



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΛΙΚΩΝ»

**ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΝΕΩΝ ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΟΝΩΝ ΣΕ  
ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΠΟΛΥ(ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ  
ΟΞΕΟΣ) (PLA) ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΟΚΑ β-  
ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΗΣ. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ  
ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥΣ ΝΑ ΔΡΟΥΝ ΩΣ  
ΦΩΤΟΔΙΑΣΠΑΣΤΕΣ ΤΟΥ DNA**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΣΤΑΪΚΙΔΟΥ ΛΑΜΠΡΙΝΑ-ΛΕΥΚΗ**

Πτυχιούχου Χημικού Ε.Κ.Π.Α.

**ΕΠΙΒΛΕΨΗ:**

**Α. ΔΕΤΣΗ**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

**ΑΘΗΝΑ, Οκτώβριος 2020**



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΛΙΚΩΝ»

**ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΝΕΩΝ ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΟΝΩΝ ΣΕ  
ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΠΟΛΥ(ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ  
ΟΞΕΟΣ) (PLA) ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΟΚΑ β-  
ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΗΣ. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ  
ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥΣ ΝΑ ΔΡΟΥΝ ΩΣ  
ΦΩΤΟΔΙΑΣΠΑΣΤΕΣ ΤΟΥ DNA**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΣΤΑΪΚΙΔΟΥ ΛΑΜΠΡΙΝΑ-ΛΕΥΚΗ**

Πτυχιούχου Χημικού Ε.Κ.Π.Α.

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

Α. ΔΕΤΣΗ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Σ. ΒΟΥΓΙΟΥΚΑ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Α. ΚΥΡΙΤΣΗΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Μ.Π.

**ΑΘΗΝΑ, Οκτώβριος 2020**

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά την περίοδο 2019 – 2020 στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ, υπό την επίβλεψη της Αναπλ. Καθ. Αναστασίας Δέτση, στα πλαίσια του ΔΠΜΣ «Επιστήμη και Τεχνολογία Υλικών».

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Δέτση που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα θέμα τόσο πρωτότυπο και επίκαιρο και για τις πολύτιμες συμβουλές της στην διεξαγωγή των πειραμάτων. Η ενασχόλησή μου με το συγκεκριμένο αντικείμενο μου προσέφερε μία νέα οπτική πάνω στη φαρμακευτική χημεία ενώ αποκόμισα πλήθος γνώσεις και εμπειρία. Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία δε θα μπορούσε να επιτευχθεί χωρίς τη συμβολή, την υποστήριξη, την καθοδήγηση και την υπομονή της Υ. Δ. Μάρω Μπαϊρακτάρη και ως εκ τούτου την ευχαριστώ θερμά για τη συνεργασία. Δεν μπορώ να παραλείψω να ευχαριστήσω θερμά την κα Ζαμπία Κατσανεβάκη που πάντα βοηθά και μας φροντίζει. Θέλω ακόμη, να εκφράσω την εκτίμησή μου σε όλο το εργαστήριο για τη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα, καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα την οικογένειά μου και το φιλικό μου περιβάλλον για την κατανόηση, και τη στήριξή τους τόσο υλικά όσο και ηθικά.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	1
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	8
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	10
ABSTRACT .....	11
GRAPHICAL ABSTRACT.....	12
.....	12
.....	12
1. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ (DRUG DELIVERY SYSTEMS).....	13
1.1. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ.....	13
1.2. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ.....	13
1.3. ΜΕΓΕΘΟΣ-ΣΧΗΜΑ.....	14
1.4. ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ.....	14
1.5. ΦΟΡΤΩΣΗ ΦΑΡΜΑΚΟΥ ΚΑΙ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ .....	15
1.6. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΝΑΝΟΦΟΡΕΩΝ.....	16
2. ΝΑΝΟΦΟΡΕΙΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	19
2.1. ΠΟΛΥ(ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ) (PLA).....	19
2.1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	19
2.1.2. ΔΟΜΗ .....	19
2.1.3. ΣΥΝΘΕΣΗ.....	20
2.1.4. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ.....	21
2.1.5. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥ PLA ΣΤΗ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	22
2.2. ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ.....	23
2.2.1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ.....	23
2.2.2. ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ.....	24
2.2.3. ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ ΩΣ ΦΟΡΕΙΣ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ .....	25
3. ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΟΝΕΣ.....	26
3.1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	26
3.2. ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ.....	27
3.2.1. ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ.....	27
3.2.2. ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	28
3.2.3. ΑΝΤΙΟΞΙΝΗ ΔΡΑΣΗ.....	30
3.2.4. ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	31
3.2.6. ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ .....	32
3.2.7. DNA ΠΑΡΕΜΒΟΛΗ.....	33

