

### ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

## Τροποποιήση φυσικών προϊόντων στοχεύοντας την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητάς τους



ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΔΙΑΜΑΝΤΗΣ ΧΗΜΙΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017



### ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

## Τροποποιήση φυσικών προϊόντων στοχεύοντας την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητάς τους



ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΔΙΑΜΑΝΤΗΣ ΧΗΜΙΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017 Εισαγωγή στο Π.Μ.Σ. του κ.Δημήτριου Διαμαντή : 27-10-2014

Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ: Επίκουρος Καθηγητης Τζάκος Ανδρέας

Θέμα: «Τροποποιήση φυσικών προϊόντων στοχεύοντας την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητάς τους»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.:953Α/14-07-2017

- 1. Τζάκος Ανδρέας
- 2. Σίσκος Μιχαήλ
- 3. Κασιούμη Θεωδώρου Βασιλική

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διατριβής στις ....-....

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας Λέκκα Μαρία - Ελένη, Καθηγήτρια Βαμβέτσου Η Γραμματέας του Τμήματος Ζωή-Βαλεντίνα

### Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φασματοσκοπίας Οργανικών Ενώσεων του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του Επίκουρου κ. Τζάκου Ανδρέα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, τον επιβλέποντα μου Επίκουρο Καθηγητή Ανδρέα Τζάκο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το θέμα της παρούσας εργασίας καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με διαφορετικά και ενδιαφέροντα θέματα καθώς και για την καθοδήγησή του σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή κ.Σίσκο Μιχαήλ και την Καθηγήτρια Βασιλικη Θεοδώρου – Κασιούμη για το άμεσο ενδιαφέρον τους και την ευχάριστη συνεργασία μας καθώς επίσης και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή τους. Επίσης τους ευχαριστώ γιατί πάντα είχαν χρόνο να μου αφιερώσουν στις απορίες μου και για να μου προσφέρουν τις σημαντικές υποδείξεις και τις γνώσεις τους.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω το προσωπικό του Κέντρου NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για όλη τη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη λήψη φασμάτων NMR καθώς και τον Δρ. Αθανάσιο Καρκαμπούνα για την βοήθειά του στη λήψη φασμάτων μάζας, υψηλής διακριτικής ικανότητας HRMS.

Θα ήταν παράλειψη εκ μέρους μου να μην ευχαριστήσω τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών και ιδιαίτερα τον Δρ. Σταμάτη Χαράλαμπο, για την πολύτιμη βοήθεια τους στην λήψη φασμάτων φθορισμού.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω να πω στους παλιούς και νέους συναδέλφους και φίλους Ειρηναίο Βρέττο, Χρήστο Χατζηγιάννη, Αντώνη Τσιαϊλάνη, Ευγένιο Στύλο, Μαριάννα Σακκά, Αλεξάνδρα Χατζηκωνσταντίνου, Έφη Μαυρογιαννάκη, Ανδρονίκη Κωσταγιάννη, Ελένη Αλεξανδρή, Μιχάλη Αλαγιάννη, Φωτεινή Χαλκίδου, Nisar Sayyad, Abdul Shaikh και Μαρία Χατζηαθανασιάδου για την πολύτιμη φιλία τους, αλλά και τη βοήθεια και την στήριξη που μου πρόσφεραν αυτά τα δύο χρόνια, σε προσωπικό και επιστημονικό επίπεδο, η οποία για μένα είναι ανεκτίμητη και τους ευχαριστώ θερμά γι αυτό.

Επίσης, τον Δρ.Andrea Babič για την διεξαγωγή των βιολογικών πειραμάτων, που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Φαρμακευτικής του Πανεπιστήμιο της Γενεύης, την Δρ. Romana Sokolava για την διεξαγωγή των πειραμάτων κυκλικής βολταμετρίας που πραγματοποιήθηκαν στο Φυσικό τμήμα της ακαδημίας της Τσεχίας καθώς επίσης και τον Καθηγητή Θωμά Μαυρομούστακο του Ε.Κ.Π.Α. για την διεξαγωγή των πειραμάτων NMR στερεής κατάστασης που πραγματοποίησε στην Γερμανία.

Τέλος, το ευχαριστώ είναι λίγο για να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου Θανάση και Ευτυχία και στον αδερφό μου Σταύρο, για την αμέριστη συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια. Τους ευχαριστώ που στάθηκαν δίπλα μου και για την παρότρυνση και στήριξή τους να ακολουθήσω τα ενδιαφέροντα και τις σπουδές μου.

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης- ΕΤΠΑ) και από εθνικούς πόρους στο πλαίσιο του έργου με τίτλο : «Πλατφόρμα σάρωσης μικρών μορίων που στοχεύουν πρωτεΐνες που εμφανίζουν δομική αταξία» (Κωδ. Ε.Ε. 81392), της Δράσης «ΑΡΙΣΤΕΙΑ ΙΙ» του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του ΕΣΠΑ 2007-2013.







Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Κατά την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής οι παρακάτω εργασίες έχουν ήδη δημοσιευθεί στη διεθνή βιβλιογραφία ή βρίσκονται στο στάδιο της προετοιμασίας:

- 1. Mapping the Interactions and Bioactivity of Quercetin–(2-Hydroxypropyl)-Cyclodextrin Complex (International Journal of Pharmaceutics)
- Lipophilic ester derivatives of rosmarinic acid protect cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> more effectively than their corresponding amide analogs: the potential role of their intracellular accumulation. (υπό προετοιμασία)
- 3. Rational design of flavonoids prodrugs triggered by alkaline phosphatase (ALP) at the cancer microenvironment. (υπό προετοιμασία)
- 4. Exploring the oxidation, metal ion responsive and DNA protection behavior of a Quercetin 2HP-β-CD complex (υπό προετοιμασία)
- 5. Development of Trifunctional pNiPAm Based Hybrid Nanogels for Biomedical Applications (υπό προετοιμασία)

### Κατάλογος Κυριότερων Συμβόλων και Συντομογραφιών

- FDA Αμερικάνικη Υπηρεσία τροφίμων και φαρμάκων
- GSH Γλουταθειόνη
- ROS Δραστικές ρίζες οξυγόνου
- NTR Νιτροαναγωγαση
- ALP Αλκαλική φωσφατάση
- PBr<sub>3</sub> Τριβρωμιούχος φωσφόρος
- TMSI Ιωδιούχο τριμέθυλοσιλάνιο
- Κ<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Ανθρακικό κάλιο
- NaBH4 Βοροϋδρίδιο του νατρίου
- CD Κυκλοδεξτρίνη
- 2HPbCD (2-Υδροξυπροπυλο) κυκλοδεξτρίνη
- HRMS Φασματομετρία μάζης υψηλής διακριτικής ικανότητας
- UV-vis Φασματοσκοπία ορατού Υπεριώδους
- NMR Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
- ESIPT Διεγερμένη ενδομοριακή μεταφορά πρωτονίων
- DOSY Φασματοσκοπία NMR διάχυσης
- NOESY Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού μέσω φαινομένου Overhauser
- ΑCΝ Ακετονιτρίλιο
- MeOH Μεθανόλη
- EtoAc Οξικός αιθελεστέρας
- DCM Διγλωρομεθάνιο
- ργ Πυριδίνη
- CDCl<sub>3</sub> Δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
- DMSO-d<sub>6</sub> Δευτεριωμένο Διμέθυλοσουλφοξείδιο
- D<sub>2</sub>O Δευτεριωμένο νερό
- EtOH Αιθανόλη

### Περιεχόμενα

Ευχαριστίες
Σκοπός και αντικείμενο της μεταπτυχής διατριβής12
Κεφάλαιο 1 Τα Φυσικά προϊόντα και σχεδιασμός νέων φαρμάκων13
1.1 Ο ρόλος που διαδραματίζουν τα φυσικά προϊόντα στο σχεδιασμό νέων φαρμάκων. 14
1.2 Βιοσύνθεση φλαβονοειδών
1.3 Κατηγορίες πολυφαινολών
1.3.1 Φαινολικά οξέα17
1.3.2 Φλαβονοειδή
1.5 Βιολογική αξιολόγιση των φλαβονοειδών23
1.5.1 Τα φλαβανοειδή ως άμεσοι δεσμευτές των ελευθέρων ριζών
1.5.2 Αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών μέσω συμπλοκοποίησης με μεταλλικά ιόντα
1.5.3 Αντικαρκινική δράση25
1.6 Μακροκυκλικά μόρια25
1.6.1 Τρόποι απελευθέρωσης του φιλοξενούμενου μόριου από την κοιλότητα των κυκλοδεξτρίνων
Κεφάλαιο 2 Βασικές αρχές αναλυτικών τεχνικών
2.1 Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV - vis)
2.2 Φασματοσκοπία Φθορισμού
2.3 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)
2.3.1 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού σε διάλυμα
2.3.2 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού σε στερεή κατάσταση 36
2.4 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού σε δύο διαστάσεις
2.4.1 Ομοπυρηνική 2D Φασματοσκοπία Συσχέτισης μέσω του Φαινομένου ΝΟΕ <sup>1</sup> Η- <sup>1</sup> Η
2.4.2 Φασματοσκοπία NMR Διάχυσης DOSY (Diffusion Ordered NMR Spectroscopy)
2.5 Κυκλική βολταμετρία (Cyclic Voltametry - CV) 43
Κεφαλαιο 3 Χαρτογράφηση αλληλεπιδράσεων και βιοδραστικότητας του συμπλόκου της Κερσετίνης με την (2-Υδροξυπροπυλο) κυκλοδεξτρίνη
3.1 Εισαγωγή
3.2 Υλικά και Μέθοδοι παρασκευής του συμπλόκου
3.3 Αποτελέσματα και συζήτηση 50
3.4 Συμπεράσματα 59

Κεφάλαιο 4 Μελέτες εκλετικής απελευθέρωσης της κερσετίνης από το σύμπλοκο	
της με την 2HP-β-CD – μελέτες κυκλικής βολταμετρίας του συμπλόκου	60
4.1 Εισαγωγή	60
4.2 Πειραματικό Μέρος	61
4.3 Συμπεράσματα	67
Κεφάλαιο 5 Ορθολογικός σχεδιασμός προφαρμάκων με βάση τα φλαβονοειδή τα	
οποία ενεργοποιούνται στο μικροπεριβάλλον καρκινικών κυττάρων	68
5.1 Εισαγωγή	68
5.2 Σύνθεση και χαρακτηρισμός	75
5.3 Βιολογική αξιολόγηση	87
Περίληψη	88
Βιβλιογραφικές αναφορές:	90

### Σκοπός και αντικείμενο της μεταπτυχής διατριβής

Τα φυσικά προϊόντα και τα παράγωγα τους ήδη από τα αρχαία χρόνια χρησιμοποιούνταν από την παραδοσιακή Ιατρική για την αντιμετώση πολλών ασθενείων. Τα φλαβονοειδή, ως σημαντικό μέλος της μεγάλης οικογένειας των φυσικών προϊόντων, διαθέτουν πλούσιο φαρμακολογικό προφίλ που περιλαμβάνει αντιοξειδώτικές, αντιϊκές καθώς και αντικαρκινικές ιδιότητες.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακης διατριβής είναι η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και η βιολογική αξιολόγιση τροποποιημένων αναλόγων των φλαβονοειδών με σκοπό την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητα τους.

Αρχικά μελετήθηκε, το σύμπλοκο εκλεισμού της κερσετίνης με την 2HP-β-CD χρησιμοποιώντας μια σειρά από τεχνικές που περιλαμβάνουν NMR στερεάς κατάστασης, DOSY NMR, φασματοσκοπία υπεριώδους και ορατού καθώς και προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Η βιοδραστικότητα του συμπλόκου αξιολογήθηκε και βρέθηκε ότι μειώνει την κυτταρική βιωσιμότητα των ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης T24.

Μία από τις πιο σημαντικές ιδιότητες των φλαβονοειδών είναι η αντιοξειδωτική τους δράση και ένας από τους προτεινόμενους μηχανισμούς είναι μέσω της συμπλοκοποιήσης τους με τα ελεύθερα κατιόντα Fe<sup>2+</sup> το οποία καταλύουν την αντίδραση Fenton που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων και εξαιρετικά δραστικών ριζών. Αφού προβήκαμε στον μετασχηματισμό της κερσετίνης μέσω της συμπλοκοποιήσης της με την 2HP-β-CD θελήσαμε να διαπιστώσουμε εάν το σύμπλοκο διατήρει την ικανότητα δέσμευσης των ιόντων σιδήρου μέσω μιας σειράς αναλυτικών τεχνικών.

Επόμενος στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η σύνθεση 2 νέων φωσφορικών αναλόγων της ναρινγενίνης και της απιγενίνης, φλαβονοειδή γνωστά για τις αντικαρκινικές τους ιδιότητες. Η σύνθεση των νέων αναλόγων είχε σαν σκόπο την αύξηση της υδατοδιαλυτάς των μητρικών ενώσων αλλά τον βιομετασχηματίσμο τους αποκλειστικά στο μικροπεριβάλον των καρκινίκων κύτταρων παρουσία της αλκαλικής φωσφατάσης.

### Κεφάλαιο 1 Τα Φυσικά προϊόντα και σχεδιασμός νέων φαρμάκων

Τα φυσικά προϊόντα (Natural Products - NPs), που συνήθως αναφέρονται και ως δευτερογενείς μεταβολίτες είναι μια αξιόπιστη πηγή επιτυχημένων φαρμάκων που προέρχονται από την χλωρίδα και την πανίδα της Γης. Δεδομένου ότι δεν έχει αξιολογηθεί περισσότερο από το 95% της βιοποικιλότητας του πλανήτη μας, η ανακάλυψη νέων φυσικών προϊόντων με ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του ανθρώπου αποτελεί πρόκληση για τους επιστήμονες. Παράλληλα με την εξέλιξη των ζωντανών οργανισμών, εξελίχθηκαν και τα φυσικά προϊόντα και σήμερα εξακολουθούν να αποτελούν μια μεγάλη δεξαμενή πιθανών φαρμάκων<sup>1</sup>.

Αρκετοί ιστορικοί αναφέρουν ότι ήδη από τον 5° αιώνα π.Χ. στην περιοχή της Μεσοποταμίας, οι άνθρωποι ξεκίνησαν να χρησιμοποιούν φαρμακευτικά φυτά για την θεραπεία ορισμένων ασθενειών. Ο Ιπποκράτης, στην αρχαία Ελλάδα πρότεινε την χορήγηση φλοιού και φύλλα ιτιάς για την αντιμετώπηση των πονοκεφάλων και του πυτερού Αρκετούς αιώνες αργότερα και πιο συγκεκριμένα, τον 19° αιώνα μ.Χ., οι επιστήμονες κατάφεραν να απομονώσουν τα ενεργά συστατικά από ορισμένα φαρμακευτικά φυτά. Ο Friedrich Sertürner ήταν ο πρώτος ο οποίος το 1806 απομόνωσε την μορφίνη από το φυτό *Papaver somniferum* και από τότε τα φυσικά προϊόντα μελετήθηκαν ευρέως για φαρμακευτικούς σκοπούς. Η απομόνωση της μορφίνης μάλλον αποτέλεσε την αρχή, αφού τις επόμενες δεκαετίες απομονώθηκαν πολλές βιοδραστικές ενώσεις από φυτά όπως η καφεΐνη, η νικοτίνη και η καψαϊκίνη (Εικόνα 1.1).



Εικονα 1.1: Δομές φαρμακευτικών προϊόντων που απομονώθηκαν από φυτά.

Παρά το γεγονός ότι η συνδυαστική χημεία απαρτίζει την κύρια μέθοδο για το σχεδιασμό και την ανακάλυψη νέων φαρμάκων, μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό από αυτά έχουν εγκριθεί και αποτελούν *de novo* νέες χημικές ενώσεις. Το πρώτο αντικαρκινικό φάρμακο το οποίο προέκυψε μέσω αυτής της διαδικασίας ήταν το sorafenib, το οποίο αναπτύχθηκε από την εταιρία Bayer και εγκρίθηκε από τον FDA το 2005, αρχικά για την θεραπεία του καρκινώματος των νεφρικών κυττάρων

και αργότερα και για την θεραπεία του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Εννιά χρόνια αργότερα, ένα δεύτερο φάρμακο, το οποίο προέκυψε επίσης από *de novo* χημική σύνθεση, το ataluren, εγκρίθηκε στην Ευρώπη από τον ΕΜΑ για την θεραπεία των ασθενών που έπασχαν από γενετικές διαταραχές λόγω μη λογικών μεταλλάξεων<sup>2</sup>.

Σύμφωνα με πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα<sup>2</sup> τις τελευταίες τρεις δεκαετίες το 47% των εγκεκριμένων φαρμάκων προέρχονται από τη φύση. Επίσης, έχει προσδιορισθεί πως 21% από τα συνθετικά φάρμακα είναι ή μιμητές φυσικών προϊόντων ή έχουν σαν βάση τα φυσικά προϊόντα (Εικόνα 1.2).



B = N = NB = ND = 5 - S/NM = S\* = S\*/NM = V

Εικόνα 1.2: Πήγες νέων εγκεκριμένων φαρμάκων για την χρονική περίοδο 1981-2014<sup>2</sup>.Όπου Β: βιολογικά μακρομόρια, Ν: φυσικά προϊόντα, NB: φάρμακα που προέρχονται από βότανα, ND: ανάλογα φυσικών προϊόντων, S: συνθετικά φάρμακα, S\*: συνθετικά φάρμακα που ο δομικός τους σκελετός προέρχεται από κάποιο φυσικό προϊόν, V: εμβόλιο, NM: μιμητές φυσικών προϊόντων.

# 1.1 Ο ρόλος που διαδραματίζουν τα φυσικά προϊόντα στο σχεδιασμό νέων φαρμάκων

Αν και οι φαρμακευτικές εταιρίες τα τελευταία χρόνια επενδύουν στο σχεδιασμό και ανάπτυξη νέων και πιο αποτελεσματικών φαρμάκων, μόλις ένα πολύ μικρό ποσοστό από αυτά έχει καταφέρει να περάσει από το στάδιο των κλινικών δομικών, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα ο αριθμός τους να είναι περίπου 20-30 ανά έτος<sup>3 4</sup> (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3: α) Σχετικός αριθμός συνθετικών ενώσεων και φυσικών προϊοντών β) Βιολογικά σχετικός χημικός χώρος που καλύπτεται από συνθετικές ενώσεις και φυσικά προϊόντα. Υπάρχουν περίπου 22.7 εκατομύρια χημικές ενώσεις στην βάση δεδομένων ZINC ενώ αντίθετα τα φυσικά προϊόντα υπολογίζονται σε μόλις 160 χιλιάδες. Από τις 22.7 εκατομμύρια χημικές ενώσεις το 70% από αυτές θεωρείται ως φαρμακοφόρα και μόλις το 30% αυτών ως ενώσεις οδηγοί. Σε αντίθεση με τις συνθετικές ενώσεις το 80% των φυσικών προϊόντων είναι φαρμακοφόρα<sup>5</sup>.

Για τον λόγο αυτό, το ερευτικό ενδιαφέρον επικεντρώνεται στην ανακάλυψη νέων μορίων που αποτελούν νέους φαρμακευτικούς οδηγούς (lead compounds). Ο εντοπισμός νέων ενώσεων οδηγών παραμένει δύσκολος, με τις εταιρίες κυρίως να στηρίζονται στη διαλογή μορίων μεγάλης έκτασης (High Throughput Screening -HTS). Η πλειοψηφία των βιβλιοθηκών διαλογής, που βασίζονται σε συνθετικές ενώσεις, αποτελείται από ουσίες που έχουν παρόμοιες ιδιότητες με φαρμακοφόρα ή ενώσεις οδηγούς και παρόμοια χαρακτηριστικά όπως είναι η απορρόφηση, η κατανομή, ο μεταβολισμός, η απέκκριση και η τοξικότητα (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity - ADMET).

Η μεγάλη διαφορά μεταξύ των *de novo* χημικών ενώσεων και των φυσικών προϊόντων είναι ο διαφορετικός χημικός χώρος που καλύπτουν. Δεδομένης και της έλλειψης που παρατηρείται στις ενώσεις οδηγούς, τα φυσικά προϊόντα χρησιμοποιήθηκαν σαν βάση για τον σχεδιασμό και την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών σκευασμάτων τα οποία παρουσίασαν αντιϊκές, ανοσολογικές και αντικαρκινικές ιδιότητες.

### 1.2 Βιοσύνθεση φλαβονοειδών

Μεταξύ του μεγάλου αριθμού φυσικών προϊόντων που προέρχονται από τα φυτά, τα φλαβονοειδή διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο. Η κατηγορία αυτή έχει συμβάλει στη διαμόρφωση των γνώσεων μας παρέχοντας χρήσιμα εργαλεία για τη διερεύνηση πολλών κεντρικών προβλημάτων των φυτών, συμπεριλαμβανομένης της βιολογίας των μεταφορέων, της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, της σίγασης γονιδίων και της οργάνωσης μεταβολικών οδών.

Η βιοσύνθεση των πολυφαινολών είναι μια αρκετά περίπλοκη διαδικασία η οποία έχει μελετηθεί διεξοδικά από τους ερευνητές και περιλαμβάνει τη συμμετοχή αρκετών ενζύμων<sup>6,7</sup>. Όπως όλες οι φαινολικές ενώσεις, έτσι και τα φαινολικά οξέα, μεταξύ αυτών το γαλλικό και το κιναμμωμικό οξύ, θεωρούνται ότι προέρχονται από το μεταβολικό μονοπάτι του σικιμικού οξέος. Η βιοσύνθεση πολύπλοκων πολυφαινολών, όπως είναι τα φλαβονοειδή, είναι άμεσα συνδεδεμένη με τον πρωτογενή μεταβολισμό μέσω ενδιαμέσων που προέρχονται από τα πλαστίδια και τα μιτοχόνδια. Ο αρωματικός δακτύλιος B, καθώς και ο δακτύλιος της χρωμόνης, θεωρούνται ότι προέρχονται από το αμινοξύ φαινυλαλανίνη, το οποίο προέρχεται από το μεταβολικό μονοπάτι του σικιμικού οξέος, ενώ ο δακτύλιος A από τρεις δομικές μονάδες του μηλονυλ-CoA<sup>6, 7</sup>. Αυτές οι τρεις μονάδες του μηλονυλ-CoA προστίθενται μέσω διαδοχικών αντιδράσεων αποκαρβοξυλίωσης, διαδικασία η οποία ξεκινά την βιοσύνθεση των φλαβονοειδών.

Όπως φαίνετια στην Εικόνα 1.4, η λυάση της φαινυλαλανίνης (γνωστή ως και PAL) είναι ένζυμο κλειδί για τη βιοσύνθεση φλαβονοειδών αφού μετατρέπει την φαινυλαλανίνη σε trans-κινναμωμικό οξύ, το οποίο με την σειρά του οδηγεί στις δομές C6-C3 Το τελικό ενδιάμεσο 4-κουμαρόυλ-CoA και τρία μόρια του μηλονυλ-CoA, στη συνέχεια συμπυκνώνονται έτσι ώστε να παράγουν το πρώτο φλαβονοειδές στην ανοικτή μορφή της γαλκόνης, το οποίο ισομερίζεται από το ένζυμο ισομεράση της χαλκόνης (CHI) σε μια φλαβανόνη, η οποία είναι η γνωστή ως ναριγενίνη. Το ένζυμο αυτό είναι απαραίτητο αφού μετατρέπει την χαλκόνη στην αντίστοιχη φλαβανόνη, η οποία αποτελεί τον κύριο σκελετό όλων των φλαβανοειδών. Στο επόμενο βήμα, ένα άλλο ένζυμο η 3-υδροξυλάση της φλαβανόνης (F3H) εισάγει στο μόριο της ναριγενίνης μια δεύτερη υδροξυλομάδα σε όρθο θέση ως προς την καρβονυλομάδα, σχηματίζοντας με αυτό τον τρόπο τις διυδροξυφλαβάνολες, που με την σειρά τους ανάγονται ενζυμικά από την αναγωγάση της διϋδρόξυφλανόλης (DFR) δίνοντας ως προϊόντα τις λευκοανθοκυανίνες. Με αφυδάτωση που λαμβάνει χώρα μεταξύ της 3-ΟΗ και του 1-Η, διαδικασία που καταλύεται επίσης ενζυματικά από την συνθάση της ανθοκυανίνης (ANS), προκύπτουν οι ανθοκυανίνες. Σε μια ταυτόχρονη διαδικασία, η οποία πραγματοποιείται μαζί με τον σχηματισμό των διϋδρόξυφλαβανολών και η οποία καταλύεται από την συνθάση της φλαβόνης (FSI και FSII) προκύπτουν οι φλαβόνες.



**Εικονα 1.4:** Σχηματική αναπαράσταση της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών στα φυτά<sup>8</sup>.

### 1.3 Κατηγορίες πολυφαινολών

Οι πολυφαινόλες αποτελούν μία από τις πιο πολυάριθμες και ευρέως κατανεμημένες ομάδες φυσικών προϊόντων στο φυτικό βασίλειο. Περισσότερες από οκτώ χιλιάδες φαινολικές δομές είναι σήμερα γνωστές και μεταξύ αυτών περισσότερα από τα μισά φλαβονοειδή έχουν ταυτοποιηθεί<sup>9, 10</sup>. Παρά το γεγονός ότι οι πολυφαινόλες χημικά χαρακτηρίζονται ως ενώσεις με φαινολικά δομικά χαρακτηριστικά, αυτή η ομάδα των φυσικών προϊόντων είναι ιδιαίτερα ποικιλόμορφη και περιλαμβάνει διάφορες υποομάδες.

Τα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά ολικής άλεσης και άλλα είδη τροφίμων και ποτών όπως το τσάι, η σοκολάτα και το κρασί, αποτελούν πλούσιες πηγές πολυφαινολών. Τόσο η ποικιλομορφία όσο και η ευρεία διανομή των πολυφαινολών στα φυτά έχει οδηγήσει στην κατηγοριοποίηση τους με βάση πολλά διαφορετικά κριτήρια. Καθώς στη φύση η πλειοψηφία των πολυφαινολών υφίστανται με την μορφή των γλυκοζιτών οι οποίοι φέρουν σε διαφορετικές θέσεις την δομική αυτή μονάδα, η κατηγοριοποιήση που ακολουθεί για λόγους ευκολίας έχει γίνει με βάση τις αντίστοιχες άγλυκες δομές τους.

### 1.3.1 Φαινολικά οξέα

Τα φαινολικά οξέα είναι πολυφαινόλες που δεν ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών και τα οποία μπορούν να διαιρεθούν περαιτέρω σε δύο κύριες κατηγορίες: τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και αυτά του κινναμωμικού οξέος και σαν βάση τους C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> και C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> σκελετούς αντίστοιχα (Εικόνα 1.5). Τα φρούτα και τα λαχανικά περιέχουν πολλά ελεύθερα φαινολικά οξέα, ενώ στα δημητριακά και στους σπόρους τα φαινολικά οξέα είναι συχνά με την μορφή των αντίστοιχων εστέρων <sup>11, 12</sup>. Αυτοί μπορούν να απελευθερωθούν / υδρολυθούν είτε ενζυμικά είτε χημικά ( όξινη / βασική υδρόλυση).



**Εικόνα 1.5:** Παραδείγματα φαινολικών οζέων στα τρόφιμα: Α) παράγωγα του βενζοϊκού οζέος Β) παράγωγα του κινναμωμικού οζέος.

### 1.3.2 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή ακολουθούν το γενικό δομικό σκελετό C6-C3-C6 στον οποίο οι δύο C<sub>6</sub> υπομονάδες (δηλαδή οι δακτύλιοι Α και Β) φέρουν στον σκελετό τους τόσο φαινολικές υδροξυλομάδες όσο και αιθέρες (Εικόνα 1.6). Λόγω του τρόπου με τον οποίο εισάγονται ενζυμικά, οι υδροξυλομαδες και ανάλογα αυτών, στο δακτύλιο της χρωμόνης (Δακτύλιος C), τα φλαβονοειδή μπορούν να διαιρεθούν περαιτέρω σε διάφορες υποκατηγορίες όπως τις ανθοκυανίνες, φλαβόνες, φλαβανόνες και φλαβονόλες. Ενώ η συντριπτική πλειοψηφία των φλαβονοειδών έχει τον δακτυλίο Β συνδεδεμένο με τον C2 άνθρακα του δακτυλίου C, φλαβονοειδή όπως ισοφλαβόνες και νεοφλαβόνες, έχουν τον δακτύλιο Β συνδεδεμένο στη θέση C3 και C4 του δακτυλίου C αντίστοιχα. Οι χαλκόνες, αν και στερούνται του ετεροκυκλικού δακτυλίου C, εξακολουθούν να κατηγοριοποιούνται ως μέλη της οικογένειας των φλαβονοειδών. Αυτές οι βασικές κατηγορίες των φλαβονοειδών που ακολουθούν έχουν γίνει απουσία των γλυκοζιτικών μονάδων. Ωστόσο, στα φυτά οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις υφίσταται με την μορφή των γλυκοζιτών. Η βιολογική δράση αυτών των ενώσεων, συμπεριλαμβανομένης της αντιοξειδωτικής τους δράσης, εξαρτάται τόσο από τις δομικές διαφορές όσο και από τα μοτίβα γλυκοζυλίωσης.



Εικόνα 1.6: Βασικές μονάδες φλαβονοειδών.

