υδροϋπεροξείδια των λιπιδίων μπορούν να θεωρηθούν ως ενδιάμεσα προϊόντα που δεν έχουν τη μορφή ριζών. Προκύπτουν κυρίως από τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, τα φωσφολιπίδια, τα γλυκολιπίδια και από την ίδια τη χοληστερόλη.

Ο σχηματισμός τους συμβαίνει σε ενζυματικές ή μη αντιδράσεις, που περιλαμβάνουν τις ελεύθερες ρίζες, οι οποίες ευθύνονται σε μεγάλο ποσοστό για διάφορες βλάβες των ιστών. Συγκεκριμένα, η επίδραση των ελεύθερων ριζών επί των λιπιδίων που υπάρχουν στις μεμβράνες των κυττάρων έχει ως συνέπεια τον σχηματισμό υπεροξειδίων.

Ο μηχανισμός της λιπιδικής υπεροξείδωσης φαίνεται στο Σχήμα 39.

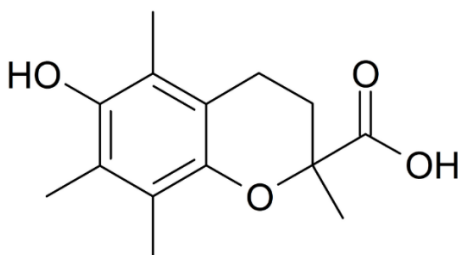


Σχήμα 39. Μηχανισμός λιπιδικής υπεροξείδωσης

Το 2,2 αζοδισ-(2-αμιδινοπροπανο)υδροχλωρίδιο (AAPH) δημιουργεί ελεύθερες ρίζες στο διάλυμα, οι οποίες προκαλούν την οξειδωση του λινολεϊκού οξέος.

Η μέθοδος μέτρησης της αντιοξειδωτικής δράσης με AAPH είναι αξιόπιστη και βασίζεται στην αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης του λινολεϊκού οξέος. [78]

Ως ένωση αναφοράς για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο του AAPH, χρησιμοποιείται ένα αντιοξειδωτικό ανάλογο της βιταμίνης E, το Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8tetramethylchroman-2-carboxylic acid).



Σχήμα 40. Η δομή του Trolox

### 2.3.2 Αντιφλεγμονώδης Δράση των ενώσεων - Προσδιορισμός της ικανότητας αναστολής της δράσης του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια

Οι λιποξυγονάσες (LOX) είναι ένζυμα που περιέχουν σίδηρο και υπάρχουν σε διάφορα φυτά και ζώα. Καταλύουν την οξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως είναι το λινολεϊκό οξύ στα φυτά (linoleic acid) και το αραχιδονικό οξύ στα θηλαστικά (arachidonic acid), σε συγκεκριμένες θέσεις, προς τον σχηματισμό υπεροξειδίων.

Οι αναστολείς των λιποξυγονασών παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της εμπλοκής του ενζύμου σε διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις.

Στους ανθρώπους, η λιποξυγονάση παίζει ένα σπουδαίο ρόλο στη βιοσύνθεση των λευκοτριενίων, οι οποίες αποτελούν προ-φλεγμονώδεις ουσίες και απελευθερώνονται κυρίως από τα κύτταρα του μυελού των οστών. Οι αναστολείς των λιποξυγονασών αναφέρονται ως πιθανοί παράγοντες για τη θεραπεία φλεγμονωδών και αλλεργικών ασθενειών, αλλά και ικανοί για την θεραπεία ορισμένων τύπων καρκίνου και καρδιαγγειακών ασθενειών.

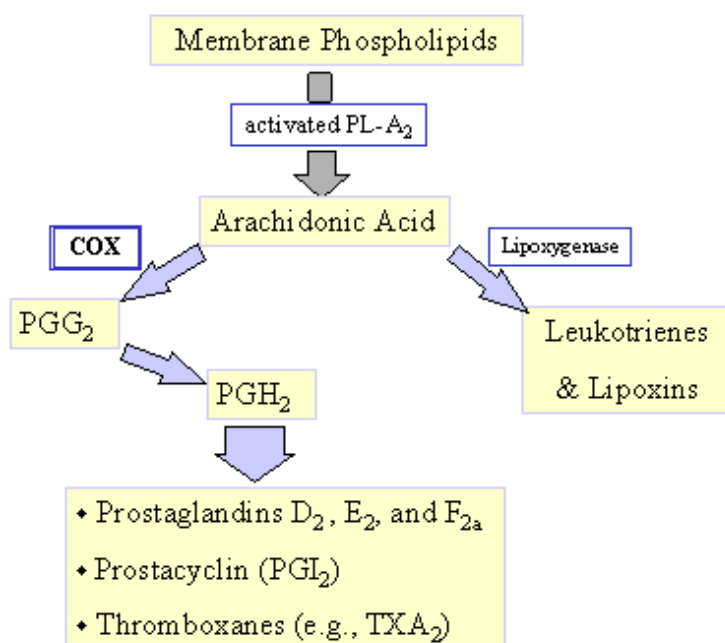
Πολλά φλαβονοειδή, φαινολικά και κουμαρινικά παράγωγα αναστέλλουν την λιποξυγονάση από σόγια. Αυτή η αναστολή σχετίζεται με την ικανότητά τους να ανάγουν τα ιόντα  $Fe^{3+}$  του ενεργού κέντρου στην καταλυτικά ανενεργή μορφή  $Fe^{2+}$ . [79]



Η πλειοψηφία των αναστολέων LO είναι αντιοξειδωτικά ή σαρωτές ελευθέρων ριζών χάρη στη δράση της λιποξυγονάσης να δημιουργεί ελεύθερες ρίζες άνθρακα. Συνεπώς, τα περισσότερα αντιοξειδωτικά μπορούν να αναστείλουν τη δημιουργία της ρίζας ή να την παγιδεύσουν μόλις σχηματιστεί. [78]

Πολλές είναι οι προσπάθειες σύνθεσης φαρμακολογικών ουσιών για την αναστολή δημιουργίας των λευκοτριενίων, είτε μέσω αναστολής της βιοσύνθεσης τους είτε με αναστολή της δράσης τους.

Για να επιτευχθεί μείωση του σχηματισμού των λευκοτριενίων, πιθανούς στόχους αποτελούν τα ένζυμα PLA2, η 5-LO, η LTA4 υδρολάση και η LTC4 συνθάση. Η δέσμευση αυτών των ενζύμων αποσκοπεί στην τελική αναστολή της 5-LO και κατά συνέπεια της εμφάνισης φλεγμονής (Εικόνα 7). [80]



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση της δημιουργίας ενζύμων υπεύθυνων για την εμφάνιση φλεγμονής

Για την πειραματική αξιολόγηση των ενώσεων που εξετάζονται ως πιθανοί αναστολείς της 5-LO, το δείγμα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιείται είναι από το *φυτό της σόγιας*,

το οποίο επιλέγεται για εργαστηριακά πειράματα καθώς είναι πιο εύκολη η απομόνωση πρωτεΐνης από φυτά παρά από θηλαστικά, και επιπλέον, η ακολουθία των αμινοξέων στις δύο πρωτεΐνες υποδεικνύει δύο περιοχές όπου παραμένει ίδια η σειρά των αμινοξέων και στην ανθρώπινη και στη φυτική λιποξυγονάση.

Ως ένωση αναφοράς για τη μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης με τη μέθοδο προσδιορισμού της ικανότητας αναστολής της δράσης του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια, χρησιμοποιείται η αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης ένωση *NDGA* (Nordihydroguaiaretic acid).

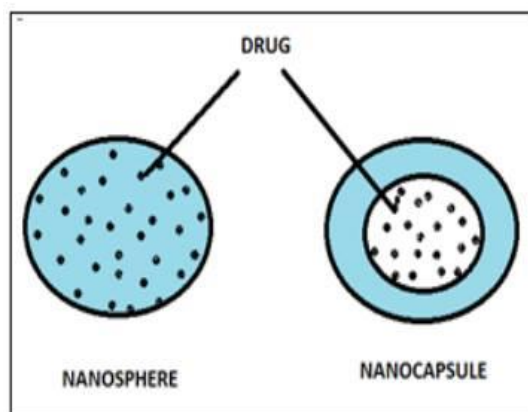
# ΝΑΝΟΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΣΕ ΠΟΛΥΜΕΡΕΣ PLA

## 3.1 Εισαγωγή

Τα νανοσωματίδια από πολυμερή υλικά (PNPs) ορίζονται ως σωματίδια διασποράς ή στερεά σωματίδια, με μέγεθος στην περιοχή εύρους από 50-300nm. Τα PNPs παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στον τομέα χορήγησης φαρμάκων μέσω σωματιδιακών συστημάτων που λειτουργούν ως «φορείς» μικρών μορίων ή μεγαλύτερων ενώσεων. Τα σωματιδιακά συστήματα, όπως είναι τα νανοσωματίδια, έχουν χρησιμοποιηθεί με σκοπό να τροποποιήσουν και να βελτιώσουν τις φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες διαφόρων τύπων φαρμακευτικών μορίων.

Τα νανοσωματίδια παρασκευάζονται από βιοσυμβατά και βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή στα οποία το φάρμακο διαλύεται, παγιδεύεται, εγκλείεται ή συνδέεται με μία μήτρα νανοσωματιδίων. Ανάλογα με την μέθοδο παρασκευής νανοσωματιδίων, μπορεί να παραχθούν νανοσφαίρες ή νανοκάψουλες (Εικόνα 8).

Οι νανοκάψουλες είναι συστήματα στα οποία το φάρμακο περιορίζεται σε μια κοιλότητα που περιβάλλεται από μια μοναδική μεμβράνη πολυμερούς, ενώ οι νανοσφαίρες είναι συστήματα μήτρας στα οποία το φάρμακο διασπείρεται φυσικά και με ομοιόμορφο τρόπο. <sup>[81]</sup>



Εικόνα 8. Διαφορά μεταξύ νανοσφαίρας και νανοκάψουλας

Τα νανοσωματίδια (συμπεριλαμβανομένων των νανοσφαιριδίων και νανοκαψουλών) είναι σταθερά, οργανικά ή ανόργανα σωματίδια. Οι φαρμακευτικές ενώσεις είναι δυνατό είτε να προσροφηθούν στην επιφάνεια των σωματιδίων είτε να εγκλειστούν μέσα σε αυτά ώστε να προστατευτούν από κάθε πιθανή χημική ή ενζυματική αποικοδόμηση.

Τα νανοσωματίδια έχουν την τάση να συσσωρεύονται σε καρκινικούς όγκους, φλεγμονές και σημεία μόλυνσης εξαιτίας του φαινομένου ενισχυμένης διαπερατότητας και κατακράτησης που εμφανίζουν τα αγγεία της πάσχουσας περιοχής λόγω μη φυσιολογικής λειτουργίας.<sup>[82]</sup>

### 3.2 Μέθοδοι σύνθεσης πολυμερικών νανοσωματιδίων (PNPs)

Προκειμένου να επιτευχθούν οι επιθυμητές ιδιότητες, ο τρόπος παρασκευής των νανοσωματιδίων παίζει καθοριστικό ρόλο, ώστε αυτά να χρησιμοποιηθούν για συγκεκριμένες εφαρμογές.

Διάφορες τεχνικές χρησιμοποιούνται, όπως ο πολυμερισμός, τα προσχηματισμένα πολυμερή και η ιοντική ζελατινοποίηση.<sup>[81]</sup>

#### **❖ Μέθοδοι σύνθεσης νανοσωματιδίων μέσω διασποράς της ουσίας στο πολυμερές**

Η διασπορά μιας δραστηκής ή φαρμακευτικής ένωσης σε προσχηματισμένα πολυμερή αποτελεί μια κοινή τεχνική για την παραγωγή κυρίως βιοαποικοδομήσιμων νανοσωματιδίων από πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA), πολυ(D, L-γλυκολικό οξύ) (PLG), πολυ(D, L-γαλακτικό-γλυκολικό οξύ) (PLGA) και πολυ(κυανοακρυλικό οξύ) (PCA).

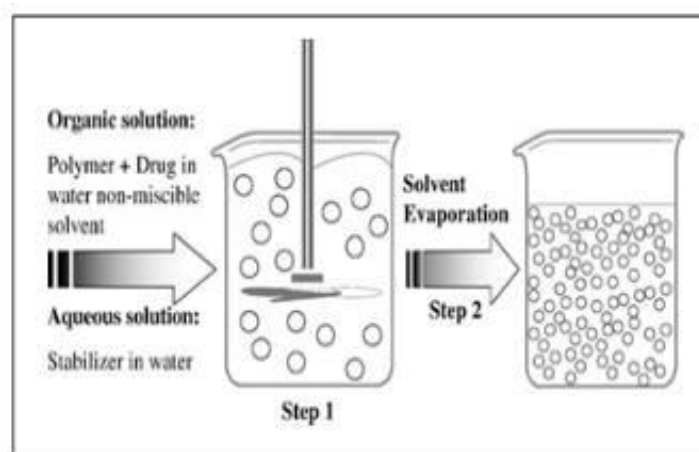
Οι περισσότερο δημοφιλείς διαδικασίες είναι:

### **1. Γαλακτωματοποίηση/Εξάτμιση διαλύτη (Emulsification/Solvent evaporation)**

Η τεχνική γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του διαλύτη αποτελεί την πρώτη μέθοδο που αναπτύχθηκε για την παραγωγή νανοσωματιδίων (PNPs). Σε αυτήν την μέθοδο, τα διαλύματα πολυμερούς παρασκευάζονται σε πτητικούς διαλύτες και δημιουργείται ένα γαλάκτωμα.

Παλαιότερα, το διχλωρομεθάνιο και το χλωροφόρμιο χρησιμοποιούνταν ως διαλύτες πολυμερών, όμως έχουν αντικατασταθεί από τον οξικό αιθυλεστέρα, ο οποίος πλεονεκτεί ως προς την τοξικολογική του συμπεριφορά.

Το γαλάκτωμα που δημιουργείται, μετατρέπεται σε ένα εναιώρημα νανοσωματιδίων κατά την εξάτμιση του διαλύτη και το πολυμερές αφήνεται να διαχυθεί μέσα από τη συνεχή φάση του γαλακτώματος. [83]



Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής γαλακτωματοποίησης/εξάτμισης του διαλύτη

Στις συμβατικές μεθόδους, δύο είναι οι κύριες στρατηγικές που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό των γαλακτωμάτων:

- Η μέθοδος απλού γαλακτώματος, όπως έλαιο σε νερό (oil-in-water)

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, η οποία είναι κατάλληλη για τον εγκλεισμό υδρόφοβων ενώσεων, το πολυμερές διαλύεται σε έναν πτητικό οργανικό διαλύτη και η ένωση που

θα εγκλειστεί διαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη, ενώ το διάλυμα που προκύπτει αναμιγνύεται με το διάλυμα του πολυμερούς.

Το τελικό μίγμα γαλακτωματοποιείται εντός υδατικής φάσης που περιέχει γαλακτωματοποιητή και δεν διαλύει το πολυμερές. Ο οργανικός διαλύτης εξατμίζεται υπό ήπιες συνθήκες και τα σωματίδια συλλέγονται με διήθηση (φιλτράρισμα) ή φυγοκέντρηση, και επαναδιασπείρονται σε απεσταγμένο νερό.

Ως γαλακτωματοποιητής χρησιμοποιείται συνήθως η πολυ(βινυλική αλκοόλη) (PVA) ή η πολυ(αιθυλενο-γλυκόλη) (PEG).

Τα πρώτα νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο αυτή ήταν τα νανοσωματίδια πολυ(γαλακτικού οξέος) (PLA).<sup>[84]</sup>

- **Η μέθοδος διπλών γαλακτωμάτων, όπως (νερό σε έλαιο) - σε νερό (water-in-oil)-in-water**

Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για τον εγκλεισμό υδατοδιαλυτών ενώσεων. Η προς εγκλεισμό ουσία διαλύεται σε μια υδατική φάση, η οποία γαλακτωματοποιείται μέσα σε μια πτητική οργανική φάση, στην οποία είναι διαλυμένο το πολυμερές. Το γαλάκτωμα που προκύπτει διασπείρεται σε μεγαλύτερο όγκο μιας δεύτερης υδατικής φάσης, με σκοπό να σχηματιστεί ένα διπλό γαλάκτωμα. Στη συνέχεια, γίνεται εξάτμιση του οργανικού διαλύτη και ανάκτηση των σωματιδίων που σχηματίζονται.<sup>[84]</sup>

Με την τεχνική γαλακτωματοποίησης/εξάτμισης του διαλύτη παράγονται νανοσωματίδια, οι ιδιότητες των οποίων εξαρτώνται από τις εξής μεταβλητές:

- Τα υλικά που χρησιμοποιούνται
- Τις συνθήκες της διεργασίας, όπως: η θερμοκρασία, η πίεση, ο ρυθμός ανάμιξης
- Τον ρυθμό εξάτμισης του διαλύτη (όσο γρηγορότερα πραγματοποιείται η εξάτμιση του οργανικού διαλύτη, τόσο μεγαλύτερα σωματίδια σχηματίζονται)

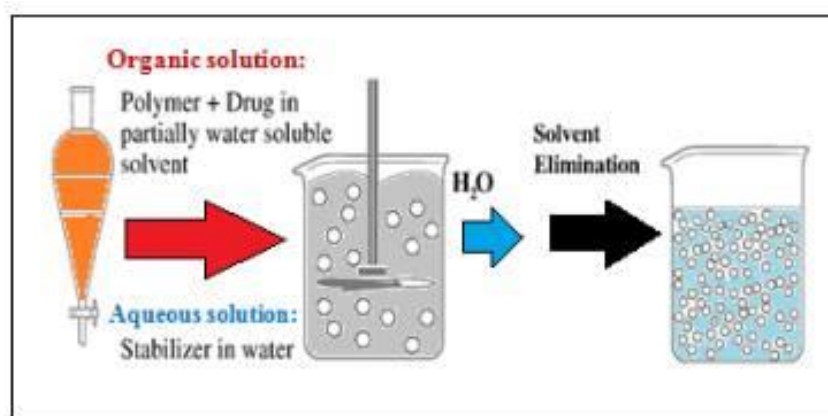
Ακόμη, το μέγεθος των παραγόμενων σωματιδίων επηρεάζεται από το είδος και την ποσότητα του μέσου διασποράς, το ιξώδες της οργανικής και της υδατικής φάσης, την ταχύτητα ομογενοποίησης και τη θερμοκρασία.<sup>[81]</sup>

## **2. Γαλακτωματοποίηση/Διάχυση διαλύτη (Emulsification/Solvent diffusion)**

Η τεχνική αυτή αποτελεί μια τροποποίηση της μεθόδου εξάτμισης του διαλύτη και είναι αποτελεσματική στον εγκλεισμό λιπόφιλων ενώσεων.

Το πολυμερές διαλύεται σε διαλύτη εν μέρει υδατικό, όπως είναι το ανθρακικό προπυλένιο. Για την πραγματοποίηση της καθίζησης του πολυμερούς και τον επακόλουθο σχηματισμό νανοσωματιδίων, είναι απαραίτητο να προωθηθεί η διάχυση του διαλύτη της διεσπαρμένης φάσης μέσω αραίωσης με νερό, όταν ο οργανικός διαλύτης είναι μερικώς αναμίξιμος με το νερό ή διαφορετικά, με άλλον οργανικό διαλύτη.