4.	ΦΥΣΙΚΟΙ ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΟΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ (Natural Deep Eutectic Solvents, NaDES).....	34
4.1.	ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ-ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ .....	34
4.2.	ΕΥΤΗΚΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ .....	35
4.3.	ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΩΝ DES .....	36
4.4.	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ NaDES .....	36
4.5.	ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ.....	36
4.6.	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ .....	36
5.	ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ.....	37
5.1.	ΦΩΤΟΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	37
5.2.	ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	37
5.2.1.	ΟΡΙΣΜΟΣ-ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ.....	37
5.2.2.	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ.....	38
5.3.	DNA ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΤΕΣ.....	39
5.4.	DNA ΠΑΡΕΜΒΟΛΗ.....	40
6.	ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ.....	42
6.1.	ΑΠΟΔΟΣΗ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ (ENCAPSULATION EFFICIENCY, EE%).....	42
6.1.1.	ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ .....	42
6.1.2.	ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΠΟΔΟΣΗ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ .	43
6.2.	ΠΟΣΟΣΤΟ ΦΟΡΤΩΣΗΣ (DRUG LOADING, DL).....	45
6.3.	ΠΡΟΦΙΛ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ (RELEASE PROFILE, RP).....	45
6.4.	ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ (DYNAMIC LIGHT SCATTERING, DLS) ..	46
6.5.	ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ (SCANNING ELECTRON MICROSCOPY, SEM).....	48
6.6.	ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ FOURIER (FT-IR)	49
6.7.	ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ (DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY, DSC) .....	50
6.8.	ΘΕΡΜΟΒΑΡΥΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (THERMOGRAVIMETRIC ANALYSIS, TGA)	51
7.	ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΥΨΗΛΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ.....	52
7.1.	ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΑ .....	52
7.2.	ΥΠΕΡΗΧΟΙ.....	52
8.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	53
8.1.	ΣΚΟΠΟΣ.....	54
8.2.	ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	54
8.3.	ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΟΝΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΠΡΟΣ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟ.....	55
8.4.	ΣΥΝΘΕΣΗ.....	56