### 1.3.2.1 Ισοφλαβόνες, νεοφλαβόνες και χαλκόνες

Οι ισοφλαβόνες έχουν τον δακτύλιο Β προσαρτημένο στη θέση C<sub>3</sub> του δακτυλίου C (Εικόνα 1.6) και κύρια πηγή τους είναι τα όσπρια. Δεδομένης της μεγάλης κατανάλωσης τους, (κυρίως της σόγιας) οι ισοφλαβόνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατροφή σε πολλούς πολιτισμούς και ως εκ τούτου, έχουν μεγάλη επίδραση στην υγεία του ανθρώπου. Η γενιστείνη και η δαιντζεΐνη είναι οι δύο κύριες ισοφλαβόνες που βρέθηκαν στη σόγια μαζί με την γλυκετεΐνη, την βιοχανίνη Α και την φορμονονετίνη<sup>13, 14</sup> (Εικόνα 1.7). Όλες αυτές οι άγλυκες ισοφλαβόνες βρίσκονται κυρίως ως 7-Ο-γλυκοζίτες και 6"-Ο-μηλονυλ-7-Ογλυκοζίτες. Οι νεοφλαβόνες δεν βρίσκονται συχνά σε βιομηχανίες τροφίμων, αλλά η νταλμπεργκίνη είναι η πιο κοινή και σχετικά ευρέως κατανεμημένη νεοφλαβόνη στο φυτικό βασίλειο<sup>15</sup>. Οι χαλκόνες βρίσκονται σε φρούτα όπως τα μήλα<sup>16</sup> και το λυκίσκο ή τις μπύρες<sup>17</sup>.



Daidzein:  $R_1 = R_2 = R_3 = H$ Formononetin:  $R_1 = R_2 = H$ ,  $R_3 = OCH_3$ Biochanin A:  $R_1 = OH$ ,  $R_2=H$ .  $R_3 = OCH_3$ Genistein:  $R_1 = OH$ ,  $R_2=R_3 = H$ Glycitein:  $R_1 = H$ ,  $R_2 = OCH_3$ 

Isoflavones



**Εικόνα 1.7:** Παραδείγματα ισοφλαβονών, νεοφλαβονών και χαλκόνων που βρίσκονται στα φυτά.

### 1.3.2.2 Φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες και φλαβανόνολες

Αυτές οι υποκατηγορίες των φλαβονοειδών είναι οι πιο κοινές και σχεδόν πανταχού παρούσες σε όλο το φυτικό βασίλειο (Εικόνα 1.8). Οι φλαβόνες και τα 3υδροξυ-παράγωγα των φλαβονολών τους, συμπεριλαμβανομένων των γλυκοζιτών, των μεθοξυ- και άλλων ακυλιωμένων προϊόντων στους τρεις δακτυλίους, τις καθιστούν την μεγαλύτερη υποκατηγορία μεταξύ όλων των πολυφαινολών. Τα πιο κοινά άγλυκα παραδείγματα αυτής της υποκατηγορίας είναι η κερσετίνη και η καμφερόλη, που από μόνες τους έχει βρεθει ότι έχουν τουλάχιστον 279 και 347 διαφορετικούς γλυκοσιδικούς συνδυασμούς, αντίστοιχα. Ο αριθμός των φλαβανονών, και των 3-υδροξυ παραγωγών τους (δηλάδή οι φλαβανονόλες, οι οποίες αναφέρονται επίσης ως διυδρόξυφλαβονόλες) που προσδιορίζονται τα τελευταία 15 χρόνια, έχει αυξηθεί σημαντικά. Μερικές φλαβανόνες έχουν μοναδικά πρότυπα υποκατάστασης π.γ., πρενυλιώμενες φλαβανόνες, φουρανοφλαβανόνες, πυρανοφλαβανόνες, βενζυλιωμένες φλαβανόνες, αποτελούν ένα μεγάλο αριθμό υποκατεστημένων παραγώγων αυτής της υποκατηγορίας. Μια πολύ γνωστή φλαβανόλη είναι η ταξιφολίνη που υπάρχει σε μεγάλη αφθονία στα εσπεριδοειδή<sup>18</sup>.



Εικόνα 1.8: Φλαβόνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες και φλαβανόνολες.

#### 1.3.2.3 Φλαβανόλες και προανθοκυανιδίνες

Οι φλαβανόλες ή φλαβαν-3-όλες συχνά ονομάζονται και κατεχίνες. Σε αντίθεση με τα περισσότερα φλαβονοειδή, σε αυτή την κατηγορία ενώσεων δεν υπάρχει κάποιος διπλός δεσμός μεταξύ του C<sub>2</sub> και του C<sub>3</sub> και καρβονυλομάδα στο C<sub>4</sub> στο δακτύλιο C της φλαβανόλης (Εικόνα 1.9). Αυτή η διαφοροποίηση τους στην δομή, καθώς και η υδροξυλίωση στον C<sub>3</sub> επιτρέπει στις φλαβανόλες να έχουν δύο χειρόμορφα κέντρα στο σκελετό τους (τόσο στον C<sub>2</sub> όσο και στον C<sub>3</sub>) και έτσι υπάρχουν τέσσερα δυνατά διαστερεοϊσομερή. Η κατεχίνη είναι αυτό το ισομερές με trans διαμόρφωση και επικατεχίνη είναι αυτό με cis διαμόρφωση. Κάθε μία από τις δύο αυτές διαμορφώσεις έχει δύο στερεοϊσομερή, δηλαδή, (+)-κατεχίνη, (-)κατεχίνη, (+)-επικατεχίνη και (-)-επικατεχίνη. Τόσο η (+)-κατεχίνη όσο η (-)- επικατεχίνη, είναι οι δύο ισομερή που συχνά βρίσκονται στα βρώσιμα φυτά (Εικόνα 1.9). Οι φλαβανόλες βρίσκονται σε πολλά φρούτα και κυρίως στις φλούδες των σταφυλιών, των μήλων και στα βατόμουρα<sup>16</sup>. Τα μονομερή των φλαβανολών (κατεχίνη και επικατεχίνη), τα παράγωγά τους (π.χ. γαλλοκατεχίνες) είναι τα κύρια φλαβονοειδή που συναντώνται στα φύλλα του τσαγιού και στους σπόρους του κακάο<sup>19, 20</sup>. Η κατεχίνη και η επικατεχίνη μπορούν να σχηματίσουν πολυμερή, τα οποία συχνά αναφέρονται ως προανθοκυανιδίνες επειδή κατά την διάσπαση των πολυμερικών αλυσίδων τους, μέσω όξινης κατάλυσης, παράγονται οι ανθοκυανιδίνες (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9: Φλαβανόλες και προκυανιδίνες.

Οι προανθοκυανιδίνες παραδοσιακά θεωρούνται ότι είναι συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι φλαβανόλες και τα ολιγομερή τους (που περιέχουν 2-7 μονομερή) είναι γνωστά ως ισχυρές αντιοξειδωτικές ενώσεις, οι οποίες έχουν συσχετιστεί με αρκετά πιθανά οφέλη για την υγεία. Ανάλογα με τους διαφλαβανικούς δεσμούς, τα ολιγομερή, δηλαδή οι προανθοκυανιδίνες, μπορούν να έχουν δομή είτε Α τύπου στην οποία τα μονομερή συνδέονται μέσω C<sub>2</sub>-O-C<sub>7</sub> ή C<sub>2</sub>-O-C<sub>5</sub>, είτε Β τύπου στην οποία η σύνδεση γίνεται μέσω C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub> ή C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>. Η προκυανιδίνη C<sub>1</sub> αποτελεί ένα τριμερές αυτής της κατηγορίας. Οι φλαβανόλες που προέρχονται από το τσάι μπορεί να σχηματίσουν μοναδικά διμερή σαν την θεαφλαβίνη μέσω ζυμώσεων (Εικόνα 1.10).



Εικόνα 1.10: Παραδείγματα διμερών, τριμερών προκυανιδίνης και θεαφλαβίνης.

### 1.3.2.4 Ανθοκυανιδίνες

Οι ανθοκυανιδίνες είναι τα κύρια συστατικά των κόκκινων, μπλε και μωβ χρωστικών που προέρχονται από τα πέταλα των λουλουδιών, των φρούτων και των λαχανικών, ενώ επιπλέον εμφανίζονται και σε ορισμένες ειδικές ποικιλίες σπόρων π.χ. μαύρο ρύζι (Εικόνα 1.11). Οι ανθοκυανιδίνες στα φυτά υφίστανται κυρίως στην γλυκοσιδική τους μορφή οι οποίες αναφέρονται συνήθως ως ανθοκυανίνες. Η κυανιδίνη, η δελφινιδίνη και η πελαργονιδίνη είναι οι πιο ευρέως διαδεδομένες ανθοκυανιδίνες, (έχουν βρεθεί περισσότερα από τριάντα μονομερή ανθοκυανιδινών). Στην πραγματικότητα, το 90% των ανθοκυανινών βασίζονται στην κυανιδίνη, την δελφινιδίνη και την πελαργονιδίνη, καθώς και στα μεθυλιωμένα παράγωγά τους. Συνολικά πάνω από 500 ανθοκυανίνες είναι ήδη γνωστές και διαφοροποιούνται ανάλογα με τον βαθμό υδροξυλίωσης, το μοτίβο με βάση το οποίο πραγματοποιείται η μεθοξυλίωση στο δακτύλιο Β και τη γλυκοζυλίωση με διαφορετικές δομικές μονάδες σακγάρου<sup>21</sup>. Το γρώμα των ανθοκυανινών εξαρτάται από το pH, δηλαδή το κόκκινο χρώμα οφείλεται σε όξινες συνθήκες ενώ το μπλε σε βασικές. Ωστόσο, άλλοι παράγοντες όπως ο βαθμός υδροξυλίωσης ή το μοτίβο σύμφωνα με το οποίο πραγματοποιείται η μεθυλίωση των αρωματικών δακτυλίων, όπως και αυτό της γλυκοζυλίωσης (η παρουσία σαχάρου εναντί του ακυλιωμένου σακχάρου) μπορούν επίσης να επηρεάσουν το γρώμα των ανθοκυανινών, οι οποίες είναι χημικά σταθερές σε όξινα διαλύματα.



Cyanidin  $R_1 = OH R_2 = H$ Delphinidin  $R_1 = OH R_2 = OH$ Pelargonidin  $R_1 = H R_2 = H$ Malvidin  $R_1 = OCH_3 R_2 = OCH_3$ Peonidin  $R_1 = OCH_3 R_2 = H$ Petunidin  $R_1 = OH R_2 = OCH_3$ 

Εικόνα 1.11. Κύριες ανθοκυανίδες.

### 1.3.2.5 Πολυφαινολικά αμίδια

Μερικές πολυφαινόλες μπορούν ακόμα να περιέχουν Ν-υποκαταστημένες λειτουργικές ομάδες. Δύο τέτοιες ομάδες πολυφαινολικών αμιδίων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο για την ύπαρξη των κύριων συστατικών των κοινών τροφίμων είναι τα καψαϊκινοειδή που απαντώνται σε πιπεριές τσίλι<sup>22</sup> και οι αβενανθραμίδες που απαντώνται στη βρώμη<sup>23</sup> (Εικόνα 1.12). Τα καψαϊκινοειδή έχουν βρεθεί ότι έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, και διαμορφώνουν το οξειδωτικό σύστημα άμυνας στα κύτταρα.





#### 1.5 Βιολογική αξιολόγιση των φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή εμφανίζουν πληθώρα ευεργετικών ιδιότητών για την υγεία του ανθρώπου, καθώς αλληλεπιδρούν με μεγάλο αριθμό κυτταρικών στόχων. Το φαρμακολογικό τους προφίλ περιλαμβάνει αντιοξειδώτικές, αντι-φλεγμονώδεις, αντιϊικές και ιδιαίτερα αντικαρκινικές δράσεις.

### 1.5.1 Τα φλαβανοειδή ως άμεσοι δεσμευτές των ελευθέρων ριζών

Είναι ευρέως γνωστό ότι οι ελεύθερες ρίζες είναι ιδιαίτερα δραστικές έναντι βιολογικών μορίων, συμπεριλαμβανομένου του DNA, των πρωτεϊνών καθώς επίσης και των λιπιδίων, καθώς μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικές βλάβες και να μεταβάλλουν τις λειτουργίες τους. Μια ήπια αύξηση των επιπέδων των δραστικών ειδών οξυγόνου τα οποία είναι γνωστά και ως ROS μπορεί να οδηγήσει σε παροδική αλλοίωση των κυττάρων, ενώ μια σοβαρή αύξηση τους μπορεί να προκαλέσει μη αναστρέψιμη οξειδωτική βλάβη και ακολούθως κυτταρικό θάνατο <sup>24</sup>. Ωστόσο, τα φλαβονοειδή μπορούν να δεσμεύσουν τις ελεύθερες ρίζες ενεργώντας ως δότες δεσμών υδρογόνου, μεταφορείς ενός μονήρους ηλεκτρονίου και σχηματίζοντας συμπλοκα με μεταλλικά ιόντα. *In vitro*, η αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών εξαρτάται από την διευθέτηση των λειτουργικών ομάδων στο δομικό τους σκελετό. Τόσο η διαμόρφωση, όσο και ο αριθμός των υδροξυλομάδων, επηρεάζουν την αντιοξειδωτική τους δράση<sup>25</sup>. Η θέση των υδροξυλίων του δακτυλίου Β είναι αυτή που διαμορφώνει την δέσμευση των ROS, ενώ η συνεισφορά των δακτυλίων Α και C έχει γενικά μικρό αντίκτυπο<sup>26, 27</sup>. Η αντιοξειδωτική δράση που εμφανίζουν τα φλαβονοειδή θα μπορούσε να αυξηθεί σημαντικά με πολυμερισμό του αντίστοιχου μονομερούς λόγω αύξησης του αριθμού των υδροξυλομάδων, ενώ αντίθετα η παρουσία των γλυκοζιτών στον σκελετό τους την μειώνει σημαντικά.

Η δέσμευση των ελεύθερων ριζών από τα φλαβονοειδή προυποθέτει την ύπαρξη ορισμένων δομικών χαρακτηριστικών τα οποία περιγράφονται παρακάτω:

Μια μονάδα κατεχόλης (γνωστή και ως διυδρόξυ ομάδα) στον δακτύλιο Β
έτσι ώστε να έχουμε απεντοπισμό των ηλεκτρονίων προς αυτόν τον δακτύλιο

 Έναν διπλό δεσμό σε θέση C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> ως προς την καρβονυλομάδα ώστε να γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίων προς τον δακτύλιο B

Υπαρξη υδροξυλομάδων σε θέση 3 και 5 ως προς την κετονομάδα, ώστε να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με αυτή



**Εικόνα 1.13:** Δομικά χαρακτηριστικά ενός φλαβονοειδούς με υψηλή αντιοζειδωτική δραση.

Χρησιμοποιώντας ως γνώμονα τα παραπάνω κριτήρια οδηγούμαστε εύκολα στο συμπέρασμα ότι μεταξύ όλων των φλαβονοειδών η κερσετίνη και η μυρικετίνη είναι εκείνα που εμφανίζουν την πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση έναντι των ελευθέρων ριζών.

Εξίσου σημαντικό αποτελεί το γεγονός ότι μπορούν να αναστέλλουν την δράση ορισμένων ενζύμων, όπως για παράδειγμα της γλουταθειόνης και του NADH, τα οποία εμπλέκονται στην παραγωγή ελευθέρων ριζών<sup>28</sup>.

# 1.5.2 Αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών μέσω συμπλοκοποίησης με μεταλλικά ιόντα

Η παρουσία διαφόρων λειτουργικών ομάδων στο δομικό σκελετό των φλαβονοειδών, όπως για παράδειγμα της κετονομάδας στη θέση 4 αλλά των υδροξυλομάδων σε διάφορες θέσεις των διακτυλιών A, B και C, είναι αυτή που τους επιτρέπει να συμπλοκοποιούνται με διάφορα μέταλλα<sup>29-31</sup> (Εικόνα 1.14). Μεταξύ όλων των μετάλλων ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει τόσο ο χαλκός όσο και ο σίδηρος, καθώς τα μέταλλα αυτά διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των ελευθέρων ριζών και παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου καταλύουν την αντίδραση Fenton (Εικόνα 1.15) σχηματίζοντας ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου, οι οποίες είναι ιδιαίτερα επιβλαβείς για τα κύτταρα. Το ένζυμο NADH ανακυκλώνει τα τρισθενή ιόντα σιδήρου προς τα αντίστοιχα δισθενή και έτσι επαναλαμβάνεται ο καταλυτικός κύκλος παρουσία περίσσειας H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Με την συμπλοκοποίηση του σιδήρου με τα φλαβονοειδή δεν είναι δυνατόν να πραγματοποιηθει η κατάλυση της αντίδρασης, το οποίο έχει σαν άμεσο αποτέλεσμα την διακοπή της παραγωγής των ελευθέρων ριζών υδροξυλίου.



Εικόνα 1.14: Πιθανές θέσεις δέσμευσης των μετάλλων στο μόριο της κερσετίνης.

 $Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH + OH^-$ 

### Εικόνα 1.15: Αντίδραση Fenton

#### 1.5.3 Αντικαρκινική δράση

Τα τελεύταια χρόνια, ένα μεγάλο πλήθος επιδημιολογικών μελετών έχει αποδείξει την προστατευτική δράση των φλαβοειδών έναντι του καρκίνου. Ένα μεγάλο ποσοστό από τις μελέτες αυτές έδειξε ότι η αυξημένη κατανάλωση ισοφλαβόνων έχει συσχετιστεί άμεσα με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης οιστρογόνων που σχετίζονται με καρκίνο και αγγειακές παθήσεις. Ακόμα, η πρόσληψη φλανονοειδών συσχετίστηκε με την μέιωση εμφάνισης καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η κερσετίνη μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα. Όσον αφόρα στον καρκίνο του στομάχου, η υψηλή πρόσληψη κερσετίνης και καμφερόλης μειώσε τον κίνδυνο εμφάνισης κατά 50% ενώ αντίστοιχα όταν η πρόσληψη τους ήταν χαμηλή το ποσοστό αυτό περιορίζονταν στο 40%.

#### 1.6 Μακροκυκλικά μόρια

Ο όρος υπερμοριακή χημεία, εισήχθη για πρώτη φορά από τον Jean-Marie Lehn το 1969. Ενώ τα μεμονωμένα μόρια αποτελούνται από άτομα συνδεδεμένα με ομοιοπολικό δεσμό, η υπερμοριακή χημεία χρησιμοποιεί διαμοριακές αλληλεπιδράσεις όπως είναι δεσμοί υδρογόνου, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ π δεσμών και οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις. Οι δεσμοί υδρογόνου επιτρέπουν στις ενώσεις που περιέχουν ηλεκτροαρνητικές λειτουργικές ομάδες να αλληλεπιδρούν με πρωτόνια για να σχηματίζουν εκτεταμένες συστοιχίες. Τα μόρια με αρωματικούς δακτυλίους μπορούν να στοιβάζονται μεταξύ τους λόγω των π-π αλληλεπιδράσεων. Oι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιόντων, διπόλων αλλά και συνδυασμό αυτών δηλαδή μεταξύ ενός διπόλου και ενός ιόντος. Οι διπολικές αλληλεπιδράσεις συσχετίζονται τόσο με θετικά όσο και αρνητικά φορτισμένα είδη. Καθώς η χημεία των μακροκυκλικών μορίων επικεντρώνεται στον τρόπο που τα μόρια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, δίνεται έμφαση στη συμπληρωματικότητα και στην οργάνωσή τους. Η συμπληρωματικότητα είναι η αντιστοίχιση ενός μορίου επισκέπτη με τις υποδογέ $\alpha^{32}$ . γεωμετρικές ανάγκες ενός μόριου ηλεκτρονικές και Oι αλληλεπιδράσεις τέτοιου τύπου συνήθως καθοδηγούνται από δύο κύριους παράγοντες: i) το μέγεθος του φιλοξενούμενου μορίου και ii) την υδροφοβικότητα του<sup>33</sup>. Τα συστήματα αυτά παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στον τομέα της βιοϊατρικής λόγω της δυναμικής, της χημικής πολυμορφίας τους και της ικανότητάς τους να αλληλεπιδρούν με βιολογικά ή συνθετικά μόρια με σκοπό την μορφοποίηση ενέσιμων σκευασμάτων, την ενθυλάκωση και ελεγχόμενη μεταφορά των εγκλεισμένων φορτίων (π.γ. φάρμακα, βιομόρια). Μεταξύ όλων των μακρυκυκλικών μορίων, ξεχωρίζουν τα καλιξαρένια και οι κυκλοδεξτρίνες αφού βρίσκουν πληθώρα εφαρμογών σε πεδία όπως τα συστήματα παράδοσης φαρμάκων.

Τα καλιξαρένια είναι κυκλικά ολιγομερή που αποτελούνται από φαινολικές μονάδες συνδεδεμένες μέσω μεθυλενικών ομάδων που έχουν καθορισμένες διαμορφωτικές ιδιότητες και κοιλότητες οι οποίες είναι ικανές να ενθυλακώσουν ουδέτερα και ιοντικά είδη. Μέσω τροποποιήσεων που μπορούν να συμβούν είτε στην διαμόρφωση τους είτε στον αριθμό των θέσεων δέσμευσης, τα παράγωγα των καλιξαρενίων μπορούν να χρησιμεύσουν ως αποτελεσματικοί υπερμοριακοί ξενιστές και ευαισθητοποιητές για διαφόρα είδη επισκεπτών<sup>34</sup>.

Από την άλλη μεριά, οι κυκλοδεξτρίνες (CD) είναι οι πιο διαδεδομένες λόγω της σχετικά υψηλής διαλυτότητάς τους στο νερό, της χαμηλής τοξικότητας και του εκτεταμένου ιστορικού γρήσης τους. Δομικά, αποτελούνται από επαναλαμβάνομενες μονάδες D-γλυκόζης διατεταγμένες με ένα σπειροειδή τρόπο μέσω α-1,4 γλυκοσιδικών δεσμών και περιέχουν 6, 7, ή 8 επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες (α, β, και γ κυκλοδεξτρίνη αντίστοιχα). Το μεγέθος της κοιλότητας τους, τους επιτρέπει να δεσμεύουν υδρόφοβα μορία στο εσωτερικό τους αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο την υδατοδιαλυτότητα τους και κατ επέκταση την βιοδιαθεσιμότητας τους (Εικόνα 1.16). Ανάλογα με τις ανάγκες που παρουσιάζονται, οι κυκλοδεξτρίνες μπόρουν να φέρουν και αυτές μια μεγάλη ποικιλία χρήσιμων λειτουργικών ομάδων στον δομικό σκελετό τους<sup>35</sup>.



**Εικόνα 1.15:** Πιθάνοι τρόποι εγκλεισμού ενός μορίου στον ζενιστή κυκλοδεζτρίνη σε διάφορες στοιχειομετρικές αναλογίες<sup>36</sup>.

Στο τέλος του περασμένου αιώνα, αρκετές μελέτες αμφισβούσαν τους μηγανισμούς που είγαν προταθεί για το σγηματισμό συμπλοκών εγκλεισμού. Πράγματι, οι μηχανισμοί και οι δυνάμεις που ασκούνται για την επίτευξη της συμπλοκοποίησης μεταξύ ενός φιλοξενούμενου μορίου και ενός μορίου ξενιστή ήταν και εξακολουθούν να αποτελούν αντικείμενο συζήτησης και αντιπαράθεσης. Ένα παράδειγμα που αναφέρεται συχνά είναι η εμφάνιση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, ο ρόλος των οποίων είναι αμφιλεγόμενος. Η υδροφοβικότητα είναι το αποτέλεσμα της δομής που καταλαμβάνουν τα μόρια του νερού στην περιοχή των μη πολικών μορίων, η οποία ευνοεί τη συσσωμάτωση των μη πολικών μορίων, ελαγιστοποιώντας με αυτόν τον τρόπο την πρόσθετη ενέργεια που θα προέκυπτε από τον σχηματισμό ενός δομημένου κέλυφους ενυδάτωσης. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι, κατά τη συμπλοκοποίηση, το πιο υδρόφοβο μέρος του φιλοξενούμενου μορίου και του μορίου ξενιστή όπως οι CD είναι προσανατολισμένες κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μεγιστοποιηθεί η επαφή μεταξύ υδρόφοβων τμημάτων αυτών και της απολής κοιλότητας της CD. Ομοίως, όσο περισσότερο υδρόφοβο είναι το φιλοξενούμενο μόριο, τόσο περισσότερο σταθερό είναι και το σύγκλοκο που σχηματίζεται. Οι Rekharsky και Inoue ύστερα από χρόνιες μελέτες οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι οι υδροφοβικές δυνάμεις και οι δυνάμεις van der Waals κυριαργούν στον σγηματισμό συμπλοκών σε σγέση με στερεοχημικά φαινόμενα και δεσμούς υδρογόνου<sup>37</sup>.

# 1.6.1 Τρόποι απελευθέρωσης του φιλοξενούμενου μόριου από την κοιλότητα των κυκλοδεξτρίνων

# Ελεγχόμενη απελευθέρωση φιλοξενούμενου μορίου από τον ξενιστή λόγω μεταβολής του pH

Σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα, το pH στο ενδόσωμα και στο λυσόσωμα καρκινικών κυττάρων μειώνεται δραματικά στο 4.5 και 6.0, αντίστοιχα. Η διαφορά, αυτή που εντοπίζεται στην τιμή του pH στα βιολογικά συστήματα, βρήκε ευρεία εφαρμογή και στα σύμπλοκα εγκλεισμού. Πράγματι, έχουν αναφερθεί αρκέτα παραδείγματα στα οποία γίνεται ελεγχόμενη απελευθέρωση του φιλοξενούμενου μορίου από την κοιλότητα μακροκυκλικών υποδοχέων όπως οι κυκλοδεξτρίνες και τα καλιξαρένια όταν το pH βρίσκεται εντός των συγκεκριμένων τιμών<sup>38, 39</sup>.

### Ελεγχόμενη απελευθέρωση του φιλοξενούμενου μορίου παρουσία ROS

Με γνώμονα την ανάγκη για ελεγχόμενη παράδοση φαρμάκων, θεωρήθηκε επιτακτική ανάγκη ο σχεδιασμός συστήματων μεταφοράς φαρμάκων (Drug Delivery System - DDS) που ανταποκρίνονται σε ROS. Τα τροποποιημένα DDS σχεδιάστηκαν με τέτοιον τρόπο ώστε οι θεραπευτικές ουσίες να απελευρώνονται αποκλειστικά σε περιοχές που παράγονται υψηλές ποσότητες ROS, όπως στα καρκινικά κύτταρα. Αυτό, είχε σαν αποτέλεσμα την ενισχύση της θεραπτευτικής αποτελεσματικότητας και την μειώση παρενεργειών από την μη ειδική απελεύρωση φαρμάκων. Ειδικά τροποποιημένες κυκλοδεξτρίνες που έφεραν άρυλο βορονικούς εστέρες (οι οποίοι οξειδώνονται παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ακόμα και σε φυσιολογικό pH) χρησιμοποιήθηκαν για τον εγκλεισμό αντιγόνων όπως η ωολευκωματίνη (OVA). Μετά πρόσληψη από τα φαγοσώματα των κυττάρων τα οποία παρουσιάζουν το συγκεκριμένο αντιγόνο (APC), τα νανοσωματίδια στα οποία είναι εγκλεισμένα η OVA αποικοδομόυνται από τα ROS <sup>40</sup>.

### Χρονοεξαρτώμενη απελευθέρωση του φιλοξενούμενου μορίου

Εκτός από την απελευθέρωση του φιλοξενούμενου μορίου από την κοιλότητα των CD είτε λόγω μεταβολής του pH είτε λόγω παρουσίας H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου η απελευθέρωση του μορίου επισκέπτη είναι χρονικά εξαρτώμενη και δεν επηρεάζεται από τους παραπάνω παράγοντες. Ανάλογα με το ρυθμό με τον οποίο λαμβάνει χώρα ο απεγκλεισμός του φιλοξενούμενου μορίου προκύπτουν και οι παρακάτω κατηγορίες αποδέσμευσης: i) άμεση ii) παρατεταμένη και iii) συμβατική<sup>41</sup>.

### Κεφάλαιο 2 Βασικές αρχές αναλυτικών τεχνικών

μελέτη της δομής και της δραστικότητας χημικών ενώσεων Η πραγματοποιείται με βάση ένα σύνολο δεδομένων που προκύπτουν από φασματοσκοπικές τεχνικές αλλά και άλλες φυσικές και χημικές μεθόδους μελέτης των ενώσεων αυτών. Οι φυσικές κυρίως μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτό, έχουν διαφορετική βαρύτητα και κατά συνέπεια και διαφορετική συμμετοχή στην διαμόρφωση της συνολικής εικόνας των ενώσεων, αναλόγως του είδους και της έκτασης των πληροφοριών που μπορούν να προσφέρουν στις συγκεκριμένες περιπτώσεις. Έτσι, ενώ για παράδειγμα είναι γενικά αποδεκτό ότι η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού δίνει τα περισσότερα και ακριβέστερα στοιχεία, όσον αφορά στη γεωμετρία για κάθε εξεταζόμενη ένωση, είναι δύσκολη η αποτίμηση φασμάτων NMR σε παραμαγνητικά συστήματα καθώς και στην περίπτωση πυρήνων με άρτιο πυρηνικό σπιν. Στην συνέχεια, γίνεται μια παράθεση των κυριότερων σημείων που αναφέρονται στις αρχές καθώς και στην εφαρμογή των φασματοσκοπικών μεθόδων που εφαρμόστηκαν στο πλαίσιο των μελετών μας.