Η φάση του διαλύτη που είναι κορεσμένη από πολυμερές και νερό γαλακτωματοποιείται σε ένα υδατικό διάλυμα που περιέχει σταθεροποιητή, οδηγώντας στη διάχυση του διαλύτη προς την εξωτερική φάση και στον σχηματισμό νανοσφαιρών ή νανοκαψουλών, σύμφωνα με την αναλογία ελαίου προς πολυμερές. Τέλος, ο διαλύτης απομακρύνεται με εξάτμιση ή διήθηση, σύμφωνα με το σημείο βρασμού του. [81]



Εικόνα 10. Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής γαλακτωματοποίησης/διάχυσης του διαλύτη

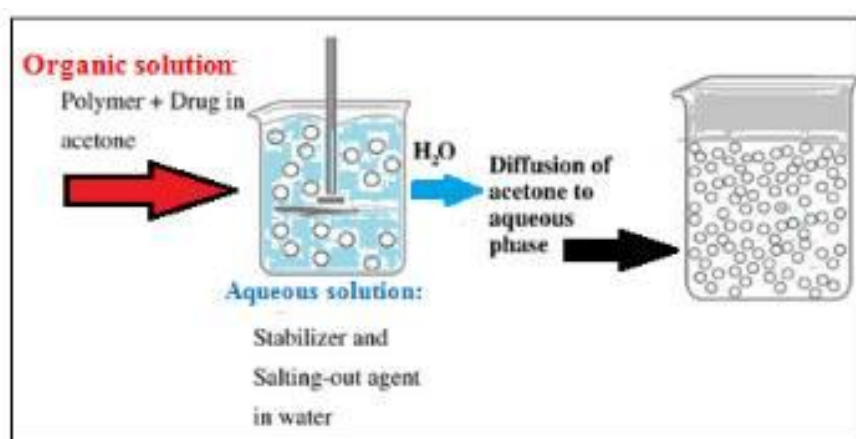
Με τη μέθοδο γαλακτωματοποίησης/διάχυσης διαλύτη επιτυγχάνονται συνήθως υψηλές αποδόσεις εγκλωβισμού των ενώσεων (encapsulation efficiency), συχνά μεγαλύτερες από 70%. Άλλα πλεονεκτήματα της τεχνικής είναι η απλότητα, η ευκολία εφαρμογής σε μεγάλη κλίμακα και η χαμηλή κατανομή μεγέθους των νανοσωματιδίων. [83]

### 3. Διαχωρισμός με τη βοήθεια αλάτων (Salting out)

Η μέθοδος βασίζεται στο διαχωρισμό ενός αναμίξιμου με το νερό διαλύτη από ένα υδατικό διάλυμα, με τη βοήθεια αλάτων. Το πολυμερές και η ένωση που πρόκειται να εγκλειστεί στα νανοσωματίδια αρχικά διαλύεται σε έναν διαλύτη όπως η ακετόνη, και

στη συνέχεια το διάλυμα αυτό γαλακτωματοποιείται εντός ενός υδατικού πηκτώματος που περιέχει τον παράγοντα εξαλάτωσης (ηλεκτρολύτες, όπως χλωριούχο μαγνήσιο, χλωριούχο ασβέστιο και οξικό μαγνήσιο, ή μη ηλεκτρολύτες όπως σακχαρόζη) και έναν σε κolloειδή μορφή σταθεροποιητή, όπως η πολυβινυλοπυρρολιδόνη ή η υδροξυαιθυλοκυτταρίνη. Αυτό το γαλάκτωμα ελαίου-νερού αραιώνεται με επαρκή ποσότητα νερού, ώστε να ενισχυθεί η διάχυση της ακετόνης στην υδατική φάση, προκαλώντας έτσι τον σχηματισμό νανοσωματιδίων. Ο διαλύτης και ο παράγοντας εξαλάτωσης στη συνέχεια απομακρύνονται με διήθηση διασταυρούμενης ροής.

Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εγκλεισμό ενώσεων ευαίσθητων στις υψηλές θερμοκρασίες, για τον εγκλωβισμό πρωτεϊνών και γενικά λιπόφιλων ουσιών.  
[81]



Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής διαχωρισμού με τη βοήθεια αλάτων

#### **4. Αντικατάσταση διαλύτη ή αλλιώς νανοκαθίζηση (solvent displacement or Nanoprecipitation)**

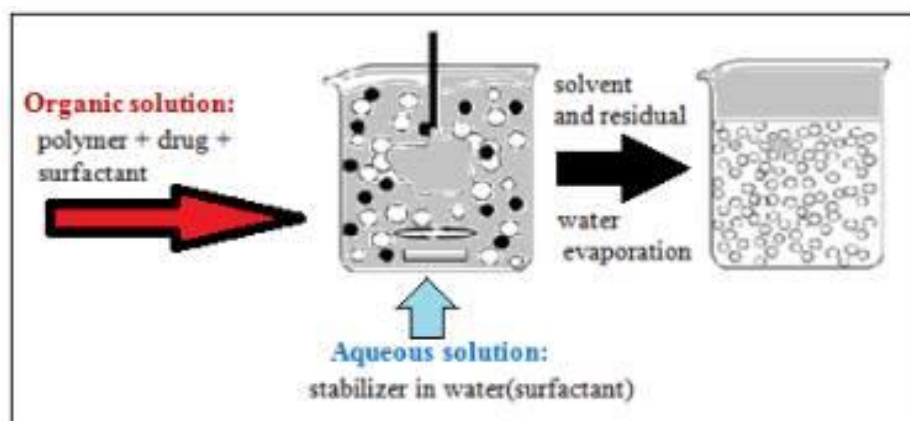
Περιλαμβάνει την καθίζηση του πολυμερούς από ένα οργανικό διάλυμα και τη διάχυση του οργανικού διαλύτη στο υδατικό μέσο υπό την παρουσία ή την απουσία ενός σταθεροποιητή.

Το πολυμερές διαλύεται σε έναν διαλύτη αναμίξιμο με το νερό και ενδιάμεσης πολικότητας, οδηγώντας σε καθίζηση νανοσωματιδίων. Αυτή η φάση εγχύεται σε αναδευόμενο υδατικό διάλυμα που περιέχει ένα σταθεροποιητή. Η εναπόθεση του



πολυμερούς στη διεπιφάνεια υδατικού και οργανικού διαλύτη που προκαλείται από την ταχεία διάχυση του διαλύτη, οδηγεί στο στιγμιαίο σχηματισμό ενός κolloειδούς.

Για να διευκολυνθεί ο σχηματισμός κolloειδών πολυμερικών σωματιδίων, ο διαχωρισμός των φάσεων πραγματοποιείται με την εισαγωγή πλήρως αναμίξιμου διαλύτη που όμως δεν διαλύει το πολυμερές.



Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής με αντικατάσταση του διαλύτη ή νανοκαθίζηση (Ο σταθεροποιητής είναι εμφανής μέσα στο υδατικό διάλυμα)

Η τεχνική αντικατάστασης διαλύτη εφαρμόζεται κυρίως για λιπόφιλα φάρμακα, λόγω της αναμιξιμότητας του διαλύτη με την υδατική φάση, και δεν είναι ένα αποτελεσματικό μέσο για την ενθυλάκωση υδατοδιαλυτών ενώσεων. <sup>[81]</sup>

## 5. Τεχνολογία υπερκρίσιμων υγρών (SCF)

Η μέθοδος των υπερκρίσιμων υγρών αποτελεί έναν φιλικό προς το περιβάλλον τρόπο παραγωγής νανοσωματιδίων υψηλής καθαρότητας και χωρίς ίχνος οργανικού διαλύτη. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, η ουσία διαλύεται σε ένα υπερκρίσιμο ρευστό για να σχηματίσει ένα διάλυμα, που ακολουθείται από την ταχεία διαστολή του διαλύματος κατά μήκος ενός στομίου ή τριχοειδούς ακροφυσίου στον αέρα του περιβάλλοντος.

Ο υψηλός βαθμός υπερκορεσμού που συνοδεύεται από την ταχεία μείωση της πίεσης, οδηγεί σε ομοιογενή πυρήνες και ως εκ τούτου, στον σχηματισμό καλά διεσπαρμένων σωματιδίων. <sup>[81]</sup>

## ❖ *Μέθοδοι σύνθεσης νανοσωματιδίων μέσω πολυμερισμού των μονομερών*

### 1. Τεχνική γαλακτώματος (*emulsion, mini emulsion, micro emulsion*)

Αποτελεί μια από τις ταχύτερες μεθόδους για την παρασκευή νανοσωματιδίων και ταξινομείται σε δύο κατηγορίες, με βάση τη χρήση μιας συνεχούς οργανικής ή υδατικής φάσης.

Η μεθοδολογία της συνεχούς οργανικής φάσης περιλαμβάνει τη διασπορά του μονομερούς εντός ενός γαλακτώματος ή αντίστροφου μικρογαλακτώματος, ή μέσα σε ένα υλικό στο οποίο το μονομερές δεν είναι διαλυτό.

Χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες, επιφανειοδραστικά, μονομερή και εκκινητές, τα οποία στη συνέχεια απομακρύνονται από τα σχηματισμένα σωματίδια. <sup>[81]</sup>

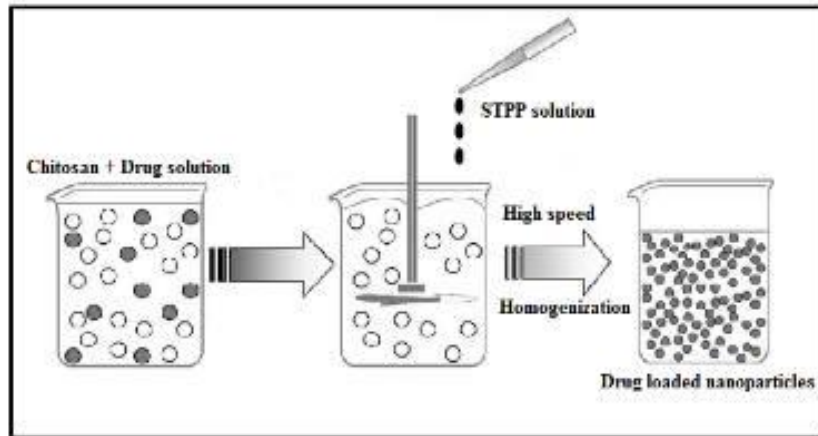
### 2. Διεπιφανειακός πολυμερισμός (*interfacial polymerization*)

Είναι μια από τις καθιερωμένες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή πολυμερικών νανοσωματιδίων. Περιλαμβάνει το στάδιο πολυμερισμού δύο δραστικών μονομερών που διαλύονται αντιστοίχως σε δύο φάσεις και η αντίδραση λαμβάνει χώρα στη διεπιφάνεια των δύο υγρών. <sup>[81]</sup>

## ❖ *Ιοντική ζελατινοποίηση ή συσσωμάτωση υδρόφιλων πολυμερών*

Η μέθοδος περιλαμβάνει ένα μίγμα δύο υδατικών φάσεων, εκ των οποίων το ένα είναι το πολυμερές χιτοζάνη και το άλλο είναι ένα πολυανιόν τριπολυφωσφορικού νατρίου. Σε αυτή τη μέθοδο, η θετικά φορτισμένη αμινομάδα της χιτοζάνης αλληλεπιδρά με τα αρνητικά φορτισμένα ιόντα για να σχηματίσουν συσσωματώματα με μέγεθος στην περιοχή των νανομέτρων.

Τα συσσωματώματα σχηματίζονται ως αποτέλεσμα ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο υδατικών φάσεων, ενώ η ιοντική ζελατινοποίηση περιλαμβάνει την μετατροπή του υλικού από υγρό σε gel, εξαιτίας των ιοντικών αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα σε θερμοκρασία δωματίου. <sup>[81]</sup>



Εικόνα 13. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου ιοντικής ζελατινοποίησης

### 3.3 Φυσικοχημικές Ιδιότητες των νανοσωματιδίων

Οι κύριες φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων είναι το μέγεθος και το φορτίο της επιφάνειάς τους. Συγκεκριμένα:

- Το **επιθυμητό μέγεθος** των σωματιδίων εξαρτάται από την εκάστοτε εφαρμογή, τη δομή του πολυμερούς, την μέθοδο και τις πειραματικές συνθήκες της παρασκευής τους. Συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 50 και 300 nm.

Τα νανοσωματίδια με μέγεθος μεταξύ 100 και 200 nm αντιστοιχούν σε νανοσφαίρες, ενώ οι νανोकάψουλες κυμαίνονται μεταξύ 100 και 300 nm. <sup>[35]</sup>

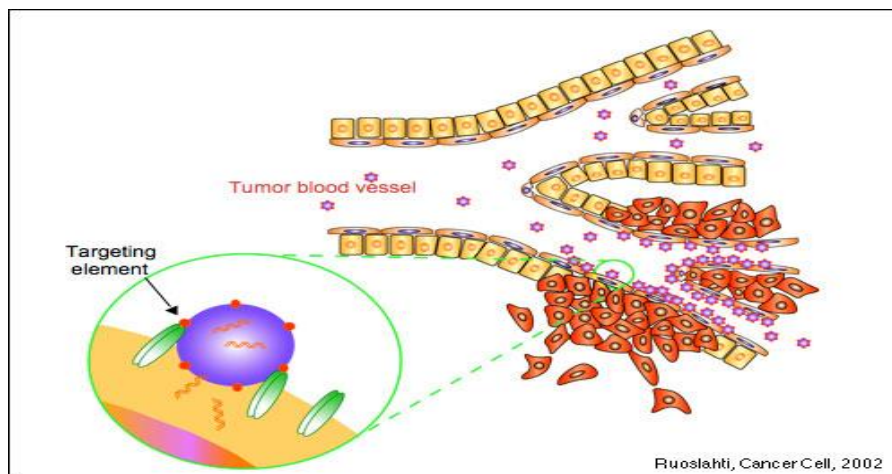
- Το **Z-δυναμικό** των σωματιδίων.  
Η τιμή του δυναμικού επηρεάζεται από το φορτίο των διαφορετικών συστατικών των νανοσωματιδίων και την σύνθεση του μέσου διασποράς. Το ζ-δυναμικό μπορεί να μετρηθεί με μετρήσεις της κινητικότητας των σωματιδίων παρουσία ηλεκτρικού πεδίου (ηλεκτροφορητικές μετρήσεις).

Τιμές μεγαλύτερες από +20mV και αντίστοιχα μικρότερες από -20mV, συνεπάγονται σταθερά μικρο/νανο-σωματίδια. Τα νανοσωματίδια πρέπει να εμφανίζουν επαρκή σταθερότητα ώστε να διατηρούν τις βιολογικές τους

ιδιότητες, όπως αυτές επιλέχθηκαν με βάση τον σχεδιασμό των νανοσωματιδίων. [85]

### 3.4 Πλεονεκτήματα των νανοσωματιδίων

- Αυξάνουν την σταθερότητα των πτητικών ουσιών και παρέχουν προστασία σε ενεργά μόρια (π.χ. βιταμίνες) που αλλοιώνονται από εξωτερικούς παράγοντες, όπως η ακτινοβολία, η υγρασία, η θερμότητα.
- Καλύπτουν ανεπιθύμητες ιδιότητες, όπως είναι η δυσάρεστη οσμή ή γεύση του φαρμάκου.
- Προσφέρουν σημαντική βελτίωση στους τρόπους χορήγησης των φαρμάκων ως προς την αποδοτικότητα και την αποτελεσματικότητα.
- Έχουν τη δυνατότητα στόχευσης συγκεκριμένης περιοχής στο σώμα.
- Μπορούν να δράσουν και σε επίπεδο ιστών και σε επίπεδο κυττάρων.
- Μεταφέρουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φαρμακευτικής ουσίας στην επιθυμητή περιοχή.
- Η επιλογή του πολυμερούς και η ικανότητα ελέγχου της απελευθέρωσης των φαρμακευτικών ουσιών από τα νανοσωματίδια, τα καθιστούν ικανά για την θεραπεία του καρκίνου και τη μεταφορά στοχευμένων αντιβιοτικών. [86]



Εικόνα 14. Στοχευμένη θεραπεία καρκινικών κυττάρων

### 3.5 Εφαρμογές νανοεγκλεισμού

Τα νανοϋλικά βρίσκουν αρκετές εφαρμογές στον τομέα των τροφίμων και των καλλυντικών, όμως ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι εφαρμογές του νανοεγκλεισμού στον τομέα της βιολογίας και της ιατρικής.

Μερικά παραδείγματα είναι τα εξής:

- η μεταφορά φαρμάκων και γονιδίων (Drug and gene delivery)
- η βιοανίχνευση κάποιας παθογένειας (Bio detection of pathogens)
- η ανίχνευση πρωτεϊνών (Detection of proteins)
- η ανίχνευση της δομής του DNA (Probing of DNA structure)
- η μηχανική των ιστών (Tissue engineering)
- η καταστροφή όγκων μέσω θέρμανσης (hyperthermia)
- ο διαχωρισμός και καθαρισμός βιολογικών μορίων και κυττάρων (Separation and purification of biological molecules and cells) <sup>[87]</sup>

### 3.6 Μηχανισμοί απελευθέρωσης των φαρμακευτικών ενώσεων

Η ελεγχόμενη αποδέσμευση των φαρμάκων σχετίζεται με την ανάπτυξη συνθετικών νανοσυστημάτων για τη στοχευμένη απόδοση περίπλοκων θεραπευτικών φαρμάκων και βιομορίων. Τα στοχευμένα συστήματα απόδοσης φαρμάκων έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν συγκεκριμένα μόρια τα οποία μπορεί να βρίσκονται είτε στην εξωτερική μεμβράνη των προς στόχευση κυττάρων ή στο εσωτερικό τους. <sup>[81]</sup>

Οι πολυμερικοί «φορείς» μεταφέρουν τις διάφορες δραστικές ενώσεις στοχευμένα στους ιστούς και τις απελευθερώνουν με έναν από τους γενικούς φυσικοχημικούς μηχανισμούς:

1. Με διόγκωση των πολυμερικών νανοσωματιδίων μέσω ενυδάτωσης και απελευθέρωση της εγκλεισμένης ουσίας μέσω διάχυσης
2. Με ενζυματική αντίδραση που οδηγεί σε ρήξη ή διάσπαση ή αποικοδόμηση του πολυμερούς στη θέση που πρέπει να πραγματοποιηθεί η απελευθέρωση του φαρμάκου από τον παγιδευμένο εσωτερικό πυρήνα

3. Με διάσταση της εγκλεισμένης ένωσης από το πολυμερές και απορρόφηση ή απελευθέρωση αυτής από τα διογκωμένα νανοσωματίδια.

Ένας ή και όλοι οι μηχανισμοί είναι δυνατόν να συμβούν σε ένα δεδομένο σύστημα αποδεσμευσης. <sup>[81]</sup>

### 3.7 Πολυμερή που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή νανοσωματιδίων

Τα πολυμερή υλικά πρέπει να είναι συμβατά με το ανθρώπινο σώμα, δηλαδή βιοσυμβατά, μη τοξικά και βιοαποικοδομήσιμα.

- **Φυσικά πολυμερή** είναι: η χιτοζάνη, η ζελατίνη, το αλγινικό άλας και η αλβουμίνη/λευκωματίνη.