8.4.1.	ΣΥΝΘΕΣΗ 6-ΒΡΩΜΟ-2-ΜΕΘΥΛΟ-4Η-BENZO[D][1,3]ΟΞΑΖΙΝ-4-ΟΝΗΣ (2)	56
8.4.2.	ΣΥΝΘΕΣΗ 3-(2-ΑΜΙΝΟΑΙΘΥΛΟ)-6-ΒΡΩΜΟ-2-ΜΕΘΥΛΟΚΙΝΑΖΟΛΙΝ- 4(3Η)-ΟΝΗΣ (3).....	56
	E.....	57
8.5.	ΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ (NaDES).....	57
8.6.	ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ (NaDES).....	58
8.6.1.	ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ.....	58
8.7.	ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΟΝΗΣ ΣΕ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ PLA (PLA NPs)..	59
8.7.1.	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΜΕΘΟΔΟΥ .....	59
8.7.2.	ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΟΝΩΝ ΜΕ PLA .....	61
8.8.	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ PLA.....	62
8.9.	ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΟΝΗΣ ΣΕ ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ $\beta$ -CD ( $\beta$ - CD Inclusion Complexes, ICs) .....	64
8.9.1.	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΜΕΘΟΔΟΥ .....	64
8.9.2.	ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΟΝΗΣ- $\beta$ CD .....	65
8.10.	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΟΚΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΟΝΗΣ- $\beta$ CD	65
8.11.	ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ.....	65
8.11.1.	ΦΩΤΟΒΟΛΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA.....	65
9.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	66
9.1.	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ 3-(2-ΑΜΙΝΟΑΙΘΥΛΟ)-6-ΒΡΩΜΟ-2-ΜΕΘΥΛΟΚΙΝΑΖΟΛΙΝ- 4(3Η)-ΟΝΗΣ (3).....	66
9.2.	ΑΠΟΔΟΣΗ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΠΟΣΟΣΤΟ ΦΟΡΤΩΣΗΣ NPs .....	69
9.3.	ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ (DYNAMIC LIGHT SCATTERING, DLS) ..	71
9.3.1.	ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ PLA ΜΕ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟ ΤΗΣ 3-(2-ΑΜΙΝΟΕΘΥΛ)-6- ΒΡΩΜΟ-2-ΜΕΘΥΛΟΚΙΝΑΖΟΛΙΝ-4(3Η)-ΟΝΗΣ (3).....	72
9.3.2.	ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ PLA ΜΕ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟ ΤΗΣ 2-(4- ΜΕΘΟΞΥΦΑΙΝΥΛΟ)-3-ΦΑΙΝΥΛΟ-2,3-ΔΙΥΔΡΟΚΙΝΑΖΟΛΙΝ-4(1Η)-ΟΝΗΣ (4)...	75
9.3.3.	ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ $\beta$ -CD.....	77
9.4.	ΠΡΟΦΙΛ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ..... <b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>	
9.5.	ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΦΑΡΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ FOURIER (FT- IR)	78
9.6.	ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ (SCANNING ELECTRON MICROSCOPY, SEM).....	80
9.7.	ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ (DIFFERENTIAL SCANNING SPECTROSCOPY, DSC).....	82
9.8.	ΘΕΡΜΟΒΑΡΥΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (THERMOGRAVIMETRIC ANALYSIS, TGA)	84

9.9.	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΩΝ ΜΕ ΤΟ DNA	85
9.10.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΦΩΤΟΔΙΑΣΠΑΣΗΣ.....	86
10.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	89
11.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	92
11.1.	ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΚΑΘΑΡΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	92
11.2.	ΦΑΣΜΑΤΑ UV/Vis .....	93
11.3.	ΦΑΣΜΑΤΑ FT-IR.....	94
11.4.	ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ Ζ .....	97
11.5.	ΦΩΤΟΒΟΛΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA.....	99
11.5.1.	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ .....	99
11.5.2.	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΦΩΤΟΒΟΛΗΣΗΣ.....	101
11.5.3.	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	101
12.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	101