### 2.1 Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV - vis)

Οι απορροφήσεις της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή του υπεριώδους (Ultra Violet- UV) και του ορατού (Visible ή Vis) τμήματος του φάσματος είναι αποτέλεσμα ηλεκτρονιακών διεγέρσεων ηλεκτρονίων σθένους από την βασική σε μια από τις διεγερμένες ηλεκτρονιακές καταστάσεις που είναι δυνατές για κάθε σύστημα. Η περιοχή του ορατού εντοπίζεται στα 350 έως 750 nm περίπου ενώ σε χαμηλότερες τιμές εντοπίζεται η περιοχή του υπεριώδους. Οι μετρήσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν, εφόσον χρησιμοποιείται κυψελίδα από χαλαζία, ο οποίος είναι διαπερατός στις ακτινοβολίες αυτές, μέχρι το μήκος κύματος το οποίο αποτελεί το κατώτατο όριο για κάθε διαλύτη. Το όριο αυτό ποικίλλει και καθορίζεται από το μήκος κύματος στο οποίο η απορρόφηση του διαλύτη γίνεται σημαντική, έτσι ώστε στην καταγραφή του φάσματος δεν υπάρχει δυνατότητα για την διάκριση του ποσού της απορρόφησης που οφείλεται στην διαλυμένη ουσία. Τα συγκεκριμένα μήκη κύματος καθορίζονται από μετρήσεις στις οποίες η απορρόφηση του καθαρού διαλύτη, που περιέχεται σε μια κυψελίδα οπτικής διαδρομής 10 mm, μόλις υπερβαίνει την τιμή 0.05 σε σχέση με μια κυψελίδα αναφοράς από απεσταγμένο νερό. Παρόλα αυτά, αν η εργασία που πραγματοποιείται δεν είναι ποσοτική, μπορεί κάποιος να εργασθεί και σε μια μικρή περιοχή μηκών κύματος χαμηλότερη από την τιμή του ορίου μέτρησης (cut off) του συγκεκριμένου διαλύτη. Η θεωρία των μοριακών τροχιακών δίνει μια απλή και κατανοητή αναπαράσταση της κατανομής των ηλεκτρονίων στα μόρια των γημικών ενώσεων. Ακόμα παρέγει την δυνατότητα να αναπαρασταθούν με σχετική ακρίβεια οι ηλεκτρονικές μεταβάσεις μέσα στο μόριο και να τις συνδέσουμε άμεσα με τις ενεργειακές μεταβολές που συμβαίνουν κατά την λήψη και καταγραφή των ηλεκτρονικών φασμάτων. Τέλος, σε αντίθεση με τα ηλεκτρονικά φάσματα των οργανικών ενώσεων όπου εμφανίζονται οι τυπικές σσ\*, π-π\* και n-π\* διεγέρσεις, στα αντίστοιχα φάσματα των σύμπλοκων ενώσεων παρατηρούνται ταινίες απορρόφησης με μεγάλο εύρος εντάσεων και σε μεγαλύτερη ποικιλία μορφών.

### 2.2 Φασματοσκοπία Φθορισμού

Τα φάσματα φθορισμού μπορούν να κατηγοροποιηθούν σε φάσματα εκπομπής και απορρόφησης. Στην πρώτη περίπτωση, τα μόρια της εξεταζόμενης ένωσης μεταπίπτουν από την διεγερμένη κατάσταση αυξημένης ενέργειας στη βασική, χαμηλότερης ενέργειας και η διαφορά ενέργειας μεταξύ των δύο καταστάσεων εκπέμπεται με μορφή ακτινοβολίας. Τα φάσματα εκπομπής δημιουργούνται με ανύψωση της θερμοκρασίας, με ηλεκτρική εκκένωση ή φωτοχημικά με επίδραση μιας ακτινοβολίας. Οι δύο πρώτοι τρόποι διέγερσης λόγω των βίαιων συνθηκών που εφαρμόζουν, δεν έχουν ευρεία απήχηση σε αντίθεση με τον τελευταίο τρόπο, δηλαδή με την επίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται ευρύτατα στη φωτοχημεία για τη μελέτη φασμάτων φθορισμού και φωσφορισμού διάφορων ενώσεων.

Στα φάσματα εκπομπής η αρχική ενεργειακή κατάσταση στην οποία βρίσκεται η εξεταζόμενη ένωση είναι υψηλότερη από την τελική, η οποία είναι και η βασική του κατάσταση (χαμηλότερης ενέργειας). Αρχικά η διεγερμένη κατάσταση προκύπτει όπως προαναφέρθηκε συνήθως με την διέγερση της ουσίας χρήσιμοποιόντας ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία η οποία και απορροφά το μόριο της ένωσης. Από την διεγερμένη αυτή κατάσταση η επάνοδος του στην αρχική βασική κατάσταση, δηλαδή η αποδιέγερη του, μπορεί να πραγματοποιηθεί με διαφορετικούς τρόπους. Καταρχάς, μπορεί να συμβεί με την αποβολή της απορροφούμενης ενέργειας με τη μορφή θερμότητας διαμέσου των θερμικών κινήσεων και ταλαντώσεων που εκτελεί το μόριο, χωρίς την εκπομπή ενέργειας με τη μορφή ακτινοβολίας τότε μπορούν να παρατηρηθούν δύο διαφορετικά φαινόμενα, αυτό του φωσφορισμού και αυτό του φθορισμού που αντίστοιχα πραγματοποιούνται από δύο διαφορετικούς μηχανισμούς αποδιέγερσης όπως φαίνεται στην επόμενη απλοποιημένη εικόνα (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1: Γενικό διάγραμμα διαδικασιών διέγερσης-αποδιέγερσης.

Η αρχική διέγερση με τη μορφή ακτινοβολίας συνεπάγεται ανύψωση ενός ηλεκτρονίου σθένους από τη βασική κατάσταση (δεσμική) σε μια διεγερμένη (αντιδεσμική) κατάσταση. Είναι σημαντικό να τονισθεί πως το φαινόμενο αυτό (της διέγερσης) διέπεται από το νόμο των Stark-Einstein, που αποτελεί και το βασικό νόμο των φωτοχημικών διεργασιών και αντιδράσεων. Έτσι, σύμφωνα με το νόμο αυτό, ένα μόριο απορροφά ένα κβάντο φωτός (φωτόνιο) και από το διεγερμένο μόριο προέρχονται όλες οι μετέπειτα πρωτογενείς μεταβολές. Από την κατάσταση αυτή η αποδιέγερση που δημιουργεί το φαινόμενο του φθορισμού είναι η απευθείας μετάπτωση από αυτή στη βασική με την αποβολή μέρους της αρχικής δαπανούμενης ενέργειας με τη μορφή επίσης ακτινοβολίας, χαμηλότερης ενέργειας φυσικά, αφού ένα μέρος της αρχικής μετατρέπεται σε θερμότητα με αποδιεγέρσεις δόνησης και περιστροφής. Η εκπομπή πραγματοποιείται από το χαμηλότερο ενεργειακό δονητικό επίπεδο της χαμηλότερης διεγερμένης απλής κατάστασης, λόγω του ότι η αποδιέγερση από τα διεγερμένα δονητικά επίπεδα είναι πολύ πιο γρήγορη διαδικασία από αυτή της εκπομπής φθορισμού.

### 2.3 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Δεδομένου ότι οι πυρήνες των ατόμων περιλαμβάνουν θετικά φορτισμένα σωματίδια τα οποία έχουν spin, συμπεριφέρονται, κάτω από ορισμένες συνθήκες, ως μικροσκοπικοί μαγνήτες. Μπορούν συνεπώς να αλληλεπιδρούν με εξωτερικά εφαρμοζόμενα μαγνητικά πεδία. Έτσι το spin των πυρήνων μπορεί να είναι είτε παράλληλα είτε αντιπαράλληλα διευθετημένο με το εξωτερικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο. Από τους δύο αυτούς προσανατολισμούς, ο παράλληλος είναι μικρότερης ενέργειας και ο αντιπαράλληλος υψηλότερης. Αν τώρα οι παράλληλοι πυρήνες ακτινοβοληθούν με κατάλληλης ενέργειας ακτινοβολία (στην περιογή των ραδιοσυχνοτήτων), λαμβάνει χώρα η απορρόφηση ενέργειας και προκαλείται διέγερση σε μια κατάσταση υψηλότερης ενέργειας. Όταν πραγματοποιηθεί η αναστροφή αυτή του spin, οι πυρήνες έχουν συντονιστεί με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία, εξ' ου και ο όρος πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός. Η ακριβής συχνότητα (ενέργεια) που απαιτείται για τον συντονισμό εξαρτάται από την ισχύ του εφαρμοζόμενου εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και από το είδος του πυρήνα. Εκείνο που παρατηρήθηκε από τις πρώτες ακόμη εφαρμογές του φαινομένου, είναι ότι όμοιοι πυρήνες δεν έχουν την ίδια ακριβώς συχνότητα συντονισμού κάτι το οποίο αποδίδεται στο γεγονός ότι κάθε πυρήνας βρίσκεται σε ένα ιδιαίτερο ηλεκτρονιακό περιβάλλον που δημιουργούν τα ηλεκτρόνια που τον περιβάλλουν. Ως εκ τούτου, τα ηλεκτρόνια αυτά δημιουργούν το δικό τους τοπικό μικροσκοπικό μαγνητικό πεδίο το οποίο δρα παράλληλα με το εξωτερικό εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο. Έτσι κάθε πυρήνας βρίσκεται σε σαφώς διαφορετικό ηλεκτρονιακό περιβάλλον με αποτέλεσμα να έχει την δική του συχνότητα συντονισμού, η οποία είναι γνωστή ως χημική μετατόπιση.

Απαραίτητη και αναγκαία συνθήκη για την εκδήλωση του φαινομένου του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού από κάποιο πυρήνα, είναι είτε ο περιττός αριθμός πρωτονίων είτε ο περιττός αριθμός νετρονίων σε αυτούς τους πυρήνες.

Ενδεικτικά, κάποιοι πυρήνες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>17</sup>O και το <sup>57</sup>Fe.

### 2.3.1 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού σε διάλυμα

Τα φάσματα NMR υπάρχει η δυνατότητα να ληφθούν είτε σε διάλυμα είτε σε στερεά κατάσταση. Οι μετρήσεις σε διάλυμα πραγματοποιούνται με την χρήση κατάλληλων δευτεριωμένων διαλυτών σε ειδικούς γυάλινους σωλήνες. Η ποσότητα δείγματος είναι συνήθως 2-20 mg (αναλόγως την αφθονία του χρησιμοποιούμενου πυρήνα) σε 0.5mL δευτεριωμένου διαλύτη. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την λήψη φασμάτων <sup>1</sup>Η NMR δεν πρέπει να αλληλεπιδρούν με τις διαλυόμενες ουσίες και δεν θα πρέπει να εμφανίζουν ταινίες απορρόφησης από υπολείμματα ατόμων στις περιοχές όπου αναμένεται να εμφανίζονται σήματα από την διαλυμένη ουσία. Οι συνηθέστεροι διαλύτες είναι οι CDCl<sub>3</sub>, DMSO-d<sub>6</sub>, CD<sub>3</sub>OD και D<sub>2</sub>O.



Εικόνα 2.2: Τυπικό διάγραμμα φασματογράφο πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού.

### 2.3.1.1 Χημικές Μετατοπίσεις

Η αποτύπωση των φασμάτων σε γραφήματα, εμφανίζουν την ισχύ του εφαρμοζόμενου πεδίου να αυξάνεται από τα αριστερά προς τα δεξιά. Κατά συνέπεια, το αριστερό τμήμα του φάσματος είναι η πλευρά του χαμηλού πεδίου (downfield) και το δεξιό υψηλού πεδίου (upfield). Για τον προσδιορισμό της θέσης μιας απορρόφησης, το γράφημα του NMR βαθμονομείται με τη χρήση κάποιου σημείου αναφοράς. Στην πράξη, το σημείο αναφοράς καθορίζεται από την προσθήκη μικρής ποσότητας ενός εσωτερικού προτύπου όπως είναι το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS, (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Si) το οποίο αντιστοιχεί στο απόλυτο μηδέν. Η χρήση του TMS στα φάσματα άνθρακα και υδρογόνου γίνεται λόγω του ότι η απορρόφηση του (απορρόφηση αναφοράς), δίνει μία και μοναδική κορυφή (τόσο στο <sup>1</sup>Η όσο και στο <sup>13</sup>C NMR) που παρατηρείται σε υψηλότερο πεδίο από τις απορροφήσεις των περισσοτέρων οργανικών ενώσεων.

Η θέση στο γράφημα, όπου ένας πυρήνας απορροφά, καλείται χημική μετατόπιση. Η χημική μετατόπιση του TMS ορίζεται κατά σύμβαση ως ίση με το

μηδέν, ενώ οι άλλες απορροφήσεις εμφανίζονται κατά κανόνα σε χαμηλότερο πεδίο (αριστερά του TMS). Τα γραφήματα του NMR βαθμονομούνται χρησιμοποιώντας μια αυθαίρετη κλίμακα, που ονομάζεται κλίμακα δέλτα (δ). Μία μονάδα δέλτα (δ) ισούται με ένα μέρος στο εκατομμύριο (ppm) της συχνότητας του φασματομέτρου. Για παράδειγμα, στο φάσμα <sup>1</sup>Η NMR ενός δείγματος, χρησιμοποιώντας ένα όργανο των 60 MHz, το 1δ θα ήταν 1 ppm των 60.000.000 Hz, δηλαδή 60 Hz. Με το ίδιο τρόπο, εάν μετρούσαμε το φάσμα χρησιμοποιώντας όργανο των 300 MHz, ένα δ είναι 300 Hz. Βάση την εξίσωση :

### δ = Παρατηρούμενη χημική μετατόπιση (αριθμός σε Hz από το TMS) Συχνότητα φασματομέτρου σε MHz

μπορούμε εύκολα να βρούμε την μετατόπιση δ.

Η βαθμονόμηση των γραφημάτων NMR με αυτό τον τρόπο είναι ιδιαίτερα χρήσιμη, αφού η χημική μετατόπιση μιας κορυφής και η απαιτούμενη ραδιοσυχνότητα συντονισμού εξαρτώνται από την ισχύ του εφαρμοζόμενου πεδίου. Δεδομένου ότι υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη φασματόμετρων, που λειτουργούν σε διαφορετικής ισχύος μαγνητικά πεδία και ραδιοσυχνότητες, οι χημικές μετατοπίσεις που θα δινόταν σε Ηz θα μεταβάλλονταν από όργανο σε όργανο. Ωστόσο, με τη χρήση ενός συστήματος μέτρησης στο οποίο οι απορροφήσεις NMR εκφράζονται σε σχετικούς όρους (ppm της συχνότητας του φασματομέτρου) και όχι σε απόλυτους όρους (Hz), καθίστανται δυνατές συγκρίσεις φασμάτων από διαφορετικά όργανα. Έτσι η χημική μετατόπιση μιας απορρόφησης NMR δίνεται σε μονάδες δ και είναι σταθερή, ανεξάρτητα από τη συχνότητα λειτουργίας του φασματομέτρου.

### 2.3.1.2 Η σύζευξη των σπιν

Ένα σημαντικό φαινόμενο που αποτελεί αιτία της λεπτής υφής των φασμάτων NMR είναι η σύζευξη των σπιν (spin-spin coupling). Η σύζευξη είναι το αποτέλεσμα της μαγνητικής αλληλεπίδρασης που έχουν μεταξύ τους κοντινοί πυρήνες. Η μαγνητική επίδραση από έναν πυρήνα σε έναν άλλο είναι υπολογίσιμη όταν το μαγνητικό πεδίο που εξασκούν είναι της τάξης του 0,01 μT ή μεγαλύτερο.

Τα σήματα συντονισμού των πυρήνων που γειτνιάζουν με άλλους μαγνητικούς πυρήνες εμφανίζονται με τη μορφή πολλαπλών κορυφών, έχουμε δηλαδή διάσπαση του σήματος σε περισσότερα με ορισμένη κανονικότητα και συμμετρία. Η πολλαπλότητα αυτή των σημάτων συντονισμού ονομάζεται σύζευξη spin-spin και οφείλεται σε αλληλεπίδραση με τα spin των γειτονικών μαγνητικών πυρήνων, που διαδίδεται διαμέσου δεσμών των μορίων και όχι μέσω του χώρου. Χαρακτηριστικό των πολλαπλών αυτών κορυφών είναι ότι ισαπέχουν μεταξύ τους και η απόσταση σε Ηz είναι η ίδια για τους πυρήνες που βρίσκονται σε σύζευξη, αυτή ονομάζεται σταθερά σύζευξης και συμβολίζεται με το γράμμα J.

Η σταθερά σύζευξης J διακρίνεται ανάλογα με τον αριθμό των δεσμών n που χωρίζουν τους πυρήνες που αλληλεπιδρούν. Ο συμβολισμός που χρησιμοποιείται είναι <sup>n</sup>J, όπου n ο αριθμός των δεσμών που παρεμβάλλονται μεταξύ των πυρήνων που αλληλεπιδρούν. Η σύζευξη spin-spin εμφανίζεται μεταξύ όμοιων ή ανόμοιων πυρήνων με I≠0, είναι όμως χαρακτηριστική κυρίως μεταξύ πυρήνων με I=1/2 και η σταθερά J έχει τόσο μεγαλύτερη τιμή όσο πλησιέστερα βρίσκονται οι πυρήνες και όσο περισσότερο διαφέρουν στο χημικό τους περιβάλλον.

Η σταθερά σύζευξης J μεταξύ δύο πυρήνων, είναι ανεξάρτητη από το εφαρμοζόμενο εξωτερικό πεδίο και μετριέται σε μονάδες Hz. Εάν υπάρχουν περισσότεροι από δύο πυρήνες που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, τότε χρειάζεται να αναλύσουμε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς προσανατολισμού των spin των πυρήνων, που βρίσκονται φυσικά αρκετά κοντά για να προκαλέσουν συζεύξεις, ώστε να βρούμε τις πιθανές σχάσεις των φασματικών γραμμών. Ο γενικός κανόνας για τον αριθμό των διασπάσεων που υπόκεινται οι φασματικές ταινίες στο NMR, λόγω της spin spin σύζευξης, είναι: όταν ένας πυρήνας αλληλεπιδρά με n (n=1, 2, 3,...) άλλους πυρήνες οι οποίοι χημικά και μαγνητικά ισοδύναμοι, παρουσιάζει ταινία απορρόφησης που διαιρείται σε n+1 κορυφές σε ίσες αποστάσεις μεταξύ τους και με αναλογία στην ένταση τους (1+X)<sup>n</sup>. Δηλαδή για n=3 η αναλογία της έντασης των φασματικών κορυφών είναι 1:3:3:1, για n=4, 1:4:6:4:1, κ.λπ. Ένας τρόπος για την πρακτική λύση της αναλογίας των εντάσεων των φασματικών γραμμών είναι το τρίγωνο Pascal που φαίνεται στην Εικόνα 2.3.



Εικόνα 2.3: Τριγωνο του Pascal.

Η σύζευξη μεταξύ πυρήνων επιτυγχάνεται μέσα από τα ηλεκτρόνια των δεσμών, δηλαδή είναι αλληλεπιδράσεις σύζευξης μεταξύ των δεσμικών ηλεκτρονίων. Υπάρχουν τρεις πιθανοί μηχανισμοί: (α) οι μαγνητικές ροπές των πυρήνων αλληλεπιδρούν με τα ηλεκτρικά ρεύματα που προκαλούνται από τα ηλεκτρονικά τροχιακά, (β) η διπολική αλληλεπίδραση μεταξύ των πυρηνικών και ηλεκτρονικών μαγνητικών ροπών και (γ) η αλληλεπίδραση μεταξύ των μαγνητικών ροπών και των ηλεκτρονικών spin στα s τροχιακά, λόγω του ότι η ηλεκτρονική κυματική συνάρτηση γύρω από τον πυρήνα έχει μια καθορισμένη τιμή, που καλείται όρος επαφής (contact term). Για τις συζεύξεις μεταξύ υδρογόνων φαίνεται ότι, ο τρίτος μηχανισμός είναι ο πιο σημαντικός, ενώ οι άλλοι δύο είναι αμελητέοι. Ωστόσο, για άλλους πυρήνες και οι τρεις μηχανισμοί είναι εξίσου σημαντικοί και οι κανόνες σύζευξεις είναι εντελώς διαφορετικοί από τις συζεύξεις Η Η και Η Χ (όπου Η υδρογόνο και Χ κάποιο ετερόατομο).

### **2.3.1.3 Ο μετασχηματισμός Fourier (Fourier Transformation)**

Ένα από τα βασικά προβλήματα της φασματοσκοπίας NMR είναι η έλλειψη ευαισθησίας σε σχέση με τις μεθόδους IR και UV-vis. Αυτό φυσικά, οφείλεται στο μικρό κλάσμα πυρήνων που μπορεί να υποστούν κβαντωμένες ενεργειακές μεταβάσεις και να προκαλέσουν απορρόφηση ακτινοβολίας στην περιοχή των ραδιοκυμάτων. Για την καταγραφή φασμάτων <sup>13</sup>C NMR όπου η χαμηλή φυσική αφθονίας του <sup>13</sup>C είναι μόνο 1.1%, μόνο ένας σε κάθε 100 άνθρακες μπορεί να αυξηθεί η ισχύς του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου, αφού οι ενέργειες των διαφόρων ενεργειακών καταστάσεων εξαρτώνται από την ισχύ του μαγνήτη. Με τους καινούργιους υπεραγώγιμους μαγνήτες που χρησιμοποιούνται σήμερα στα φασματόμετρα NMR, μπορούμε να πειραματιστούμε σε πεδία από 200 έως και 1000 MHz, γεγονός που αυξάνει κατά πολύ την ευαισθησία του οργάνου και της μεθόδου. Ωστόσο, οι τεχνικές δυσκολίες και η ακριβή τιμή των μαγνητών αυτών, καθώς και η μικρή φυσική αφθονία πολλών πυρήνων καθιστά τη μέθοδο πρακτικά αδύνατη.

Αντίθετα, ένας απλός τρόπος να ξεπεραστεί η δυσκολία της ευαισθησίας είναι να σαρωθεί το δείγμα αρκετές φορές και να προστεθούν μαθηματικά τα διαδοχικά φάσματα. Με τον τρόπο αυτό, οι κορυφές απορρόφησης του NMR θα προστεθούν με αποτέλεσμα την αύξηση της έντασης τους,ενώ ο θόρυβος που είναι τυχαία κατανεμημένος εξουδετερώνεται. Η μέθοδος αυτή οδηγεί σε σημαντική βελτίωση του κλάσματος Σήματος / Θορύβου (που δίνεται από την τετραγωνική ρίζα του αριθμού των σαρώσεων, π.χ. για 1000 σαρώσεις το κλάσμα Σήματος / Θορύβου γίνεται μεγαλύτερο 1000 =10 φορές). Με τη βοήθεια ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή γίνεται αποθήκευση των φασμάτων, που στη συνέχεια με ταχύτατο υπολογισμό σε 8.000 σημεία αναπαράγεται το βελτιωμένο φάσμα. Η δυνατότητα μετατροπής των πληροφοριών από σχέση χρόνου σε σχέση συχνότητας επιτυγχάνεται με ένα μαθηματικό μετασχηματισμό που καλείται μετασχηματισμός Fourier (FT). Η εξίσωση μεταξύ της σχέσης χρόνου και συχνότητας εκφράζεται ως εξής

$$F_{(\mathbf{v})} = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) \ e^{-i\mathbf{v}t} dt$$

όπου F(v) είναι η σχέση συχνότητας και f(t) είναι η αντίστοιχη σχέση χρόνου για το σήμα (δηλαδή η FID). Η ολοκλήρωση της εξίσωσης NMR με αριθμητικά δεδομένα δίνει τελικά το πραγματικό φάσμα.

# 2.3.2 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού σε στερεή κατάσταση

Στη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού σε διάλυμα, όλες οι ανισοτροπικές αλληλεπιδράσεις υπολογίζονται κατά μέσον όρο καθώς η ανισοτροπία των μόριων σε διάλυμα συμβαίνει ταχύτερα σε σχέση με τη συχνότητα των αλληλεπιδράσεων. Αντίθετα, το NMR στερεάς κατάστασης περιλαμβάνει ανισοτροπικές αλληλεπιδράσεις και τα φάσματα περιέχουν σημαντικές δομικές πληροφορίες. Ακόμα οι πυρήνες των πρωτόνιων δεν είναι προς παρατήρηση αφού εμπλέκονται σε ένα ισχυρό διπολικό συζευγμένο δίκτυο περιστροφών, με αποτέλεσμα τα φάσματα να είναι διευρυμένα και έτσι αυτό να επικεντρώνεται σε άλλους ετεροπυρήνες όπως είναι το <sup>13</sup>C και <sup>15</sup>N. Η ανίχνευση πυρήνων χαμηλής αφθονίας όπως είναι τα <sup>13</sup>C και <sup>15</sup>N απαιτεί συνήθως εμπλουτισμό ισότοπων για ενίσχυση της ευαισθησίας του σήματος. Για την περαιτέρω αύξηση της ευαισθησίας και της ανάλυσης των φασμάτων στερεάς κατάστασης, αυτό συνδυάζεται με αποσύζευξη πρωτονίων υψηλής ισχύος και διασταυρούμενη πόλωση (Cross Polarization - CP).

### 2.3.2.1 Η περιστροφή μαγικής γωνίας (Magic Angle Spinning - MAS)

Η περιστροφή μαγικής γωνίας (MAS) είναι μια βασική τεχνική σε NMR στερεάς κατάστασης για τη λήψη φασμάτων υψηλής ανάλυσης. Η τεχνική αυτή οδηγεί σε σημαντική απλούστευση των φασμάτων NMR στερεάς κατάστασης μειώνοντας το μοτίβο της ένωσης σε μια μέση ισοτροπική τιμή όπου τα παρατηρούμενα σήματα είναι πολύ περιορισμένα.



**Εικόνα 2.4:** Χωρίς την μαγική γωνία περιστροφής MAS, προκύπτουν συντονισμοί από την ανισοτροπία χημικής μετατόπισης (v<sub>A</sub>) όπως φαίνεται ένα τυπικό φάσμα (άνω εικόνα). Στο MAS NMR ο ρότορας ρυθμίζεται στη «μαγική γωνία» που είναι ρυθμισμένη στις 54,7° σε σχέση με τον άζονα z του στατικού μαγνητικού πεδίου. Επειδή όλα τα σημεία της διαγωνίου αυτής έχουν τις ίδιες συντεταγμένες και στους
τρεις άξονες (x, y, z), η ανισότροπια του μορίου σε αυτή την περίπτωση χάνεται. Καθώς η συχνότητα περιστροφής (ω<sub>r</sub>) αυξάνεται, το ευρύ φάσμα σπάει σε στενούς συντονισμούς στις ισότροπες χημικές μετατοπίσεις και σε ομάδες περιστροφικών πλευρικών ζωνών που απέχουν από τη συχνότητα περιστροφής (τα επόμενα δύο φάσματα κάτω από το φάσμα της σκόνης). Όταν η συχνότητα της MAS είναι πολύ μεγαλύτερη από το εύρος της ανισοτροπίας χημικής μετατόπισης, παρατηρείται μόνο ο ισοτροπικός συντονισμός (το φάσμα στο πυθμένα).

Η μέθοδος του NMR στερεάς κατάστασης βασίζεται στην γρήγορη περιστροφή ενός ρότορα γύρω από μία μονάδα περιστροφής, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.5, γύρω από έναν άξονα 54.74°, την γνωστή μαγική γωνία MAS, σε σχέση με το στατικό πεδίο B<sub>0</sub>. Η χημική προστασία, η διπολική και η τετραπολική αλληλεπίδραση περιέχουν και έναν εξαρτώμενο όρο ( $3\cos^2\theta$ -1) σε σχέση με το μαγνητικό πεδίο του οργάνου. Στο NMR σε διάλυμα, η ταχεία ισοτροπική ανατροπή (εάν ο ρυθμός ανατροπής είναι τ<sub>r</sub><sup>-1</sup> >> v<sub>A</sub>, v<sub>D</sub>) υπολογίζει κατά μέσον όρο αυτή τη χωρική συνιστώσα στο μηδέν, ενώ στην περίπτωση του solid state NMR, ο μέσος όρος της γωνιακής συνιστώσας είναι ουσιαστικά ο μέσος όρος της μηχανικής.

Ο ρυθμός περιστροφης της μαγικής γωνίας ω<sub>r</sub>, δηλαδή η MAS πρέπει να είναι τουλάχιστον ίσος με τον συντελεστή της ανισοτροπικής αλληλεπίδρασης, έτσι ώστε ο μέσος όρος τους να είναι μηδέν. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση των πλευρικών εντάσεων και την αύξηση των κεντρικών αντίστοιχα, καθώς οι αλληλεπιδράσεις ισότροπης μετατόπισης και οι ισοτροπικές συζεύξεις J απουσιάζουν, δίνοντας φάσματα NMR στερεάς κατάστασης παρόμοια με εκείνα που παρατηρήθηκαν στο NMR σε διαλύμα.



Εικόνα 2.5: Σχηματική αναπαράσταση της μαγικής γωνιάς περιστροφής.