- **Συνθετικά πολυμερή** είναι: το πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA), το πολυ(γλυκολικό οξύ) (PGA), το πολυ(γαλακτικό-συν-γλυκολικό) οξύ (PLGA), οι πολυανυδρίτες, οι πολυ-ορθοεστέρες, το πολυ-γλουταμινικό οξύ, το πολυ-μηλικό οξύ, το πολυ-ακρυλικό οξύ. <sup>[81]</sup>

- I. Το πολυ(γαλακτικό-συν-γλυκολικό) οξύ PLGA είναι ένα από τα πλέον αναπτυγμένα βιοδιασπώμενα πολυμερή. Μεταξύ των πολυμερών που σχηματίζουν νανοσωματίδια, το PLGA παρουσιάζει πολύ σημαντικές ιδιότητες, μερικές από τις οποίες είναι η βιοαποικοδομησιμότητά του, η βιοσυμβατότητα, η προστασία του εγκλεισμένου φαρμάκου, η πιθανότητα παρατεταμένης απελευθέρωσης του φαρμάκου, η δυνατότητα τροποποίησης των ιδιοτήτων της επιφάνειας ώστε η αλληλεπίδραση με τα βιολογικά υλικά να είναι καλύτερη.

Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι σε νανοσωματίδια PLGA έχουν εγκριθεί από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για τη χρήση τους σε συστήματα διανομής φαρμάκου (drug delivery) για παρεντερική χορήγηση και επιπλέον, μπορούν να εισαχθούν σε νανοσωματίδια PLGA υδρόφιλες και υδρόφοβες ενώσεις, μικρού μεγέθους ή ακόμα και μεγαλομόρια. <sup>[88]</sup>

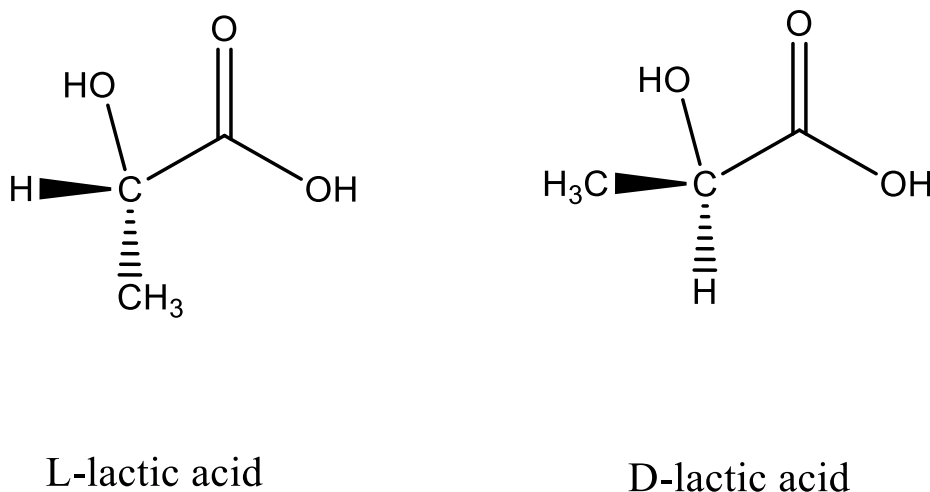
- II. Το πολυ(γαλακτικό) οξύ PLA είναι ένας αλειφατικός πολυεστέρας με πολλά πλεονεκτήματα έναντι άλλων πολυμερών. Ήδη από τη δεκαετία του 1970, τα προϊόντα PLA έχουν εγκριθεί από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για την άμεση επαφή με βιολογικά υγρά.

Μερικά από τα πιο σημαντικά πλεονεκτήματά του είναι η ανανεωσιμότητα, η βιοσυμβατότητα, η βιοαποσύνθεση και η εξοικονόμηση ενέργειας. Το PLA προέρχεται από ανανεώσιμες πηγές και πόρους που διασπώνται, όπως το καλαμπόκι και το ρύζι, ενώ τα προϊόντα αποδόμησής του, δηλαδή το H<sub>2</sub>O και το CO<sub>2</sub>, δεν είναι τοξικά και καρκινογόνα για τον ανθρώπινο οργανισμό, γεγονός που το καθιστά εξαιρετικό υλικό για βιοϊατρικές εφαρμογές.<sup>[89]</sup>

Παρόλο που το PLA είναι ένα βιοϋλικό με εξαιρετικές ιδιότητες, έχει επίσης ορισμένα μειονεκτήματα, τα κυριότερα από τα οποία είναι:

- Ο ρυθμός υποβάθμισης μέσω υδρόλυσης των εστερικών ομάδων είναι πολύ αργός. Αυτή η διαδικασία διαρκεί μερικές φορές ακόμα και χρόνια, γεγονός που μπορεί να εμποδίζει τις εφαρμογές της βιοϊατρικής και της συσκευασίας των τροφίμων
- Το PLA είναι πολύ εύθραυστο, γεγονός που το καθιστά ακατάλληλο για απαιτητικές εφαρμογές μηχανικής απόδοσης
- Το PLA είναι έντονα υδρόφοβο και μπορεί να εκμειεύσει φλεγμονώδεις αποκρίσεις από τους ιστούς των ζώντων ξενιστών, λόγω της χαμηλής συγγένειάς του με κύτταρα όταν χρησιμοποιείται σαν ένα υλικό μηχανικής ιστών.

Τα δύο ισομερή του γαλακτικού οξέος είναι το L-γαλακτικό οξύ και το D-γαλακτικό οξύ (Σχήμα 41). Καθαρό L-γαλακτικό οξύ ή D-γαλακτικό οξύ, ή μίξη αυτών είναι απαραίτητα για τη δημιουργία του PLA.<sup>[89]</sup>



Σχήμα 41. Τα στερεοϊσομερή του γαλακτικού οξέος

Το ομοπολυμερές του LA είναι μια λευκή σκόνη σε θερμοκρασία δωματίου. Το PLA υψηλού μοριακού βάρους είναι ένα άχρωμο, γυαλιστερό, άκαμπτο θερμοπλαστικό υλικό με ιδιότητες παρόμοιες με το πολυστυρένιο.

Τα δύο ισομερή του LA μπορούν να παράγουν τέσσερα διακριτά υλικά:

- I. το πολυ-(D-γαλακτικό οξύ) (*PDLA*), ένα κρυσταλλικό υλικό με τακτική δομή αλυσίδας
- II. το πολυ-(L-γαλακτικό οξύ) (*PLLA*), το οποίο είναι ημικρυσταλλικό με τακτική δομή αλυσίδας
- III. το πολυ-(D, L-γαλακτικό οξύ) (*PDLLA*), το οποίο είναι άμορφο
- IV. το μεσο-PLA, που λαμβάνεται από τον πολυμερισμό του μεσο-γαλακτιδίου

Τα PDLA, PLLA και PDLLA είναι διαλυτά σε κοινούς διαλύτες συμπεριλαμβανομένου του βενζολίου και του χλωροφορμίου, και αποικοδομούνται με απλή υδρόλυση του εστερικού δεσμού.



Το PLA έχει αποικοδόμηση ημίσειας ζωής στο περιβάλλον που κυμαίνεται από 6 μήνες έως 2 χρόνια, ανάλογα με το μέγεθος και το σχήμα του αντικειμένου, την αναλογία των ισομερών του, και τη θερμοκρασία.

Οι ιδιότητες εφελκυσμού του PLA μπορεί να ποικίλουν ευρέως ανάλογα με το αν υφίσταται ανόπτηση ή προσανατολισμό, ή ανάλογα με τον βαθμό της κρυσταλλικότητάς του. <sup>[89]</sup>

Το PLA, ως ένας βιοδιασπώμενος και βιοσυμβατός πολυεστέρας που μπορεί να παραχθεί από ανανεώσιμες πηγές και μέσω των νέων τεχνικών που επιτρέπουν οικονομική παραγωγή υψηλού μοριακού βάρους PLA, το καθιστούν ως ένα από τα πλέον ελπιδοφόρα υλικά για την αντικατάσταση των συνθετικών πολυμερών.

Οι ιδιότητες του PLA είναι καλές οπτικά, φυσικά και μηχανικά σε σύγκριση με άλλα πολυμερή, όπως το πολυστυρένιο και το πολυπροπυλένιο (Πίνακας 1). <sup>[90]</sup>

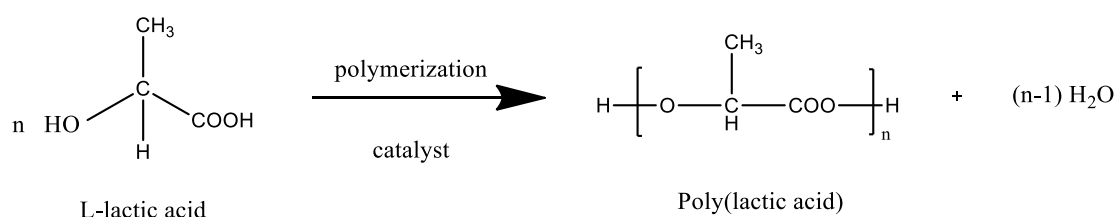
<b>ΙΔΙΟΤΗΤΑ</b>	<b>PLA</b> (πολυγα- λακτικό οξύ)	<b>PE</b> (πολυαιθυλένιο)	<b>PS</b> (πολυστυρέ- νιο)	<b>PP</b> (πολυπροπυλέ- νιο)	<b>PET</b> (τερεφθαλικό πολυαιθυλέ- νιο)
<b>Βιοαποικοδόμηση</b>	+	-	-	-	-
<b>Βιοσυμβατότητα</b>	+	+	-	-	-
<b>Θερμοπλαστικότητα</b>	+	+	+	+	+
<b>Θερμοκρασία Τήξεως (°C)</b>	145-186	124-136	240	134-174	200-265
<b>Θερμοκρασία Υαλώδους Μετάπτωσης (°C)</b>	53-64	-120	100	-18 έως -3	69-115
<b>Αντοχή σε εφελκυσμό (MPa)</b>	28-50	12-44	20-50	19-42	47-90

Πίνακας 1: Ιδιότητες θερμοπλαστικών πολυμερών υλικών

Οι δύο κύριες συνθετικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την σύνθεση του PLA είναι η άμεση πολυσυμπύκνωση και ο πολυμερισμός με άνοιγμα του δακτυλίου:

### Άμεση Πολυσυμπύκνωση

Δεδομένου ότι το μονομερές γαλακτικό οξύ (LA) διαθέτει και ομάδα υδροξυλίου (-OH) και καρβοξυλομάδα (-COOH) που απαιτούνται για τον πολυμερισμό, η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί απευθείας από την αυτο-συμπύκνωση (Σχήμα 42) :



Σχήμα 42. Άμεση πολυσυμπύκνωση του γαλακτικού οξέος

Ο απευθείας πολυμερισμός περιλαμβάνει την πολυσυμπύκνωση διαλύματος και τήγματος, ανάλογα με το αν ένας διαλύτης χρησιμοποιείται στην αντίδραση με σκοπό τη διάλυση ή όχι του PLA.

Στην περίπτωση πολυσυμπύκνωσης διαλύματος, προστίθεται ένας οργανικός διαλύτης με την ικανότητα να διαλυτοποιεί το PLA και χωρίς να επηρεάζει την αντίδραση.

Ωστόσο ο πολυμερισμός διαλύματος έχει ορισμένα μειονεκτήματα, όπως το γεγονός ότι επηρεάζεται από διάφορες ακαθαρσίες του διαλύτη και από τις πλευρικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα, όπως η ρακεμοποίηση και η trans-εστεροποίηση. Επιπλέον, απαιτούνται μεγάλες ποσότητες οργανικών διαλυτών που είναι πιθανοί ρυπαντές για το περιβάλλον.

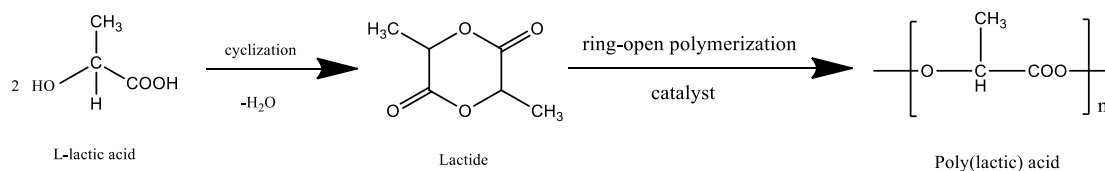
Σε αντίθεση, η πολυσυμπύκνωση τήγματος των μονομερών μπορεί να προχωρήσει χωρίς οργανικό διαλύτη, αλλά μόνον εάν η θερμοκρασία της αντίδρασης παραμένει πάνω από την θερμοκρασία τήξης (Tm) του πολυμερούς. Η μέθοδος αυτή μπορεί να μειώσει το κόστος της σύνθεσης σημαντικά λόγω της απλοποιημένης διαδικασίας, αλλά πρέπει ακόμη να επιλυθούν σημαντικά προβλήματα ώστε να μπορέσει να εφαρμοστεί βιομηχανικά, λόγω της ευαισθησίας του σε συνθήκες αντίδρασης. <sup>[89]</sup>

### Πολυμερισμός με άνοιγμα του δακτυλίου

Λαμβάνοντας υπόψη τα μειονεκτήματα του άμεσου πολυμερισμού, το PLA συνήθως συντίθεται μέσω πολυμερισμού με άνοιγμα του δακτυλίου (ring-open polymerization), μια σημαντική και αποτελεσματική μέθοδος για την παρασκευή PLA υψηλού μοριακού βάρους.

Η αντίδραση αυτή απαιτεί την αυστηρή καθαρότητα του μονομερούς που αποκτήθηκε από τον διμερισμό του μονομερούς γαλακτικού οξέος. Το PLA λαμβάνεται με τη χρήση ενός καταλύτη μαζί με το μονομερές υπό κενό ή αδρανή ατμόσφαιρα.

Με τον έλεγχο του χρόνου παραμονής και τις θερμοκρασίες, σε συνδυασμό με τον τύπο του καταλύτη και τη συγκέντρωση, ελέγχεται η αναλογία και η ακολουθία των D- και L-γαλακτικών οξέων (LA) στο τελικό πολυμερές. <sup>[89]</sup>



Σχήμα 43. Πολυμερισμός του γαλακτικού οξέος με άνοιγμα δακτυλίου

---

# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

## 4.1 Συσκευές και Όργανα Εργαστηρίου

Για την διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών της σύνθεσης των ενώσεων και της παραγωγής των νανοσωματιδίων, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες συσκευές:

1. Φασματογράφος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) *Varian 300MHz*, για την ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν.

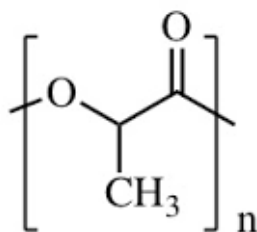
Οι σταθερές συζεύξεως  $J$  δίνονται σε Hz και οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων δίνονται σε ppm. Η πολλαπλότητα των σημάτων στα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR περιγράφεται ως απλή (s), διπλή (d), διπλή διπλών (dd), τριπλή (t), τετραπλή (q), πολλαπλή (m), broad (br).

2. Συσκευή *Gallenkamp*, για την μέτρηση των σημείων τήξης των ενώσεων.
3. Συσκευή *Malvern Zetasizer Nano ZSP*, για τις μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS).
4. Φυγόκεντρος *Sorvall RC 28S* (DuPont) και κεφαλή *Sorvall F28/50*.
5. Φασματογράφος ορατού υπεριώδους UV-Vis διπλής δέσμης.
6. Συσκευή *Temperature Controlled Shaker*.

## 4.2 Υλικά

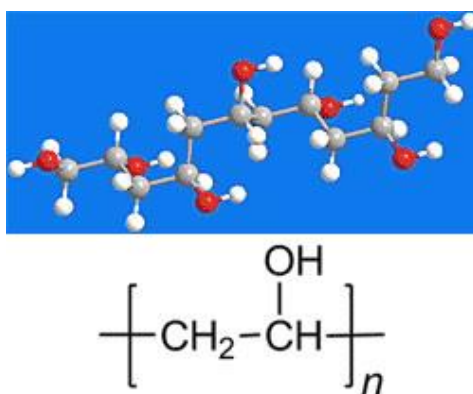
Χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια υψηλής καθαρότητας εμπορικά διαθέσιμα. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων είναι τα εξής:

- Πολυ-γαλακτικό οξύ (PLA) , μοριακού βάρους ( $M_n$ ) 56.000 g/mol, της εταιρεία Natureplast.



Εικόνα 15. Χημική δομή μορίου πολυ(γαλακτικού οξέος)

- Πολυ-βινυλική αλκοόλη (PVA) που χρησιμοποιείται ως γαλακτωματοποιητής, της εταιρείας Alsa Aesar, υψηλού μοριακού βάρους, υδρολυμένη κατά 87–89%.



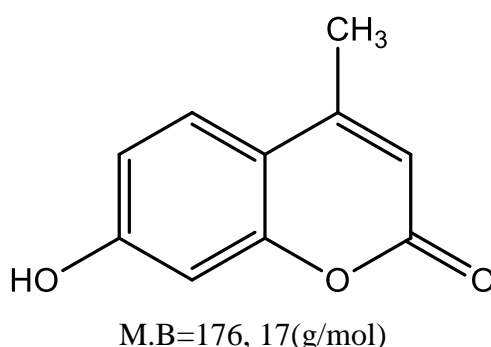
Εικόνα 16. Στεreoχημική και χημική δομή μορίου πολυ(βινυλικής αλκοόλης)

## 4.3 Συνθετική πορεία βιοδραστικών ενώσεων

### A. 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη

Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται, υπό ψύξη και συνεχή ανάδευση, 10g (0,09 mol) ρεσορκινόλης (resorcinol) και 12ml ακετοξικού αιθυλεστέρα (ethyl aceto-acetate) παρουσία 100ml διαλύτη θειϊκού οξέος (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Το τελικό προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή κίτρινου στερεού, σε μορφή νιφάδων.



**Απόδοση : 50 %**

**Σημείο τήξεως: 186-187 °C**

**Σημείο τήξεως βιβλιογραφίας: 186-191° C**

Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 24 ώρες, υπό αδρανή ατμόσφαιρα και σε θερμοκρασία που διατηρείται κάτω από τους 10°C. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα-οξικού αιθυλεστέρα (PE/EtOAc) με αναλογία 7-3. Το διάλυμα της αντίδρασης, στη συνέχεια, αναμιγνύεται με πάγο και ύστερα από έντονη ανάδευση καταβυθίζεται στερεό.

Ακολουθεί διήθηση υπό κενό του διαλύματος και το στερεό συγκρατείται στον ηθμό.

Το τελικό καθαρό προϊόν παραλαμβάνεται ύστερα από ανακρυστάλλωση με διαλύτη αιθανόλη.

Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H NMR.

## B. Γενική Μέθοδος Σύνθεσης γερανυλοξυ-κουμαρινών

Σε σφαιρική φιάλη που περιέχει ξηρή ακετόνη προστίθενται η κουμαρίνη που πρόκειται να αλκυλιωθεί και το αλκυλοβρωμίδιο, παρουσία ανθρακικού καλίου ( $K_2CO_3$ ). Στην σφαιρική φιάλη προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 24 ώρες στους  $80^\circ C$ , υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα-οξικού αιθυλεστέρα (PE/EtOAc) με αναλογία 7-3. Μετά το τέλος της αντίδρασης το μίγμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου, το ανθρακικό κάλιο διηθείται και εκπλένεται ο ηθμός με μικρή ποσότητα ακετόνης. Το διήθημα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση οπότε προκύπτει στερεό υπόλειμμα. Το τελικό προϊόν λαμβάνεται ύστερα από ανακρυστάλλωση.