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1:	Νανοδομημένα ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων.....	14
Εικόνα 2:	Δομή λιποσώματος.....	15
Εικόνα 3:	Κατηγορίες νανοφορέων.....	17
Εικόνα 4:	Σύγκριση δομής νανοκάψουλας και νανοσφαίρας.....	18
Εικόνα 5:	Διάγραμμα φάσης δυαδικού συστήματος.....	35
Εικόνα 6:	Μηχανισμός φωτοδιάσπασης. <sup>55</sup> .....	39
Εικόνα 7:	Παραμόρφωση της αλυσίδας DNA με παρεμβολή και αρχή του αποκλεισμού γειτονικών θέσεων ενός μορίου παρεμβολέα (με μαύρο χρώμα).....	41
Εικόνα 8:	Απεικόνιση του μοντέλου αλληλεπίδρασης DNA-φαρμάκου.....	42
Εικόνα 9:	Απεικόνιση της κατανομής φορτίων σε σωματίδιο.....	47
Εικόνα 10:	Τρόποι αλληλεπίδρασης ακτινοβολίας-ύλης.....	48
Εικόνα 11:	Όργανο υπέρυχων.....	53
Εικόνα 12:	NaDES G/LA, 1:5.....	59
Εικόνα 13:	Η διασπορά των NPs μετά το στάδιο της γαλακτωματοποίησης.....	60
Εικόνα 14:	Ξηρά νανοδομημένα PLA.....	61
Εικόνα 15:	Μορφές πλασμιδιακού DNA και gel αгарόζης.....	66
Εικόνα 16:	Φάσμα <sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) του μορίου 3.....	67
Εικόνα 17:	Μεγέθυνση του φάσματος <sup>1</sup> H NMR της κινάζολιनोंης 3 (περιοχή 9-7ppm).....	68
Εικόνα 18:	Μεγέθυνση του φάσματος <sup>1</sup> H NMR της κινάζολιनोंης 3 (περιοχή 4-1 ppm).....	69
Εικόνα 19:	Κατανομή μεγεθών του δείγματος LS17 (νανοδομημένα PLA με εγκλεισμένη την κινάζολιनोंη 3 σε διαλύτη DMSO).....	73
Εικόνα 20:	Κατανομή μεγεθών του δείγματος LS5 (νανοδομημένα PLA με εγκλεισμένη την κινάζολιनोंη 3 σε διαλύτη NaDES CC/LA 1:1.5).....	73
Εικόνα 21:	Κατανομή μεγεθών του LS18 (νανοδομημένα PLA με εγκλεισμένη την κινάζολιनोंη 3 σε διαλύτη NaDES G/LA 1:5).....	74
Εικόνα 22:	Μέγεθος κενών νανοδομημάτων PLA, LS6 (με προσθήκη NaDES CC/LA 1:1.5).....	74
Εικόνα 23:	Κατανομή μεγέθους κενών νανοδομημάτων PLA, LS19 (με προσθήκη NaDES G/LA 1:5).....	75