#### 2.3.2.2 Διασταυρούμενη πόλωση (Cross Polarization - CP)

Η διασταυρούμένη πόλωση (CP) είναι μια τεχνική διπλής αντήχησης η οποία ξεπερνά δύο κοινά προβλήματα του NMR στερεής κατάστασης. Το πρώτο πρόβλημα προέρχεται από το γεγονός ότι στο NMR στερεάς κατάστασης οι πυρήνες φτωχής αφθονίας, όπως για παράδειγμα τα <sup>13</sup>C και <sup>15</sup>N (ισοτοπική αφθονία στην φύση 1.1% και 0.03% αντίστοιχα), υποφέρουν από χαμηλή ευαισθησία, ιδιαίτερα όταν αυτοί έχουν και χαμηλό γυρομαγνητικό λόγο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, σε ένα συμβατικό πείραμα NMR στερεάς κατάστασης ανάκτησης παλμού, γνωστό και ως πείραμα διάσπασης Bloch (BD), παρατηρούνται πολύ λίγες αραιές περιστροφές. Το δεύτερο πρόβλημα είναι το γεγονός ότι οι χρόνοι αποδιέγερσης spin-πλέγματος των αραιωμένων πυρήνων περιστροφής 1/2 είναι συνήθως μακρύς (δεκάδες δευτερόλεπτα για τον <sup>13</sup>C). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι ισχυρές ομοπυρηνικές διπολικές αλληλεπιδράσεις, που μπορούν να διεγείρουν μεταβάσεις αποδιέγερσης, είναι απούσες σε μεγάλο βαθμό και παραμένουν μόνο οι πολύ ασθενέστερες αλληλεπιδράσεις ετεροπυρηνικών διπόλών. Μεγάλος χρόνος αποδιέγερσης περιστροφής-πλέγματος σημαίνει ότι πρέπει να υπάρχουν και αντίστοιχα μεγάλες καθυστερήσεις μεταξύ των διαδοχικών σαρώσεων και έτσι ο αριθμός των παλμών θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλος. Έτσι η λήψη των φασμάτων θα απαιτούσε πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα.

Η διασταυρούμενη πόλωση εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι σε πολλά στερεά οι αραιωμένοι και άφθονοι πυρήνες βρίσκονται σε στενή εγγύτητα και έτσι συζεύγνονται μέσω της μαγνητικής διπολικής αλληλεπίδρασης. Η CP συνήθως συνδυάζεται με την μαγική γωνία περιστροφής (MAS) και την υψηλής ισχύος αποσύζευξη. Έτσι, οι περισσότερες ακολουθίες παλμών που χρησιμοποιούνται σε NMR στερεάς κατάστασης περιλαμβάνουν CP. Για να είναι δυνατή η μεταφορά της πόλωσης, οι Ι και S πρέπει να πληρούν τη συνθήκη Hartmann-Hahn. Καθώς η CP βασίζεται σε ετεροπυρηνικές διπολικές αλληλεπιδράσεις, είναι ευαίσθητη στις εσωτερικές πυρηνικές αποστάσεις και στην κινητικότητα των μορίων ή των σχετικών λειτουργικών ομάδων. Αυτό σημαίνει ότι η CP μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να εδραιώσει τη σύνδεση μεταξύ συζευγμένων πυρήνων και για να παρακολουθήσει τη μοριακή δυναμική στα στερεά το οποίο είναι ένα πολύ χρήσιμο χαρακτηριστικό για τον δομικό προσδιορισμό.

Cross-polarization pulse sequence



Εικόνα 2.6: Βασική ακολουθία των παλμών CP. Μετά την περίοδο προετοιμασίας, κατά την οποία το δείγμα πολώνεται στο μαγνητικό πεδίο, εφαρμόζεται ένας παλμός 45° στα σπειρώματα Ι κατά μήκος του άζονα x του περιστρεφόμενου πλαισίου. Στη συνέχεια εφαρμόζεται ένας μακρύς παλμός ασφάλισης περιστροφής πλάτους B<sub>11</sub> κατά μήκος του άζονα y'. Ταυτόχρονα, ένας μακρύς παλμός πλάτους B<sub>15</sub> εφαρμόζεται στις

περιστροφές S κατά μήκος του άζονα y'. Αυτή η χρονική περίοδος, κατά την οποία λαμβάνει χώρα η διασταυρούμενη πόλωση, είναι γνωστή ως χρόνος επαφής, t. Τα πλάτη των παλμών ικανοποιούν την κατάσταση Hartmann-Hahn  $\gamma_I B_{II} = \gamma_S B_{IS}$ . Τέλος, το πεδίο ραδιοσυχνοτήτων που εφαρμόζεται στις περιστροφές S είναι απενεργοποιημένο και παρατηρείται μια ελεύθερη αποσύνθεση επαγωγής των περιστροφών.

## 2.3.2.3 Αποσύζευξη πρωτονίων

Ο πυρήνας των πρωτονίων <sup>1</sup>Η έχει ιδιαίτερα μεγάλο γυρομαγνητικό λόγο γ και βρίσκεται σχεδόν σε 100% φυσική αφθονία. Ειδικά στα βιομόρια, ο αριθμός των πρωτονίων είναι μεγάλος και οι αλληλεπιδράσεις τους με ετεροπυρήνες όπως <sup>13</sup>C και <sup>15</sup>N, περιπλέκουν πολύ το φάσμα. Επομένως, η αποσύζευξη των πρωτονίων είναι μια απαραίτητη διαδικασία για να απομακρύνθουν οι υπολειπόμενες διπολικές συζεύξεις  ${}^{1}$ H /  ${}^{13}$ C κάτω από την MAS και οι  ${}^{1}$ H /  ${}^{13}$ C υπολειπόμενες ζεύξεις J, οι οποίες δεν υπολογίζονται κατά μέσον όρο με την περιστροφή του δείγματος υπό την μαγική γωνία. Η απλούστερη μέθοδος αποσύζευξης των πυρήνων περιλαμβάνει συνεχή ραδιενεργή ακτινοβολία σταθερής φάσης κατά την λήψη του FID και αποκαλείται αποσύζευξη συνεχών κυμάτων (CW). Πρόσφατα έχουν εισαχθεί πιο εξελιγμένες μέθοδοι, οι οποίες βελτιώνουν σημαντικά την αποδοτικότητα της αποσύζευξης. Η διαμόρφωση φάσης δύο παλμών (TPPM) αποτελείται από δύο παλμούς π όπου γίνεται ταχεία εναλλαγή των φάσεων τους. Πειραματικά έχει βρεθεί ότι η αποσύξευση της TPPM είναι πολύ ευαίσθητη στη ρύθμιση παραμέτρων των δύο τιμών δηλαδή του μήκους του παλμού και της γωνίας φάσης. Υπάρχει επίσης, και το σχήμα αποσύζευξης Χ- αντίστροφο -Χ (XiX), το οποίο είναι ένα απλό σγήμα υψηλής αποσύζευξης που βελτιώνει την αποσύζευξη σε σύγκριση με άλλες διαθέσιμες ακολουθίες όπως η CW και η TPPM. Ουσιαστικά εφαρμόζεται συνεχή ακτινοβολία στα πρωτονία με παλμούς ίσης πλάτους τ<sub>p</sub> και με διαφορά φάσης 180°. Έτσι η απόδοση της XiX, εξαρτάται μόνο από το πλάτος του παλμού τ<sub>p</sub> σε μονάδες της περιόδου του ρότορα, τ<sub>r</sub> =  $1/\omega_r$ 

## 2.4 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού σε δύο διαστάσεις

Η μεταφόρα του φάσματος NMR σε μια δεύτερη διάσταση άνοιξε νέες προοπτικές στ χρήση της φασματοσκοπίας NMR. Τα συμβατικά δισδιάστατα πειράματα NMR έγιναν πολύ δημοφιλή αφού αμέσως χαρτογράφησαν τις ενδομοριακές και διαμοριακές αλληλεπιδράσεις. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε: α) συζεύξεις μεταξύ των δεσμών που παρατηρούνται κυρίως μέσω πειραμάτων COSY, HMQC και HMBC και β) συζεύξεις μέσω χώρου που παρατηρούνται μέσω πειραμάτων NOESY και ROESY. Άλλη μια κατηγοριοποιήση μπορεί να γίνει ανάλογα με το είδος των πύρηνων σε ομοπυρηνικές και ετεροπυρηνικές τεχνικές με βάση αν οι αλληλεπηδράσεις αυτές μπορούν να προσδιοριστούν από ίδιο ή διαφορετικό τύπο πυρήνα.

## 2.4.1 Ομοπυρηνική 2D Φασματοσκοπία Συσχέτισης μέσω του Φαινομένου NOE <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H.

Τα πειράματα τα οποία πραγματοποιούνται μέσω φασματοσκοπίας NOESY βασίζονται σε διπολικές αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα διαμέσου του χώρου και μπορούν να αποκτηθούν βασικά δεδομένα που αφορούν στην τριδιάστατη δομή μιας ένωσης.

Δύο αρκετά κοντινοί πυρήνες μπορούν βιώσουν το φαινόμενο NOE. Ο πρώτος πυρήνας δημιουργεί ένα τοπικό πεδίο στο δεύτερο πυρήνα λόγω της στιγμιαίας μαγνήτισης του. Το τοπικό πεδίο που δημιουργείται εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους. Η απόσταση r μεταξυ των 2 πυρήνων που είναι αντιστρόφως ανάλογη με την μεταξύ τους απόσταση υψομένη στην έκτη δύναμη δηλαδή r<sup>-6</sup>, εντός της απόστασης των 5 Å. Ο δεύτερος παράγοντας είναι ο γυρομαγνητικός λόγος γ των δύο πυρήνων. Όσο υψηλότερο είναι το γ τόσο πιο σημαντική είναι η μαγνητική ροπή τόσο υψηλότερης έντασης είναι το τοπικό μαγνητικό πεδίο.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πυρήνων που είναι συζευμένοι μπορεί να προσδιοριστεί από τέσσερα ενεργειακά επίπεδα ενώ υπάρχουν 6 τρόποι μετάβασης από το ένα επίπεδο στο άλλο εκ των οποίων τα 4 από αυτά προέρχονται από αποδιέγερση των πυρήνων και περιλαμβάνουν καταστάσεις μετάβασης του ενός πυρήνα μια χρονική στιγμή από το α στο β και αντίστροφα. Οι μεταβάσεις αυτές χαρακτηρίζονται από έναν ρυθμό αποδιέργεσης  $W_1^X$ , όπου το X αντιστοιχεί στον πυρήνα που επηρεάζεται από αυτή την μετάβαση. Οι άλλοι δυο τρόποι μετάβασης προέρχονται από διασταυρούμενη αποδιέγερση, δηλαδή και οι δύο πυρήνες αντιστρέφονται ταυτόχρονα. Ο ρυθμός αποδιέργεσης ορίζεται από τον όρο  $W_2^{12}$ , όταν ο όρος  $a_1a_2$  γίνεται  $β_1β_2$  και αντίστροφα και από τον όρο  $W_0^{12}$  όταν οι καταστάσεις των πυρήνων βρίσκονται στην αντίθετη κατεύθυνση και ο όρος  $a_1β_2$ γίνεται  $a_2β_1$  (Εικόνα 2.7).



**Εικόνα 2.7:** Ενεργειακά επίπεδα των δύο πυρήνων που αλληλεπιδρούν μαζί και οι τρόποι αποδιέγερσης τους. Το φαινόμενο ΝΟΕ αναγκάζει τους πυρήνες να ακολουθήσουν τις οδούς W<sub>0</sub> και W<sub>2</sub>.

Τη στιγμή της ισορροπίας, τα ενεργειακά επίπεδα δεν είναι εξίσου κατειλημμένα και σταθερότερο είναι εκείνο το οποίο είναι περισσότερο κατειλημμένο σε σχέση με το ενεργειακό επίπεδο χαμηλότερης ενέργειας. Όταν συμβεί κάποια διαταραχή, η κατανομή του πληθυσμού τροποποιείται και οι

πυρήνες βρίσκονται σε υψηλότερα επίπεδα. Όταν επεισέρχεται πάλι ισορρόπια στο σύστημα, αυτή μπορεί να γίνει με διασταυρούμενη αποδιέγερση με αποτέλεσμα να υπάρχει μεταφορά μαγνητισμού από τον έναν πυρήνα στον άλλο. Ο πιο απλός τρόπος για να παρατηρηθεί το φαινόμενο ΝΟΕ είναι μέσω δισδιάστατου πειράματος NOESY με την παλμική ακολουθία που φαίνεται στην Εικόνα 2.8.

Όπως συμβαίνει στα δισδιάστατα πειράματα μετά τον χρόνο εξέλιξης, τα σήματα ρυθμίζονται με κλιμακωτές συζεύξεις και χημικές μετατοπίσεις. Στη συνέχεια, ξεκινά ο χρόνος ανάμειξης κατά τη διάρκεια του οποίου μεταδίδεται η μαγνήτιση από έναν πυρήνα στον άλλον με διασταυρούμενη αποδιέργεση. Όπως συμβαίνει και κατά τον χρόνου μίξης των πειραμάτων TOCSY, η μαγνήτηση που μεταφέρεται, διατηρεί πληροφορίες σχετικά με τον πυρήνα που προέρχεται και είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία διασταυρούμενων κορυφών στο φάσμα.



Εικονα 2.8: Φάσμα NOESY της κωδεΐνης.

Οι διασταυρούμενες κορυφές προέρχονται από μαγνητισμούς κατά τον άξονα z που μεταφέρονται από τον ένα πυρήνα στον άλλο ως αποτέλεσμα της διασταυρούμενης αποδιέγερσης. Εάν η σταθερά του ρυθμού διασταύρωσηςαποδιέργεσης είναι θετική, δηλαδή το  $W_2$  ευνοείται έναντι του  $W_0$ , οι διασταυρούμενες κορυφές είναι θετικού σημείου ενώ εάν αυτή η σταθερά είναι αρνητική, τα σήματα NOE έχουν αρνητική φάση. Στην περίπτωση που η σταθερά ρυθμού διασταύρωσης είναι ίση με το μηδέν, δεν λαμβάνει χώρα αποδιέργεση μεταξύ των κοντινών πυρήνων και δεν παρατηρούνται διασταυρούμενες κορυφές. Πρέπει να σημειωθεί ότι ορισμένες φορές η ένταση των κορυφών δεν είναι σταθερή, κάποιες είναι ισχυρότερες από άλλες. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ορισμένοι πυρήνες είναι πιο κοντά χωρικά σε σχέση με κάποιους άλλους.

# 2.4.2 Φασματοσκοπία NMR Διάχυσης DOSY (Diffusion Ordered NMR Spectroscopy)

#### Διάχυση

Η διάχυση είναι ένα μέγεθος που εξαρτάται από ένα πλήθος παραμέτρων, κυρίως την υδροδυναμική ακτίνα του μορίου, την θερμοκρασία του διαλύματος, την συνεισφορά στην τριβή, όροι που όλοι συνδέονται από την εξίσωση Stokes-Einstein:

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

Όπου D είναι ο συνελεστής διάχυσης, k η σταθερά Boltzmann, T η θερμοκρασία, η το ιξώδες του διαλύματος με χαμηλό αριθμό Reynolds και r<sub>s</sub> η ακτίνα μιας σφαίρας με υδροδυναμικές παραμέτρους ισοδύναμες με την ένωση που παρατηρούμε. Η παραπάνω εξίσωση περιγράφει την εξάρτηση μεταξύ του μεγέθους του μορίου και της σταθεράς διάχυσης, η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογη με το μέγεθος του.

## Φασματοσκοπία διάχυσης

Η φασματοσκοπία διάχυσης (DOSY) συσχετίζει τα σήματα μιας ένωσης με τον αντίστοιχο συντελεστή διάχυσης. Καθώς όλοι οι πυρήνες ενός μορίου έχουν το ίδιο συνελεστή διάχυσης D, αυτή η αλληλουχία επιτρέπει έναν εικονικό διαχωρισμό μιας ένωσης σύμφωνα με την τιμή D. Στη φασματοσκοπία DOSY, τα αποτελέσματα χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση ενός δισδιάστατου φάσματος που αποτελείται από άξονα συχνοτήτων και έναν άξονα διάχυσης.

Η ανάλυση που προκύπτει από ένα φάσμα DOSY είναι απλή. Οποιοδήποτε σήμα που προέρχεται από τους πυρήνες ενός μορίου θα πρέπει να διαχέεται με τον ίδιο ρυθμό και αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σήμα να εμφανίζεται σαν μία τιμή D. Τα σήματα που ανήκουν σε μικρά μόρια έχουν υψηλότερο συντελεστή διάχυσης σε σύγκριση με τα μεγάλα μόρια που διαχέονται πιο αργά και συνεπώς θα έχουν χαμηλότερη τιμή D (Εικόνα 2.9).



Εικόνα 2.9: Ανάλυση μείγματος φλαβονοειδών μέσω φασματοσκοπίας διάχυσης DOSY.

## 2.5 Κυκλική βολταμετρία (Cyclic Voltametry - CV)

Η κυκλική βολταμετρία είναι μια μέθοδος για τη διερεύνηση της ηλεκτροχημικής συμπεριφοράς ενός συστήματος. Αναφέρθηκε και περιγράφηκε για πρώτη φορά από την Randies το 1938 και πλέον αποτελεί την πλέον διαδεδομένη τεχνική για την απόκτηση ποιοτικών πληροφοριών σχετικά με τις ηλεκτροχημικές αντιδράσεις. Η ισχύς της κυκλικής βολταμετρίας προκύπτει από την ικανότητά της να παρέχει γρήγορα σημαντικές πληροφορίες που σχετίζονται με τη θερμοδυναμική αντιδράσεων οξειδοαναγωγής, την κινητική των ετερογενών αντιδράσεων μεταφοράς ηλεκτρονίων και τις χημικές αντιδράσεις σύζευξης.

## Βασικές αρχές κυκλικής βολταμετρίας

Η βολταμετρία είναι ένα σύνολο ηλεκτροαναλυτικών τεχνικών στις οποίες οι πληροφορίες για την αναλυόμενη ουσία προέρχονται από τη μέτρηση του ρεύματος συναρτήσει του εφαρμοζόμενου δυναμικού. Χρησιμοποιείται για θεμελιώδεις μελέτες που περιλαμβάνουν διαδικασίες οξειδοαναγωγής, διεργασίες επιφανειακής προσρόφησης, μηχανισμούς μεταφοράς ηλεκτρονίων και κινητικής των ηλεκτρονίων.

Η ηλεκτροχημεία αποτελεί μια από τις πιο ευαίσθητες τεχνικές και παρέχει πολλές χρήσιμες πληροφορίες. Ηλεκτροαναλυτικές τεχνικές όπως η κυκλική βολταμετρία και η διαφορική παλμική βολταμετρία δεν είναι μόνο ικανές να προσδιορίσουν τις συγκεντρώσεις ενός ηλεκτροδραστικού αναλύτη σε επίπεδα ίχνους, αλλά παρέχουν και χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τις φυσικοχημικές του ιδιότητες. Μεγέθη όπως το δυναμικό οξείδωσης, οι συντελεστές διάχυσης και ο ρυθμός μεταφοράς ηλεκτρονίων επιτυγχάνονται εύκολα χρησιμοποιώντας ηλεκτροανάλυση καθώς είναι δύσκολο να ληφθούν χρησιμοποιώντας άλλες αναλυτικές τεχνικές. Επιπλέον, οι ηλεκτροαναλυτικές μέθοδοι μπορούν να συζευχθούν με φασματοσκοπία παρέχοντας *in situ* πληροφορίες σχετικά με τις μοριακές δομές και μηχανισμούς αντίδρασης.

Η κυκλική βολταμετρία (CV) είναι μια τεχνική σάρωσης του δυναμικού των ηλεκτροδίων ανάμεσα στα δυναμικά E<sub>1</sub> και E<sub>2</sub> με ένα γνωστό ρυθμό σάρωσης. Κατά την επίτευξη του ορίου E<sub>2</sub>, η σάρωση αντιστρέφεται στο δυναμικό E<sub>1</sub> για να επιτευχθεί μια πλήρης κυκλική σάρωση. Η σάρωση της CV αποτυπώνεται με μια γραφική παράσταση του ρεύματος και του δυναμικού και υποδεικνύει την τιμή στην οποία συμβαίνει η διαδικασία της οξειδοαναγωγής. Ο άξονας του δυναμικού είναι επίσης ένας χρονικός άξονας που σχετίζεται με τον ρυθμό σάρωσης. Το σήμα διέγερσης είναι μια γραμμική δυναμική σάρωση με τριγωνική κυματομορφή όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.10. Αυτό το τριγωνικό σήμα διέγερσης σαρώνει τη διαδικασίατα που μετριέται κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας συχνά κανονικοποιείται στο εμβαδόν επιφάνειας ηλεκτροδίου και αναφέρεται ως πυκνότητα ρεύματος.



Εικόνα 2.10: Μεταβολή του εφαρμοζόμενου δυναμικού συναρτήσει του χρόνου σε ένα τυπικό διάγραμμα κυκλικής βολταμετρίας.

Στη συνέχεια, η πυκνότητα του ρεύματος απεικονίζεται γραφικά σε σχέση με το εφαρμοζόμενο δυναμικό και το αποτέλεσμα αναφέρεται ως κυκλικό βολταμόγραμμα (Εικόνα 2.11). Η κορυφή στο μετρούμενο ρεύμα παρατηρείται στο δυναμικό που είναι χαρακτηριστικό μιας οποιασδήποτε αντίδρασης ηλεκτροδίου που λαμβάνει χώρα. Το πλάτος και το ύψος κορυφής για μια συγκεκριμένη διεργασία εξαρτάται από τον ρυθμό σάρωσης, τη συγκέντρωση ηλεκτρολύτη και το υλικό ηλεκτροδίου.



**Εικόνα 2.11:** Τυπικό διάγνωμα κυκλικής βολταμετρίας του ρεύματος συναρτήσει του δυναμικού.

## Κεφαλαιο 3 Χαρτογράφηση αλληλεπιδράσεων και βιοδραστικότητας του συμπλόκου της Κερσετίνης με την (2-Υδροξυπροπυλο) κυκλοδεξτρίνη

## 3.1 Εισαγωγή

Τα φυσικά προϊόντα έχουν πολύπλοκες δομές που τους επιτρέπουν να αλληλεπιδρούν με πολλαπλά βιομόρια. Το πολυφαρμακολογικό προφίλ έχει καταγραφεί για πολλά φυσικά προϊόντα, σε διάφορες θεραπευτικές περιοχές και θα μπορούσε να αποδοθεί στις ενδιαφέρουσες δομές τους. Η κερσετίνη βρίσκεται σε πολλά φρούτα, λαγανικά και σε σπόρους42. Η παρουσία των φλαβονοειδών στην καθημερινή διατροφή έχει συνδεθεί με πολλά οφέλη για την υγεία και ταυτόχρονα έχει βρεθεί ότι προσαρμόζουν την βιοδραστικότητα τους σε ευρύ φάσμα ασθενειών. Η χορήγηση κερσετίνης έχει πολλαπλώς συνδεθεί με σημαντική μείωση της συστολικής πίεσης στο αίμα<sup>43</sup> ενώ έχει αναφερθεί ότι μπορεί να εμποδίζει ουσίες που εμπλέκονται σε αλλεργίες και δρα ως αναστολέας της έκκρισης ιστιοκυττάρων<sup>44</sup>. Ακόμα έχει την δυνατότητα να αναστέλλει την *in vitro* παραγωγή ενζύμων που προκαλείται από μία φλεγμονή (όπως είναι η κυκλοοξυγενάση και η λιποξυγενάση)<sup>45</sup>, ενώ έμμεσα στοιγεία υποδεικνύουν ότι η ίδια, καθώς και ένα μεγάλο πλήθος πολυφαινολών, είναι σε θέση να αποτρέψουν την παχυσαρκία μέσω διαφορετικών μοριακών μονοπατιών<sup>46</sup>. Η ερευνητική ομάδα των Ma και συνεργατών προσδιόρισε την κυτταροτοξική δράση της κερσετίνης σε κύτταρα κύστης in vitro<sup>47</sup> ενώ επανειλημμένως έχει τονιστεί ότι η κερσετίνη μειώνει την βιωσιμότητα, αναστείλει την ανάπτυξη και επάγει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου  $G_0 / G_1$  και της απόπτωσης στην κυτταρική σειρά T24<sup>47</sup>. Πρόσφατα, αξιολογήθηκε η προ-αποπτωτική δράση της κερσετίνης σε ανθρώπινα λεμφοκυττάρα Jurkat T24 και αποδείκτηκε ότι η δράση της οφείλεται στην άμεση αντιαποπτωτική πρωτεΐνη Bcl-xL<sup>48</sup>. την То αλληλεπίδραση της με πολυφαρμακολογικό προφίλ που παρουσιάζει αποτελεί τη βάση ώστε να αξιολογηθεί ως πιθανό φάρμακο. Ωστόσο, αυτό έχει παρεμποδιστεί λόγω της χαμηλής διαλυτότητας της κερσετίνης στο νερό (έχει υπολογιστεί ότι είναι περίπου 1 μg/mL, ενώ η διαλυτότητα της αυξάνεται σε 5.5 μg/mL σε προσομοιωμένο γαστρικό υγρό και 28.9 μg/mL σε προσομοιωμένο εντερικό υγρό)<sup>49</sup>, καθώς επίσης και λόγω της περιορισμένης βιοδιαθεσιμότητας της, αφού σύμφωνα με νέες μελέτες, μετά τη χορήγηση ραδιοσημασμένης κερσετίνης δια στόματος σε αρσενικούς αρουραίους προσροφήθηκε μόλις το 20%<sup>50</sup>.

Οι κυκλοδεξτρίνες (CD), έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε φαρμακευτικά σκευάσματα για την ενίσχυση της δια του στόματος βιοδιαθεσιμότητας ενώσεων. Η εφαρμογή τους ήταν ιδιαίτερα εμφανής στην περίπτωση των λιπόφιλων φαρμάκων, όπου θα μπορούσε να επιτευχθεί μια βελτίωση του θεραπευτικού τους δείκτη<sup>37</sup>. Μια τέτοια εφαρμογή πραγματοποιήθηκε σε πρόσφατη δημοσιευμένη εργασία της ερευνητικής μας ομάδας για το μόριο της σιλιμπίνης που αποτελεί ένα φυσικό προϊόν<sup>51</sup>. Λόγω της χαμηλής διαλυτότητας και βιοδιαθεσιμότητας της

κερσετίνης, τα σύμπλοκα εγκλεισμού της με κυκλοδεξτρίνες γενικά, και ειδικότερα με την (2-υδροξυπροπυλ) κυκλοδεξτρίνη (2HP-β-CD), έχουν μελετηθεί εκτενώς. Η ερευνητική ομάδα του Liu ήταν η πρώτη που προσδιόρισε την στοιχειομετρία και τις θερμοδυναμικές παράμετρους του συμπλόκου για τη διαδικασία σύμπλεξης χρησιμοποιώντας πειράματα διαλυτότητας και φασμάτων φθορισμού<sup>52</sup>. Ακόμα πραγματοποιήσε πειράματα <sup>1</sup>Η NMR ώστε να προσδιοριστεί η αλληλεπίδραση της κερσετίνης με την 2HP-β-CD. Η αντιοξειδωτική δράση του συμπλόκου εγκλεισμού προσδιορίστηκε με την δέσμευσης της πλέον σταθερής ρίζας DPPH•52. Επιπλέον, μελετήθηκαν οι επιδράσεις της (2-υδροξυπροπυλ) κυκλοδεξτρίνης όσον αφόρα την υδατοδιαλυτότητα της κερσετίνης<sup>53</sup> χρησιμοποιώντας φασματοσκοπική ανάλυση και μοριακή δυναμική προσομοίωσης ώστε να χαρακτηριστεί το σύμπλοκο<sup>53</sup>. Χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία ESR, διευκρινήστηκε την ικανότητα δέσμευσης της κερσετίνης και του συμπλόκου της με την κυκλοδεξτρίνη, από ρίζες DPPH• και galvinoxyl.<sup>54</sup>. Τέλος, η ερευνητική ομάδα του Savic πρόσφατα μελέτησε και χαρακτήρισε το σύμπλοκο της κερσετίνης με την 2HP-β-CD, χρησιμοποιώντας πληθώρα τεχνικών ενώ παράλληλα έδειξε ότι η υδατοδιαλυτότητα του συμπλόκου αυξήθηκε κατά 130 φορές σε σχέση με την κερσετίνη<sup>55</sup>.

Παρά το γεγονός ότι αυτές οι μελέτες επικεντρώθηκαν στις αλληλεπιδράσεις της κερσετίνης με διαφορετικά είδη κυκλοδεξτρίνων, η βιοδραστικότητα απέναντι στα διάφορα είδη καρκίνου παρέμεινε ανεκμετάλλευτη.

Στην ενότητα αυτή είχαμε ως στόχο το χαρακτηρίσμο του συμπλοκου εγκλεισμού της κερσετίνης και με την 2HP-β-CD χρησιμοποιώντας μια σειρά από αναλυτικές τεχνικές που περιλαμβάνουν NMR στερεάς κατάστασης (Solid State NMR, <sup>13</sup>C CP / MAS), φασματοσκοπία διάχυσης (DOSY), φασματοσκοπία υπεριώδους και ορατού (UV-vis) και προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Τέλος, ελέγχθηκε και η αντιπολλαπλασιαστική δραστικότητα του συμπλόκου σε καρκινικά κύτταρα T24 χρησιμοποιώντας την δοκιμασία MTT.