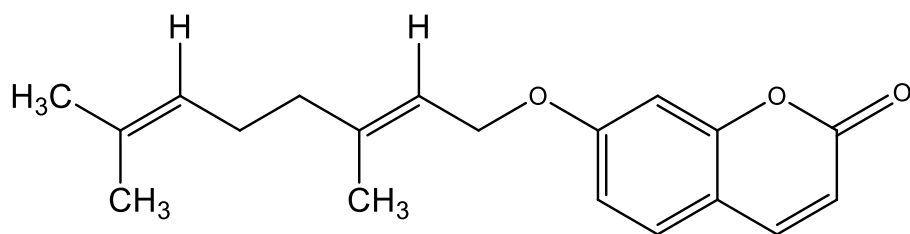
Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία  $^1H$  NMR.

### i. 7-γερανυλοξυ-κουμαρίνη

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης των γερανυλοξυ-κουμαρινών, σε 21,6ml ξηρής ακετόνης προστίθενται 0,25g (0,0015 mol) 7-υδροξυ-κουμαρίνη, 0,4ml γερανυλοβρωμίδιο (geranyl bromide) και 0,21g (0,0015 mol) ανθρακικό κάλιο. Προκύπτει στερεό προϊόν ύστερα από διήθηση υπό κενό.

Ο καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιείται με ανακρυστάλλωση του στερεού που δημιουργήθηκε και διαλύτες 3ml μεθανόλη και 1ml εξάνιο. Το διάλυμα που προκύπτει απ την ανακρυστάλλωση, ψύχεται ώστε να καταβυθιστεί στερεό και έπειτα διηθείται υπό κενό.

Το τελικό προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή σκόνης, λευκού χρώματος.



M.B=298, 38 (g/mol)

**Ποσότητα : 130 mg**

**Απόδοση : 52 %**

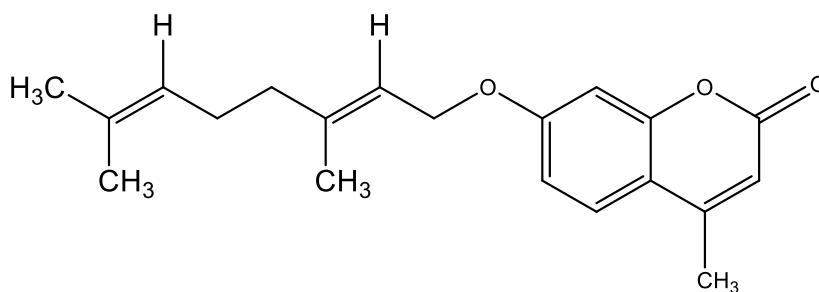
**Σημείο τήξεως: 66-67 °C**

**Σημείο τήξεως βιβλιογραφίας: 68 °C**

## ii. 7-γερανυλοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης των πρενυλοξυ-κουμαρινών, σε 19,9ml ξηρής ακετόνης προστίθενται 0,25g (0,0014 mol) 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη, 0,3ml γερανυλοβρωμίδιο (geranyl bromide) και 0,19g (0,0014 mol) ανθρακικό κάλιο. Προκύπτει στερεό προϊόν ύστερα από διήθηση υπό κενό. Ο καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιείται με ανακρυστάλλωση του στερεού που δημιουργήθηκε και διαλύτες 3ml μεθανόλη και 1ml εξάνιο. Επειδή δεν καταβυθίστηκε στερεό, το διάλυμα συμπυκνώνεται και αφήνεται για περαιτέρω εξάτμιση των διαλυτών στην αντλία.

Το τελικό προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή πάστας, καφέ χρώματος.



M.B=312,40 (g/mol)

**Ποσότητα : 169 mg**

**Απόδοση : 67,6 %**



## 4.4 Σχηματισμός νανοσωματιδίων PLA και εγκλεισμός των ενώσεων

Η παρασκευή των νανοσωματιδίων από πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη *μέθοδο γαλακτωματοποίησης με ταυτόχρονη εξάτμιση του οργανικού διαλύτη* και εφαρμόζεται κυρίως για τον εγκλωβισμό υδρόφοβων ενώσεων.

Η μέθοδος πραγματοποιείται σε δύο στάδια:

- i. Το πρώτο στάδιο της μεθόδου απαιτεί τη γαλακτωματοποίηση του οργανικού διαλύματος πολυ(γαλακτικού οξέος) (PLA), το οποίο έχει αναμειχθεί με το διάλυμα της προς εγκλωβισμού ένωσης και του οργανικού διαλύτη στον οποίο αυτή διαλύεται (*ασυνεχής οργανική φάση*). Η οργανική φάση εισάγεται σε υδατικό διάλυμα πολυβινυλικής αλκοόλης (PVA) που αποτελεί την *συνεχή υδατική φάση*.
- ii. Στο δεύτερο στάδιο ακολουθεί η εξάτμιση του διαλύτη στον οποίο είναι διαλυμένο το πολυμερές, το οποίο τελικά κατακάθεται (ίζημα) με τη μορφή νανοσφαιριδίων.

### ➤ *Υδατικό διάλυμα πολυ-βινυλικής αλκοόλης (PVA) 1%*

Πραγματοποιείται παρασκευή της υδατικής φάσης, με προσθήκη σε ένα ποτήρι ζέσεως, 1g πολυ-βινυλικής αλκοόλης (PVA) μαζί με 100ml απιονισμένο νερό, ώστε να προκύψει διάλυμα περιεκτικότητας 1% (w/v). Το ποτήρι ζέσεως με το υδατικό διάλυμα αφήνεται σε μαγνητικό αναδευτήρα, με ταχύτητα 250 rpm και σε θερμοκρασία 45 °C. Μετά από 4 ώρες και αφού η πολυ-βινυλική αλκοόλη έχει διαλυτοποιηθεί πλήρως, το διάλυμα που βρίσκεται στο ποτήρι ζέσεως τοποθετείται προς φύλαξη σε κλειστό μπουκάλι (διάλυμα stock), από το οποίο λαμβάνεται κάθε φορά κατάλληλη ποσότητα για τα πειράματα του νανοεγκλεισμού.

### ➤ *Παρασκευή «κενών» πολυμερικών σωματιδίων (Blanks)*

Αρχικά, από το υδατικό διάλυμα 1% PVA που έχουμε παρασκευάσει, ζυγίζουμε 30 ml σε ένα ποτήρι ζέσεως και το αφήνουμε για ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε μαγνητικό αναδευτήρα. Στη συνέχεια, γίνεται η παρασκευή του οργανικού διαλύματος με συγκέντρωση 1%. Για τον σκοπό αυτόν, σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετούνται 30 mg πολυμερούς PLA μαζί με 3 ml διαλύτη ακετόνη, και αφού ο δοκιμαστικός σωλήνας καλυφτεί με parafilm που εμποδίζει την εξάτμιση του διαλύτη,

οδηγείται για ανάδευση σε vortex, ώστε να διαλυτοποιηθεί πλήρως το πολυμερές. Έπειτα, πραγματοποιείται έγχυση 2 ml του οργανικού διαλύματος PLA με αργό ρυθμό, με τη χρήση σύριγγας, εντός της υδατικής φάσης που βρίσκεται υπό ανάδευση. Κατά την ανάμιξη της οργανικής με την υδατική φάση, παρατηρείται ο σχηματισμός γαλακτώματος. Η ανάδευση συνεχίζεται για 10 min στον μαγνητικό αναδευτήρα και ακολουθεί τοποθέτηση του γαλακτώματος σε αναδευτήρα (shaker) για 24h, στα 100 rpm και στους 27 °C, με στόχο την αργή εξάτμιση του οργανικού διαλύτη και το σχηματισμό των σωματιδίων PLA.



Εικόνα 17. Shaker Gallenkamp

Η απομόνωση των σωματιδίων από το υδατικό διάλυμα πραγματοποιείται με 3 διαδοχικές φυγοκentrήσεις. Η πρώτη φυγοκentrηση πραγματοποιείται για 5 min, στους 25°C και σε 5.000 rpm, με σκοπό την καταβύθιση των μεγαλύτερων σωματιδίων. Τα σωματίδια που καταβυθίζονται απορρίπτονται και το υπερκείμενο ανακτάται και φυγοκentrείται για 20 min, στους 10°C και σε 17.000 rpm. Το υπερκείμενο αυτής της φυγοκentrησης (S1) απομακρύνεται και τα νανοςωματίδια που έχουν σχηματιστεί διαλυτοποιούνται σε απιονισμένο νερό, ώστε να ακολουθήσει η τρίτη φυγοκentrηση για 20 min, στους 10°C και σε 17.000 rpm. Το υπερκείμενο αυτής της φυγοκentrησης (S2) απομακρύνεται και τα νανοςωματίδια, που είναι πλέον ευδιάκριτα ως συσσωμάτωμα, ξεπλένονται με 1 ml δις απιονισμένο νερό.

Σε ένα vial τοποθετείται το 1 ml με τα νανοςωματίδια και το δις απιονισμένο νερό και προστίθενται άλλα 3 ml δις απιονισμένο νερό, ώστε τελικά προκύπτει διάλυμα 4 ml, το οποίο φυλάσσεται στην ψύξη.

## ➤ *Εγκλεισμοί των ενώσεων σε πολυμερικά σωματίδια PLA*

Οι εγκλωβισμοί των τεσσάρων ενώσεων σε νανοσωματίδια PLA πραγματοποιούνται με drug loading (DL) ίσο με 20%, το οποίο ορίζεται από την σχέση:

$$DL = \frac{\text{μάζα ουσίας (mg)}}{\text{μάζα πολυμερούς (mg)}}$$

### *1. Εγκλεισμός της 7-υδροξυ-κουμαρίνης (1)*

Η διαδικασία είναι παρόμοια με αυτήν που περιγράφηκε για την παρασκευή των «τυφλών» σωματιδίων. Παρασκευάστηκε διάλυμα 1% της 7-υδροξυ-κουμαρίνης (**1**) σε οργανικό διαλύτη την μεθανόλη (MeOH), αναμιγνύοντας 15 mg της 7-υδροξυ-κουμαρίνης (**1**) μαζί με 1,5 ml μεθανόλη. Από το διάλυμα αυτό, τα 300 μl αναμιγνύονται με 1,5 ml του διαλύματος του PLA σε ακετόνη και γίνεται έγχυση αυτού του οργανικού διαλύματος σε 15 ml υδατικού διαλύματος PVA 1% w/v.

Στη συνέχεια η διαδικασία συνεχίζεται όπως αναφέρθηκε παραπάνω, με τη διαφορά ότι τα υπερκείμενα της δεύτερης και της τρίτης φυγοκέντρωσης (S1 και S2) δεν απορρίπτονται, αλλά φυλάσσονται σε κλειστές κωνικές φιάλες.

### *2. Εγκλεισμός της 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης (2)*

Η διαδικασία είναι παρόμοια με αυτήν που περιγράφηκε για την παρασκευή των «τυφλών» σωματιδίων. Παρασκευάστηκε διάλυμα 1% της 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης (**2**) σε οργανικό διαλύτη την αιθανόλη (EtOH), αναμιγνύοντας 15 mg της 7-υδροξυ-κουμαρίνης (**1**) μαζί με 1,5 ml αιθανόλη. Από το διάλυμα αυτό, τα 300 μl αναμιγνύονται με 1,5 ml του διαλύματος του PLA σε ακετόνη και γίνεται έγχυση αυτού του οργανικού διαλύματος σε 15 ml υδατικού διαλύματος PVA 1% w/v.

Και εδώ, τα υπερκείμενα της δεύτερης και της τρίτης φυγοκέντρωσης (S1 και S2) φυλάσσονται σε κλειστές κωνικές φιάλες.

### *3. Εγκλεισμός της 7-γερανυλοξυ-κουμαρίνης (3)*

Η διαδικασία είναι παρόμοια με αυτήν που περιγράφηκε για την παρασκευή των «τυφλών» σωματιδίων, με τη μόνη διαφορά ότι η εξάτμιση του οργανικού διαλύτη πραγματοποιήθηκε στον εξατμιστήρα/συμπυκνωτήρα (rotary), στα 100rpm και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Παρασκευάστηκε διάλυμα 1% της ένωσης **3** σε οργανικό διαλύτη το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), αναμιγνύοντας 15 mg της ένωσης **3** μαζί με 1,5 ml DMSO. Από το διάλυμα αυτό, τα 300 μl αναμιγνύονται με 1,5 ml του διαλύματος του PLA σε ακετόνη και γίνεται έγχυση αυτού του οργανικού διαλύματος σε 15 ml υδατικού διαλύματος PVA 1% w/v.

Τα υπερκείμενα της δεύτερης και της τρίτης φυγοκέντρησης (S1 και S2) φυλάσσονται σε κλειστές κωνικές φιάλες.

#### **4. Εγκλεισμός της 7-γερανυλοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης (4)**

Η διαδικασία είναι ίδια με αυτή που περιγράφεται για τον εγκλεισμό της κουμαρίνης **3**. Παρασκευάστηκε διάλυμα 1% της ένωσης **4** σε οργανικό διαλύτη το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), αναμιγνύοντας 15 mg της ένωσης **4** μαζί με 1,5 ml DMSO. Από το διάλυμα αυτό, τα 300 μl αναμιγνύονται με 1,5 ml του διαλύματος του PLA σε ακετόνη και γίνεται έγχυση αυτού του οργανικού διαλύματος σε 15 ml υδατικού διαλύματος PVA 1% w/v.

Όλη η διαδικασία συνεχίζεται όπως για τον σχηματισμό των σωματιδίων με την ένωση **3**, ενώ τα υπερκείμενα της δεύτερης και της τρίτης φυγοκέντρησης (S1 και S2) δεν απορρίπτονται.

## 4.5 Χαρακτηρισμός νανოსωματιδίων

### ***I. Μέγεθος και κατανομή μεγέθους***

Ο χαρακτηρισμός των νανοςωματιδίων, όσον αφορά στο μέγεθος και στον δείκτη πολυδιασποράς των νανοςωματιδίων, πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS).

Για την παρασκευή του δείγματος που προορίζεται για DLS, 20 μl από το δείγμα των 4 ml κάθε ένωσης που είχε μείνει στην ψύξη, πραγματοποιήθηκε αραιώση με 2,98 ml δις-απιονισμένο νερό και το τελικό διάλυμα που έχει όγκο 3 ml, τοποθετήθηκε σε ανάδευση για περίπου 2 ώρες, ώστε να αποκτήσει καλή διασπορά. Στη συνέχεια, το δείγμα οδηγήθηκε προς μέτρηση, η οποία πραγματοποιείται στους  $25 \pm 1$  °C.

Για κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις για το μέγεθος και το δείκτη πολυδιασποράς, από τις οποίες λαμβάνεται ο μέσος όρος.

Στις ρυθμίσεις του οργάνου ως δείκτης διάθλασης (Refractive index R.I.), λαμβάνεται ο δείκτης διάθλασης του νερού R.I. =1.330.



Εικόνα 18. Όργανο Malvern Zetasizer Nano

## ***II. Δυναμικό επιφανείας (ζ-δυναμικό)***

Για τον προσδιορισμό του ζ-δυναμικού των νανοσωματιδίων, χρησιμοποιήθηκε ξανά η μέθοδος δυναμικής σκέδασης φωτός (DLS).

Η προετοιμασία του δείγματος ακολουθεί την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε και για τον προσδιορισμό του μεγέθους. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται στους  $25 \pm 1$  °C, ενώ για κάθε δείγμα, πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις, από τις οποίες λαμβάνεται ο μέσος όρος.

### ***III. Ποσοστό εγκλωβισμού – φόρτωση των ενώσεων στα νανοσωματίδια***

Η ικανότητα εγκλωβισμού των μορίων στα νανοσωματίδια (Encapsulation Efficiency, EE) προσδιορίζεται έμμεσα μέσω της φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).

Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των μη εγκλωβισμένων ενώσεων στα διαλύματα S1 και S2, δηλαδή στα υπερκείμενα των φυγοκεντρήσεων. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε συγκριτικά με την καμπύλη αναφοράς της κάθε ένωσης.

Συνεπώς, το ποσοστό της εκάστοτε ένωσης που εγκλωβίστηκε στα νανοσωματίδια προσδιορίζεται από τη σχέση:

$$\%EE = \frac{\text{αρχική ποσότητα ένωσης (mg)} - \text{ποσότητα ένωσης στα υπερκείμενα (mg)}}{\text{αρχική ποσότητα ένωσης (mg)}} * 100$$

## 4.6 Αποτελέσματα - Μέγεθος, Δείκτης Πολυδιασποράς, Z-Δυναμικό νανοσωματιδίων

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ο σχηματισμός των κενών (blank) νανοσωματιδίων πολυ-γαλακτικού οξέος (PLA) με μοριακό βάρος ( $M_n$ ) 56.000 g/mol, τα οποία στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν ως «τυφλό» για τα αντίστοιχα πειράματα νανοεγκλεισμού.

Πίνακας 2. Συνθήκες σχηματισμού των «τυφλών» νανοσωματιδίων PLA

<i>Θερμοκρασία (°C)</i>	<i>Ρυθμός ανάδευσης (rpm)</i>	<i>% PVA</i>	<i>Αναλογία Όγκου Οργ.-Υδ. Φάσης</i>	<i>% Φόρτωσης</i>
27	100	1	0,07	0

Ο χαρακτηρισμός των κενών νανοσωματιδίων που προέκυψαν πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS).

Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα από χαλαζία μίας χρήσεως, ενώ πραγματοποιήθηκαν 3 μετρήσεις για κάθε δείγμα ώστε να εξαχθούν πιο ακριβή αποτελέσματα.