Εικόνα 24: Κατανομή μεγεθών του δείγματος LS3 (νανοσωματίδια PLA με εγκλεισμένη την κινναζολινόνη 4 σε συμβατικό διαλύτη).....	76
Εικόνα 25: Κατανομή μεγεθών του δείγματος LS4 (κενά νανοσωματίδια PLA).....	76
Εικόνα 26: Κατανομή μεγεθών NPs LS7 (νανοσωματίδια PLA με εγκλεισμένη την ένωση 4 με διαλύτη NaDES CC/LA 1:1.5).....	77
Εικόνα 27: Κατανομή μεγεθών του δείγματος LS14 (νανοσωματίδια PLA με εγκλεισμένη την ένωση 4 με διαλύτη NaDES CC/OA 1:1).....	77
Εικόνα 28: Κατανομή μεγεθών του δείγματος LS13 (σύμπλοκα της κινναζολινόνης 3 με $\beta$ CD).....	78
Εικόνα 29: Προφίλ απελευθέρωσης των NPS LS5 με θέρμανση ( $T=37^{\circ}\text{C}$ ) και ανάδευση σε σφαιρική φιάλη, σε $\text{pH}=7.4$ .....	<b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>
Εικόνα 30: Προφίλ απελευθέρωσης των NPS LS5 με ακτινοβολία στα 312 nm, ύψος 15 cm, σε $\text{pH}=7.4$ .....	<b>Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.</b>
Εικόνα 31: FTIR φάσμα του LS6 (κενά νανοσωματίδια PLA), της καθαρής κινναζολινόνης 3, και των νανοσωματιδίων LS5 (με εγκλεισμένη την κινναζολινόνη 3).....	79
Εικόνα 32: FTIR φάσμα του LS6 (κενά νανοσωματίδια PLA), της καθαρής κινναζολινόνης 4, και των νανοσωματιδίων LS7 (με εγκλεισμένη την κινναζολινόνη 4).....	80
Εικόνα 33: Απεικόνιση SEM δειγμάτων LS4 (κενών νανοσωματιδίων PLA) αριστερά και LS5 δεξιά, μεγέθυνση x150.....	81
Εικόνα 34: Απεικόνιση SEM δειγμάτων LS4 (κενών νανοσωματιδίων PLA) αριστερά και LS5 δεξιά, μεγέθυνση x500.....	81
Εικόνα 35: Απεικόνιση SEM δειγμάτων LS4 (κενών νανοσωματιδίων PLA) αριστερά και LS5 δεξιά, μεγέθυνση x1000.....	81
Εικόνα 36: Θερμογράμματα θέρμανσης-ψύξης σε ρυθμό $10.00^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .....	83
Εικόνα 37: Θερμογράμματα θέρμανσης-μεταβολής μάζας σε ρυθμό $10.00^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , των κενών νανοσωματιδίων LS4 και LS5 νανοσωματιδίων (που περιέχουν εγκλεισμένη την κινναζολινόνη 3).....	85
Εικόνα 38: Τρισδιάστατη αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης της 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκινναζολιν-4(3H)-όνης με τη διπλή έλικα του DNA, μέσω groove binding..	86
Εικόνα 39: Τρισδιάστατη απεικόνιση της συναρμογής της 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκινναζολιν-4(3H)-όνης στη διπλή έλικα του DNA.....	86
Εικόνα 40: Ραβδόγραμμα ποσοστών κυκλικού (Form II) και γραμμικού (Form III) πλασμιδιακού DNA έπειτα από φωτοβολήση των δειγμάτων στα 312 nm.....	88
Εικόνα 41: Καμπύλη αναφοράς της καθαρής ένωσης 3, σε DMSO.....	92
Εικόνα 42: Καμπύλη αναφοράς της καθαρής ένωσης 4, σε ακετόνη.....	93
Εικόνα 43: Φάσμα UV/Vis της ένωσης 3.....	93
Εικόνα 44: Φάσμα UV/Vis της ένωσης 4.....	94
Εικόνα 45: FT-IR φάσμα της ένωσης 3.....	94
Εικόνα 46: FT-IR φάσμα των νανοσωματιδίων LS5.....	95
Εικόνα 47: FT-IR φάσμα των κενών νανοσωματιδίων LS6.....	95
Εικόνα 48: FT-IR φάσμα των νανοσωματιδίων LS7.....	96
Εικόνα 49: FT-IR φάσμα της ένωσης 4.....	96
Εικόνα 50: Δυναμικό $\zeta$ των νανοσωματιδίων LS3.....	97
Εικόνα 51: Δυναμικό $\zeta$ των κενών νανοσωματιδίων NPs LS4.....	97
Εικόνα 52: Δυναμικό $\zeta$ των νανοσωματιδίων LS5.....	97
Εικόνα 53: Δυναμικό $\zeta$ των νανοσωματιδίων LS6.....	98
Εικόνα 54: Δυναμικό $\zeta$ των νανοσωματιδίων LS7.....	98
Εικόνα 55: Δυναμικό $\zeta$ των νανοσωματιδίων LS13.....	98
Εικόνα 56: Δυναμικό $\zeta$ των νανοσωματιδίων LS14.....	98
Εικόνα 57: Δυναμικό $\zeta$ των νανοσωματιδίων LS17.....	99
Εικόνα 58: Δυναμικό $\zeta$ των νανοσωματιδίων LS18.....	99