β-D-glycopyranose unit

2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin

**Εικόνα 3.1:** Δομές της κερσετίνης, της β-D-γλυκοπυρανοζικής μονάδος και της (2υδροζυπρόπυλ) β-κυκλοδεζτρίνης.

#### 3.2 Υλικά και Μέθοδοι παρασκευής του συμπλόκου

Για την παρασκευή του συμπλόπου εγκεισμού κερσετίνης με την 2HP-β-CD εφαρμόσθηκε η διαδικασία ξήρανσης διαμέσου ψύξης, μιας μεθόδου που χρησιμοποιείται ώστε να παραλάβουμε το προϊόν μας ως λυοφιλοποιημένη σκόνη<sup>56</sup> απαλλαγμένο από παγιδευμένα μόρια νερού. Πιο συγκεκριμένα, 30 mg κερσετίνης και 306 mg 2HP-β-CD ζυγίστηκαν με ακρίβεια, μεταφέρθηκαν σε ένα ποτήρι 50 mL και εναιωρήθηκαν σε 20 mL νερού. Στη συνέχεια, μικρές ποσότητες υδροξειδίου του αμμωνίου προστέθηκαν υπό συνεχή ανάδευση και παρακολούθηση του pH έως ότου επιτευχθεί πλήρης διάλυτοποίηση της κερσετίνης και το pH αποκτήσει μια τιμή μεταξύ 9 και 10. Το προκύπτον διάλυμα με αναλογία 1:2 λυοφιλοποιήθηκε χρησιμοποιώντας γραμμομοριακή έναν λυοφιλοποιητή Kryodos-50 Telstar.

Ta πειράματα Solid State NMR <sup>13</sup>C CP / MAS διεξήχθησαν στους 310 K σε φασματόμετρο Bruker Avance I 600WB εξοπλισμένο με HX 4 mm ανιχνευτή MAS και χρησιμοποιώντας 12 kHz μαγική γωνία περιστροφής. Για τη αποδιέγερση του πυρήνα <sup>13</sup>C χρησιμοποήθηκε διασταυρούμενη πολώση<sup>57</sup> ενώ κατά τη διάρκεια της ανίχνευσης του <sup>13</sup>C, εφαρμόστηκε πυρηνική αποσύζευξη των πρωτονίων. Τα υπό μελέτη δείγματα αναφέρονται στη φυσική αφθονία του σήματος <sup>13</sup>C της ομάδα CH του αδαμαντανίου που συντονιζεται στα 38.48 ppm.

## Φασματοσκοπία <sup>1</sup>Η-ΝΜR υψηλής ανάλυσης

Τα πειράματα 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα φασματόμετρο Bruker Avance MHz 400 MHz και ένα ανιχνευτή BBI έχοντας ως διαλύτη DMSO-d<sub>6</sub>. Ο χρόνος αποδιέγερσης που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος ορίστηκε 1.5 sec και ο χρόνος ανάμιξης ήταν 400 msec.

#### Μοριακή μοντελοποίηση

Η αρχική δομή για την κερσετίνη λήφθηκε από τη βάση δεδομένων RCSB (PDB ID 1H11)<sup>58</sup>. Η κρυσταλλική δομή της β-CD (CSD κωδικός αναφοράς BUVSEQ02)<sup>59</sup> τροποποιήθηκε στο πρόγραμμα Maestro Suite Schrödinger 2015.2 για την 2HP-β-CD. Το πεδίο OPLS3<sup>60</sup> χρησιμοποιήθηκε για να ελαχιστοποιηθεί η ενέργεια του συμπλόκου κερσετίνης με 2HP-β-CD. Το πρόγραμμα GlideXP, χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα πρόσδεσης<sup>61</sup>, θεωρώντας την 2HP-β-CD ως υποδοχέα και την εκάστοτε πόζα ελέγχθηκε με τη χρήση των δεδομένων που προκύπτουν από τα πειράματα NOE και του NMR στερεάς κατάστασης, καθώς στη συνέχεια, το σύμπλοκο υποβλήθηκε σε προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (Molecular Dynamics MD).

Η προσομοίωση MD πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μονάδας PMEMD από το πακέτο προσομοίωσης AMBER 14<sup>62</sup>. Η γεωμετρία της κερσετίνης

βελτιστοποιήθηκε μέσω του HF / 6-31G\* (Gaussian 09)  $^{63}$ .Το γενικό πεδίο δυνάμεων AMBER (GAFF) χρησιμοποιήθηκε για την λήψη των παραμέτρων του δυναμικού πεδίου για το μόριο της κερσετίνης με τις κατηγορίες RESP<sup>64,65</sup>. Το πεδίο δυνάμεων GLYCAM\_06j-1<sup>66</sup> χρησιμοποιήθηκε για να αντιπροσωπεύσει τη συμπεριφορά του τμήματος κυκλοδεξτρίνης του μορίου του υποδοχέα, ενώ αυτό του GAFF χρησιμοποιήθηκε για τις 2-υδροξυπροπυλ ομάδες. Συνολικά, οι κατηγορίες των RESP υπολογίστηκαν για την 2HP-β-CD. Το σύστημα τοποθετήθηκε σε μοντέλο νερού TIP3P<sup>67</sup>.

Στη συνέχεια τα παρακάτω βήματαπραγματοποιήθηκαν:

1. Ελαχιστοποίηση του συμπλόκου για 5000 βήματα

 Θέρμανση του διαλυμένου συμπλόκου υπό σταθερό όγκο για 100 ps έως τους 300 K με χρήση θερμοστάτη Langevin<sup>68</sup>

3. Η ισορροπία του συστήματος πραγματοποιήθηκε σε δύο βήματα των 100 ps. Δύο ανεξάρτητοι υπολογισμοί MD 400 ns έλαβαν χώρα στους 300 K υπό συνεχή πίεση. Τα ομόλογα που αφορούν τα άτομα υδρογόνου περιορίστηκαν στη απόσταση ισορροπίας τους, χρησιμοποιώντας το λογισμικό SHAKE<sup>69</sup>. Η συχνότητα σύγκρουσης (γ) ορίστηκε σε 2 ps<sup>-1</sup>. Η ανάλυση έγινε με τη cpptraj του λογισμικού AMBER14<sup>70</sup>.

## **MM-PBSA**

Η ενέργεια δέσμευσης μεταξύ της τροποποιημένης κυκλοδεξτρίνης και της κερσετίνης υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την μοριακή μηχανική επιφάνειας Poisson-Boltzmann (MM-PBSA)<sup>71, 72</sup>.

## Φασματοσκοπία διάχυσης NMR (DOSY)

Ένα φασματόμετρο Bruker AV-500 εξοπλισμένο με μια μονάδα παλμικής κλίσης με πεδίο ικανό να παράγει μαγνητικό πεδίο βαθμωτού παλμού στην κατεύθυνση  $\zeta$  53 G cm<sup>-1</sup> χρησιμοποιήθηκε για να καταγράψει τη φασματοσκοπία (DOSY) σε θερμοκρασία δωματίου. διάχυσης NMR Τα δείγματα διαλυτοποιήθηκαν σε 500 ul D<sub>2</sub>O και μεταφέρθηκαν σε σωληνάκια NMR των 5 mm. Το πρόγραμμα Topspin 2.1 χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του συστήματος NMR. O  $\chi$ póvoc  $\lambda$ ńψεως (acquisition time) και ο  $\chi$ póvoc αποδιέγερσης (relaxation delay) ορίστηκαν στα 1.09 sec και 4T1 αντίστοιχα. Οι τιμές T1 προσδιορίστηκαν από την παλμική ακολουθία αντίστροφης-επαναφοράς (inversion-recovery) και υπολογίστηκαν από 2 εώς 3.5 sec. Τα πειράματα DOSY πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της παλμικής ακολουθίας bipolar pulse longitudinal eddy current delay (BPPLED). Πιο συγκεκριμένα καταγράφηκαν 16 φάσματα BPPLED με 16 K σημεία και το eddy current delay (Te) ορίστηκε στα 5 ms. Η διάρκεια πεδίου βαθμωτού παλμού, δg, βελτιστοποιήθηκε προκειμένου να ληφθεί και το 5% υπολειπόμενου σήματος με τη μέγιστη βαθμωτή κλίση πεδίου. Η μεταβολή της βαθμίδωσης παλμού (pulse gradient) από 2 σε 95% της μέγιστης βαθμιδωτής

δύναμης επιτεύχθηκε μέσω μιας γραμμικής ράμπας. Έπειτα από μετασχηματισμό Fourier και διόρθωση της γραμμής βάσης, η επεξεργασία του φάσματος διάχυσης επιτεύχθηκε με το λογισμικό Topspin 2.1

#### Φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους

Τα φάσματα του συμπλόκου της κερσετίνης με 2HP-β-CD και της κερσετίνης (95 μM) καταγράφηκαν σε ένα φασματόμετρο Analytik Jena SPECORD 205 σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα διαλυτοποιήθηκαν σε H<sub>2</sub>O καθαρότητας LC-MS ( pH = 6.8 ) και επωάστηκαν υπό ανακίνηση στους  $37^{\circ}$ C ± 0.1°C στα 600 rpm για κατάλληλη χρονική περίοδο. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 10.000 rpm για 5 λεπτά και η κατακρημνισμένη κερσετίνη διηθήθηκε μέσω φίλτρων μικρής διαμέτρου πόρων.

#### Κυτταρικές καλλιέργειες

Τα καρκινικά κύτταρα κύστης T24 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM που περιείχε 10% FBS και 1% πενικιλίνη / στρεπτομυκίνη και επωάστηκαν στους 37 ° C και με 5% CO<sub>2</sub> για 24 ώρες.

#### Δοκιμασία ΜΤΤ

Τα κύτταρα εμβολιάστηκαν σε πλάκες 96 φρεατίων, πυκνότητας 5000 κύτταρων / φρεάτιο. Την επόμενη ημέρα, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με διάφορες συγκεντρώσεις κερσετίνης και συμπλόκου κερσετίνης 2HP-β-CD (100, 75, 50, 10 μM), για 24 ώρες. Η κερσετίνη και το σύμπλοκο διαλυτοποιήθηκαν σε μίγμα EtOH/DMSO (50:50) και H<sub>2</sub>O Millipore, αντίστοιχα. Κατόπιν, 10 μl διαλύματος MTT προστέθηκαν σε κάθε φρεάτιο και τα δείγματα επωάστηκαν για 3 ώρες. Στο τέλος, χρησιμοποιήθηκε ένα διάλυμα αποτελούμενο από 20% SDS αραιωμένο σε 50:50 N, N-διμεθυλμεθυλαμίδιο και H<sub>2</sub>O, με αποτέλεσμα να τερματιστεί η αντίδραση. Τα δείγματα μετρήθηκαν στα 550 nm χρησιμοποιώντας έναν μετρητή μικροπλακών ELISA στα 650 nm. Τα αποτελέσματα από δύο ανεξάρτητες σειρές πειράματων αφού πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν μαζεύτηκαν, ομαλοποιήθηκαν σύμφωνα με τις τιμές ελέγχου.

## Συνεστιακή Μικροσκοπία (Confocal microscopy)

Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πλάκες 24 φρεατίων (55000 κύτταρα / φρεάτιο). Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα συνεπωάστηκαν με 50 μΜ κερσετίνη (διαλυμένη σε DMSO) και DMSO για 1 ώρα. Στη συνέχεια, τα φρεάτια αυτά ξεπλύθηκαν μια φορά με ρυθμιστικό διάλυμα PBS που περιείχε 3.7% παραφορμαλδεΰδη για 15 λεπτά. Τα κύτταρα ξαναπλύθηκαν με διάλυμα PBS και εξουδετερώθηκαν με 50 mM NH<sub>4</sub>Cl για άλλα 15 λεπτά. Τέλος, οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε γυάλινα πλακίδια με μια σταγόνα Mowiol που περιέχει την χρωστική DABCO (100 mg / ml) και παρατηρήθηκαν με ένα σύστημα SP5 συνεστιακής μικροσκοπίας Leica TCS, χρησιμοποιώντας μήκος κύματος διέγερσης στα 488nm και εκπομπής στα 500-540nm.

## 3.3 Αποτελέσματα και συζήτηση

## 3.3.1 Συνεστιακή μικροσκοπία της κερσετίνης σε καρκινικά κυττάρα κύστης T24

Πριν από την αξιολόγηση της βιοδραστικότητας της κερσετίνης στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ουροδόχου κύστεως T24, αξιολογήσαμε την εσωτερίκευση της στα σχετικά κύτταρα. Για να γίνει αυτό εκμεταλευτήκαμε τις ιδιότητες φθορισμού (488 nm ex / 500-540 nm em) που είχαν περιγραφεί προηγουμένως<sup>73</sup>. Αυτή η μετατόπιση στον φθορισμό της κερσετίνης που προέρχεται από πιθανή αλληλεπίδραση με ενδοκυτταρικούς στόχους θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην συνεστιακή μικροσκοπία για τον εντοπισμό της σε κυτταρικά συστήματα. Όπως φαίνεται και από την Εικόνα 3.2 είναι προφανές ότι η κερσετίνη εισέρχεται στα κύτταρα T24.



**Εικόνα 3.2:** Ανάλυση συνεστιακής μικροσκοπίας καρκινικών κυττάρων ανθρώπινης κύστης T24. Α κύτταρα ελέγχου, Β κύτταρα που επωάζονται με 50 μΜ κερσετίνης για 1h.

## 3.3.2 Μελέτες σταθερότητας μέσω φασματοσκοπίας ορατού υπεριώδους

Στη συνέχεια ερεύνηθηκε τόσο η σταθερότητα της κερσετίνης όσο και του συμπλόκου εγκλεισμού στην ίδια συγκέντρωση (95 μM) σε υδατικό διάλυμα μέσω φασματοσκοπίας ορατού υπεριώδους (UV-vis) με τον χρόνο (Εικόνα 3.4). Το μόριο της κερσετίνης εμφανίζει 2 χαρακτηριστικές μπάντες απορρόφησης στα 258 nm, η οποία προέρχεται από τον δακτύλιο A και στα 370 nm που προέρχεται από τους δακτύλιους B+C που αντιστοιχούν σε π-π\* μεταπτώσεις<sup>74</sup>. Μέσω αυτής της μελέτης, παρατηρήθηκε ταχεία μείωση της απορρόφησης της κερσετίνης που θα μπορούσε ενδεχομένως να αποδοθεί σε συσσωματώματα και καταβύθιση της κερσετίνης γεγονός που θα μπορούσε δυνητικά να μειώσει τη βιοδιαθεσιμότητα της. Αυτό το εμπόδιο υπερνικηθήκε μέσω του εγκλεισμού της κερσετίνης από την 2HP-β-CD της οποίας η σταθερότητα επίσης αξιολογήθηκε (Εικόνα 3.4). Όπως

φαίνεται, μορφοποίηση της κερσετίνης διατηρεί τη σταθερότητα της σε διάλυμα ακόμα και μετά από 240 λεπτά σε αντίθεση με την ελεύθερη κερσετίνη.

## 3.3.3 Βιολογική αξιολόγηση του συμπλόκου εγκλεισμού της κερσετίνης με την 2HP-β-CD σε καρκινικών κυττάρων κύστης T24

Για να διερευνηθεί η κυτταροτοξική δράση τόσο της κερσετίνης,όσο και του υπό μελέτη συμπλόκου πραγματοποιήθηκε ανάλυση MTT σε καρκινικά κύτταρα T24 όπου διαφορετικές συγκεντρώσεις κερσετίνης και συμπλόκου επωάστηκαν για 24 ώρες και βρέθηκε ότι η κυτταροτοξική δράση του συμπλόκου διατήρηθηκε στα ίδια επίπεδα σε σύγκριση την εγγενή κερσετίνη ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3: % Κυτταρική βιωσιμότητα των κυττάρων T24 μετά από την χορήση ελεύθερης κερσετίνης και συμπλοκοποιήμενης κερσετίνης με 2HP-β-CD σε συγκεντρώσεις 10, 50, 75 και 100 μΜ (με μαύρο και γκρι χρώμα αντίστοιχα). Οι μπλε στήλες αντιπροσωπεύουν την επίδραση της EtOH/DMSO (δεξιά) που χρησιμοποιήθηκε για την αραίωση της κερσετίνης και τη συγκέντρωση της 2HP-β-CD (αριστερά) ίση ως προς την συγκέντρώση της 2HP-β-CD που αντιστοιχεί σε σύμπλοκο συγκέντρωσης 100 μΜ κερσετίνης.



**Εικόνα 3.4:** Χρονική εξέλιζη του φάσματος απορρόφησης της κερσετίνης και του συμπλόκου κερσετίνης 2HP-β-CD (95uM) σε υδατικό διάλυμα.

## 3.3.4 Χαρακτηρισμός του συμπλόκου εγκλεισμού κερσετίνης 2HP-β-CD μέσω Φασματοσκοπίας NMR.

Στο δισδιάστατο φάσμα NOESY που ακολουθεί, παρουσιάζεται η αναμενόμενη αλληλεπίδραση των πρωτονίων H5'-H6' που θα μπορούσε να εξηγηθεί λόγω της χωρικής εγγύτητας του συμπλόκου. Η προσεκτική εξέταση των φασμάτων απεικονίζει την αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτονίων H5'-H8 που γίνεται δυνατή μέσω της περιστροφής του δεσμού C1'-C2 (Εικόνα 3.5). Επιπλέον κατά την διάρκεια την συμπλοκοποιήσης της κερσετίνης με την 2HP-β-CD παρατηρήθηκαν αρκετά μεγάλες μεταβολές στο <sup>1</sup>H NMR φάσμα του συμπλόκου. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 οι πιο έντονες αλλαγές παρατηρούνται στο δακτύλιο A ενώ η χημική μετατόπιση είναι εμφανώς λιγότερο έντονη στον δακτύλιο C.

Πίνακας 1: Χημικές μετατοπήσεις <sup>1</sup>Η σε υδατικό διάλυμα της κερσετίνης που παρατηρήθηκαν στο σύμπλοκο με την 2HP-β-CD.

<sup>1</sup> H atoms of QUE	<sup>1</sup> H chemical shifts of QUE (500 MHz)	<sup>1</sup> H chemical shifts of QUE in complex with 2HP-β-CD (500 MHz)
6	6.30	6.12
8	6.60	6.32
2'	7.66	7.70
5'	6.95	7.01
6'	7.58	7.62



**Εικόνα 3.5:** 2D<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY του συμπλόκου κερσετίνης με την 2HP-β-CD.

## 3.3.5 NMR Στερεής κατάστασης

Το <sup>13</sup>C-CP / MAS NMR του συμπλόκου κερσετίνης με την 2HP-β-CD αποκαλύπτει όλες τις αναμενόμενες κορυφές της 2HP-β-CD (Πίνακας 2). Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.6 οι κορυφές που αντιστοιχούν στην 2HP-β-CD είναι μετατοπισμένες λόγω της συμπλοκοποιήσης με την κερσετινή ενώ αντίστοιχα για τον ίδιο λόγο στην περιοχή μεταξύ των 90 έως 175 ppm οι κορυφές της κερσετίνης παρουσιάζονται ευρείες.



**Εικόνα 3.6:** A )<sup>13</sup>C CP/MAS φάσμα του συμπλόκου εγκλεισμού της κερσετίνης με την 2HP-β-CD, B)<sup>13</sup>C CP/MAS φάσμα της 2HP-β-CD.

**Πίνακας 2:** Χημικές μετατοπήσεις <sup>13</sup>C της κερσετίνης μετά την συμπλοκοποίηση με την 2HP- $\beta$ -CD.

C atoms	<sup>13</sup> C-CP-MAS	<sup>13</sup> C-CP-MAS	<sup>13</sup> C-CP-MAS
of QUE	chemical shifts of	chemical shifts of	chemical shifts of

	QUE (75.46 MHz) <sup>75</sup>	QUE (75.5 MHz) <sup>76</sup>	QUE in complex
			with 2HP-β-CD
2	148.5	148.0	nr*
3	135.8	135.3	Nr
4	174.8	174.3	174.0
5	155.5	154.9	155.0
6	96.6	96.1	95.4
7	164.4	163.8	165.1
8	96.5	96.0	90.03
9	157.7	159.1	Nr
10	102.1	101.6	Nr
1′	122.5	125.9	Nr
2′	112.7	112.3	Nr
3'	142.1	142.1	Nr
4′	146.7	146.3	Nr
5 ′	116.3	115.8	115.1
6′	126.5	121.9	Nr

\*\* δεν έχει επιλυθει

Οι συντονισμοί που αποδόθηκαν στην κερσετίνη διευρύνθηκαν σημαντικά σε σχέση με ήδη προαναφερμένα φάσματα της εγγενής κερσετίνης. Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι η κερσετίνη είναι λιγότερο διέταταγμενη και σε πιο άμορφο περιβάλλον, το οποίο συμβαδίζει με το σχηματισμό συμπλόκου εγκλεισμού. Όπως έχει ήδη αναφερθεί για μια παρόμοια μελέτη με την γ-CD<sup>77</sup>, αυτό μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικά κρυσταλλικά πλέγματα της κερσετίνης όπως μεταξύ της διένυδρης και της άνυδρης μορφής κερσετίνης, οι οποίες παρουσιάζονται σε φάσματα <sup>13</sup>C CP / MAS NMR σαν διεύρυνση των κορυφών με την απελευθερώση μορίων νερού από το κρυσταλλικό πλέγμα<sup>75</sup>. Ετσι, η παρατηρούμενη διεύρυνση των κορυφών της κερσετίνης στο φάσμα <sup>13</sup>C του συμπλόκου εγκλεισμού μπορεί να οφείλεται στην απώλεια του δεσμευμένου νερού από το πλέγμα ή αλλαγή στην διαμόρφωση της κερσετίνης σε μια λιγότερο διεταγμένη κατάσταση.

#### 3.3.6 Φασματοσκοπία NMR διάχυσης.

Η φασματοσκοπία NMR διάχυσης (DOSY) είναι μια τεχνική NMR που επιτρέπει τον προσδιορισμό των συντελεστών αυτοδιάχυσης. Αρκετές πληροφορίες μπορεί να εξαχθούν μέσω αυτής της τεχνικής (μέγεθος, σχήμα, και μάζα). Για να επιβεβαιωθεί ο σχηματισμός του συμπλόκου εγκλεισμού της κερσετίνης και της 2HP-β-CD, σε υδατικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία διάχυσης DOSY. Στην Εικόνα 3.7 απεικονίζεται υπέρθεση μιας επιλεγμένης περιοχής του φάσματος DOSY της ελεύθερης 2HP-β-CD, η οποία είναι χρωματισμένη με κόκκινο χρώμα, με την αντίστοιχη περιοχή του φάσματος DOSY του λυοφιλοποιημένου προϊόντος δηλαδή του συμπλόκου κερσετίνης με 2HP-β-CD, χρωματισμένη αντίστοιχα με μαύρο χρώμα. Ο συντελεστής διάχυσης της ελεύθερής 2HP-β-CD βρέθηκε ότι είναι 3.55 x  $10^{-10}$  m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>. Ταυτόχρονα, το σύμπλοκο εγκλεισμού έδειξε μία μείωση στο ρυθμό διάχυσης, σε σχέση με την ελεύθερη 2HP-β-CD, με συντελεστή διάχυσης 3.09 x  $10^{-10}$  m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>, υποδείχνοντας το σχηματισμό του νέου σύμπλοκο (Εικόνα 3.7B). Η σύγκριση των φασμάτων <sup>1</sup>H NMR της ελεύθερης κερσετίνης και του συμπλόκου υποδηλώνει επίσης συμπλοκοποίηση τους όπως σαφώς υποδεικνύεται με την χαρακτηρηστική μετατόπιση των αρωματικών πρωτονίων της κερσετίνης (Εικόνα 3.7A). Τα πρωτόνια με την ισχυρότερη αλληλεπίδραση είναι τα H-6 και H-8 της κερσετίνης αφού είναι και αυτά που επιδεικνύουν την πιο έντονη χημική μετατόπιση.



Εικόνα 3.7: Α) Υπέρθεση του πρωτονιακού φάσματος NMR της ελεύθερης κερσετίνης με κόκκινο χρώμα (5.5mM) και της συμπλοκοποιημένης κερσετίνης με μαύρο χρώμα (3.5 mM) διαλυμένα σε D<sub>2</sub>O που περιείχε 0.78% DMSO-d<sub>6</sub>. B) Επικάλυψη της ίδιας περιοχής του φάσματος DOSY της συμπλοκοποιημένης κερσετίνης (3.5 mM) και της ελεύθερης 2HP-β-CD (3.1 mM). Τα φάσματα λήφθησαν σε D<sub>2</sub>O στους 298 K.

## 3.3.7 Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής

Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.8 η κερσετίνη είναι πολύ σταθερή κατά την διάρκεια ολόκληρης της προσομοίωσης ενώ αντίθετα η κυκλοδεξτρίνη σταθεροποιείται μετά από 75 ns. Κατά τη διάρκεια των 400 ns, που διαρκεί η προσομοιώση, η κερσετίνη τοποθετείται στο εσωτερικό της κοιλότητας της 2HP-β-CD. Η ανάλυση έδειξε ότι η κερσετίνη δεν σχηματίζει σταθερούς δεσμούς υδρογόνου με την συγκεκριμένη κυκλοδεξτρίνη κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης. Αντ 'αυτού, το σύστημα φαίνεται να σταθεροποιείται κυρίως μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.9.



**Εικόνα 3.8:** MD προσομοιώση της 2HPβCD (μπλε χρώμα) και της κερσετίνης (κόκκινο χρώμα)



**Εικόνα 3.9:** Στιγμιότυπα του συμπλόκου κερσετίνης 2HP-β-CD: (A) Μετά από μοριακή πρόσδεση (οι δεσμοί υδρογόνου φαίνονται με μπλε γραμμές), (B) μετά από 100 ns προσομοιώσης, (Γ) μετά από 200 ns προσομοιώσης, (Δ) στο τέλος της προσομοιωσης.

Η μέθοδος MM-PBSA έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για τον υπολογισμό της ενέργειας πρόσδεσης των φαρμάκων στο εσωτερικό της κοιλότητας κυκλοδεξτρίνης<sup>51, 78,79</sup>. Η συνολική ενέργεια πρόσδεσης του συμπλόκου εγκλεισμού για μια πλήρη περιστροφή, βρέθηκε ότι είναι -2.34 kcal / mol (-9.78 kJ/mol), ενώ η ενθαλπία του συστήματος -17.32 kcal/mol. Η ανάλυση που συνοψίζεται στον Πίνακα 3 δείχνει ότι η πρόσδεση ευνοείται ενεργειακά. Ακόμα αποδεικνύεται ότι η πρόσδεση ως επί το πλείστον προκύπτει από αλληλεδράσεις van der Waals, όπως φαίνεται στην περίπτωση της σιλιμπίνης (ένα μόριο δομικά παρόμοιο με την κερσετίνη). Οι σταθερές πρόσδεσης που αναφέρονται στη βιβλιογραφία δείχνουν ότι οι τιμές αυτές είναι συμφώνες με εκείνες που υπολογίστηκαν (Πίνακας 3)<sup>80, 81</sup>. Η ερευνητική ομάδα του  $Liu^{82}$  σε μια θερμοδυναμική μελέτη σχετικά με την συμπλοκοποίηση της κερσετίνης με 2HP-β-CD έδειξε ότι πρόκειται για μια διαδικασία που οφείλεται στην ενθαλπία του συστήματος. Από ανάλυση της φάσης διαλυτότητας που πραγματοποιήθηκαν βρέθηκε ότι ΔG<sub>binding</sub> ήταν της τάξεως των -19.94 kJ/mol. Οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (50 mM, pH = 7.40, με 0.05 M NaCl)<sup>82</sup>. Ανάλογες μετρήσεις διαλυτότητας φάσεων πραγματοποιήθηκαν επίσης από την ερευνητική ομάδα του Zheng σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού οξέος (0.05 M, pH=3) όπου η ενέργεια πρόσδεσης σε αυτή την περίπτωση βρέθηκε να είναι της τάξεως των - 23.00 kJ/mol<sup>83</sup>. O Pralhad και οι συνεργάτες του υπολογίσαν επίσης την ενέργεια πρόσδεσης του συμπλόκου κερσετίνης με 2HP-β-CD σε μη ρυθμισμένο υδατικό μέσο όπου το ΔG<sub>binding</sub> βρέθηκε αυτή τη φορά στα - 15.55 kJ / mol. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 4.<sup>79</sup>.

Energy Component	Average value	$\pm SEM^1$
	(kcal/mol)	
	40.40	0.012
$\Delta E_{ m vdw}$	-40.42	0.013
$\Lambda E$	0 00	0.021
$\Delta L_{ m elec}$	-0.90	0.021
$\Lambda G_{\rm DDD}$	35.01	0.023
20PB	55.01	0.025
$\Delta G_{ m cavity}$	-2.92	0.001
$\Delta E_{ m gas}$	-49.41	0.023
e		
$\Delta G_{ m solv}$	32.09	0.023
$\Delta H = \Delta E_{\text{gas}} + \Delta G_{\text{solv}} \text{ (eq. 2)}$	-17.32	0.015
$T \wedge S$	14.09	0.015
$-1 \Delta S_{\text{total}}$	-14.70	0.015
AG	-7 34	0 015 <sup>2</sup>
Dinding	- <b>4.J</b> t	0.015

Πίκανας 3: Ανάλυση της ελεύθερης ενεργειας δέσμευσης για το σύμπλοκο Que-2HPβ-CD, όπως προέκυψαν από τους υπολογισμούς MM-PBSA.