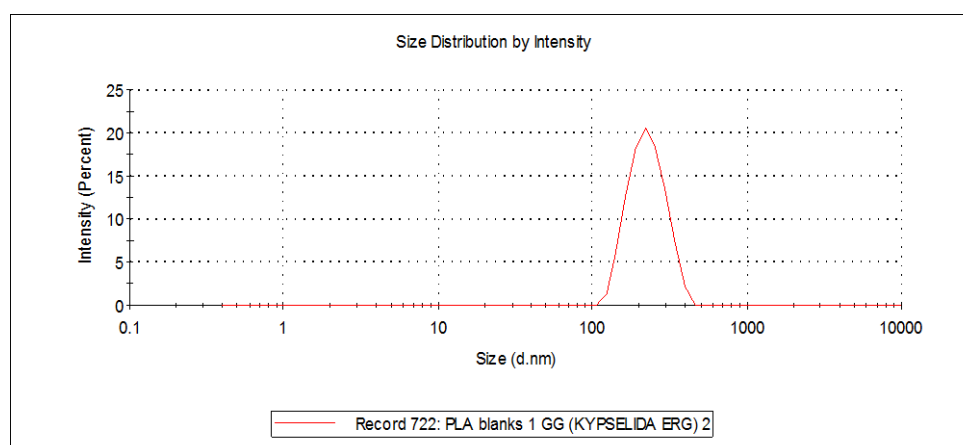
Οι τιμές των μετρήσεων παρουσιάζονται ακολούθως (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Αποτελέσματα μετρήσεων DLS (blanks)

Blanks	Διασπορά (nm)	PDI	Z-δυναμικό(mV)
1η μέτρηση	230,3	0,238	-16,4
2η μέτρηση	212,7	0,281	-17,3
3η μέτρηση	233	0,24	-18,5
<b>M.O</b>	<b>225,3</b>	<b>0,253</b>	<b>-17,4</b>

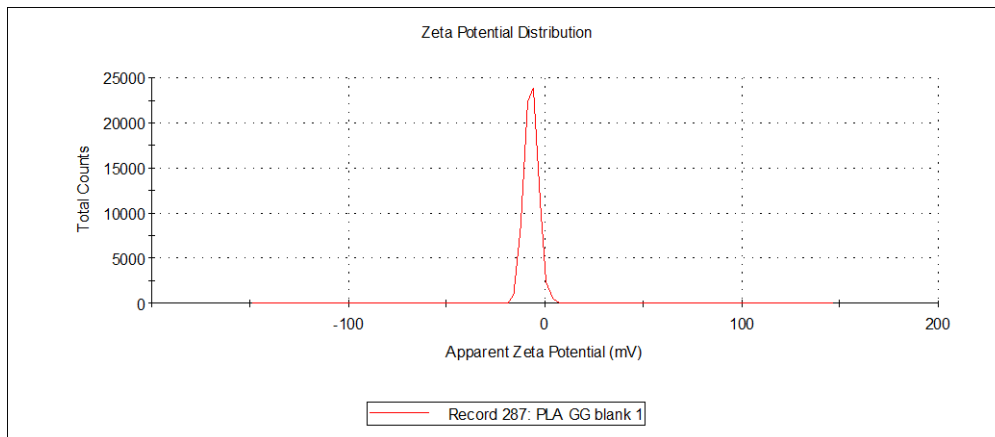
Σύμφωνα με τον Πίνακα 3, βλέπουμε ότι τα «κενά» νανοσωματίδια από PLA έχουν ένα ικανοποιητικό μέγεθος ίσο με 225,3nm, ζ-δυναμικό μικρότερο από -20mV που σημαίνει ότι εμφανίζουν επαρκή σταθερότητα και έχουν καλό ποσοστό διασποράς στο διάλυμα.

Ενδεικτικά παρατίθενται τα διαγράμματα που προέκυψαν από το συγκεκριμένο δείγμα από τη μέτρησή του μέσω της μεθόδου DLS.



Διάγραμμα 1. Κατανομή μεγέθους των «κενών» νανοσωματιδίων





Διάγραμμα 2. Κατανομή του δυναμικού επιφανείας των «κενών» νανοσωματιδίων

Τα επόμενα πειράματα αφορούν στον εγκλεισμό των βιοδραστικών ενώσεων στα νανοσωματίδια PLA. Στον Πίνακα 4 που ακολουθεί καταγράφονται οι συνθήκες σχηματισμού των φορτωμένων με τις ενώσεις **1**, **2**, **3** και **4** νανοσωματιδίων.

Πίνακας 4. Συνθήκες σχηματισμού των φορτωμένων νανοσωματιδίων PLA

Θερμοκρασία (°C)	Ρυθμός ανάδευσης (rpm)	% PVA	Αναλογία Όγκου Οργ.-Υδ. Φάσης	% Φόρτωσης
27	100	1	0,1	20

Αρχικά γίνεται ο σχηματισμός των σωματιδίων που περιέχουν την 7-υδροξυ-κουμαρίνη (**1**).

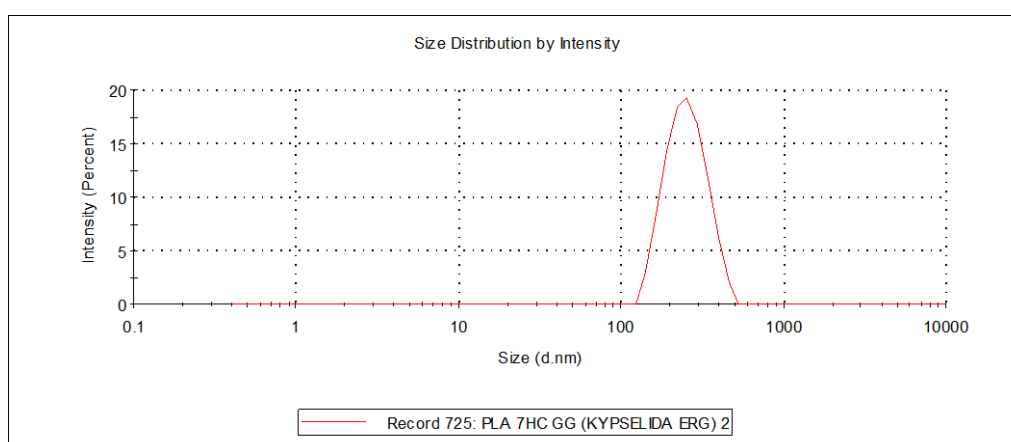
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Αποτελέσματα μετρήσεων DLS νανοσωματιδίων με την ένωση 1

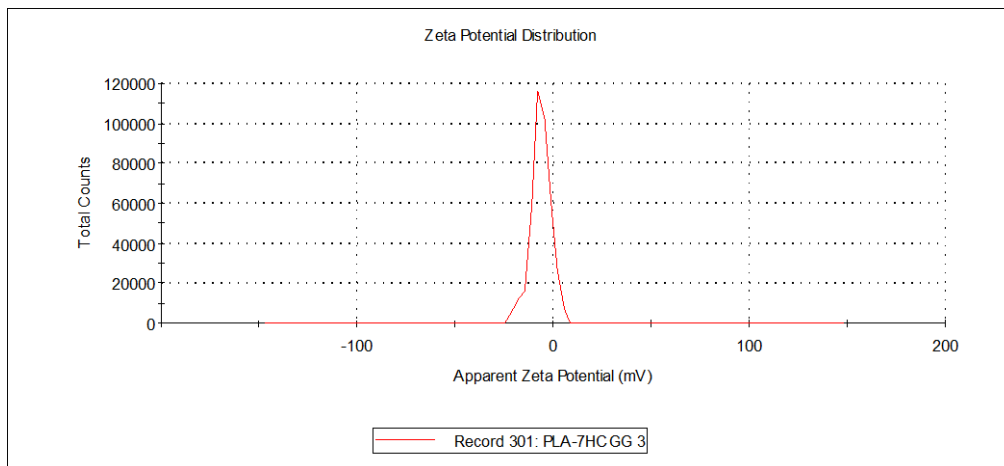
7-υδροξυ-κουμαρίνη	Διάμετρος (nm)	PDI	Z-δυναμικό (mV)
1η μέτρηση	250,7	0,22	-11,2
2η μέτρηση	280	0,205	-7,63
3η μέτρηση	255,1	0,211	-8,32
<b>M.O</b>	<b>261,9</b>	<b>0,212</b>	<b>-9,05</b>

Παρατηρούμε ότι το μέγεθος των φορτωμένων με την ένωση 1 νανοσωματιδίων είναι μεγαλύτερο από το μέγεθος των «κενών» νανοσωματιδίων, καθώς επίσης ο δείκτης πολυδιασποράς έχει μειωθεί και το ζ-δυναμικό αυξήθηκε.

Στην συνέχεια παρατίθενται τα διαγράμματα που προέκυψαν από το DLS.



Διάγραμμα 3. Κατανομή μεγέθους των φορτωμένων με την ένωση 1 νανοσωματιδίων



Διάγραμμα 4. Κατανομή του δυναμικού επιφανεΐας των φορτωμένων με την ένωση 1 νανοσωματιδίων

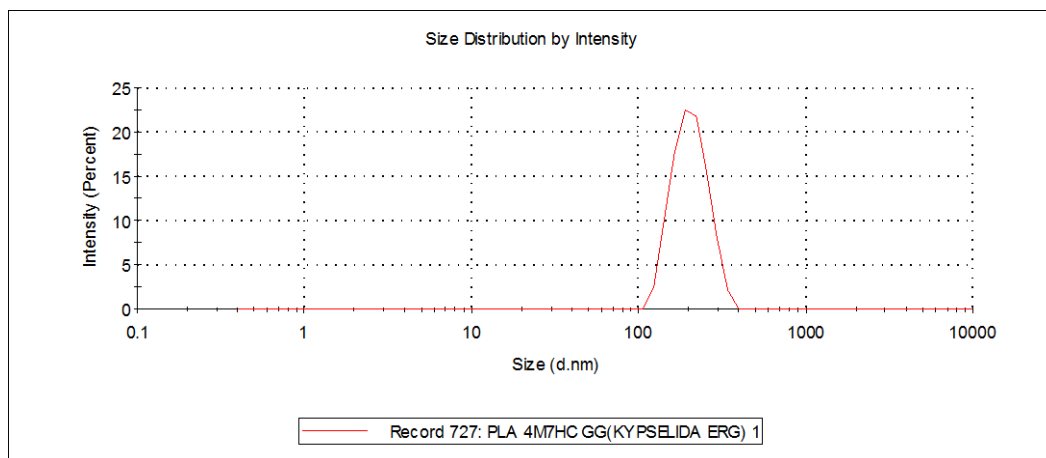
Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ο εγκλεισμός της 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης (2) και τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Αποτελέσματα μετρήσεων DLS νανοσωματιδίων με την ένωση 2

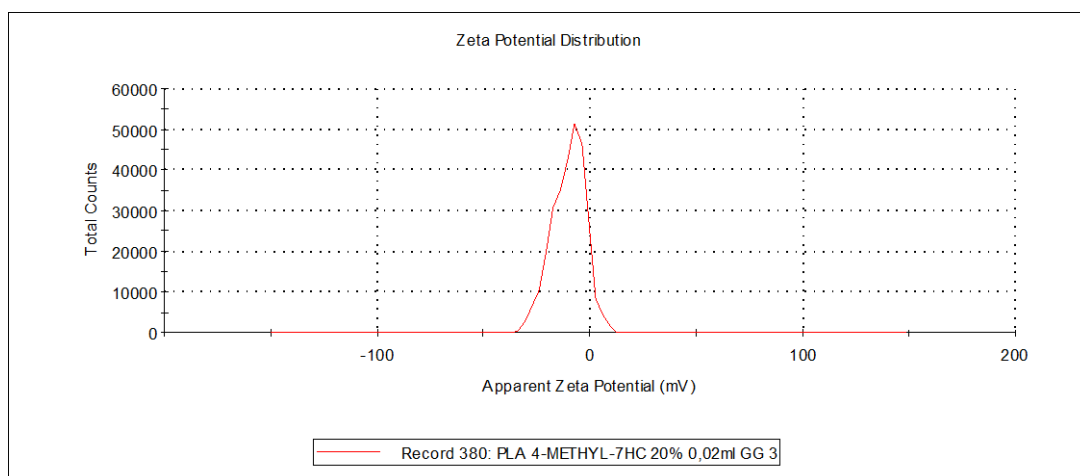
7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη	Διάμετρος (nm)	PDI	Z-δυναμικό (mV)
1η μέτρηση	208,2	0,241	-15,4
2η μέτρηση	208,4	0,235	-10,1
3η μέτρηση	212	0,228	-9,98
<b>M.O</b>	<b>209,5</b>	<b>0,235</b>	<b>-11,83</b>

Βλέπουμε ότι με το μέγεθος των νανοσωματιδίων της ένωσης 2 σε σύγκριση με τα «κενά» νανοσωματίδια είναι μικρότερο. Επίσης, ο δείκτης πολυδιασποράς έχει ελαττωθεί, ενώ το ζ-δυναμικό των νανοσωματιδίων έχει αυξηθεί σε σχέση με τα «κενά» νανοσωματίδια.

Ακολουθούν τα διαγράμματα που προέκυψαν από το συγκεκριμένο δείγμα από τη μέτρησή του μέσω της μεθόδου DLS.



Διάγραμμα 5. Κατανομή μεγέθους των φορτωμένων με την ένωση 2 νανοσωματιδίων



Διάγραμμα 6. Κατανομή του δυναμικού επιφάνειας των φορτωμένων με την ένωση 2 νανοσωματιδίων

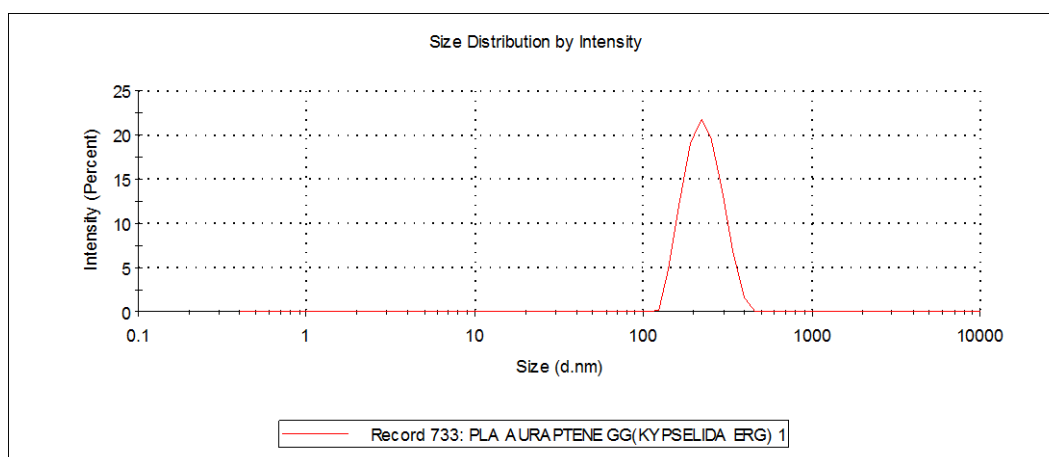
Εν συνεχεία, στον Πίνακα 7, ακολουθούν οι μετρήσεις από τα νανοσωματίδια που περιέχουν την 7-γερανυλοξυ-κουμαρίνη (3).

Πίνακας 7. Αποτελέσματα μετρήσεων DLS νανοσωματιδίων με την ένωση 3

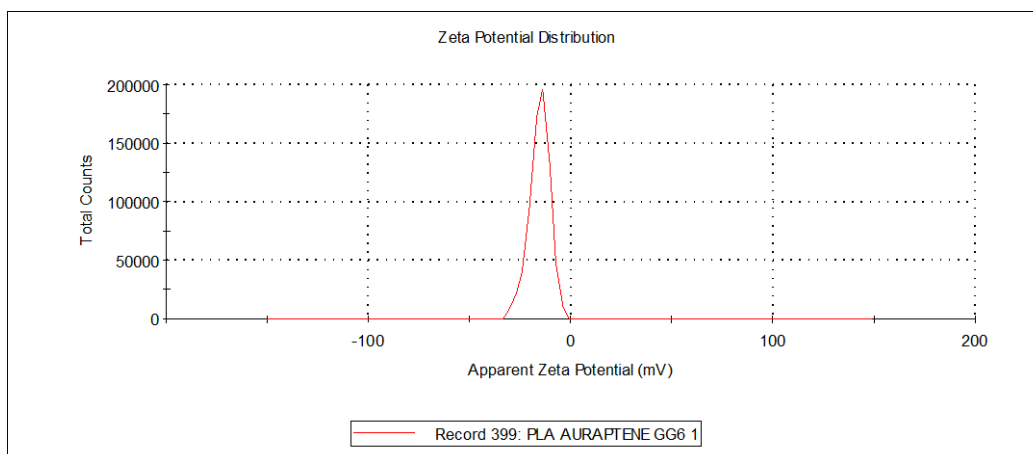
7-γερανυλοξυ-κουμαρίνη	Διάμετρος (nm)	PDI	Z-δυναμικό (mV)
1η μέτρηση	231,6	0,183	-15,3
2η μέτρηση	185,3	0,355	-12,7
3η μέτρηση	215,5	0,215	-9,47
<b>M.O</b>	<b>210,8</b>	<b>0,251</b>	<b>-12,49</b>

Παρατηρούμε ότι το μέγεθος των νανοσωματιδίων που περιέχουν την ένωση 3 είναι αρκετά μικρότερο από τα «κενά» νανοσωματίδια. Ο δείκτης πολυδιασποράς είναι σχεδόν όμοιος με τα «κενά» νανοσωματίδια, ενώ το ζ-δυναμικό έχει αυξηθεί.

Ενδεικτικά, παρατίθενται τα διαγράμματα που προέκυψαν από το συγκεκριμένο δείγμα από τη μέτρησή του μέσω της μεθόδου DLS.



Διάγραμμα 7. Κατανομή μεγέθους των φορτωμένων με την ένωση 3 νανοσωματιδίων



Διάγραμμα 8. Κατανομή του δυναμικού επιφανείας των φορτωμένων με την ένωση 3 νανοσωματιδίων

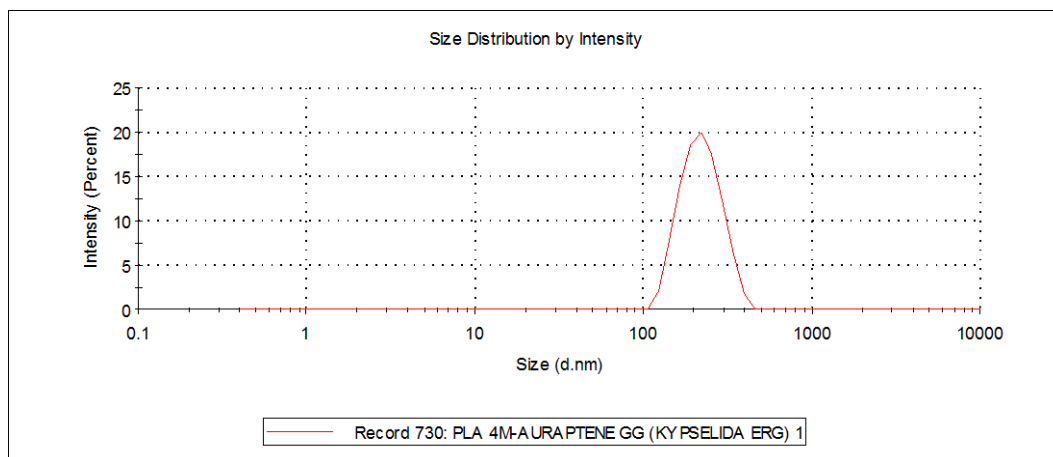
Ακόμη, πραγματοποιήθηκε ο εγκλεισμός της 7-γερανυλοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη (4) σε νανοσωματίδια PLA. Οι μετρήσεις φαίνονται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8. Αποτελέσματα μετρήσεων DLS νανοσωματιδίων με την ένωση 4

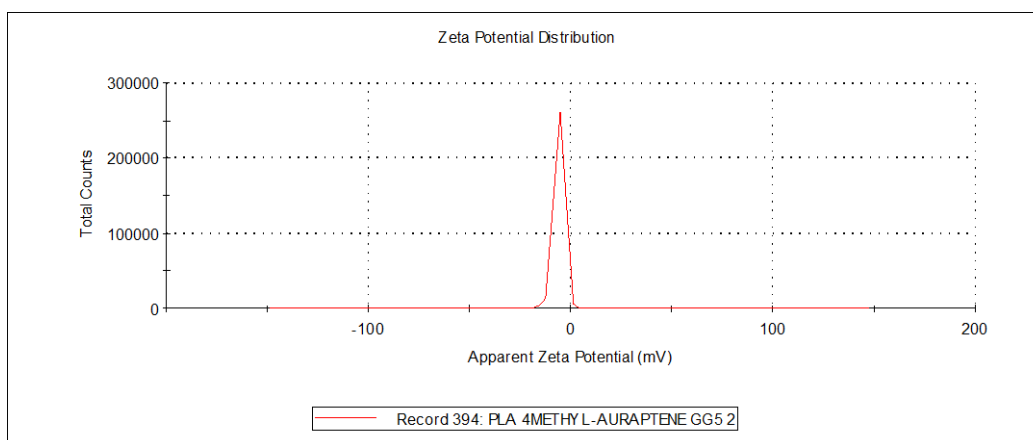
7-γερανυλοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη	Διάμετρος (nm)	PDI	Z-δυναμικό (mV)
1η μέτρηση	225,6	0,244	-15
2η μέτρηση	223,6	0,234	-5,43
3η μέτρηση	232,9	0,192	-9,12
<b>M.O</b>	<b>227,4</b>	<b>0,223</b>	<b>-9,85</b>

Στην συγκεκριμένη περίπτωση παρατηρούμε ότι το μέγεθος των νανοσωματιδίων έχει αυξηθεί λίγο σε σχέση με τα «κενά» νανοσωματίδια. Ο δείκτης πολυδιασποράς εμφανίζεται ελαττωμένος, ενώ το ζ-δυναμικό έχει αυξηθεί λίγο σε σχέση με τα «κενά» νανοσωματίδια.