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Στερεοχημεία του γαλακτικού οξέος και των λακτιδίων. <sup>13</sup> .....	19
Σχήμα 2: Δομή PLA.....	20
Σχήμα 3: Μέθοδοι σύνθεσης PLA.....	21
Σχήμα 4: Χημική και τρισδιάστατη δομή των φυσικών CD.....	24
Σχήμα 5: (a) Στερεοχημική διαμόρφωση της β-CD.	
(b) Δομή κόλλουρου κώνου της CD και θέση εσωτερικών και εξωτερικών πρωτονίων. <sup>24</sup> .....	25
Σχήμα 6: Βασική δομή κινναζολινόνης.....	26
Σχήμα 7: Δομές κινναζολίνης, ισομερών κινναζολινονών και κινναζολινοδιόνης.....	27
Σχήμα 8: Δομές εμπορικά διαθέσιμων φαρμάκων παραγώγων κινναζολινών/κινναζολινονών. <sup>30</sup>	
.....	28
Σχήμα 9: Νέα κινναζολινονικά παράγωγα με αντιμικροβιακή δράση.....	29
Σχήμα 10: Κινναζολινονικά παράγωγα με αντιμυκητιακή δράση.....	29
Σχήμα 11: Μόρια με αντι-χλαμυδική δράση.....	30
Σχήμα 12: Δομή κινναζολινονικών παραγώγων με αντιόξινη δράση.....	30
Σχήμα 13: Ενώσεις κινναζολινόνης με αντιδιαβητική δράση.....	31
Σχήμα 14: Μόρια που μελετήθηκαν με αντιπαρκινσονική δράση.....	32
Σχήμα 15: Μόρια με αντικαρκινική δράση.....	32
Σχήμα 16: Παράγωγο κινναζολινόνης με αντικαρκινικές ιδιότητες.....	33
Σχήμα 17: Νέες συνθετικές κινναζολινονές για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού.....	33
Σχήμα 18: Δομή πυριδάζινο[1,6-b]κινναζολινόνης με αντικαρκινικές ιδιότητες.....	34
Σχήμα 19: Δομή αζολο-κινναζολινόνης με αντιμικροβιακή δράση DNA παρεμβολής.....	34
Σχήμα 20: Δομές συνήθων συστατικών NaDES.....	37
Σχήμα 21: Σύνθεση της 6-βρωμο-2-μεθυλο-4H-βενζο[ <i>d</i> ][1,3]οξαζιν-4-όνης (2).....	56
Σχήμα 22: Σύνθεση της 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκινναζολιν-4(3H)-όνης (3).....	56
Σχήμα 23: NaDES G/LA 1:5.....	58
Σχήμα 24: Δομή του μορίου 3.....	66

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Σύγκριση φυσικοχημικών ιδιοτήτων των PLLA και PDLLA. <sup>16</sup> .....	22
Πίνακας 2: Ιδιότητες κυκλοδεξτρινών.....	24
Πίνακας 3: Βασικοί τύποι των DES.....	36
Πίνακας 4: Παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση εγκλεισμού.....	43
Πίνακας 5: Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν.....	54
Πίνακας 6: Ανάλογα κινναζολινονών που εγκλείστηκαν.....	55
Πίνακας 7: Σύνοψη των NaDES που χρησιμοποιήθηκαν.....	57
Πίνακας 8: Ποσότητες για την παρασκευή νανοσωματιδίων 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκινναζολιν-4(3H)-όνης (Μόριο 3).....	61
Πίνακας 9: Ποσότητες για την παρασκευή νανοσωματιδίων 2-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-φαινυλο-2,3-δihυδροκινναζολιν-4(1H)-όνης (Μόριο 4).....	61
Πίνακας 10: Ποσότητες για την παρασκευή των κενών νανοσωματιδίων.....	62
Πίνακας 11: Συνθήκες μέτρησης DLS σε μήτρα PLA.....	63
Πίνακας 12: Συνθήκες πειράματος DSC σε ένα κύκλο θέρμανσης-ψύξης.....	64
Πίνακας 13: Συνθήκες πειράματος TGA.....	64