<sup>1</sup>Πρότυπο σφάλμα της μέσης τιμής (SEM): SEM = Τυπική απόκλιση / √n. Όπου n είναι ο αριθμός των καρέ που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια των υπολογισμών MM-PBSA (20000 καρέ για την εντροπία και 40000 καρέ για οτιδήποτε άλλο).<sup>2</sup> Το συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής.

Πίκανας 4: Ενέργεια δέσμευσης του συμπλόκου της κερσετίνης 2HP-β-CD και σύγκριση με θεωρητικούς υπολογισμούς για τις ενέργειες δέσμευσης για φλαβονοειδή με παρόμοια δομή με την κερσετίνη.

Method of calculation	$\Delta G$ (kJ/mol)
Phase-solubility measurements in phosphate buffer (0.05 M, pH	-23.00
3)	
Phase solubility in Tris–HCl buffer solutions of pH 7.40 <sup>84</sup>	-19.94
Phase solubility in unbuffered solution	-15.55
MMPBSA for hesperetin	-17.86
MMPBSA for silybin	-17.65
MMPBSA calculation for quercetin	-9.78

Σε συμφωνία με τα προαναφερόμενα αποτελέσματα <sup>1</sup>Η NMR από την αντίστοιχη εργασιά του Savic<sup>55</sup> προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

I. τα πρωτόνια CH<sub>3</sub> της ισοπρόπυλομαδας της 2HP-β-CD δεν εμπλέκονται στο σχηματισμό μη-ομοιοπολικών αλληλεπιδράσων

II. το H-3 ως επί το πλείστον εμπλέκεται στη συμπλοκοποίηση.

III. σε όλα τις στιγμιότυπα, ο δακτύλιος Β είναι πάντα μέσα στον υδρόφοβο πυρήνα μεγιστοποιώντας με αυτό τον τρόπο τις van der Waals αλληλεπιδράσεις.

IV. οι δακτύλιοι A και C είναι τοποθετημένοι προς την πολική περιοχή.

ν. μόνο στο στιγμιότυπο Α, ένας δεσμός υδρογόνου παρατηρείται μεταξύ του
 H-3 του δακτυλίου Α και της 2-υδροξυπροπύλομαδας. Ωστόσο, αυτός ο δεσμός
 υδρογόνου είναι στιγμιαίος και δεν παρατηρείται στα υπόλοιπα στιγμιότυπα.

VI. Οι πολικές αλληλεπιδράσεις των δακτυλίων Α και C δεν αντισταθμίζουν τις αλληλεπιδράσεις van der Waals που ασκούνται από δακτύλιο B. Οι δυνάμεις Van der Waals βρέθηκε να είναι η κύρια αλληλεπίδραση μεταξύ επισκέπτη-ξενιστή στην περίπτωση που η εσπερεδίνη συνδέεται με CDs <sup>79</sup>

Ο Zheng και συνεργάτες τυ ανέφεραν αποτελέσματα μοριακής δυναμικής του συμπλόκου εγκλεισμού της κερσετίνης με την β-CD<sup>83</sup>. Η ανάλυση της προσομοίωσης έδειξε ότι οι υδροξυλομάδες της κερσετίνης βρίσκονται εκτός της υδρόφοβής κοιλότητας της β-CD, ενώ ο αρωματικός Β δακτυλίος είναι τοποθετημένος στο εσωτερικό της κοιλότητας. Αυτά τα απολέσματα έρχονται σε συμφωνία με αυτά που λάβαμε για την περίπτωση της 2HP-β-CD<sup>83</sup>.

## 3.4 Συμπεράσματα

Για να ενισχύσουμε το μεγάλο θεραπευτικό δυναμικό που διαθέτει η κερσετίνη, διάφορες μορφοποιήσεις μπορούν να εφαρμοστουν. Τόσο η περιορισμένη διαλυτότητα της εγγενής κερσετίνης στο νερό, όσο η κακή βιοδιαθεσιμότητα, μπορούν να υπερνικηθούν μέσω του σχηματισμού ενός σύνθετου συμπλόκου υποδοχέα ξενιστή με την 2HP-β-CD. Το σύμπλοκο αυτό διερευνήθηκε χρησιμοποιώντας μια σειρά από τεχνικές που περιλαμβάνουν NMR στερεάς κατάστασης, DOSY NMR, φασματοσκοπία υπεριώδους και ορατού καθώς και προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Η βιοδραστικότητα του συμπλόκου αξιολογήθηκε και βρέθηκε ότι μειώνει την κυτταρική βιωσιμότητα των ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης T24. Κεφάλαιο 4 Μελέτες εκλετικής απελευθέρωσης της κερσετίνης από το σύμπλοκο της με την 2HP-β-CD – μελέτες κυκλικής βολταμετρίας του συμπλόκου



## 4.1 Εισαγωγή

Ο σίδηρος είναι ένα μέταλλο ζωτικής σημασίας για τον φυσιολογικό μεταβολισμό κυττάρων ενώ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε διεργασίες, όπως μεταφορά του οξυγόνου, μεταφορά ηλεκτρονίων και σύνθεση του DNA, οι οποίες είναι απαιραίτητες διεργασίες τόσο για την ανάπτυξη των κυττάρων όσο και για τον πολλαπλασιασμό τους. Οι απαιτήσεις του οργανισμού για σιδήρο έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη πολύπλοκων μηχανισμών για τη πρόσληψη, μεταφορά και αποθήκευση αυτού του δυσδιάλυτου μετάλλου μετάπτωσης αφού τα ελεύθερα και τα μερικώς συμπλοκοποιημένα ιόντα σιδήρου μπορούν να συμμετάσχουν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις τύπου Fenton με το υπεροξείδιο του υδρογόνου ή τις λιπιδικές υπεροξειδάσες, παράγοντας ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου ή λιπιδικές ρίζες αντίστοιχα που μπορούν να βλάψουν τους λιπώδεις ιστούς, τις πρωτεϊνες και τα νουκλεϊνικά οξέα.

Η κερσετίνη είναι ένα φλαβονοειδές το οποίο έχει μελετηθεί εκτενώς λόγω του πλούσιου φαρμακακολογικού προφίλ της. Στο δομικό της σκελετό φέρει αρκετές φαινολικές υδροξυλομάδες καθώς επίσης και μια καρβονυλομάδα. Μέσω αυτών των λειτουργικών ομάδων μπορεί να συμπλοκοποιηθεί με διάφορα μεταλλικά ιόντα, και αυτό μπορεί να επιβεβαιωθεί με διάφορες αναλυτικές τεχνικές<sup>85</sup>. Ακόμα, διαθέτει αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς έχει την ικανότητα να δεσμεύει ROS, ενώ η ίδια υφίσταται χημική αποικοδόμηση σε υδατικά διάλυματα όπως φαίνεται

στην Εικόνα 4.1. Αυτή η οξειδωτική διαδικασία αποκοιδόμησης περιλαμβάνει αρκετά σταδία και μπορεί να μελετηθεί μέσω κυκλικής βολταμετρίας<sup>86</sup>.



Εικόνα 4.1: Μηχανισμός οξείδωσης της κερσετίνης

Όπως παρουσιάστηκε ήδη εκτενώς στο προηγούμενο κεφάλαιο, πραγματοποιήθηκαν μελέτες σταθερότητας του συμπλόκου σε βάθος χρόνου όπου παρατηρήσαμε σταδιακή απελευθέρωση της κερσετίνης από την κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης. Έτσι, θελήσαμε να διαπιστώσουμε αν υπάρχει κάποιος μηχανισμός με τον οποίο θα λάμβανε χώρα το φαινόμενο. Δεδομένου ότι αρκετές ερευνικές ομάδες απέδειξαν ότι η κερσετίνη μπορεί να συμπλοκοποιείται με διάφορα μέταλλα μετάπτωσης, αποφασίσαμε να εστιάσουμε την προσοχή μας στα δισθενή και τρισθενή κατιόντα σιδήρου αφού υπερ συσσωρεύονται στα καρκινικά κύτταρα.

## 4.2 Πειραματικό Μέρος

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν μελέτες μέσω φασματοσκοπίας ορατού υπεριώδες (UV-vis), σε δύο διαφορετικές τιμές pH (7.25 και 5.81) διατηρώντας σταθερή την συγκέντρωση του συμπλόκου μας στα 17 uM. Παρατηρήσαμε μείωση της έντασης στην κύρια μπάντα απορρόφησης στα 370 nm, η οποία ήταν άμεσα εξαρτωμένη από την ποσότητα των δισθενων κατιόντων σιδήρου που τιτλοδοτούσαμε. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4.2, είναι εμφανής η εμφάνιση ενός ισοσβεστικού σημείου στα 393 nm καθώς επίσης και μία σημαντική αύξηση στην μπάντα απορρόφησης που εμφανίζεται στα 422 nm, υποδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο τον σχηματισμό ενός νέου συμπλόκου μεταξύ της κερσετίνης και των ιόντων δισθενούς σίδηρου με παρόμοιο τρόπο, όπως προηγουμένως είχε περιγραφεί για το μόριο της εγγενής κερσετίνης το 2007<sup>29</sup>.

Λαμβάνοντας υπόψη, ότι η κύρια μπάντα απορρόφησης του συμπλόκου κερσετίνης με την 2HP-β-CD στα 370 nm προέρχεται αποκλειστικά από το μόριο της κερσετίνης και πιο συγκεκριμένα από το κινναμωμικό σύστημα που εκτίνεται μεταξύ του δακτυλίου B και του C, θα μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο σίδηρος χειλικοποιείται είτε από την ομάδα της κατεχόλης που ανήκει στον δακτυλίου B είτε μεταξύ της καρβονυλομάδας και της 3-OH, που ανήκουν στον δακτύλιο C. Οι υποθέσεις αυτές μπορούν να εδραιωθούν από την πιθανή δομή του συμπλόκου που προτάχθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο.



**Εικόνα 4.2:** Φάσμα απορρόφησης του συμπλόκου κερσετίνης 2HP-β-CD (17 uM) παρουσία διαφορετικών συγκεντώσεων  $Fe^{2+}$  (0, 0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 5.0, 7.5 και 10 ισοδύναμα) σε υδατικό διαλυμα σε pH 7.25 και 5.81 αντίστοιχα).

Παράλληλα με τα πειράματα τιτλοδότησης μέσω φασματοσκοπίας UV-vis, προκειμένου να προσδιορίσουμε την ακριβή θέση στην οποία τα ιόντα σιδήρου συμπλοκοποιούνται με κερσετίνη πραγματοποιήθηκαν μελέτες μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού κάτω από τις ίδιες ακριβώς συνθήκες (Εικόνα 4.3). Με βαθμιαία τιτλοδότηση των ιόντων Fe<sup>2+</sup>, η ένταση του φθορισμού του υπό μελέτη συμπλόκου, όταν διεγείρονταν στα 370 nm, σταδιακά μειώνονταν. Αυτή η μείωση θα μπορούσε να αποδοθεί στην συμπλοκοποίηση του Fe<sup>2+</sup> με την καρβονυλομάδα καθώς λειτουργεί ως δέκτης ηλεκτρονίων και συμμετέχει στο φαινόμενο της διεγερμένης ενδομοριακής μεταφοράς πρωτονίων που είναι υπεύθυνο για τον φθορισμό της κερσετίνης <sup>87</sup>.



**Εικόνα 4.3:** Φάσματα φθορισμού του συμπλόκου κερσετίνης με 2HP-β-CD (17uM) παρουσία διαφορετικών συγκεντώσεων  $Fe^{2+}$  (0, 0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0 και 2.5 ισοδύναμα αντίστοιχα) σε υδατικό διαλυμα σε pH 7.25 και 5.81 αντίστοιχα όταν το σύμπλοκο διεγήρεται στα 370 nm.

Αυτό που παρατηρούμε, τόσο από τα φάσματα απορρόφησης όσο και από τα αντίστοιχα φάσματα φθορίσμου, είναι ότι ο σχηματισμός του συμπλόκου που προκύπτει μεταξύ κερσετίνης και ιόντων Fe<sup>2+</sup> είναι άμεσα συνδεδεμένος με την τιμή του pH που πραγματοποιήθηκαν οι αντίστοιχες τιτλοδοτήσεις. Πιο συγκεκριμένα, σε υψηλές τιμές pH η κερσετίνη βρίσκεται στην αποπρωτονιωμένη της μορφή, ευνοώντας πιο εύκολα με αυτόν τον τρόπο τον σχηματισμό μεταλλικών συμπλοκών.

Όσον αφορά την στοιχειομετρία του συμπλόκου που σχηματίζεται όπως φαίνεται και από τις αντίστοιχες καμπύλες τιτλοδότησης στην Εικόνα 3.4, η κερσετίνη μπορεί και σχηματίζει δύο είδη μεταλλικών συμπλόκων με τα δισθενή κατιόντα σιδήρου αρχικά με γραμμομοριακή αναλογία 2:1 και στην συνέχεια με 1:1.



**Εικόνα 4.4:** Καμπύλες τιτλοδότησης του προκύπτον συμπλόκου στα 422 nm και 421 nm, αντίστοιχα σε pH 7.25 και 5.81 συναρτήσει με την συγκέντωση των ιόντων  $Fe^{2+}$ .

Με παρόμοιο τρόπο μελετήθηκε η πρόσδεση τρισθένων κατιόντων σιδήρου από το σύμπλοκο εγκλεισμού της κερσετίνης με 2HP-β-CD. Με την σταδιακή τιτλοδότηση τρισθενούς σιδήρου σε υδατικό διάλυμα του συμπλόκου παρατηρήθηκαν μεταβολές οι οποιές εμφάνιζαν παρόμοια χαρακτηριστίκα με εκείνα που περιγράφηκαν προηγούμενως για τα δισθενή κατιόντα του σιδήρου δηλαδή αύξηση της μπάντας απορρόφησης στα 422 nm και παρουσία ισοσβεστικού σημείο στα 394 nm στο φάσμα απορρόφησης αλλά και σταδιακή μείωση της έντασης στο φάσμα φθορισμού (Εικόνα 4.4 και 4.5 αντίστοιχα). Κατά την προσθήκη τρισθενούς σιδήρου στο διάλυμα του σύμπλοκου της κερσετίνης με την κυκλοδεξτρίνη παρατηρήθηκε καθίζηση στερεού το οποίο μας ανάγκασε να μελετήσουμε το φαινόμενο της συμπλοκοποίησης και με χρήση φασματοσκοπίας μαγνητικού συντονισμού (<sup>1</sup>H NMR) ώστε να ταυτοποιήσουμε το προκύπτον ίζημα.

Πράγματι, από τα πειράματα που διεξήχθησαν, έχοντας ως διαλύτη  $D_2O$  σε φυσιολογικό pH (7.17) παρατηρήσαμε ότι με την σταδιακή προσθήκη τρισθενών

ιόντων σιδήρου τα πρωτόνια που αντιστοιχούν στην κερσετίνη σταδιακά μετατοπίζονταν σε χαμηλότερα πεδία λόγω συμπλοκοποίησης με τα ιόντα σιδήρου. Όπως φαίνεται και από την Εικόνα 4.7, τα πρωτόνια H-6 και H-8 της κερσετίνης, τα οποία είναι και εκείνα τα οποία έχουν την μεγαλύτερη χημική μετατόπιση λόγω της συμπλοκοποιήσης με την 2HP-β-CD και συνεπώς είναι πιο εκτεθημένα στην υδρόφοβη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης είναι και εκείνα τα οποία μετατοπίζονται περισσότερο και με την σταδιακή προσθήκη τρισθενών ιόντων σιδήρου. Όπως και στην αντίστοιχη τιτλοδότηση που είχε προηγηθεί φασματοσκοπικά μέσω UV-vis και φθορισμό έτσι και στην συγκεκριμένη τιτλοδότηση σχηματίστηκε στερεό το οποίο αφού απομονώθηκε με φυγοκέντρηση αποδείκτηκε ότι είναι ελεύθερη κερσετίνη.



**Εικόνα 4.5:** Φάσματα απορρόφησης του συμπλόκου κερσετίνης με την 2HP- $\beta$ -CD (17uM) παρουσία διαφορετικών συγκεντώσεων  $Fe^{3+}$  (0, 0.25, 0.50, 1.0, 1.5 και 2.0) σε υδατικό διαλυμα σε pH 7.25 και 5.81.



**Εικόνα 4.6:** Φάσματα φθορισμού του συμπλόκου κερσετίνης με την 2HP-β-CD (17uM) παρουσία διαφορετικών συγκεντώσεων  $Fe^{3+}$  (0, 0.25, 0.50, 1.0 και 1.5 ισοδύναμα αντίστοιχα) σε υδατικό διαλυμα σε pH 7.25 και 5.81.



**Εικόνα 4.7:** Υπέρθεση του πρωτονιακού φάσματος της εγγενής κερσετίνης και του συμπλόκου εγκλεισμού της κερσετίνης με την 2HP-β-CD με σταδιακή τιτλοδότηση με  $Fe^{3+}$  A) <sup>1</sup>H NMR φάσμα της εγγενής κερσετίνης σε DMSO-d<sub>6</sub> B) <sup>1</sup>H NMR φάσμα του συμπλόκου εγκλεισμού της κερσετίνης με την 2HP-β-CD (3.8mM) σε D<sub>2</sub>O C) <sup>1</sup>H NMR φάσμα του συμπλόκου εγκλεισμού της κερσετίνης με την 2HP-β-CD (3.8mM) σε D<sub>2</sub>O μετά την προσθήκη 0.25 ισοδυνάμου  $Fe^{3+}$  D) <sup>1</sup>H NMR φάσμα του συμπλόκου εγκλεισμού της κερσετίνης με την 2HP-β-CD (3.8mM) σε D<sub>2</sub>O μετά την προσθήκη 0.25 ισοδυνάμου  $Fe^{3+}$  D) <sup>1</sup>H NMR φάσμα του συμπλόκου εγκλεισμού της κερσετίνης με την 2HP-β-CD (3.8mM) σε D<sub>2</sub>O μετά την προσθήκη 0.50 ισοδυνάμου  $Fe^{3+}$  E) <sup>1</sup>H NMR φάσμα του συμπλόκου εγκλεισμού της κερσετίνης με την 2HP-β-CD (3.8mM) σε D<sub>2</sub>O μετά την προσθήκη 0.50 ισοδυνάμου  $Fe^{3+}$  E) <sup>1</sup>H NMR φάσμα του συμπλόκου εγκλεισμού της κερσετίνης με την 2HP-β-CD (3.8mM) σε D<sub>2</sub>O μετά την προσθήκη 0.50 ισοδυνάμου  $Fe^{3+}$  E) <sup>1</sup>H NMR φάσμα του συμπλόκου εγκλεισμού της κερσετίνης με την 2HP-β-CD (3.8mM) σε D<sub>2</sub>O μετά την προσθήκη 0.50 ισοδυνάμου  $Fe^{3+}$  E) <sup>1</sup>H NMR φάσμα του συμπλόκου εγκλεισμού της κερσετίνης με την 2HP-β-CD (3.8mM) σε D<sub>2</sub>O μετά την προσθήκη 1.0 ισοδυνάμου  $Fe^{3+}$  F) <sup>1</sup>H

Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν παράλληλα με την απελευθέρωση της κερσετίνης από την κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης λαμβάνει χώρα κάποιο άλλο φαινόμενο όπως η δέσμευση των ιόντων σιδήρου από την κυκλοδεξτρίνη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα τιτλοδοτήσης τρισθενών? ιόντων σιδήρου σε υδατικό μέσο χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR. Όπως φαίνεται από την Εικόνα 4.8 με σταδιακή προσθήκη ιόντων σιδήρου τα πρωτόνια που ανήκουν στο μόριο της κυκλοδεξτρίνης μετατοπίζονται σε υψήλότερες τιμές ppm ενώ ταυτόχρονα και η κορυφή του διαλύτη ακολουθεί την ίδια τάση. Έτσι διεξάγαμε το συμπέρασμα ότι ο τρισθενής σίδηρος συμπλοκοποιείται τόσο με την 2HP-β-CD όσο και με τον διαλύτη μας.



**Еіко́va 3.8:** Пеіра́µата тітλобо́тησης µе́σω φаσµатоσкотіаς πυρηνικού µауvηтікоύ συντονισµού της (2-Yδροζυπροπυλο) κυκλοδεζτρίνης:A) επιλεγµе́νη περιοχή του φάσµаτος της 2HP-β-CD (6.9 mM) σε  $D_2OB$ ) επιλεγµе́νη περιοχή του φάσµаτος της 2HP-β-CD (6.9 mM) µετά την προσθήκη 0.50 ισοδυνάµου  $Fe^3$  σε  $D_2OC$ ) επιλεγµе́νη περιοχή του φάσµατος της 2HP-β-CD (6.9 mM) µετά την προσθήκη 1.00 ισοδυνάµου  $Fe^{3+}$  σε  $D_2OD$ ) επιλεγµе́νη περιοχή του φάσµατος της 2HP-β-CD (6.9 mM) σε µετά την προσθήκη 1.50 ισοδυνάµου  $Fe^{3+}$  σε  $D_2OE$ ) επιλεγµе́νη περιοχή του φάσµατος µετά την προσθήκη 2.00 ισοδυνάµων  $Fe^{3+}$  σε  $D_2OF$ ) επιλεγµе́νη περιοχή του φάσµατος µετά την προσθήκη 2.50 ισοδυνάµων  $Fe^{3+}$  σε  $D_2O$ .

Αφού μελετήσαμε την ικανότητα αποδέσμευσης της κερσετίνης από το σύμπλοκο εγκεισμού με την 2HP-β-CD μέσω σχηματισμού συμπλόκων με μέταλλα θελήσαμε να μελετήσουμε το ηλεκτροχημικό προφίλ του συμπλόκου εγκλεισμού της κερσετίνης με 2HP-β-CD μέσω κυκλικής βολταμετρίας.

Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 3.9, τόσο το σύμπλοκο όσο και η εγγενής κερσετίνη παρουσιάζουν τρία κύρια οξειδωτικά κύματα. Το πρώτο οξειδωτικό κύμα που εμφανίζει το σύμπλοκο, ανήκει στις 2 υδροξυλομάδες του μορίου της κερσετίνης που προέρχονται από τον δακτύλιο Β. Στην συνέχεια, η υδροξυλομάδα στη θέση 3 του δακτυλίου C οξειδώνεται παράγωντας το δεύτερο οξειδωτικό κύμα, σε μία μη αναστρέψιμη αντίδραση οξείδωσης. Όπως παρατηρούμε και στην Εικόνα 3.9 η κορυφή αυτή είναι πολύ μικρή καθώς η υδροξυλομαδα μπορεί να σχηματίζει ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με την καρβονυλομάδα που βρίσκεται στη θέση 4 του δακτυλίου C. Το τελευταίο οξειδωτικό κύμα που εμφανίζει τόσο το σύμπλοκο όσο και η εγγενής κερσετίνη προέρχεται από τις υδροξυλομάδες που βρίσκονται στο δακτύλιο A και συμβαίνει σε πολύ υψηλότερα θετικά δυναμικά.

Λαμβάνοντας υπόψην, ότι το πρώτο οξειδωτικό κύμα πρόερχεται αποκλειστικά από την μονάδα της κατεχόλης του δακτυλίου Β, μπορούμε να διεξαγούμε ορισμένα ασφαλή συμπέρασματα όσον αφορά στην δομή του σύμπλοκου. Πιο συγκεκριμένα, ο δακτύλιος B θα πρέπει να είναι τοποθετημένος εκτός της κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης, πράγμα που μπορεί να επιβεβαιώθει και από τα πειράματα τιτλοδότησης με τα ιόντα σιδήρου που προηγήθηκαν ενώ τόσο ο διπλός δεσμός C<sub>2</sub>=C<sub>3</sub> όσο και OH-3 της κερσετίνης θα πρέπει να βρίσκονται μερικώς εκτός της υδρόφοβης κοιλότητας της κυκλοδεξτρίνης.



**Εικόνα 4.9:** Διάγραμμα κυκλικής βολταμετρίας του συμπλόκου εγκλεισμού της κερσετίνης με 2HP-β-CD και της εγγενής κερσετίνης συγκέντρωσης 0.20mM και 0.17mM, αντίστοιχα.

## 4.3 Συμπεράσματα

Με την χρήση διαφόρων αναλυτικών τεχνικών όπως φασματοσκοπίας UV-vis, φθορισμομετρίας και φασματοσκοπίας NMR μελετήσαμε την απελεύθερωση της κερσετίνης από την υδρόφοβη κοιλότητα της κυκλοδεξτρίνης παρουσία ιόντων σιδήρου σε δυο διαφορετικές τιμές pH με ταυτόχρονο σχηματισμό μεταλλικών συμπλόκων με την κερσετίνη. Επίπλεον, μέσω πειραμάτων κυκλικής βολταμετρίας θελήσαμε να μελετήσουμε το ηλεκτροχημικό προφίλ του συμπλόκου μας όπου βρέθηκε ότι έχει ακριβώς ίδια συμπεριφορά με την εγγενή κερσετίνη.

## Κεφάλαιο 5 Ορθολογικός σχεδιασμός προφαρμάκων με βάση τα φλαβονοειδή τα οποία ενεργοποιούνται στο μικροπεριβάλλον καρκινικών κυττάρων

## 5.1 Εισαγωγή

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δύο δεκαετιών, υπήρξε σταθερή βελτίωση των φυσικοχημικών, βιοφαρμακευτικών ή / και των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των φαρμακολογικών δραστικών ενώσεων με εφαρμογή της στρατηγικής των προφαρμάκων. Εκτιμάται, ότι σήμερα περίπου το 10% των φαρμάκων που κυκλοφορούν στην παγκόσμια αγόρα μπορούν να ταξινομηθούν ως προφάρμακα. Ήδη από 2008, το ένα τρίτο όλων των εγκεκριμένων φαρμάκων μικρού μοριακού βάρους ανήκει σε αυτή την κατηγορία. Ο βασικός σκοπός του σχεδιασμού των προφαρμάκων είναι η κάλυψη των ανεπιθύμητων ιδιοτήτων που μπορεί να έχει μία φαρμακευτική ένωση, όπως η χαμηλή υδατοδιαλυτότητα, η χαμηλή εκλεκτικότητα, η χημική αστάθεια καθώς και η τοξικότητα. Γενικά, η λογική πίσω από τη χρήση προφαρμάκων στογεύει στη βελτιστοποίηση ιδιοτήτων όπως είναι η απορρόφηση, η κατανομή, ο μεταβολισμός, η απέκκριση και η ανεπιθύμητη τοξικότητα (δηλαλή των λεγόμενων ADMET) των μητρικών φαρμάκων. Ο όρος προφάρμακο, εισήχθηκε για πρώτη φορά το 1958 και αναφέρεται σε βιολογικά αδρανή παράγωγα φαρμάκων που υφίστανται ενζυματική και / ή χημική μετατροπή in vivo με σκοπό την απελευθέρωση του φαρμακολογικώς δραστικού εγγενή φαρμάκου. Το δραστικό φάρμακο μπορεί να απελευθερωθεί από την ανενεργή του μορφή πριν, κατά τη διάρκεια ή / και μετά την απορρόφηση του προφαρμάκου.

## Κατηγορίες προφαρμάκων

Τα προφάρμακα συνήθως ταξινομούνται σε δύο κύριες κατηγορίες: i) σε φάρμακα που είναι συνδεδεμένα με κάποιον φορέα και ii) σε βιοπρόδρομα φάρμακα που είναι συνδεδεμένα με ορισμένους βιοδείκτες Στην κατηγορία των προφάρμακων που συνδεδεμένα με κάποιον φορέα, το δραστικό φάρμακο είναι προσωρινά συνδεδεμένο με κάποιο φορέα μέσω ομοιοπολικού δεσμού και μόλις βρεθεί στο σώμα υφίσταται βιομετασχηματισμό απευθερώνοντας το δραστικό φάρμακο και τον φορέα. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν επίσης και τα προφάρμακα στα οποία και οι δύο δραστικές ενώσεις ενεργούν η μία ως φορέας της άλλης. Αυτού του είδους τα προφάρμακα έχουν δείξει αυξημένη αποτελεσματικότητα λόγω της συνεργιστικής τους δράσης. Τα προφάρμακα είναι ανενεργές ενώσεις που δεν φέρουν κάποιο φορέα αλλά μετατρέπονται ταχέως στο δραστικό φάρμακο μετά από μεταβολικές αντιδράσεις. Ο κάθε βιοδείκτης αναγνωρίζεται από ένα καθορισμένο υπόστρωμα και έτσι τα προφάρμακα αυτού του τύπου μπορούν να ταξινομηθούν στις παρακάτω κατηγορίες:

## Προφάρμακα που ελευθερώνονται λόγω ROS<sup>88</sup>

Τα προφάρμακα αυτού του τύπου ενεργοποιούνται μέσω ROS και ουσιαστικά αποτελούνται από δυο λειτουργικές μονάδες. Η πρώτη λειτουργική μονάδα είναι μια ένωση η οποία αντιδρά αποκλειστικά παρουσία των ROS ενώ η δεύτερη είναι το ενεργό φάρμακο. Τα δυο κομμάτια που αποτελούν το προφάρμακο θα πρέπει να είναι συνδεδεμένα με τρόπο ώστε η απελεύθωση του φαρμάκου να προκαλεί αύξηση στην κυτταροτοξική ισχύ του φαρμάκου και να γίνεται αποκλειστικά παρουσία ROS. Μια τέτοια κατηγορία τέτοιων ενώσεων αποτελούν τόσο τα άρυλο βορονικά οξέα όσο και οι αντίστοιχοι εστέρες τους που αντιδρούν επιλεκτικά με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σχηματίζοντας ένα ασταθές βορονικό ενδιάμεσο το οποίο υδρολύεται ταχέως απελευθερώντας το ενεργό φάρμακο όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.1.