Ακολουθούν τα διαγράμματα που προέκυψαν από το συγκεκριμένο δείγμα από τη μέτρησή του μέσω της μεθόδου DLS.



Διάγραμμα 9. Κατανομή μεγέθους των φορτωμένων με την ένωση 4 νανοσωματιδίων



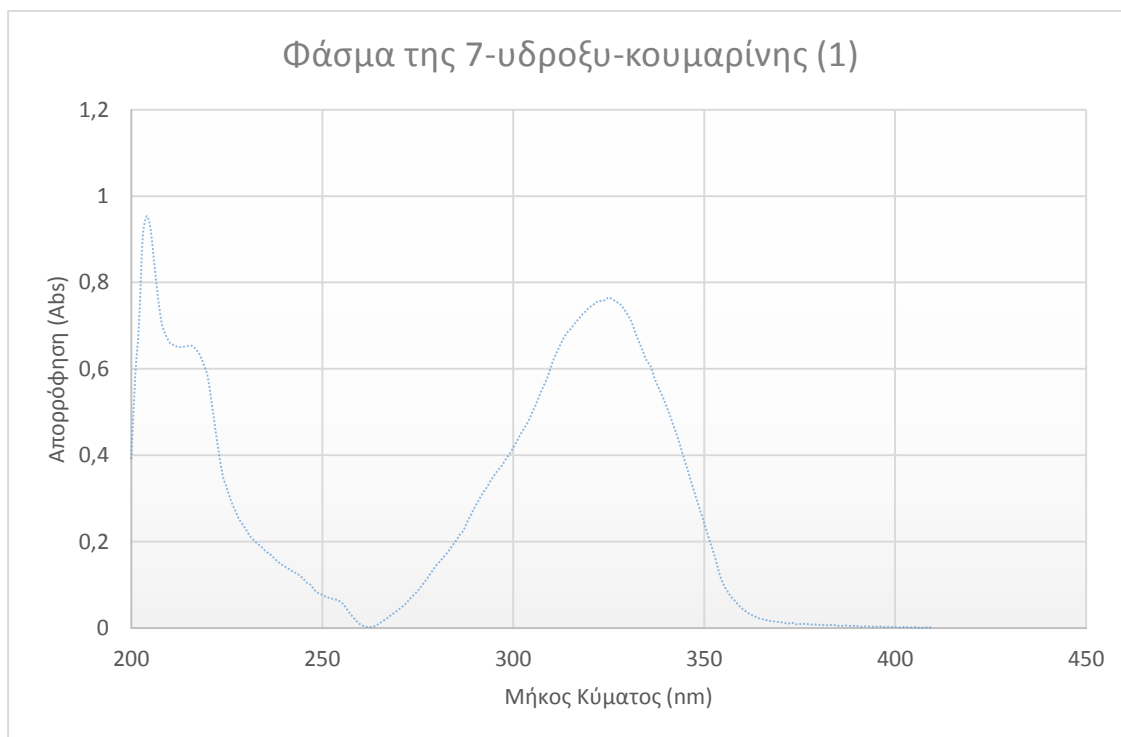
Διάγραμμα 10. Κατανομή του δυναμικού επιφάνειας των φορτωμένων με την ένωση 4 νανοσωματιδίων

## 4.7 Απόδοση Εγκλεισμού των Βιοδραστικών Ενώσεων

### a) 7-υδροξυ-κουμαρίνη

Για τον προσδιορισμό της ικανότητας εγκλεισμού (Encapsulation Efficiency, EE%) της 7-υδροξυκουμαρίνης (**1**), κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς της απορρόφησης στο όργανο UV-Vis που χρησιμοποιήθηκε, συναρτήσει της συγκέντρωσης.

Αρχικά, λήφθηκε ένα φάσμα της ένωσης **1** (Εικόνα 19), προκειμένου να προσδιοριστεί το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης. Αυτό προσδιορίστηκε στα 325 nm, οπότε ακολούθησε μέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης στο συγκεκριμένο μήκος κύματος.



Εικόνα 19. Το φάσμα της ένωσης **1**

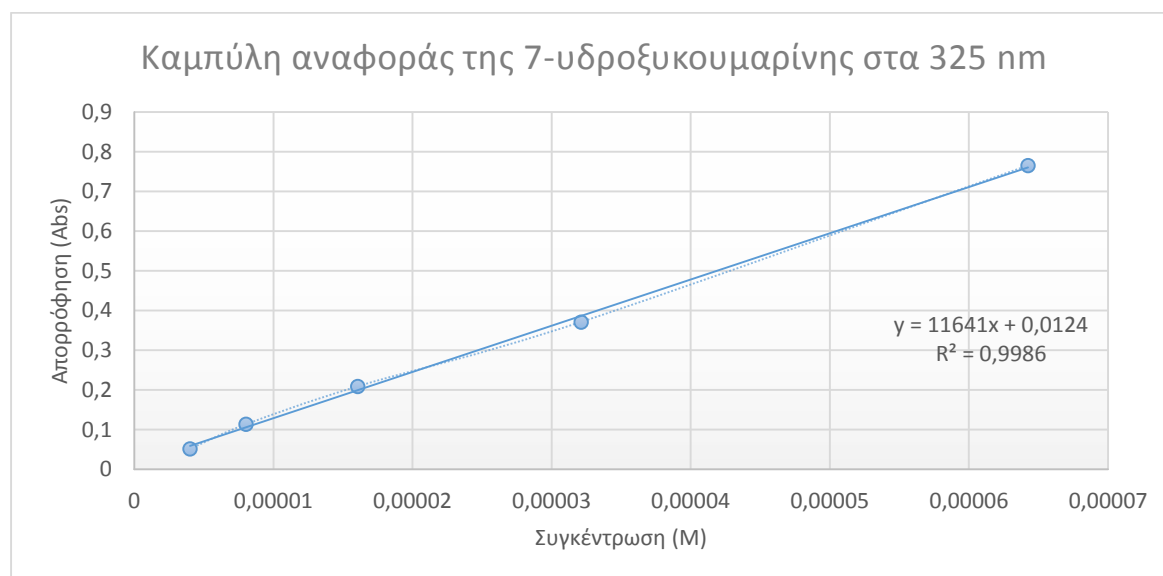


Για γνωστές συγκεντρώσεις πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις που παρουσιάζονται ακολούθως:

Πίνακας 9. Αποτελέσματα μετρήσεων πρότυπων διαλυμάτων για κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της 7-υδροξυ-κουμαρίνης (1)

Συγκέντρωση (M)	Απορρόφηση (ABS)
6,42449E-05	0,7648
3,21224E-05	0,3713
1,60612E-05	0,2092
8,03061E-06	0,1136
4,01531E-06	0,0521

Σύμφωνα με τις μετρήσεις του Πίνακα 9, κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς της 7-υδροξυ-κουμαρίνης (1) στα 325 nm, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 11.



Διάγραμμα 11. Καμπύλη Αναφοράς της 7-υδροξυ-κουμαρίνης (1)

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση της μάζας της μη εγκλεισμένης ένωσης **1**, η οποία λήφθηκε από τα υπερκείμενα S1 και S2 των φυγοκεντρήσεων.

Συγκεκριμένα, για το κάθε υπερκείμενο ελήφθη η μέγιστη απορρόφηση του κάθε δείγματος, στα 325nm. Επίσης έγινε μέτρηση του όγκου των υπερκείμενων διαλυμάτων, ώστε να βρεθεί, μέσω της συγκέντρωσης, η ακριβής μάζα της μη εγκλεισμένης ένωσης **1**.

Καθώς τα υπερκείμενα ήταν πολύ πυκνά, για την μέτρησή τους πραγματοποιήθηκε αραίωση 1/50, ώστε οι απορροφήσεις τους να βρίσκονται μέσα στο εύρος τιμών της καμπύλης αναφοράς. Τα αποτελέσματα συγκεντρώνονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10. Αποτελέσματα μετρήσεων UV-Vis για τα υπερκείμενα S1 και S2

Ένωση 1	Συγκέντρωση (M)	Απορρόφηση (Abs)	Όγκος διαλύματος(ml)	Μάζα (mg)
S1	0,00139	0,336	5,5	1,24
S2	7,13E-05	0,029	2,5	0,03
Συνολικά	0,001461	0,365	8	1,27

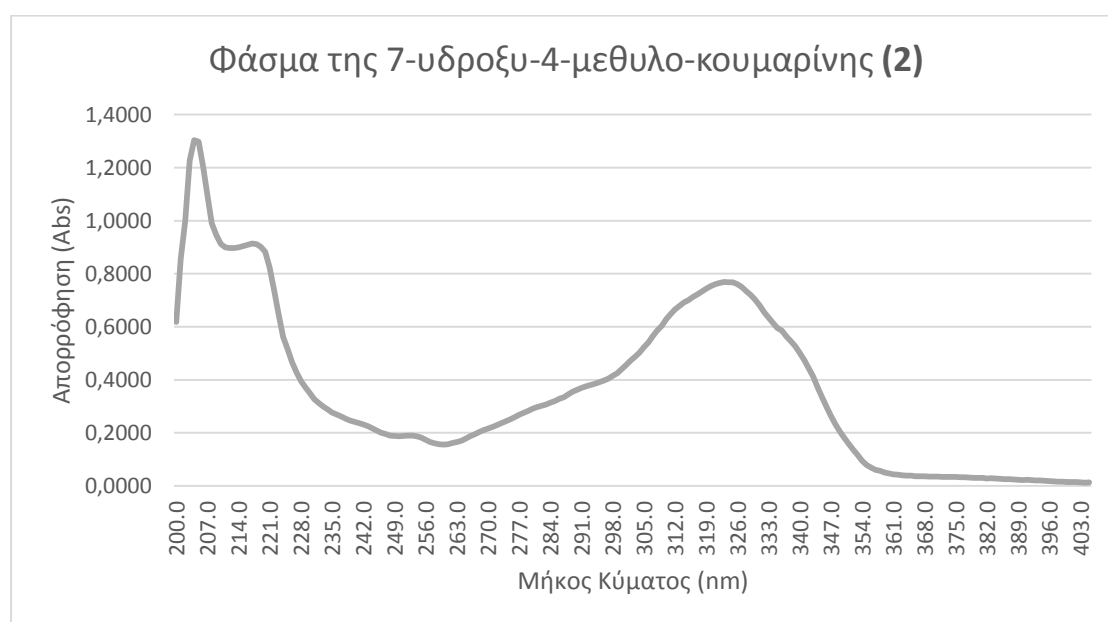
Επομένως, αν θέσουμε ως θεωρητική μάζα τα 3mg προκύπτει το εξής ποσοστό εγκλεισμού της ένωσης **1** :

$$EE_{(ένωσης1)} = 57,72\%$$

### **b) 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη**

Για τον προσδιορισμό του ποσοστού εγκλεισμού (Encapsulation Efficiency, EE%) της 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης (**2**), κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς της απορρόφησης στο όργανο UV-Vis που χρησιμοποιήθηκε, συναρτήσει της συγκέντρωσης.

Αρχικά, λήφθηκε ένα φάσμα της ένωσης **2** (Εικόνα 20), προκειμένου να προσδιοριστεί το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης. Αυτό προσδιορίστηκε στα 323 nm, οπότε ακολούθησε μέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης στο συγκεκριμένο μήκος κύματος.



Εικόνα 20. Το φάσμα της ένωσης **2**

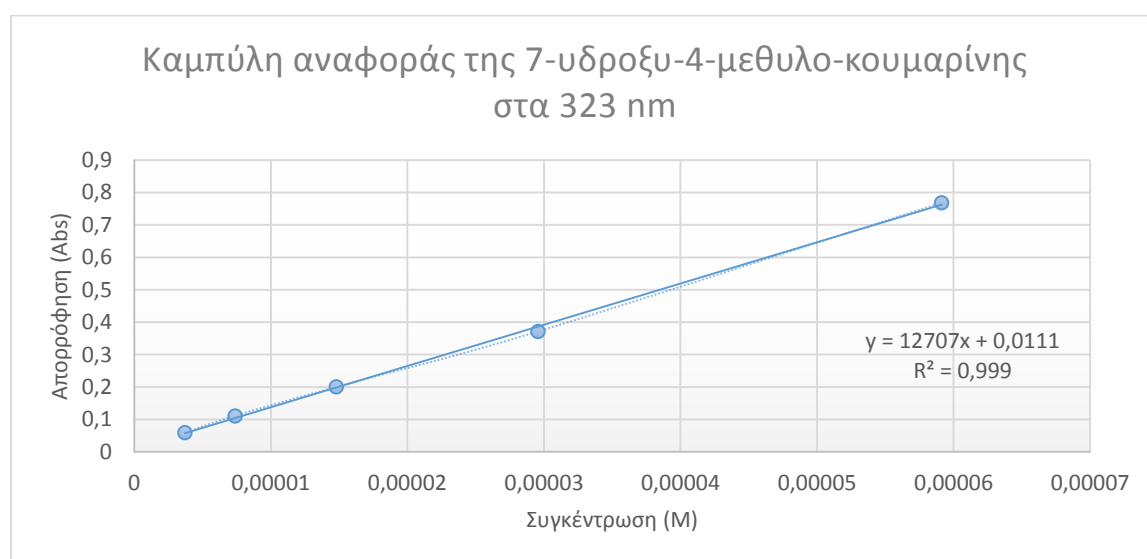
Για γνωστές συγκεντρώσεις πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις που παρουσιάζονται στον Πίνακα 11:

Πίνακας 11. Αποτελέσματα μετρήσεων πρότυπων διαλυμάτων για κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης (**2**)

<i>Συγκέντρωση (M)</i>	<i>Απορρόφηση (ABS)</i>
5,91285E-05	0,7689

$2,95642E-05$	0,3714
$1,47821E-05$	0,2003
$7,39106E-06$	0,1113
$3,69553E-06$	0,0592

Εν συνεχεία κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς της 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης (**2**) στα 323nm:



Διάγραμμα 12. Καμπύλη Αναφοράς της 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης (**2**)

Η ποσοτικοποίηση της μάζας της μη εγκλεισμένης ένωσης **2** γίνεται μέσω των υπερκειμένων, όπως και στην περίπτωση με την 7-υδροξυκουμαρίνη (**2**).

Για κάθε υπερκείμενο ελήφθη η μέγιστη απορρόφηση του κάθε δείγματος, στα 323nm, ενώ για την μέτρησή τους πραγματοποιήθηκε και πάλι αραιώση 1/50, ώστε οι απορροφήσεις τους να βρίσκονται μέσα στο εύρος τιμών της καμπύλης αναφοράς.

Πίνακας 12. Αποτελέσματα μετρήσεων UV-Vis για τα υπερκείμενα S1 και S2

Ένωση 2	Συγκέντρωση (M)	Απορρόφηση (Abs)	Όγκος διαλύματος(ml)	Μάζα (mg)
S1	0,00209	0,543	4,2	1,55
S2	8,22E-05	0,032	2,5	0,03
<b>Συνολικά</b>	0,00218	0,575	6,7	1,58

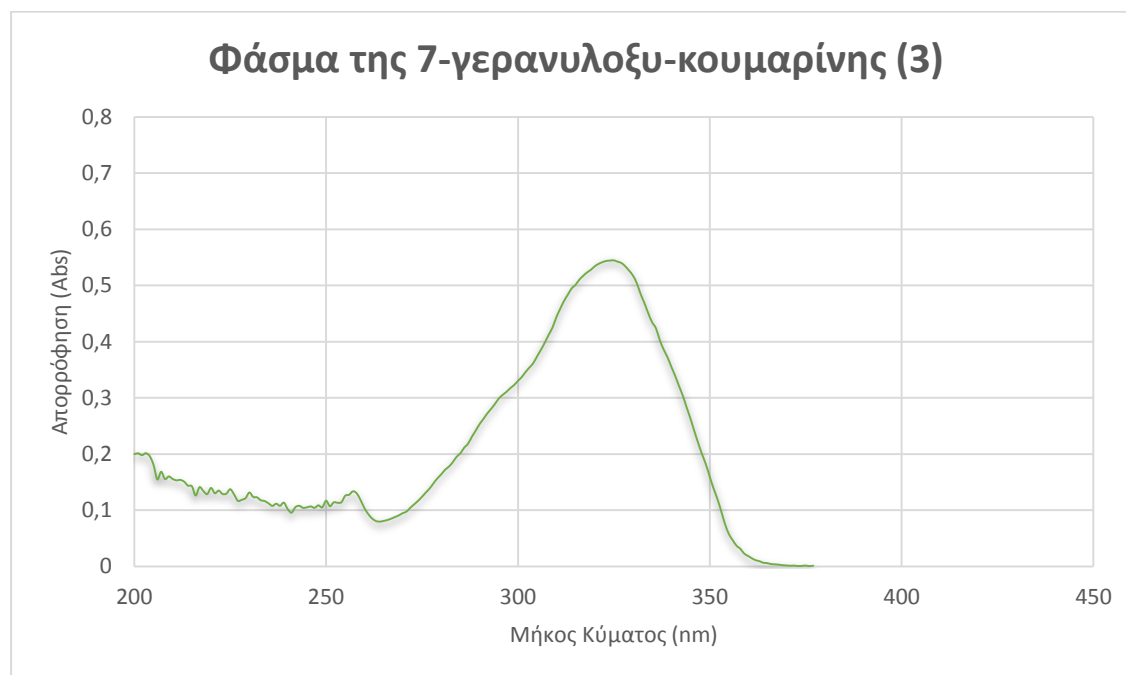
Άρα, με θεωρητική μάζα τα 3mg προκύπτει το εξής ποσοστό εγκλεισμού της ένωσης 2:

$$EE_{(ένωσης2)} = 47,17\%$$

**c) 7-γερανυλοξυ-κουμαρίνη**

Όπως στις προηγούμενες περιπτώσεις, για τον προσδιορισμό του ποσοστού εγκλεισμού (Encapsulation Efficiency, EE%) της 7-γερανυλοξυ-κουμαρίνης (**3**), κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς της απορρόφησης στο όργανο UV-Vis που χρησιμοποιήθηκε, συναρτήσει της συγκέντρωσης.