Εικόνα 5.1 Μηχανισμός εκλεκτικής απελευθέρωσης του φαρμάκου HN<sub>2</sub> μέσω ROS

# Προφάρμακα που ελευθερώνονται μέσω διάσπασης δισουλφιδικού δεσμού από την γλουταθειόνη.<sup>89</sup>

Ο δισουλφιδικός δεσμός είναι μια λειτουργική ομάδα η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε βιολογικές λειτουργίες όπως είναι η δομή των πρωτείνων. Ο δεσμός αυτός μπορεί εύκολα να διασπασεί στον εξωκυττάριο χώρο κυρίως λόγω της αφθονίας των κυτταρικών ελεύθερων θειολών, συμπεριλαμβανομένης της γλουταθειόνης (GSH). Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της GSH είναι πολύ υψηλότερη στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά κύτταρα. Η διαφορά αυτή, είναι πολύ σημαντική για την ανάπτυξη νέων συστημάτων χορήγησης αντικαρκινικών φαρμάκων. Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση, το ενεργό φάρμακο συνδέεται μέσω ενός συνδέτη ο οποίος φέρει ένα δισουλφιδικό δεσμό και μέσω της διάσπασης του απελευθερώνεται το ενεργό φάρμακο. Ταυτόχρονα με το φάρμακο, ο συνδέτης μπορεί να φέρει και ένα μόριο φορέα όπως για παράδειγμα ένα πεπτίδιο ή ακόμα και μια χρωμοφόρα ένωση (Εικόνα 5.2).



**Εικόνα 5.2:** Μηχανισμός εκλεκτικής απελευθέρωσης της καμπτοθεκίνης μέσω διάσπασης δισουλφικού δεσμόυ από τη GSH<sup>89</sup>.

## Προφάρμακα που ελευθερώνονται μέσω δράσης ενζύμων.

Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο μπορει γίνει η εκλεκτική απελευθέρωση του ενεργού φαρμάκου είναι μέσω ορισμένων ενζύμων τα οποία υπερεκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά και εντοπίζονται είτε ενδοκυττάρια είτε εξωκυττάρια<sup>90</sup>. Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν συγκεκριμένα υποστρώματα και με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ο σωστός σχεδιασμός προφαρμάκων. Μία αντιπροσωπευτική κατηγορία αυτών των ενζύμων είναι:

Αλκαλική Φωσφατάση (Alkaline Phosphatase ALP): Η αλκαλική φωσφατάση αποτελεί μέλος μιας οικογένειας μεταλλοπρωτεϊνών, οι οποίες μπορούν να καταλύσουν αντιδράσεις υδρόλυσης φωσφομονοεστέρα. Τα αυξημένα επίπεδα της ALP έχουν συνδεθεί άμεσα με εμφάνιση διάφορων μορφών καρκίνου και κυρίως καρκίνου του μαστού. Με βάση τον μηχανισμό δράσης της ALP έχουν σχεδιαστεί αρκετά προφάρμακα τα οποία εμφανίζουν αυξημένη υδατοδιαλυτότητα σε σχέση με τις μητρικές τους ενώσεις ενώ ελευθερώνονται αποκλειστικά στα καρκινικά κύτταρα (Εικόνα 5.3).



**Εικόνα 5.3:** Σχηματική αναπαράσταση της απελευθέρωσης του προφαρμάκου Lusedra από την αλκαλική φωσφατάση<sup>91</sup>.

Νιτροαναγωγάση (NTR): Ένα χαρακτηρικό των συμπαγών καρκινικών όγκων αποτελεί η κατάσταση της υποξίας όπου η συγκέντρωση σε οξυγόνο είναι περίπου 4% ενώ τοπικά μπορεί να μειωθεί ακόμα και σε 0%. Επιπλεόν, στα καρκινικά κύτταρα που εμφανίζουν υποξία σε αντίθεση με τα φυσιολογικά έχει παρατηρηθεί αυξημένη συγκέντρωση αναγωγικών ενζύμων όπως είναι η αζοαναγωγάση καθώς και νιτροαναγώγαση (NTR)<sup>92</sup>. Η τελευταία αντιπροσωπευεί μια οικόγενεια ενζύμων που ανάγουν αρωματικές νιτροομάδες στις αντίστοιχες αμινομάδες σε μια διαδικασία που περιλαμβάνει 4 σταδία όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5.4. Λόγω του μηχανισμού δράσης αυτού του ενζύμου αρκετά προφάρμακα και διαγνωστικές ενώσεις έχουν σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο ώστε μέσω της αναγωγής της νιτροομάδος να επιτυγχάνεται η εκλεκτική απελευθέρωση του ενεργού φαρμάκου στα καρκινικά κύτταρα<sup>92-94</sup> (Εικόνα 5.4).



**Εικόνα 5.4:** Μηχανισμός της σταδιακής αναγωγής της αρωματικής νιτροομάδός στην αντίστοιχη αμινομάδα<sup>95</sup>

## Συνδέτες και μηχανισμοί απελευθέρωσης της δραστικής ένωσης από το προφάρμακο

Προκειμένου, να πραγματοποιηθεί πιο εύκολα και πιο γρήγορα η απελευθέρωση των φαρμάκων είναι η ύπαρξη κατάλληλων υποστρώματων με βάση τα οποία θα μπορούσε να λάβει χώρα 1,4 ή 1,6 απόσπαση<sup>96</sup>. Η λειτουργική ομάδα που αναγνωρίζεται από τον επιθυμιτό βιοδείκτη, υποκαθιστά συνήθως την φαινολική υδροξυλομάδα ή την αμινομάδα μιας 4-υδρόξυ ή 4-άμινο βενζυλικής αλκοόλης αντίστοιχα, ενώ το φάρμακό μπορεί να είναι συνδεδεμένο σε αυτό το υπόστρωμα είτε μέσω ανθρακικού είτε μέσω αιθερικού δεσμού<sup>97</sup>. Μόλις αυτή η λειτουργική ομάδα αναγνωστεί από τον κατάλληλο βιοδείκτη γίνεται η διάσπαση του δεσμού και στην συνέχεια μέσω δομών συντονισμού γίνεται η απελευθέρωση του φαρμάκου όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5.5.



**Εικόνα 5.5:** Σχηματική αναπαράσταση της απελευθέρωσης του φαρμάκου μέσω 1,6 απόσπασης (A, 1,4 απόσπασης (B) αλλά και συνδυασμό των δύο μεθόδων (C)<sup>97</sup>.

## Αλκαλική φωσφατάση (ALP)

Η ALP ανήκει στην οικογένεια των υδρολασών οι οποίες έχουν σαν υποστρώματα τις φωσφορικές ομάδες και έχει βέλτιστη λειτουργία στο pH 9. Το ένζυμο αυτό, υδρολύει σχεδόν κάθε φωσφομονοεστέρα ελεθευρώνοντας φωσφορικό οξύ και την αντίστοιχη αλκοόλη. Ταυτόχρονα, εκτός από αυτη τη
λειτουργεία, το ένζυμο μπορεί να καταλύσει και αντιδράσεις μεταφωσφορυλύωσης, οι οποίες όμως συμβαίνουν σε υψηλές συγκεντρώσεις της φωσφορικής ομάδας.

Δομικά, η αλκαλική φωσφατάση είναι ένα ομοδιμερικό ένζυμο που το μέγεθος του ξεπερνά τα 160 kDa και στο ενεργό της κέντρο περιέχονται δυο ιόντα ψευδαργύρου και ένα ιόν μαγνησίου τα οποία είναι απαραίτητα για την καταλυτική δράση του ενζύμου. Τα κατάλοιπα των αμινοξέων τα οποία είναι απαιραίτητα για τη διαδικασία της αποφωσφορυλίωσης είναι η Ser<sup>102</sup>, η Arg<sup>166</sup>, το Asp<sup>327</sup> και η His<sup>412</sup> όπως φαίνονται στην Εικόνα 5.6 για την περίπτωση του 3-νιτροβενζυλο φωσφορικού οξέος.



**Εικόνα 5.6:** Μηχανισμός υδρόλυσης του 3-νιτροβενζυλο φωσφορικού οξέος από την ALP<sup>98</sup>.

Το ήμισυ της επιφάνειας του ενζύμου αντιστοιχεί σε τρεις περιοχές αναγνώρισης, οι οποίες υπάρχουν αποκλειστικά στα θηλαστικά. Η πρώτη περιοχή είναι μια μακριά N-τερματική α-έλικα που σχηματίζει ένα βραχίονα που αγκαλιάζει το άλλο μονομερές, η δεύτερη είναι ένας εύκαμπτος βρόχος διεπιφάνειας που σχηματίζεται από την τομή ενός κατάλοιπου 60 αμινοξέων που υπάρχει σε κάθε μονομερές ενώ η τρίτη είναι ένας τομέας δέσμευσης του μετάλλου που περιέχει ένα επιπρόσθετο μεταλλικό ιόν. Αυτή η περιοχή του ενζύμου δεν καταλύει κάποια αντίδραση και μπορεί να καταληφθεί είτε από ένα επιπρόσθετο ιόν μαγνησίου είτε από ιόν ασβεστίου.



**Εικόνα 5.7:** Μοντελοποίηση της ALP όπου τα ιόντα μαγνησίου φαίνονται με πράσινο χρώμα και τα ιόντα ψευδαργύρου με μώβ χρώμα.

## Ναρινγενίνη

Η ναρινγενίνη είναι ένα φυσικό προϊόν το οποίο ανήκει στην οικογένεια των φλαβανονών και συναντάται κυρίως στα εσπεροειδή όπως τα πορτοκάλια. Στην φύση συντίθεται άπο την χαλκόνη της ναριγενίνης μέσω μιας αντίδρασης ισομερίωσης η οποία καταλύεται από το ένζυμο ισομεράση της χαλκόνης. Διαθέται ένα πλούσιο φαρμακολογικό προφίλ, το οποίο περιλαμβάνει αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδή, αντιδιαβητική αλλά και αντικαρκινική δράση. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά την αντικαρκινική δρασή της ναρινγενίνης, νέες μελέτες έδείξαν ότι μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων μέσω μια σειράς μηχανισμών όπως είναι η αναστολή του κυτταρικού κύκλου στα καρκινικά κύτταρα του πλακούντα και αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε ανθρώπινα κύτταρα λευχαιμίας K562<sup>99, 100</sup>.

### Απιγενίνη

Η απιγενίνη είναι φυσικό προϊόν το οποίο ανήκει στην οικογένεια των φλαβονών και απαντάται σε πολλά φρούτα και λαχανικά όπως είναι τα πορτοκάλια, τα κρεμμύδια και το χαμομήλι. Για πολλά χρόνια, η απιγενίνη χορωγούνταν σαν φάρμακο στον κλάδο της παραδοσιακής ιατρικής για αντιμετώπηση ασθενειών όπως το άσθμα, η νόσος του Parkinson και η νευραλγία. Αρκέτα πρόσφατες μελέτες έδειξαν, ότι η απιγενίνη εμφανίζει αρκετά ισχυρή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδή δράση *in vitro* ενώ ταυτόχρονα όλο και περισσότερα στοιχεία από επιδημιολογικές μελέτες και μελέτες ελέγχου δείχνουν ότι η υψηλότερη πρόσληψη της μειώνει τον κίνδυνο χρόνιων παθήσεων συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου<sup>101</sup>. Επιπλέον, δύο ανεξάρτητες μελέτες που πραγματοποιήθαν στην Ελλάδα και στην Ιταλία απέδειξαν ότι η πρόσληψη φλαβονειδών είναι αντιστρόφως ανάλογη με πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού<sup>102</sup>. Πιο συγκεκριμένα, για το μόριο της απιγενίνης βρέθηκε ότι διαθέται αντι-πολλαπλασιαστική δράση σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινου καρκίνου του μαστού που εμφάνιζαν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης του HER2 υποδοχέα. Ακόμα, εμφάνισε ισχυρή ανασταλτική δράση σε κύτταρα καρκίνου του μαστού που υπερεκφράζουν τον HER2 αλλά ήταν πολύ λιγότερο αποτελεσματική στην αναστολή ανάπτυξης κυττάρων που εκφράζουν τα βασικά επίπεδα του HER2. Επαγωγή της απόπτωσης παρατηρηθήκε τόσο από δοσοεξαρτώμενα όσο και από χρονικά εξαρτώμενα πειράματα μετά από χορήγωση απιγενίνης<sup>103, 104</sup>.

### Περιορισμοί στην χορήση της ναριγενίνης και απιγενίνης

Δυστυχώς, παρά την σπουδαία βιολογική δράση που εμφανίζουν τόσο η ναρινγενίνη όσο και η απιγενίνη στην εγγενή τους μορφή, είναι αρκετά δυσδιαλυτές τόσο σε υδατικούς όσο και σε οργανικούς διαλύτες, περιορίζοντας με αυτό τον τρόπο την χορήγηση τους. Στη φύση, απαντόνται κυρίως είτε με την μορφή των γλυκοζιτών είτε με εκείνη των ακυλιώμενων αναλογών τους, τα οποία εμφανίζουν σαφώς αυξημένη διαλυτότητα σε σχέση με τις μητρικές ένωσεις όμως είναι αρκετά ασταθείς ειδικά σε όξινες συνθήκες και έτσι η απορρόφηση τους είναι φτωχή. Για τον λόγο, αυτό θεωρήθηκε ανάγκή σύνθεσης νέων αναλόγων τα οποία θα αύξαναν την διαλυτότητας τους αλλά ταυτόχρονα θα ήταν σε θέση να απελευθέρωσουν τις εγγενείς ένωσεις αποκλειστικά στα καρκινικά κύτταρα.



**Εικόνα 5.8:** Σχηματική απεικόνη του μηχανισμού απελευθέρωσης των προφαρμάκων από την ALP.

#### 5.2 Σύνθεση και χαρακτηρισμός

Περιληπτικά, κατά το πρώτο βήμα της σύνθεσης των φωσφορικών αναλόγων πραγματοποιήθηκε αντίδραση υποκατάστασης στη φαινολική υδροξυλομάδα της 4υδρόξυβενζαλδεύδης με το χλωροφωσφορικό διαιθυλεστέρα, ομάδα που λειτούργει ως πρόδρομη ένωση για το υπόστρωμα το οποίο αναγνωρίζεται από την ALP. Στο επόμενο βήμα, έγινε αναγωγή της αλδευδομάδος με χρήση του αναγωγικού αντιδραστηρίου βοροϋδρίδιου του νατρίου όπου απομονώσαμε την ένωση 2. Ακολούθησε βρωμίωση της ένωσης 2 με τριβρωμιούχο φωσφόρο και σύζευξη μέσω αιθερικού δεσμού με το εκάστοτε φλαβανοειδές όπου λάβαμε τις ενώσεις 4 και 6. Απαραίτητη προϋπόθεση όμως για να μπορέσουν τα προφάρμακα μας να αναγνώριστουν από το ενεργό κέντρο του ενζύμου δηλαδή της αλκαλικής φωσφατάσης και να ελευθερώσουν τις δραστικές μας ενώσεις, ήταν η ύπαρξη στον σκελετό τους της φωσφορίκης ομάδας. Για αυτό τον λόγο, στο τελευταίο στάδιο της συνθετικής μας πορείας πραγματοποιήθηκε υδρόλυση του φωσφοδιεστέρα με ιωδιούχο τριμέθυλοσιλάνιο όπου λάβαμε αντίστοιχα τις ενώσεις 5 και 7.



**Εικόνα 5.9:** Σχηματική αναπαράσταση της συνθετικής πορείας.: (i) Diethylchlorophosphate, pyridine, rt, 4h; (ii) NaBH<sub>4</sub>, EtOH, rt, 1h; (iii) PBr<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 3h (iv) naringenin / apingenin, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> acetone / acetonitrile 14h; (v) Iodotrimethylsilane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 4h / 8h.

#### Σύνθεση της ένωσης 1:

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου, έγινε σταγωνομετρίκη προσθήκη στους 0°C, του χλωροφωσφορικού διαιθυλεστέρα (258mg, 1.5mmol) σε διάλυμα της 4υδροξυβενζαλδεύδης (122mg, 1mmol) σε 2mL ξηρής πυριδίνης και η αντίδραση αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 3.5 ώρες. Αφού απομακρύνθηκε ο διαλυτής της αντίδρασης υπό υψηλή πίεση προστέθηκε στο μίγμα νερό (8ml) και ακολούθησε εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc). Οι οργανικές φάσεις συλλέχθηκαν, εκπλύθηκαν με νερό και brine, ξηράθηκαν με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και συμπυκνώθηκαν με εξάτμιση υπό υψηλή πίεση όπου λάβαμε την ένωση 1 ως κίτρινο λάδι (190mg, 74%) η οποία χρησιμοποιήθηκε χωρίς περεταίρω καθαρισμό.

### Σύνθεση της ένωσης 2:

Σε διάλυμα της ένωσης 1 (258mg, 1mmol) σε 5mL απόλυτης αιθανόλης, πραγματοποιήθηκε σταδιακή προσθήκη του αναγωγικού αντιδραστηρίου βοροϋδρίδιου του νατρίου (49.2mg, 1.3mmol) ενώ το διάλυμα βρίσκονταν σε παγόλουτρο. Το προκύπτον αιώρημα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30' και ακολούθησε προσθήκη 2mL H<sub>2</sub>O ώστε να εξουδετερωθεί η μικρή περίσσεια του αναγωγικού μέσου. Στη συνέχεια, ο διαλύτης της αντίδρασης απομακρύνθηκε υπό υψηλή πίεση και η ένωση 2 καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : Ακετόνη 5:1) όπου λάβαμε την επιθυμητή ένωση 2 σαν υποκίτρινο λάδι (231mg, 88.4%).

Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης 2 μέσω φασματοσκοπίας NMR και φασματομετρίας μάζης:

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.33 (d, J = 8.32 Hz, 2H, H-4), 7.21 (d, J = 8.32 Hz, 2H, H-3), 4.66 (s, 2H, H-1), 4.27-4.16 (m, 4H, H-6), 1.35 (t, J = 7.08, 6H, H-7)

<sup>13</sup>C NMR (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 150.2 (C-5), 137.8 (C-2),128.51 (C-3) 120.1 (C-4), 64.7 (C-6,C1)), 16.2 (C-7).

**MS** (**HRMS**):  $m/z = 261.1 [M+H]^+$ , 278.1  $[M+NH_4]^+$ , 282.9  $[M+Na]^+$ , 298.9  $[M+K]^+$ , 521.2  $[2M+H]^+$ .



**Εικόνα 5.10:** Φάσμα <sup>1</sup>Η NMR (400 MHz, CDCl3) της ένωσης **2**.



**Εικόνα 5.11:** Φάσμα <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) της ένωσης **2**.



**Eikóva 5.12:** HRMS φάσμα της ένωσης 2 για m/z 261.1 που αντιστοιχεί στη μάζα  $[M+H]^+$ , m/z 278.1 που αντιστοιχεί σε  $[M+NH_4]^+$ , m/z 282.9 που αντιστοιχεί σε  $[M+Na]^+$ , 299.04 που αντιστοιχεί σε  $[M+K]^+$  και τέλος m/z 521.16 που αντιστοιχεί σε  $[2M+H]^+$ .

#### Σύνθεση της ένωσης 3:

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου, πραγματοποιήθηκε σταγωνομετρίκη προσθήκη στους 0°C, του τριβρωμιούχου φωσφόρου (115.15mg, 0.426mmol) σε διάλυμα της ένωσης 2 (100 mg, 0.387mmol) σε 10mL ξηρού διχλωρομεθανίου και η αντίδραση αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης προστέθηκε στο μίγμα νερό (25mL) και ακολούθησε εκχύλιση. Συλλέχθηκαν οι οργανικές φάσεις, εκπλύθηκαν με νερό και brine, ξηράθηκαν με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και συμπυκνώθηκαν με εξάτμιση υπό υψηλή πίεση όπου λάβαμε την ένωση 3 ως κίτρινο λάδι (114mg, 89%).

Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης 2 μέσω φασματοσκοπίας NMR

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.36 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-4), 7.21 (d, J = 8.4 Hz, 2H, H-3), 4.47 (s, 2H, H-1), 4.27-4.16 (m, 4H, H-6), 1.35 (t, J = 7.08, 6H, H-7).

<sup>13</sup>**C NMR** (100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 151.0 (C-5), 134.80 (C-2), 130.8(C-3), 120.63 (C-4), 65.04 (C-6), 32.97 (C-1), 16.42 (C-7).



**Εικόνα 5.13:** Φάσμα <sup>1</sup>Η NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) της ένωσης 3.



**Εικόνα 5.14:** Φάσμα <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) της ένωσης 3.

## Σύνθεση της ένωσης 4:

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου, έγινε σταγωνομετρίκη προσθήκη της ένωσης 3 (40 mg, 0.124mmol) σε διάλυμα ναριγενίνης (33.71 mg, 0.124mmol) και άνυδρου ανθρακικού καλίου (68.45 mg, 0.495 mmol) σε 10 mL ξηρής ακετόνης και το μίγμα της αντίδρασης θερμάνθηκε μέχρι βρασμού με κάθετο ψυχτήρα για 14 ώρες. Αφού η αντίδραση ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, το μίγμα της αντίδρασης διήθηκε και αφού ο διαλύτης συμπυκνώθηκε υπό υψηλή πίεση, το δείγμα υποβλήθηκε σε καθαρισμό με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (νερό / ακετονιτρίλιο 65:35-10:90) όπου λάβαμε την επιθυμιτή ένωση 4 σαν λευκό στερεό (25mg, 39.3%).

Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης 4 μέσω φασματοσκοπίας NMR και φασματομετρίας μάζης:

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 12.09 (s, 1H, H-17), 9.65 (s, 1H, H-22), 7.42 (d, 2H, 1.6 Hz, 8.5 Hz, H-4), 7.32 (d, 2H, 8.6 Hz, H-19), 7.22 (d, 2H, 7.8 Hz, H-3), 6.79 (d, 2H, 8.5 Hz, H-20), 6.15 (m, 2H, H-9, H-10), 5.45 (dd, 1H, 2.8 Hz, H-15), 5.15 (s, 2H, H-1), 4.15(m, 4H, H-6), 3.33 (dd, 1H, 12.78 Hz, 4.4 Hz, H-14), 2.71 (dd, 1H, 14 Hz, 3.1 Hz, H-14), 1.25 (ddd, 6H, H-7).

<sup>13</sup>C NMR (100MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 197.02 (C-13), 166.27 (C-11), 163.14 (C-8), 162.87 (C-16), 157.7(C-21), 150.07(d) (C-5), 133.02 (C-18), 129.53 (C-3, C-2), 128.65(C-7), 128.41 (C-19), 120.2 (C-4), 115.16 (C-20), 102.74 (C-12), 95.44 (C-10), 94.51 (C-9), 78.64 (C-15), 69.07 (C-1), 64.32(d) (C-6), 42.01 (C-14), 15.89(d) (C-7).

**MS** (**HRMS**): m/z = 514.1,  $[M/2-2H]^{-} = 255.23$ ,  $[M-H]^{-} = 513.13$ ,  $[M+C1]^{-} = 513.13$  $549.1^+$ ,  $[2M-H]^- = 1027.26$ .



**Εικόνα 5.15:** Φάσμα <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) της ένωσης 4.



**Εικόνα 5.16:** Φάσμα <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) της ένωσης 4 μετά την προσθήκη 20ul  $D_2O$ .



**Εικόνα 5.17:** Φάσμα  ${}^{13}C$  NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) της ένωσης **4**.



**Εικόνα 5.18:** HRMS φάσμα της ένωσης 4 για m/z 513.13 που αντιστοιχεί στη μάζα [M-H], m/z 549.1 που αντιστοιχεί στη μάζα [M-Cl] και m/z 1027.26 που αντιστοιχεί σε [2M-1].

#### Σύνθεση της ένωσης 6:

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου, έγινε σταγονομετρίκη προσθήκη της ένωσης 3 (40 mg, 0.124mmol) σε διάλυμα απιγενίνης (134 mg, 0.494mmol) και άνυδρου ανθρακικού καλίου (34.2 mg, 0.248 mmol) σε 10 mL ξηρού ακετονιτρίλιου και το

μίγμα της αντίδρασης θερμάνθηκε μέχρι βρασμού με κάθετο ψυχτήρα για 14 ώρες. Αφού η αντίδραση ψύχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, το μίγμα της αντίδρασης διήθηκε. Αφού ο διαλύτης συμπυκνώθηκε υπό υψηλή πίεση, το δείγμα υποβλήθηκε σε καθαρισμό με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (νερό / ακετονιτρίλιο 65:35 - 10:90) όπου λάβαμε την ένωση 6 ως μίγμα τοποϊσομερών σε αναλογία 85:15 αντίστοιχα σαν κίτρινο στερεό (17mg, 27%).

Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης 6 μέσω φασματοσκοπίας NMR:

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 12.97 (br, 1H, H-17), 10.40 (br, 1H, H-22), 7.97 (d, 1H, 16Hz, H-19), 7.52 (d, 2H, 8.6 Hz, H-4), 7.25 (d, 2H, 8.6 Hz, H-3), 6.94 (d, 2H, 8.4Hz, H-10 / H-14), 6.84 (d, 2H, 8.6 Hz, H-20), 6.47 (d, 1H, 2 Hz, H-9), 5.22 (s, 2H, H-1), 4.15 (m, 4H, H-6), 1.27(ddd, 6H, H-7).

<sup>13</sup>**C NMR** (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 181.94 (C-13), 164.10 (C-8), 164.00 (C-11, C-15), 161.21 (C-16, C-21), 157.16 (C-5), 132.97 (C-2), 129.70 (C-18), 128.95 (C-3), 120.04 (C-4), 115.39 (C-20), 104.81 (C-12), 103.04 (C-14), 98.75 (C-9), 93.79 (C-10), 69.07 (C-1), 64.32 (C-6), 15.91 (C-7).



**Εικόνα 5.20:** Φάσμα<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) της ένωσης 6.



**Εικόνα 5.21:** Φάσμα <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) της ενώσης 6.

#### Σύνθεση της ένωσης 5:

Υπό ατμόσφαιρα αζώτο, έγινε σταγωνομετρίκη προσθήκη του ιωδιούχου τριμεθυλοσιλάνιου (7.78 mg, 0.039 mmol) σε διάλυμα της ένωσης 4 (9.5 mg, 0.0185mmol) σε ξηρό διχλωρομεθάνιο και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε για 4 ώρες. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του διαλύτη υπό υψηλή πίεση και ακολούθησε προσθήκη μεθανόλης (1ml) και επιπλέον ανάδευση της αντίδρασης για επιπλέον 30'. Αφού απομακρύνθηκε ο διαλύτης, το μίγμα της αντίδρασης υποβλήθηκε σε καθαρισμό με υπό υγρή χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (νερό / ακετονιτρίλιο 65:35 - 10:90) όπου λάβαμε την επιθυμιτή ένωση **5** ως λευκό στερεό (6.1 mg, 58.9%).

Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης 5 μέσω φασματοσκοπίας NMR:

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 12.10 OH(s, 1H, H-17), 9.61 (br, 1H, H-22), 7.37 (d, 2H, 1.6 Hz, 8.5 Hz, H-2), 7.16 (d, 2H, 8.45 Hz, H-19), 7.17 (d, 2H, 8Hz, H-3) 6.79 (d, 2H, 8.5 Hz, H-20), 6.15 (m, 2H, H-9, H-10), 5.49 (dd, 1H, 2.8Hz, H-15), 5.10 (s, 2H, H-1), 3.33(dd, 1H, 12.78 Hz, 4.4 Hz, H-14), 2.71(dd, 1H, 14Hz, 3.1Hz, H-14).

<sup>13</sup>C NMR (100MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 197.02 (C-13), 166.37 (C-11), 163.13 (C-8), 162.86 (C16), 157.79 (C-22), 151.85(d) (C-5), 131.22 (C-18), 129.22 (C-3), 128.65 (C-2), 128.43 (C-19), 120.11 (C-4), 115.16 (C-20), 102.68 (C-12), 95.43 (C-10), 94.51 (C-9), 78.62 (C-15), 69.35 (C-1), 41.99 (C-14).



**Εικόνα 5.21:** Φάσμα <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) της ένωσης 5.



**Εικόνα 5.22:** Φάσμα  ${}^{13}C$  NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) της ένωσης 5.

# Σύνθεση της ένωσης 7:

Υπό ατμόσφαιρα αζώτου, έγινε σταγονομετρίκη προσθήκη του ιωδιούχου τριμεθυλοσιλάνιου (53 mg, 0.265 mmol) σε διάλυμα της ενώσης 6 (17 mg, 0.033mmol) σε ξηρό διχλωρομεθάνιο και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύτηκε για 8 ώρες. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση του διαλύτη υπό υψηλή πίεση και ακολούθησε προσθήκη μεθανόλης (2mL) και επιπλέον ανάδευση της

αντίδρασης για επιπλέον 30'. Αφού απομακρύνθηκε ο διαλύτης, το μίγμα της αντίδρασης υποβλήθηκε σε καθαρισμό με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (νερό / ακετονιτρίλιο 65:35 - 10:90) όπου λάβαμε την επιθυμιτή ένωση **7** σαν κίτρινο στερεό (5.1 mg, 41%).