Αρχικά, λήφθηκε ένα φάσμα της ένωσης **3** (Εικόνα 21), προκειμένου να προσδιοριστεί το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης. Αυτό προσδιορίστηκε στα 325 nm, οπότε ακολούθησε μέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης στο συγκεκριμένο μήκος κύματος.



Εικόνα 21. Το φάσμα της ένωσης **3**

Για κάθε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις του Πίνακα 13 και έπειτα μέσω των μετρήσεων αυτών έγινε η καμπύλη αναφοράς της 7-γερανυλοξυ-κουμαρίνης (**3**) στα 325nm (Διάγραμμα 13):

Πίνακας 13. Αποτελέσματα μετρήσεων πρότυπων διαλυμάτων για κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της 7-γερανυλοξυ-κουμαρίνης (**3**)

<i>Συγκέντρωση (M)</i>	<i>Απορρόφηση (ABS)</i>
3,49107E-05	0,5447
1,74554E-05	0,2686

8,72769E-06

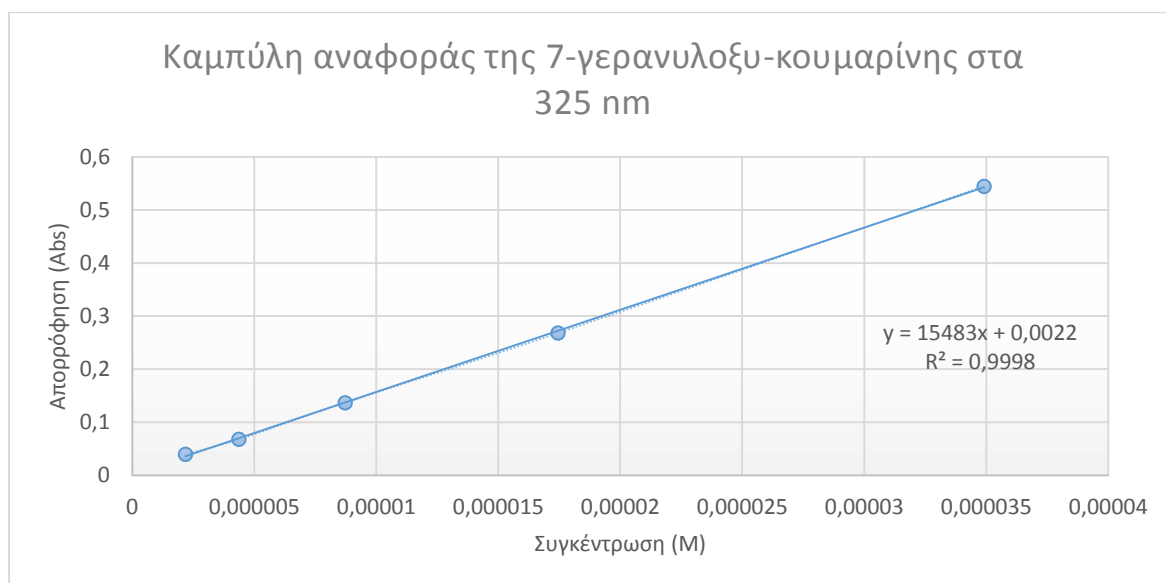
4,36384E-06

2,18192E-06

0,1371

0,068

0,0399



Διάγραμμα 13. Καμπύλη Αναφοράς της 7-γερανυλοξυ-κουμαρίνης (3)

Η ποσοτικοποίηση της μάζας της μη εγκλεισμένης ένωσης **3** γίνεται μέσω των υπερκειμένων, όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις.

Για κάθε υπερκείμενο ελήφθη η μέγιστη απορρόφηση του κάθε δείγματος, στα 325nm, ενώ για την μέτρησή τους πραγματοποιήθηκε και πάλι αραίωση 1/50.

Πίνακας 14. Αποτελέσματα μετρήσεων UV-Vis για τα υπερκείμενα S1 και S2

Ένωση 3	Συγκέντρωση (M)	Απορρόφηση (Abs)	Όγκος διαλύματος(ml)	Μάζα (mg)
S1	0,00012	0,038	6,2	0,212
S2	9,04E-06	0,005	3	0,008
Συνολικά	0,000124	0,043	9,2	0,22

Προκύπτει λοιπόν ότι με θεωρητική μάζα τα 3mg το ποσοστό εγκλεισμού της ένωσης 3 είναι ίσο με:

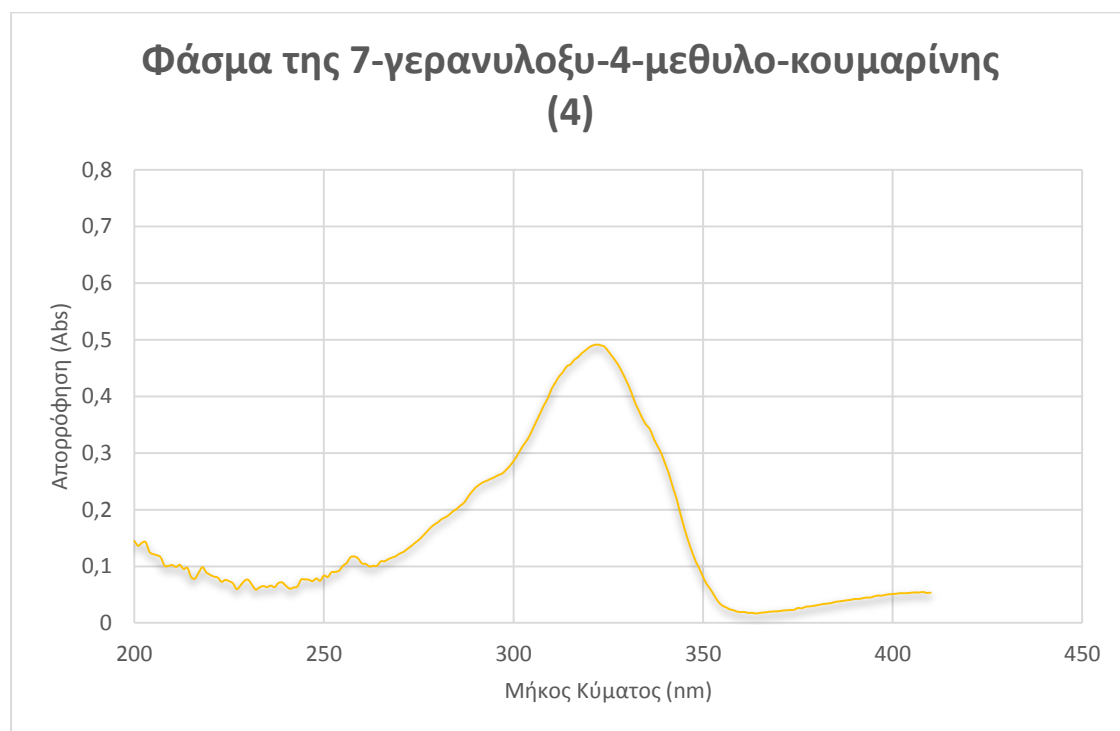
$$EE_{(ένωσης3)} = 92,6\%$$



#### d) 7-γερανυλοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη

Για τον προσδιορισμό του ποσοστού εγκλεισμού (Encapsulation Efficiency, EE%) της 7-γερανυλοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης (**4**), κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς της απορρόφησης συναρτήσει της συγκέντρωσης.

Αρχικά, λήφθηκε ένα φάσμα της ένωσης **4** (Εικόνα 22), προκειμένου να προσδιοριστεί το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης. Αυτό προσδιορίστηκε στα 322 nm, οπότε ακολούθησε μέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης στο συγκεκριμένο μήκος κύματος.



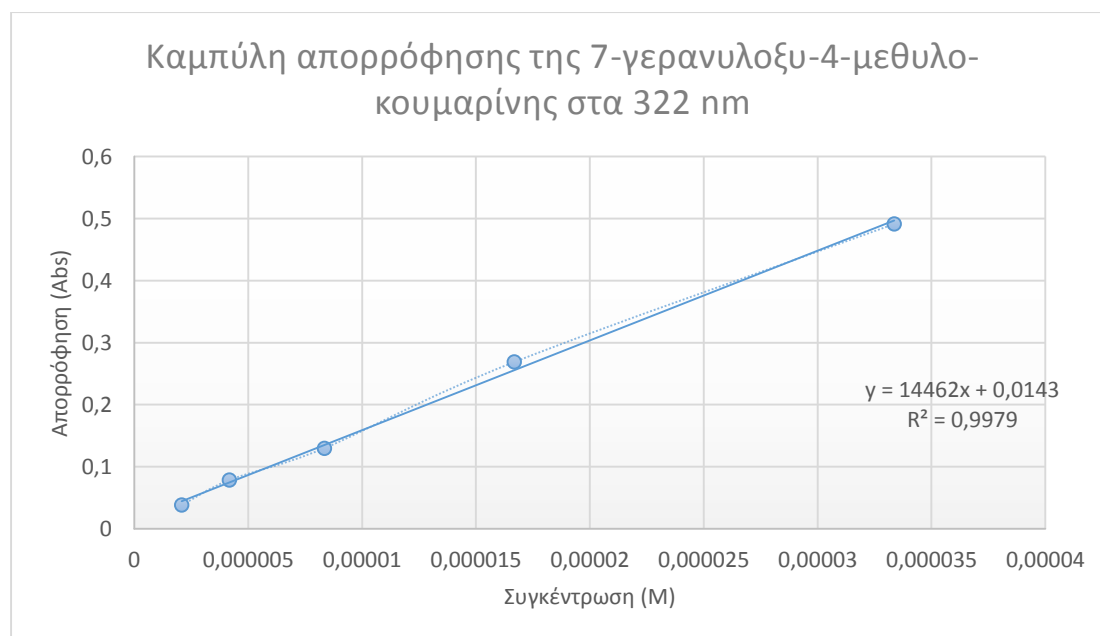
Εικόνα 22. Το φάσμα της ένωσης **4**

Για κάθε συγκέντρωση πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις του Πίνακα 15 :

Πίνακας 15. Αποτελέσματα μετρήσεων πρότυπων διαλυμάτων για κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της 7-γεραυλοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης (4)

Συγκέντρωση (M)	Απορρόφηση (ABS)
3,33686E-05	0,4915
1,66843E-05	0,2688
8,34214E-06	0,1298
4,17107E-06	0,0783
2,08554E-06	0,0381

Οπότε κατασκευάστηκε, σύμφωνα με τις μετρήσεις αυτές η καμπύλη αναφοράς της ένωσης 3 (Διάγραμμα 14):



Διάγραμμα 14. Καμπύλη Αναφοράς της 7-γεραυλοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης (4)

Η ποσοτικοποίηση της μάζας της μη εγκλεισμένης ένωσης **4** γίνεται μέσω των υπερκειμένων, όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις.

Για κάθε υπερκείμενο ελήφθη η μέγιστη απορρόφηση του κάθε δείγματος, στα 322nm, ενώ για την μέτρησή τους πραγματοποιήθηκε και πάλι αραίωση 1/50.

Πίνακας 16. Αποτελέσματα μετρήσεων UV-Vis για τα υπερκείμενα S1 και S2

Ένωση 4	Συγκέντρωση (M)	Απορρόφηση (Abs)	Όγκος διαλύματος(ml)	Μάζα (mg)
<b>S1</b>	0,00033	0,11	6,5	0,672
<b>S2</b>	-1,49E-05	0,01	2,7	-0,013
<b>Συνολικά</b>	0,00032	0,12	9,2	0,659

Τελικά προκύπτει το ποσοστό εγκλεισμού της ένωσης **4** είναι ίσο με:

$$EE_{(ένωσης4)} = 78,02\%$$

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι κουμαρίνες αποτελούν μια ομάδα ενώσεων που βρίσκονται ευρύτατα στο φυτικό βασίλειο είτε σε ελεύθερη μορφή είτε ως γλυκοζίτες και εμφανίζουν πολλές βιολογικές δράσεις, μερικές από τις οποίες είναι η αντιμικροβιακή, η αντικαρκινική, η δράση αναστολής ενζύμου, η αντιφλεγμονώδης και η αντιοξειδωτική δράση.

Συγκεκριμένα, οι κουμαρίνες που είναι υποκατεστημένες στους άνθρακες 4' και 7', όπως είναι η 7-υδροξυ-κουμαρίνη (**1**) και η 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**2**) παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και γι' αυτό τον λόγο βρίσκονται υπό συνεχή μελέτη και εξέλιξη.

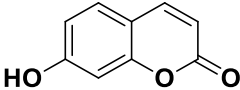
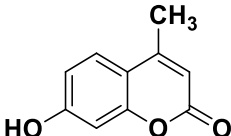
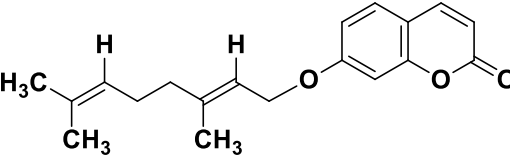
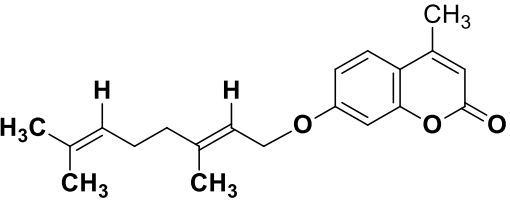
Παράγωγα των ενώσεων **1** και **2** αποτελούν οι δευτερογενείς μεταβολίτες, που είναι η 7-γερανυλοξυ-κουμαρίνη (**3**) και η 7-γερανυλοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**4**) αντίστοιχα. Οι ενώσεις **2**, **3** και **4** που συντέθηκαν κατά την εκπόνηση της εργασίας, καθώς και η ένωση **1**, αξιολογήθηκαν για την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση τους στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΑΠΘ (Καθ. Δ. Χατζηπαύλου-Λίτινα).

Ως ένωση αναφοράς για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο του DPPH και τη μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης μέσω της αναστολής της δράσης του ενζύμου λιποξυγονάση (LOX), χρησιμοποιήθηκε η αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης ένωση NDGA (Nordihydroguaiaretic acid).

Για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο του AAPH, χρησιμοποιήθηκε ως ένωση αναφοράς το Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), ένα υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό ανάλογο της βιταμίνης E.

Τα αποτελέσματα των in vitro βιολογικών δοκιμασιών των ενώσεων **1**, **2**, **3** και **4** παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 17) :

Πίνακας 17. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης των ενώσεων **1**, **2**, **3** και **4**

ΕΝΩΣΗ	Αλληλεπί- δραση με την ελεύθερη ρίζα <b>DPPH</b> (%100 $\mu$ M) 20/60 min	Αναστολή της υπεροξειδω- σης του λινολεϊκού οξέος <b>LP</b> (% 100 $\mu$ M)	Ικανότητα αναστολής της λιποξυγο- νάσης <b>LO</b> (%100 $\mu$ M)
 <b>(1)</b>	<b>1/2</b>	<b>92</b>	<b>100</b>
 <b>(2)</b>	<b>No/No</b>	<b>93</b>	<b>No</b>
 <b>(3)</b>	<b>26/6</b>	<b>52</b>	<b>44</b>
 <b>(4)</b>	<b>21/No</b>	<b>20</b>	<b>78</b>
<b>NDGA</b>	<b>93</b>	<b>-</b>	<b>86</b>
<b>Trolox</b>	<b>-</b>	<b>63</b>	<b>-</b>

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 17, παρατηρούμε ότι με την μέθοδο DPPH, την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζει η ένωση **3** μεταξύ των υπόλοιπων ενώσεων που εξετάστηκαν. Γενικά, οι ενώσεις **3** και **4** δεν αναμενόταν να εμφανίσουν αξιόλογη ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, καθώς η 7-γερανυλοξυ-κουμαρίνη **3** και η 7-γερανυλοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη **4** δεν έχουν στο μόριό τους κάποιο ελεύθερο υδροξύλιο. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της ένωσης **3** θα μπορούσαν να συγκριθούν με την ένωση αναφοράς NDGA. Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι οι ενώσεις **1** και **2** που φέρουν μια υδροξυλομάδα στο μόριό τους, με τη μέθοδο DPPH φαίνεται ότι δεν έχουν ικανοποιητική αντιοξειδωτική δράση.

Αντιθέτως, με τη μέθοδο AAPH, παρατηρούμε ότι οι ενώσεις **1** και **2** δίνουν πολύ καλά αποτελέσματα (92% και 93% αντίστοιχα), γεγονός που σημαίνει ότι αναστέλλουν αποτελεσματικά την υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος, παρουσιάζοντας αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση. Από τις γερανυλοξυ-κουμαρίνες, με τη μέθοδο AAPH, φαίνεται ότι η ένωση **3** δίνει και πάλι καλύτερα αποτελέσματα (52%), συγκρίσιμα με την ένωση αναφοράς Trolox, ενώ η ένωση **4** παρουσιάζει χαμηλότερη αντιοξειδωτική δράση.

Για την αντιφλεγμονώδη δράση των ενώσεων, παρατηρούμε ότι τη μέγιστη ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης από σόγια δίνει η ένωση **1** (100%) που έχει μόνο ένα υδροξύλιο στην θέση C7. Σημαντικό, επίσης, είναι το αποτέλεσμα για την αντιφλεγμονώδη δράση της ένωσης **2**, που όπως φαίνεται με την προσθήκη ενός μόνο μεθυλίου στη θέση C4 του μορίου, η ένωση **2** δεν αναστέλλει καθόλου το ένζυμο λιποξυγονάσης από το φυτό της σόγιας.

Από την άλλη πλευρά, η 7-γερανυλοξυ-κουμαρίνη **3** φαίνεται να παρουσιάζει μικρή αντιφλεγμονώδη δράση (44%) σε σχέση με την ουσία αναφοράς NDGA, όμως με την προσθήκη μιας μεθυλομάδας, η ένωση **4** εμφανίζει υψηλή ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης από σόγια (78%) και η δράση της είναι συγκρίσιμη με αυτή του NDGA.

Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι η ύπαρξη ενός μόνο επιπλέον μεθυλίου στην ένωση **4** μπορεί να διπλασιάσει περίπου την αντιφλεγμονώδη δράση που εμφανίζει η ένωση **3**, χωρίς την μεθυλομάδα, ενώ η ύπαρξη μιας μεθυλομάδας και μιας υδροξυλομάδας στο μόριο της ένωσης **2** μπορεί να αναστείλει την αντιφλεγμονώδη δράση της ένωσης.

## 5.1 Συμπεράσματα και Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Κατά την διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός της 7-υδροξυ-κουμαρίνης **2**, της 7-γερανυλοξυ-κουμαρίνης **3** και της 7-γερανυλοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης **4** και μελετήθηκε η αντιοξειδωτική και η αντιφλεγμονώδης δράση τους.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός των υδρόφοβων ενώσεων που συντέθηκαν σε βιοπολυμερείς μήτρες από πολυ-γαλακτικό οξύ με τη μέθοδο γαλακτωματοποίησης και εξάτμισης του οργανικού διαλύτη, με σκοπό την προστασία των υδρόφοβων ενώσεων από το φως και τον αέρα, και εξετάστηκαν τα νανοσωματίδια ως προς το μέγεθος, την πολυδιασπορά και το δυναμικό της επιφάνειάς τους.

Τα αποτελέσματα της μελέτης της βιολογικής δράσης των ενώσεων έδειξαν ότι η 7-γερανυλοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη(**4**) παρουσιάζει ιδιαίτερα αξιόλογη αντιφλεγμονώδη δράση, συγκρίσιμη με την ένωση αναφοράς και πολύ μεγαλύτερη από την αντιφλεγμονώδη δράση της 7-γερανυλοξυ-κουμαρίνης (**3**). Το γεγονός αυτό είναι ενθαρρυντικό και μας οδηγεί στην περαιτέρω μελέτη της δράσης των μορίων.

Η εισαγωγή μιας ή περισσότερων ομάδων μεθυλίου ως υποκαταστάτες στον αρωματικό δακτύλιο θα μπορούσε να μας οδηγήσει σε χρήσιμα συμπεράσματα ως προς την πιθανή δραστηριότητα των νέων ενώσεων.

Επιπλέον, οι ενώσεις που συντέθηκαν δίνουν πολύ καλά ποσοστά απόδοσης εγκλεισμού στο πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA), με τις γερανυλοξυ-κουμαρίνες να εμφανίζουν εξαιρετικά ποσοστά ικανότητας εγκλεισμού στο συγκεκριμένο πολυμερές.

Θα είχε λοιπόν ενδιαφέρον αν οι ίδιες ενώσεις εγκλείονταν σε διαφορετικό υλικό πολυμερούς ή σε κάποιο συμπολυμερές, όπως είναι το πολυ(γαλακτικό- γλυκολικό οξύ) (PLGA) ή ακόμη αν γινόταν επικάλυψη των νανοσωματιδίων με πολυ-αιθυλενο-γλυκόλη (PEG), ώστε να εξεταστεί κατά πόσο μεταβάλλεται το μέγεθος και η σταθερότητα των νέων νανοσωματιδίων, καθώς και η απόδοση εγκλεισμού αυτών.

Τέλος, σημαντική θα ήταν η μελέτη της στοχευμένης αποδέσμευσης των βιοδραστικών ενώσεων που συντέθηκαν από τις πολυμερικές μήτρες κατά την χορήγηση φαρμάκων και η αποτελεσματικότητα της δράσης τους για την θεραπεία διάφορων ασθενειών.

---

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- [1] F. Borges, F. Roleira, N. Milhazes, L. Santana and E. Uriarte, ‘Simple Coumarins and Analogues in Medical Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity’, *Current Med. Chem.*, **2005**, 12, 887-916
- [2] Vogel, A. Gilbert’s *Am. Phys.*, **1820**, 64, 161
- [3] B. G. LAKE, ‘Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment’, *Food and Chemical Toxicology*, **1999**, 37, 423-453
- [4] R. O’ Kennedy, R. Douglas Thornes, ‘Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action’, John Wiley and Sons, **1997**, ISBN 0-471-96997-4
- [5] J. R. S Hoult and Miguel Payat, ‘Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential’, *Gen. Pharmac.*, **1996**, 27, 713-722
- [6] Nida N. Farshori, Mudasir R. Banday, Anis Ahmad, Asad U. Khan, Abdul Rauf, ‘7-Hydroxy-coumarin derivatives: synthesis, characterization and preliminary antimicrobial activities’, *Med. Chem. Res.*, **2011**, 20, 535-541
- [7] L. M. Kabeya, C. N. Fuzissaki, S. H. Taleb-Contini, Ana Maria da C. Ferreira, Zeki Naal, Everton O. L. Santos, Andrea S. G. Figueiredo-Rinhel, Ana Elisa C. S. Azzoloni, R. B. Vermelho, A. Malvezzi, Antonia T.-do Amaral, Joao Luis C. Lopes, Yara Maria Lucisano-Valim, ‘7-Hydroxycoumarin modulates the oxidative metabolism, degranulation and microbial killing of human neutrophils’, *Chemico-Biological Interactions*, **2013**, 206, 63-75



- [8] Murray, R. D. H, Nat. Prod. Rep., **1995**, 12, 477
- [9] Trkovnik, M. Ivezi, Z. J. Heterocyclic Chem, **2000**, 37, 137
- [10] Aihara K., Higuchi T., Hirobe M, '3-Hydroxycoumarins: first direct preparation from coumarins using a Cu<sub>2</sub>(+)-ascorbic acid-O<sub>2</sub> system and their potent bioactivities', Biochem. Biophys. Res. Commun., **1990**, 168, 169-175
- [11] Majid M. Herari, Soheila Khaghaninejad, Manizhe Mostofi, 'Pechmann Reaction in the synthesis of coumarin derivatives', Advances in Heterocyclic Chemistry, **2014**, 112
- [12] C. F. H. Allen and J. R. Thirtle, Org. Synt. Coll, **1955**, 3, 136
- [13] R. B. Durairaj, 'Resorcinol: Chemistry, Technology and Applications', **2005**, 117-177
- [14] M.C Laufer, H. Hausmann and W.F. Holderich, 'Synthesis of 7-hydroxycoumarins by Pechmann reaction using Nafion resin/silica nanocomposites as catalysts', Journal of catalysis, **2003**, 218, 315-320
- [15] A. De la Hoz, A. Moreno, E. Vazques, Synlett, **1999**, 608
- [16] G.A.Olah, S.I.Pradeep, G.K.S. Prakash, Synthesis, **1986**, 513
- [17] G.A.Olah, J.Fraissard, L.Petrakis, 'Activity and Basicity of solids', The Netherlands, **1994**, 305
- [18] Eicher T, Hauptmann S, 'The Chemistry of Heterocycles', New York Thieme, G and Stuttgart V, **1995**, 248-251
- [19] Saha N.N, Desai V.N, Dhavale D.D, J.Org.Chem, **1999**, 64, 1715
- [20] Takechi H, Kamad S, Machida M, Chem Pharm Bull, **1996**, 44, 793
- [21] Ferroud D, Collard J, Klich M, Dupuis-Hamelin C, Mauvais P, Lassaigue P, Bonnefoy A, Musicki B, Biorg Med Chem Lett, **1999**, 9,2881

- [22] Souali Sandhu, Yogita Bansal, Om Silakari, Gulshan Bansal, 'Coumarin hybrids as novel therapeutic agents', *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, 22, 3806-3814
- [23] Borges F., Roleira F., Milhazes N., Santana L., Uriarte E., *Curr. Med. Chem.*, **2005**, 12,887
- [24] Egan D, O' Kennedy R, Moran E, Cox D, Prosser E and Thornes R.D, 'The pharmacology, metabolism, analysis and application of coumarin and coumarin-related compounds', *Drug Metabolism Reviews*, **1990**, 22, 503-529
- [25] Thornes D, Daly L, Lynch G, Browne H, Tanner A, Keane F, O' Loughlin S, Corrigan T, Daly P, Edwards G, Breslin B, Browne Hy, Shine M, Lennon F, Hanley J, Mc Murray N and Gaffney E, 'Prevention of early recurrence of high risk malignant melanoma by coumarin', *European Journal of Surgical Oncology*, **1989**, 15, 431-435
- [26] Schio L, Chatreaux F, Klich M, *Tetrahedron Lett*, **2000**, 41, 1543
- [27] Perriers A.M, Laurin P, Benedetti Y, Lachand S, Ferroud D, Iltis A, Haesslein J.L, Klich M, Hermite G, Musicki B, *Tetrahedron Lett*, **2000**, 41,867
- [28] Smyth T, Ramachandran V.N, Smyth W.F, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2009**, 33, 421
- [29] Shi Y, Zhou C, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, 21, 956
- [30] Ronad P.M, Noolvi M.N, Sapkal S, Dharbhamullo S, Maddi V.S, *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, 45, 85
- [31] Hamdi N, Saoud M, Romerosa A, Haseen R. B, *J. Heterocyclic Chem*, **2008**, 45, 1835
- [32] Asres K, Seyoum A, Veeresham C, Bucar F, *Phytother. Res*, **2005**, 19, 557

- [33] Thaisrivongs S, Watenpaugh K.D, Howe W.J, Tomich P.K, Dolak L.A, Chong K.-T, Tomich, C.-S.C, Tomasselli A.G, Turner S.R, Strohbach J.W, Mulichak A.M, Janakiraman M.N, Moon J.B, Lynn J.C, Horng M.-M., Hinshaw R.R., Curry K.A., Rothrock D.J, *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 3624
- [34] Lunney E.A., Hagen S.E., Domagala J.M., Humblet C., Kosinsky J, Tait B.D., Warmus J.S., Wilson M., Ferguson D., Hupe D., Tummino P.J, Baldwin, E.T., Bhat T.N., Liu B., Erickson W, *J. Med. Chem.*, **1994**, 37, 2664
- [35] Zhao H, Neamati N, Hong H, Mazumder A, Wang S, Sunder S, Milne G. W. A, Pommier Y, Burke Jr, T. R, *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 242
- [36] Mao P. C-M, Mouscadet J-F, Leh. H, Auclair C, Hsu L-Y, *Chem. Pharm. Bull*, **2002**, 50, 1634
- [37] Zhao H, Neamati N, Pommier Y, Burke Jr, T. R. *Heterocycles*, **1997**, 45, 2277
- [38] Abdel-Kader, M.S *Planta Med*, **2001**, 67, 388
- [39] Ishikawa T, Kotake K-I, Ishii H, *Chem. Pharm. Bull.*, **1995**, 43, 1039
- [40] Fesik S. W, *Nat. Rev. Cancer*, **2005**, 5, 876
- [41] Sloane D, *Methods Mol. Biol.*, **2009**, 471, 65
- [42] Agarwal R, *Biochem. Pharmacol*, **2006**, 6, 1042
- [43] Valenti P, *Fitoterapia*, **1996**, 68, 115
- [44] Velasco-Velázquez M.A., Agramonte-Hevia J., Barrera D., Jiménez-Orozco A., García-Mondragón M.J., MendozaPatiño N., Landa A., Mandoki J. *Cancer Lett.*, **2003**, 198, 179
- [45] Yamada M, Yasuhara H, *Neurotoxicology*, **2004**, 25, 215
- [46] Joao M, Maria-Vina D, Vazquez-Rodriguez S, Uriarte E, Santana L, *Curr. Top. Med. Chem.*, **2012**, 12, 2210

- [47] Gnerre C., Catto M., Leonetti F., Weber P., Carrupt P.-A., Altomare C., Carotti A., Testa B. J. Med. Chem., **2000**, 43, 4747
- [48] Bilokin Y.V., Vasylyev M.V., Branytska O.V., Kovalenko S.M., Chernykh V.P. Tetrahedron, **1999**, 55, 13757
- [49] Wrodnigg T.M., Withers S.G., Stütz A.E. Bioorg. Med. Chem. Lett., **2001**, 11, 1063
- [50] Satoshi Okuyama, Sona Minami, Naoko Shimada, Nahomi Makihata, Mitsunari Nakajima, Yoshiko Furukawa, 'Anti-inflammatory and neuroprotective effects of auraptene, a citrus coumarin, following cerebral global ischemia in mice', Eur. J. Pharmacology, **2013**, 699, 118-123
- [51] Wang Q, Tang X. N, Yenari M. A, 'The inflammatory response in stroke', J. Immunol, **2007**, 184, 53-68
- [52] R. E. Lee, G. Bykadi and W.A. Ritschel, 'Inhibition of prostaglandin biosynthesis by coumarin, 4-hydroxycoumarin and 7-hydroxycoumarin', **1981**
- [53] L. A. Khan, M. V Kulkarni, M. Gopal, M. S Shahabuddin, C. M Sun, Bioorg. Med. Chem. Lett., **2005**, 15, 3584
- [54] A. Maltese, F. Maugeri, K. W. Ward, C. Bucolo, Biomed. Chromatogr, **2007**, 21, 351
- [55] Melagraki G, Afantitis A, Igglessi-Markopoulou O, Detsi A, Koufaki M, Kontogiorgis C, Hadjipavlou-Litina, 'Synthesis and evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of novel coumarin-3-aminoamides and their alpha-lipoic acid adducts', Eur. J. of Med. Chem, **2009**, 44, 3020-3026
- [56] Marina Roussaki, Christos A. Kontogiorgis, Dimitra Hadjipavlou-Litina, Stylianos Hamilakis, Anastasia Detsi, 'A novel synthesis of 3-aryl

coumarins and evaluation of their antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity', *Bioorg. Med. Chem. Lett*, **2010**, 20, 3889-3892

[57] Miller D.M., Buettner G.R., Aust S.D., 'Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions', *Free Radic Biol Med.*, **1990**, 8, 95-108

[58] Inoue M., Sato E.F., Nishikawa M., Park A.M., Kira Y., Imada I., Utsumi K., 'Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life', *Curr Med Chem.*, **2003**, 10, 2495-2505

[59] Fridovich, I. Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys.* **1986**, 247, 1-11

[60] Michiels C., Raes M., Toussaint O., Remacle J., 'Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress', *Free Radic Biol Med.*, **1994**, 17, 235-248

[61] Stjepan M, Ivekovic D, Bazidar S. Grabaric, 'A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical', *Bioelectrochemistry*, **2006**, 68, 175-180

[62] Guilherme Borges Bubols, Damiana da Rocha Vianna, Alexander Medina-Rejon, Gilsane von Poser, Rosa Maria Lamuela-Raventos, Vera Lucia Eifler-Lima and Solange Cristina Garcia, 'The Antioxidant Activity of Coumarins and Flavonoids', *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2013**, 13

[63] Kadhum A.A, Mohamad A.B, Al-Amiery A.A, Takriff, M.S, 'Antimicrobial and antioxidant activities of new metal complexes derived from 3-aminocoumarin. *Molecules*', **2011**, 16, 6969-6984

[64] Francesco Epifano, Salvatore Genovese, Luigi Menghini, Massimo Curini, 'Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites', *Phytochemistry*, **2007**, 68, 939-953

- [65] Kariyone T, Matsuno T, ‘Studies on the constituents of orange oil. I. On the structure of auraptene’, *Pharm. Bull*, **1953**, 1, 19-22
- [66] Takeuchi N, Kasama T, Aida Y, Oki J, Maruyama I, Watanabe K, Tobinaga S, ‘Pharmacological activities of the prenylcoumarins, developed from folk usage as a medicine of *Peucedanum japonicum* THUNB, *Chem. Pharm. Bull.*, **1991**, 39, 1415-1422
- [67] Massimo Curini, Francesco Epifano, Federica Maltese, Maria C. Marcotullio, Aurelia Tubaro, Gianmario Altinier, Sylvia Prieto, Juan C. Rodriguez, ‘Synthesis and anti-inflammatory activity of natural and semisynthetic geranyloxycoumarins’, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 2241-2243
- [68] Tanaka T., Kawabata K., Kakumoto M., Makita H., Hara A., Mori H., Satoh K., Hara A., Murakami A., Kuki W., Takahashi Y., Yonei H., Koshimizu K., Ohigashi H., ‘Citrus auraptene inhibits chemically induced colonic aberrant crypt foci in male F344 rats’, *Carcinogenesis*, **1997**, 18, 2155–2161
- [69] Chen I. S, Lin Y. C, Tsai I. L, Teng C. M, Ko F. N, Ishikawa T, Ishii H, *Phytochemistry*, **1995**, 39, 1091
- [70] Murakami A, Matsumoto K, Koshimizu K, Ohigashi H, ‘Effects of selected food factors with chemopreventive properties on combined lipopolysaccharide- and interferon- $\gamma$ -induced I $\kappa$ B degradation in RAW264.7 macrophages’, *Cancer Letters*, **2003**, 195, 17–25
- [71] Kent U.M, Lin H, Noon K. R, Harris D. L, Hollenberg P. F, ‘Metabolism of bergamottin by cytochromes P450 2B6 and 3A5’, *J. Pharm. Exp. Ther.*, **2006**, 318, 992-1005
- [72] John McMurry, ‘Οργανική Χημεία’, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, **2010** , Τόμος II, 829-830

- [73] John McMurry, 'Οργανική Χημεία', Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, **2010**, Τόμος I, 463-465
- [74] Valerie Bethmont, Fabienne Fache, Marc Lemaire, 'An Alternative Catalytic Method to the Williamson's Synthesis of Ethers', *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36, 4235-4236
- [75] Alexander R. Surrey, 'Name Reactions in Organic Chemistry - Williamson Synthesis', *Second Edition Revised and Enlarged*, **1961**, 244-245
- [76] Cuvelier M. E., Richard H., Berset C., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1992**, 56, 324-325
- [77] M. S. Blois, 'Antioxidant determinations by the use of a stable free radical', *Nature*, **1958**, 181, 1199-1200
- [78] Anastasia Detsi, Maya Majdalani, Christos A. Kontogiorgis, Dimitra Hadjipavlou-Litina, Panagiotis Kefalas, 'Natural and synthetic 20-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity', *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 8073-8085
- [79] Theodoros Symeonidis, Konstantina C. Fylaktakidou, Dimitra J. Hadjipavlou-Litina, Konstantinos E. Litinas, *Europ. Journal of Med. Chem.*, **2009**, 44, 5012– 5017
- [80] Mc Millian R. M, Walker E. R. H, 'Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors', *Trends Pharmacol Sci.*, **1992**, 13, 323-30
- [81] Nagavarma B V N, Hemant K.S.Yadav, Ayaz A, Vasudha L.S, Shivakumar H.G, 'Different Techniques for preparation of polymeric nanoparticles-A review', *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, **2012**, 5

- [82] Κ. Κυπαρισσίδης, Ο. Καμμώνα, Σ. Χαϊτίδου, ‘Εφαρμογές Νανοτεχνολογίας στην Ιατρική’, Intellectum, **2008**, 4, 5-20
- [83] Catarina Pinto Reis, Ronald J. Neufeld, Antonio J. Ribeiro, Francisco Veiga, ‘Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles’, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, **2006**, 2, 8– 21
- [84] Gurny, R., Peppas, N.A., Harrington, D.D. and Banker, G.S., Drug Develop. Ind. Pharm., **1981**, 7, 1
- [85] D.B. Shenoy, M.M. Amiji, ‘Poly-(ethylene-oxide)-modified poly-(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer’, Int. J. Pharm, **2005**, 293, 261– 270
- [86] Kayser.O, A. Lemke and N. Hernández-Trejo., ‘The Impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems’, Current Pharmaceutical Biotechnology, **2005**, 6,35
- [87] OV Salata, ‘Applications of nanoparticles in biology and medicine’, Journal of Nanobiotechnology, **2004**, 2, 1-6
- [88] Fabienne Danhier, Eduardo Ansorena, Joana M. Silva, Régis Coco, Aude Le Breton, Véronique Prétat, ‘PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications’, Journal of Controlled Release, **2012**, 161,505–522
- [89] Lin Xiao, Bo Wang, Guang Yang, Mario Gauthier, ‘Poly (Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications’, Intech, **2012**, 248-282
- [90] M. Żenkiewicz, P. Rytlewski, R. Malinowski, ‘Compositional, physical and chemical modification of polylactide’, Journal of achievements in materials and manufacturing engineering, **2010**, 43, 192-198