Ακολουθεί ο πλήρης χαρακτηρισμός της ένωσης 7 μέσω φασματοσκοπίας NMR:

<sup>1</sup>**H NMR** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 12.98 OH(s, 1H, H-17), 10.36 (br, 1H, H-22),7.96 (d, 2H, 8.8 Hz, H-19) 7.42 (d, 2H, 8.5 Hz, H-4), 7.20 (d, 2H, 8.45 Hz, H-19), 6.95 (d, 2H, 8.8Hz, H-19, H-14), 6.86 (d, 2H, 8Hz, H-20), 6.44 (d, 1.8Hz, 1H, H-10), 5.18 (s, 2H, H-1).

<sup>13</sup>C NMR (100MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 181.91 (C-13), 164.12 (C-8), 164.07 (C-15, C-11), 161.32 (C-16, C-21), 161.20 (C-16), 157.15 (C-5), 129.30 (C-19), 128.55 (C-2, C-3), 121.02 (C-18), 120.11 (C-4), 115.98 (C-20), 104.74 (C-12), 103.02 (C-14), 98.56 (C-10), 93.47 (C-9), 69.65 (C-1).



**Εικόνα 5.23:** Φάσμα<sup>1</sup> H NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) της ένωσης 7.



**Εικόνα 5.24:** Φάσμα <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) της ένωσης 7.

# 5.3 Βιολογική αξιολόγηση

Η βιολογική αξιολόγηση των προφαρμάκων 5 και 7 που συνθέσαμε είναι υπό εξέλιξη από την ερευνητική ομάδα του Andrea Babič του Πανεπιστήμιου της Γενεύης.

# Περίληψη

Τα φυσικά προϊόντα και τα παράγωγα τους ήδη από τα αρχαία χρόνια χρησιμοποιούνταν από την παραδοσιακή Ιατρική για την αντιμετώση πολλών ασθενείων. Τα φλαβονοειδή, ως σημαντικό μέλος της μεγάλης οικογένειας των φυσικών προϊόντων, διαθέτουν πλούσιο φαρμακολογικό προφίλ που περιλαμβάνει αντιοξειδώτικές, αντιϊκές καθώς και αντικαρκινικές ιδιότητες.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακης διατριβής είναι η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και η βιολογική αξιολόγιση τροποποιημένων αναλόγων των φλαβονοειδών με σκοπό την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητα τους.

Αρχικά μελετήθηκε, το σύμπλοκο εκλεισμού της κερσετίνης με την 2HP-β-CD χρησιμοποιώντας μια σειρά από τεχνικές που περιλαμβάνουν NMR στερεάς κατάστασης, DOSY NMR, φασματοσκοπία υπεριώδους και ορατού καθώς και προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. Η βιοδραστικότητα του συμπλόκου αξιολογήθηκε και βρέθηκε ότι μειώνει την κυτταρική βιωσιμότητα των ανθρωπίνων καρκινικών κυττάρων ουροδόχου κύστης T24.

Στην συνέχεια, μελετήθηκε φασματοσκοπίκα η ικανότητα αποδέσμευσης της κερσετίνης από την κοιλότητα της 2HP-β-CD παρούσια κατιόντων σιδήρου σε δυο διαφορετικές τιμές pH, όπου παρατηρήθηκε ο σχηματισμός μεταλλικών συμπλόκων μεταξύ της κερσετίνης και των ιόντων σιδήρου. Ακόμα, πραγματοποιήθηκαν μελέτες κυκλικής βολταμετρίας όπου το σύμπλοκο εκλεισμού και η εγγενής κερσετίνη έδειξαν ίδίο οξειδωτικό προφίλ.

Τέλος, συνθέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν δύο νέα φωσφορικά ανάλογα της ναρινγενίνης και απιγενίνης με σκόπο την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας και την εκλεκτική απελεύθερωσης τους αποκλειστικά στα καρκινίκα κύτταρα από το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση.

## Abstract

Natural products and their derivatives since ancient times have been used by traditional medicine to deal with many diseases. Flavonoids, as an important member of the large family of natural products, possess a rich pharmacological profile including antioxidant, antiviral and anti-tumor properties.

The purpose of this postgraduate dissertation is the synthesis, characterization and biological evaluation of modified analogues based on flavonoids in order to increase their bioavailability.

Initially, quercetin-2HP- $\beta$ -CD host-guest complex was studied using a series of analytical techniques including solid state NMR, DOSY NMR, UV-vis spectroscopy and molecular dynamics simulations. The bioactivity of the complex was also evaluated and found that it reduces the cell viability of human T24 bladder cancer cells.

Subsequently, the decomplexation of quercetin from the cavity of  $2HP-\beta$ -CD was spectroscopy investigated in presence of iron species at two different pH values, in which the formation of metal complexes between quercetin and iron was observed. In addition, cyclic voltammetry studies were conducted in which the complex and native quercetin showed the same oxidative profile.

Finally, in order to enhance the solubility and the bioavaibility of naringenin and apigenin we synthesized and characterized two prodrugs, trigged by alkaline phosphatase, which will selectively release the native drug, exclusively in cancer cells.

# Βιβλιογραφικές αναφορές:

1. David, B.; Wolfender, J.-L.; Dias, D. A., The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochemistry Reviews* **2015**, 14, 299-315.

2. Newman, D. J.; Cragg, G. M., Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products* **2016**, 79, 629-61.

3. Butler, M. S., The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of natural products* **2004**, 67, 2141-53.

4. Butler, M. S.; Robertson, A. A.; Cooper, M. A., Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Natural product reports* **2014**, 31, 1612-61.

5. Harvey, A. L.; Edrada-Ebel, R.; Quinn, R. J., The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature reviews. Drug discovery* **2015**, 14, 111-29.

6. Tsao, R., Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2010**, 2, 1231-46.

7. Fatland, B. L.; Ke, J.; Anderson, M. D.; Mentzen, W. I.; Cui, L. W.; Allred, C. C.; Johnston, J. L.; Nikolau, B. J.; Wurtele, E. S., Molecular characterization of a heteromeric ATP-citrate lyase that generates cytosolic acetyl-coenzyme A in Arabidopsis. *Plant physiology* **2002**, 130, 740-56.

8. Mouradov, A.; Spangenberg, G., Flavonoids: a metabolic network mediating plants adaptation to their real estate. *Frontiers in plant science* **2014**, 5, 620.

9. Bravo, L., Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews* **1998**, 56, 317-333.

10. Harborne, J. B.; Williams, C. A., Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **2000**, 55, 481-504.

11. Kim, K.-H.; Tsao, R.; Yang, R.; Cui, S. W., Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry* **2006**, 95, 466-473.

12. Chandrasekara, A.; Shahidi, F., Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* **2010**, 58, 6706-14.

13. Tsao, R.; Papadopoulos, Y.; Yang, R.; Young, J. C.; McRae, K., Isoflavone profiles of red clovers and their distribution in different parts harvested at different growing stages. *J Agric Food Chem* **2006**, 54, 5797-805.

14. Mazur, W. M.; Duke, J. A.; Wähälä, K.; Rasku, S.; Adlercreutz, H., Isoflavonoids and Lignans in Legumes: Nutritional and Health Aspects in Humans <sup>1</sup>. *Journal of Nutritional Biochemistry* 9, 193-200.

15. Garazd, M. M.; Garazd, Y. L.; Khilya, V. P., Neoflavones. 1. Natural Distribution and Spectral and Biological Properties. *Chemistry of Natural Compounds* **2003**, 39, 54-121.

16. Tsao, R.; Yang, R.; Young, J. C.; Zhu, H., Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *J Agric Food Chem* **2003**, 51, 6347-53.

17. Zhao, F.; Watanabe, Y.; Nozawa, H.; Daikonnya, A.; Kondo, K.; Kitanaka, S., Prenylflavonoids and phloroglucinol derivatives from hops (Humulus lupulus). *Journal of natural products* **2005**, 68, 43-9.

18. Kawaii, S.; Tomono, Y.; Katase, E.; Ogawa, K.; Yano, M., Quantitation of flavonoid constituents in citrus fruits. *J Agric Food Chem* **1999**, 47, 3565-71.

19. Si, W.; Gong, J.; Tsao, R.; Kalab, M.; Yang, R.; Yin, Y., Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. *Journal of chromatography. A* **2006**, 1125, 204-10.

20. Prior, R. L.; Lazarus, S. A.; Cao, G.; Muccitelli, H.; Hammerstone, J. F., Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (Vaccinium spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Agric Food Chem* **2001**, 49, 1270-6.

21. McCallum, J. L.; Yang, R.; Young, J. C.; Strommer, J. N.; Tsao, R., Improved high performance liquid chromatographic separation of anthocyanin compounds from grapes using a novel mixed-mode ion-exchange reversed-phase column. *Journal of chromatography*. A **2007**, 1148, 38-45.

22. Davis, C. B.; Markey, C. E.; Busch, M. A.; Busch, K. W., Determination of capsaicinoids in habanero peppers by chemometric analysis of UV spectral data. *J Agric Food Chem* **2007**, 55, 5925-33.

23. Bratt, K.; Sunnerheim, K.; Bryngelsson, S.; Fagerlund, A.; Engman, L.; Andersson, R. E.; Dimberg, L. H., Avenanthramides in oats (Avena sativa L.) and structure-antioxidant activity relationships. *J Agric Food Chem* **2003**, 51, 594-600.

24. Trachootham, D.; Alexandre, J.; Huang, P., Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature reviews. Drug discovery* **2009**, 8, 579-91.

25. Heim, K. E.; Tagliaferro, A. R.; Bobilya, D. J., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry* **2002**, 13, 572-584.

26. Amic, D.; Davidovic-Amic, D.; Beslo, D.; Rastija, V.; Lucic, B.; Trinajstic, N., SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Current medicinal chemistry* **2007**, 14, 827-45.

27. Burda, S.; Oleszek, W., Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem* **2001**, 49, 2774-9.

28. Nijveldt, R. J.; van Nood, E.; van Hoorn, D. E.; Boelens, P. G.; van Norren, K.; van Leeuwen, P. A., Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition* **2001**, 74, 418-25.

29. Guo, M.; Perez, C.; Wei, Y.; Rapoza, E.; Su, G.; Bou-Abdallah, F.; Chasteen, N. D., Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects. *Dalton transactions* **2007**, 4951-61.

30. Raza, A.; Xu, X.; Xia, L.; Xia, C.; Tang, J.; Ouyang, Z., Quercetin-Iron Complex: Synthesis, Characterization, Antioxidant, DNA Binding, DNA Cleavage, and Antibacterial Activity Studies. *Journal of fluorescence* **2016**, 26, 2023-2031.

31. Riha, M.; Karlickova, J.; Filipsky, T.; Macakova, K.; Rocha, L.; Bovicelli, P.; Silvestri, I. P.; Saso, L.; Jahodar, L.; Hrdina, R.; Mladenka, P., In vitro evaluation of copper-chelating properties of flavonoids. *RSC Advances* **2014**, 4, 32628-32638.

32. Appel, E. A.; del Barrio, J.; Loh, X. J.; Scherman, O. A., Supramolecular polymeric hydrogels. *Chemical Society reviews* **2012**, 41, 6195-214.

33. Szejtli, J., Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chemical reviews* **1998**, 98, 1743-1754.

34. Yu, G.; Jie, K.; Huang, F., Supramolecular Amphiphiles Based on Host-Guest Molecular Recognition Motifs. *Chemical reviews* **2015**, 115, 7240-303.

35. Albers, E.; Muller, B. W., Cyclodextrin derivatives in pharmaceutics. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* **1995**, 12, 311-37.

36. Crini, G., Review: a history of cyclodextrins. *Chemical reviews* **2014**, 114, 10940-75.

37. Challa, R.; Ahuja, A.; Ali, J.; Khar, R. K., Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. *AAPS PharmSciTech* **2005**, 6, E329-E357.

38. Das, S.; Subuddhi, U., Cyclodextrin Mediated Controlled Release of Naproxen from pH-Sensitive Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogels for Colon Targeted Delivery. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2013**, 52, 14192-14200.

39. Roik, N. V.; Belyakova, L. A., pH-Sensitive Supramolecular Assemblies of  $\beta$ -Cyclodextrin and 2-Aminodiphenylamine in Water Medium: Structure, Solubility and Stability. *Journal of Solution Chemistry* **2016**, 45, 818-830.

40. Liang, J.; Liu, B., ROS-responsive drug delivery systems. *Bioengineering & Translational Medicine* **2016**, 1, 239-251.

41. Salústio, P. J.; Pontes, P.; Conduto, C.; Sanches, I.; Carvalho, C.; Arrais, J.; Marques, H. M. C., Advanced Technologies for Oral Controlled Release: Cyclodextrins for Oral Controlled Release. *AAPS PharmSciTech* **2011**, 12, 1276-1292.

42. D'Andrea, G., Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia* **2015**, 106, 256-271.

43. Zahedi, M.; Ghiasvand, R.; Feizi, A.; Asgari, G.; Darvish, L., Does Quercetin Improve Cardiovascular Risk factors and Inflammatory Biomarkers in Women with Type 2 Diabetes: A Double-blind Randomized Controlled Clinical Trial. *International Journal of Preventive Medicine* **2013**, 4, 777-785.

44. Shaik, Y. B.; Castellani, M. L.; Perrella, A.; Conti, F.; Salini, V.; Tete, S.; Madhappan, B.; Vecchiet, J.; De Lutiis, M. A.; Caraffa, A.; Cerulli, G., Role of quercetin (a natural herbal compound) in allergy and inflammation. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* **2006**, 20, 47-52.

45. Kim, H. P.; Mani, I.; Iversen, L.; Ziboh, V. A., Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guineapigs. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **1998**, 58, 17-24.

46. Nabavi, S. F.; Russo, G. L.; Daglia, M.; Nabavi, S. M., Role of quercetin as an alternative for obesity treatment: You are what you eat! *Food Chemistry* **2015**, 179, 305-310.

47. Ma, L.; Feugang, J. M.; Konarski, P.; Wang, J.; Lu, J.; Fu, S.; Ma, B.; Tian, B.; Zou, C.; Wang, Z. Growth inhibitory effects of quercetin on bladder cancer cell. Front Biosci, 11, 2275-2285, 2006; <u>http://europepmc.org/abstract/MED/16720314</u>

http://dx.doi.org/10.2741/1970 (accessed 2006).

48. Primikyri, A.; Chatziathanasiadou, M. V.; Karali, E.; Kostaras, E.; Mantzaris, M. D.; Hatzimichael, E.; Shin, J. S.; Chi, S. W.; Briasoulis, E.; Kolettas, E.; Gerothanassis, I. P.; Tzakos, A. G., Direct binding of Bcl-2 family proteins by quercetin triggers its pro-apoptotic activity. *ACS chemical biology* **2014**, 9, 2737-41.

49. Cai, X.; Fang, Z.; Dou, J.; Yu, A.; Zhai, G., Bioavailability of quercetin: problems and promises. *Current medicinal chemistry* **2013**, 20, 2572-82.

50. Chen, X.; Yin, O. Q. P.; Zuo, Z.; Chow, M. S. S., Pharmacokinetics and Modeling of Quercetin and Metabolites. *Pharmaceutical Research* **2005**, 22, 892-901.

51. Kellici, T. F.; Ntountaniotis, D.; Leonis, G.; Chatziathanasiadou, M.; Chatzikonstantinou, A. V.; Becker-Baldus, J.; Glaubitz, C.; Tzakos, A. G.; Viras, K.; Chatzigeorgiou, P.; Tzimas, S.; Kefala, E.; Valsami, G.; Archontaki, H.; Papadopoulos, M. G.; Mavromoustakos, T., Investigation of the interactions of silibinin with 2-hydroxypropylbeta-cyclodextrin through biophysical techniques and computational methods. *Molecular pharmaceutics* **2015**, 12, 954-65.

52. Liu, M.; Dong, L.; Chen, A.; Zheng, Y.; Sun, D.; Wang, X.; Wang, B., Inclusion complexes of quercetin with three  $\beta$ -cyclodextrins derivatives at physiological pH: Spectroscopic study and antioxidant activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2013**, 115, 854-860.

53. Zheng, Y.; Haworth, I. S.; Zuo, Z.; Chow, M. S. S.; Chow, A. H. L., Physicochemical and Structural Characterization of Quercetin-β-Cyclodextrin Complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94, 1079-1089.

54. Jullian, C.; Moyano, L.; Yañez, C.; Olea-Azar, C., Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: An antioxidant study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2007**, 67, 230-234.

55. Savic, I. M.; Nikolic, V. D.; Savic-Gajic, I.; Nikolic, L. B.; Radovanovic, B. C.; Mladenovic, J. D., Investigation of properties and structural characterization of the

quercetin inclusion complex with (2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2015**, 82, 383-394.

56. Figueiras, A.; Carvalho, R. A.; Ribeiro, L.; Torres-Labandeira, J. J.; Veiga, F. J. B., Solid-state characterization and dissolution profiles of the inclusion complexes of omeprazole with native and chemically modified  $\beta$ -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2007**, 67, 531-539.

57. Chattah, A. K.; Mroue, K. H.; Pfund, L. Y.; Ramamoorthy, A.; Longhi, M. R.; Garnero, C., Insights into Novel Supramolecular Complexes of Two Solid Forms of Norfloxacin and β-Cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 102, 3717-3724.

58. Steiner, R. A.; Kalk, K. H.; Dijkstra, B. W., Anaerobic enzyme.substrate structures provide insight into the reaction mechanism of the copper-dependent quercetin 2,3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99, 16625-30.

59. Hingerty, B.; Klar, B.; Hardgrove, G. L.; Betzel, C.; Saenger, W., Neutron diffraction of alpha, beta and gamma cyclodextrins: hydrogen bonding patterns. *Journal of biomolecular structure & dynamics* **1984**, 2, 249-60.

60.Jorgensen,W.L.,Maxwell, D.S., Tirado-Rives, J.,Development and testing of the OPLS all-

atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. J. Am. Ch em. Soc. **1996**, 118, 11225-11236.

61. Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S., Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *Journal of medicinal chemistry* **2004**, 47, 1739-49.

62. Case, D. A.; Cheatham, T. E., 3rd; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M., Jr.;
Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J., The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of computational chemistry* 2005, 26, 1668-88.
63. Frisch, M.

J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H.P., Izmaylov, A.F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J.L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fuk uda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery Jr., J.A., Peralta, J.E., Ogliaro, F., Bearpark, M.J., Heyd, J., Brothers, E.N., Kudi n, K.N., Staroverov, V.N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A.P., Buran t, J.C., Iyengar, S.S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, N.J., Klene, M., Knox, J.E., Cross , J.B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R.E., Yazyev, O., Aus tin, A.J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J.W., Martin, R.L., Morokuma, K., Zakrzews ki, V.G., Voth, G.A., Salvador, P., Dannenberg, J.J., Dapprich, S., Daniels, A.D., Farkas, Ö., F oresman, J.B., Ortiz, J.V., Cioslowski, J., Fox, D.J.,, Gaussian 09. Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA. **2009**.

64. Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W.D., Kollman, P.A., A wellbehaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: The RESP model. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 10269-10280.

65. Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A., Development and testing of a general amber force field. *Journal of computational chemistry* **2004**, 25, 1157-74.

66. Kirschner, K. N.; Yongye, A. B.; Tschampel, S. M.; Gonzalez-Outeirino, J.; Daniels, C. R.; Foley, B. L.; Woods, R. J., GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field. Carbohydrates. *Journal of computational chemistry* **2008**, 29, 622-55.

67. Jorgensen,

W.

L., Chandrasekhar, J., Madura, J.D., Impey, R.W., Klein, M.L., Comparison of simple poten tial functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **1983**, 79, 926-935.

68. Izaguirre, J. A., Langevin stabilization of molecular dynamics. . . J. Chem. Phys. **2001**, 114, 2090-2098.

69. J.P.,

R., Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraint s: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.*, 327-341.

70. Roe, D. R.; Cheatham, T. E., 3rd, PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *Journal of chemical theory and computation* **2013**, 9, 3084-95.

71. Kollman, P. A.; Massova, I.; Reyes, C.; Kuhn, B.; Huo, S.; Chong, L.; Lee, M.; Lee, T.; Duan, Y.; Wang, W.; Donini, O.; Cieplak, P.; Srinivasan, J.; Case, D. A.; Cheatham, T. E., 3rd, Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Accounts of chemical research* **2000**, 33, 889-97.

72. Miller, B. R., 3rd; McGee, T. D., Jr.; Swails, J. M.; Homeyer, N.; Gohlke, H.; Roitberg, A. E., MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *Journal of chemical theory and computation* **2012**, *8*, 3314-21.

73. Nifli, A. P.; Theodoropoulos, P. A.; Munier, S.; Castagnino, C.; Roussakis, E.; Katerinopoulos, H. E.; Vercauteren, J.; Castanas, E., Quercetin exhibits a specific fluorescence in cellular milieu: a valuable tool for the study of its intracellular distribution. *J Agric Food Chem* **2007**, 55, 2873-8.

74. Massaro, M.; Piana, S.; Colletti, C. G.; Noto, R.; Riela, S.; Baiamonte, C.; Giordano, C.; Pizzolanti, G.; Cavallaro, G.; Milioto, S.; Lazzara, G., Multicavity halloysite-amphiphilic cyclodextrin hybrids for co-delivery of natural drugs into thyroid cancer cells. *Journal of Materials Chemistry B* **2015**, 3, 4074-4081.

75. Olejniczak, S.; Potrzebowski, M. J., Solid state NMR studies and density functional theory (DFT) calculations of conformers of quercetin. *Organic & biomolecular chemistry* **2004**, 2, 2315-22.

76. Wawer, I.; Zielinska, A., 13C-CP-MAS-NMR studies of flavonoids. I. Solid-state conformation of quercetin, quercetin 5'-sulphonic acid and some simple polyphenols. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **1997**, 10, 33-8.

77. Koontz, J. L.; Marcy, J. E.; O'Keefe, S. F.; Duncan, S. E., Cyclodextrin inclusion complex formation and solid-state characterization of the natural antioxidants alpha-tocopherol and quercetin. *J Agric Food Chem* **2009**, 57, 1162-71.

78. Nutho, B.; Khuntawee, W.; Rungnim, C.; Pongsawasdi, P.; Wolschann, P.; Karpfen, A.; Kungwan, N.; Rungrotmongkol, T., Binding mode and free energy prediction of fisetin/beta-cyclodextrin inclusion complexes. *Beilstein J Org Chem* **2014**, 10, 2789-99.

79. Sangpheak, W.; Kicuntod, J.; Schuster, R.; Rungrotmongkol, T.; Wolschann, P.; Kungwan, N.; Viernstein, H.; Mueller, M.; Pongsawasdi, P., Physical properties and biological activities of hesperetin and naringenin in complex with methylated β-cyclodextrin. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2015**, 11, 2763-2773.

80. Felton, L. A.; Popescu, C.; Wiley, C.; Esposito, E. X.; Lefevre, P.; Hopfinger, A. J., Experimental and Computational Studies of Physicochemical Properties Influence NSAID-Cyclodextrin Complexation. *AAPS PharmSciTech* **2014**, 15, 872-881.

81. Rekharsky, M. V., Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1875-1918.

82. Liu, M.; Dong, L.; Chen, A.; Zheng, Y.; Sun, D.; Wang, X.; Wang, B., Inclusion complexes of quercetin with three beta-cyclodextrins derivatives at physiological pH: spectroscopic study and antioxidant activity. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* **2013**, 115, 854-60.

83. Zheng, Y.; Haworth, I. S.; Zuo, Z.; Chow, M. S. S.; Chow, A. H. L., Physicochemical and Structural Characterization of Quercetin-β-Cyclodextrin Complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2005**, 94, 1079-1089.

84. Pralhad, T.; Rajendrakumar, K., Study of freeze-dried quercetin–cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2004**, 34, 333-339.

85. Primikyri, A.; Mazzone, G.; Lekka, C.; Tzakos, A. G.; Russo, N.; Gerothanassis, I. P., Understanding zinc(II) chelation with quercetin and luteolin: a combined NMR and theoretical study. *The journal of physical chemistry. B* **2015**, 119, 83-95.

86. Sokolova, R.; Ramesova, S.; Degano, I.; Hromadova, M.; Gal, M.; Zabka, J., The oxidation of natural flavonoid quercetin. *Chemical communications* **2012**, 48, 3433-5.

87. Sengupta, B.; Reilly, S. M.; Davis, D. E., Jr.; Harris, K.; Wadkins, R. M.; Ward, D.; Gholar, D.; Hampton, C., Excited state proton transfer of natural flavonoids and their chromophores in duplex and tetraplex DNAs. *The journal of physical chemistry. B* **2015**, 119, 2546-56.

88. Peng, X.; Gandhi, V., ROS-activated anticancer prodrugs: a new strategy for tumor-specific damage. *Therapeutic delivery* **2012**, 3, 823-33.

89. Lee, M. H.; Sessler, J. L.; Kim, J. S., Disulfide-based multifunctional conjugates for targeted theranostic drug delivery. *Accounts of chemical research* **2015**, 48, 2935-46.

90. Singh, Y.; Palombo, M.; Sinko, P. J., Recent trends in targeted anticancer prodrug and conjugate design. *Current medicinal chemistry* **2008**, 15, 1802-26.

91. Jornada, D. H.; dos Santos Fernandes, G. F.; Chiba, D. E.; de Melo, T. R.; dos Santos, J. L.; Chung, M. C., The Prodrug Approach: A Successful Tool for Improving Drug Solubility. *Molecules* **2015**, 21, 42.

92. Li, Y.; Sun, Y.; Li, J.; Su, Q.; Yuan, W.; Dai, Y.; Han, C.; Wang, Q.; Feng, W.; Li, F., Ultrasensitive near-infrared fluorescence-enhanced probe for in vivo nitroreductase imaging. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, 137, 6407-16.

93. Feng, P.; Zhang, H.; Deng, Q.; Liu, W.; Yang, L.; Li, G.; Chen, G.; Du, L.; Ke, B.; Li, M., Real-Time Bioluminescence Imaging of Nitroreductase in Mouse Model. *Analytical chemistry* **2016**, 88, 5610-4.

94. Guo, T.; Cui, L.; Shen, J.; Zhu, W.; Xu, Y.; Qian, X., A highly sensitive longwavelength fluorescence probe for nitroreductase and hypoxia: selective detection and quantification. *Chemical communications* **2013**, 49, 10820-2.

95. Williams, E. M.; Little, R. F.; Mowday, A. M.; Rich, M. H.; Chan-Hyams, J. V.; Copp, J. N.; Smaill, J. B.; Patterson, A. V.; Ackerley, D. F., Nitroreductase gene-directed enzyme prodrug therapy: insights and advances toward clinical utility. *The Biochemical journal* **2015**, 471, 131-53.

96. Greenwald, R. B.; Pendri, A.; Conover, C. D.; Zhao, H.; Choe, Y. H.; Martinez, A.; Shum, K.; Guan, S., Drug delivery systems employing 1,4- or 1,6-elimination: poly(ethylene glycol) prodrugs of amine-containing compounds. *Journal of medicinal chemistry* **1999**, 42, 3657-67.

97. Tranoy-Opalinski, I.; Fernandes, A.; Thomas, M.; Gesson, J. P.; Papot, S., Design of self-immolative linkers for tumour-activated prodrug therapy. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* **2008**, 8, 618-37.

98. Duarte, F.; Amrein, B. A.; Kamerlin, S. C., Modeling catalytic promiscuity in the alkaline phosphatase superfamily. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2013**, 15, 11160-77.

99. Bao, L.; Liu, F.; Guo, H. B.; Li, Y.; Tan, B. B.; Zhang, W. X.; Peng, Y. H., Naringenin inhibits proliferation, migration, and invasion as well as induces apoptosis of gastric cancer SGC7901 cell line by downregulation of AKT pathway. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **2016**, 37, 11365-74.

100. Xu, C.; Chen, J.; Zhang, J.; Hu, X.; Zhou, X.; Lu, Z.; Jiang, H., Naringenin inhibits angiotensin II-induced vascular smooth muscle cells proliferation and migration and

decreases neointimal hyperplasia in balloon injured rat carotid arteries through suppressing oxidative stress. *Biological & pharmaceutical bulletin* **2013**, 36, 1549-55.

101. Xu, W. H.; Zheng, W.; Xiang, Y. B.; Ruan, Z. X.; Cheng, J. R.; Dai, Q.; Gao, Y. T.; Shu, X. O., Soya food intake and risk of endometrial cancer among Chinese women in Shanghai: population based case-control study. *Bmj* **2004**, 328, 1285.

102. Peterson, J.; Lagiou, P.; Samoli, E.; Lagiou, A.; Katsouyanni, K.; La Vecchia, C.; Dwyer, J.; Trichopoulos, D., Flavonoid intake and breast cancer risk: a case--control study in Greece. *British journal of cancer* **2003**, 89, 1255-9.

103. Patel, D.; Shukla, S.; Gupta, S., Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). *International journal of oncology* **2007**, 30, 233-45.

104. Way, T. D.; Kao, M. C.; Lin, J. K., Apigenin induces apoptosis through proteasomal degradation of HER2/neu in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* **2004**, 279, 4479-89.