Πίνακας 14: Πίνακας συνθηκών μέτρησης DLS σε $\beta$ -CD σύμπλοκα.....	65
Πίνακας 15: % Απόδοση εγκλεισμού % Ποσοστό φόρτωσης για τα νανοσωματίδια PLA με εγκλεισμένη την κιναιζολινόνη 3.....	69
Πίνακας 16: % Απόδοση εγκλεισμού % Ποσοστό φόρτωσης για τα νανοσωματίδια PLA με εγκλεισμένη την κιναιζολινόνη 4.....	70
Πίνακας 17: Αποτελέσματα DLS για τα δείγματα νανοσωματιδίων PLA με εγκλεισμένη την κιναιζολινόνη 3.....	71
Πίνακας 18: Αποτελέσματα DLS για τα δείγματα νανοσωματιδίων PLA με εγκλεισμένη την κιναιζολινόνη 4.....	71
Πίνακας 19: Αποτελέσματα DLS των κενών νανοσωματιδίων PLA.....	71
Πίνακας 20: Αποτελέσματα DLS μεγέθους (nm), δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και δυναμικού $\zeta$ (mV) στα σύμπλοκα $\beta$ -CD.....	77
Πίνακας 21: Πίνακας αποτελεσμάτων πειράματος DSC.....	83
Πίνακας 22: Αποτελέσματα και παράμετροι πειράματος TGA. ....	84
Πίνακας 23: Δείγματα που εξετάζονται με φωτοβολήση στο UVB.....	87
Πίνακας 24: Περιγραφή των δειγμάτων και των συγκεντρώσεων που πραγματοποιήθηκε η φωτοβολήση στο UVB, στα 312 nm, σε απόσταση 15 cm και χρονική διάρκεια 30 min.....	88

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νανοτεχνολογία γνωρίζει πολύ μεγάλη ανάπτυξη τις τελευταίες δεκαετίες σε πληθώρα τομέων, όπως η επιστήμη των υλικών, των τροφίμων και η ιατρική. Εκτεταμένη έρευνα γίνεται στο σχεδιασμό νέων δομών και στην ανάπτυξη νέων τεχνολογιών με βάση τα νανοσωματίδια, λόγω των ιδιαίτερων ιδιοτήτων που προσφέρει η νανοκλίμακα. Μια εφαρμογή που μελετάται ευρέως, είναι ο εγκλεισμός μιας δραστικής ουσίας σε κατάλληλους φορείς προς το σχηματισμό νανοσωματιδίων, το μέγεθος των οποίων είναι συγκρίσιμο με αυτό των βιολογικών συστημάτων. Σκοπός είναι η ανάπτυξη συστημάτων με στοχευμένη και ελεγχόμενη δράση, οι μειωμένες παρενέργειες αλλά και η παράταση της διάρκειας ζωής του τελικού προϊόντος.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε για πρώτη φορά η διεργασία εγκλεισμού νέων κινναζολινονικών παραγώγων τα οποία λειτουργούν ως φωτοευαίσθητοποιητές, σε δύο φυσικής προέλευσης φορείς: το βιοπολυμερές πολυ(γαλακτικό οξύ) και τον κυκλικό ολιγοσακχαρίτη β-κυκλοδεξτρίνη. Τα πλεονεκτήματα της χρήσης φυσικών μορίων είναι η βιοαποικοδομησιμότητά τους, η χαμηλή τοξικότητα και η συμβατότητά τους με βιολογικά συστήματα.

Η φωτοδυναμική θεραπεία, είναι μία στοχευμένη μέθοδος αντικαρκινικής θεραπείας, η οποία έχει προσελκύσει έντονο ενδιαφέρον λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών της, όπως τη χαμηλή συστηματική τοξικότητα, τη μειωμένη επεμβατικότητα, την έλλειψη ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων. Η ικανότητα των κινναζολινονικών παραγώγων να λειτουργήσουν ως φωτοδιασπαστές στο DNA, τους καθιστά πιθανούς φορείς της φωτοδυναμικής θεραπείας. Ο εγκλεισμός των κινναζολινονικών σε κατάλληλο σύστημα μεταφοράς φαρμάκου αναμένεται να βελτιώσει το θεραπευτικό προφίλ και να ελαχιστοποιήσει προβλήματα λόγω χαμηλής διαλυτότητας αλλά και να ενισχύσει τον πράσινο χαρακτήρα των βιολογικών διεργασιών στα *in vitro* πειράματα.

Στόχος της έρευνας ήταν ο επιτυχής εγκλεισμός των κινναζολινονικών παραγώγων, ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων, η παρατήρηση των ιδιοτήτων πριν και μετά τον εγκλεισμό. Μεγάλη βαρύτητα δόθηκε στην τροποποίηση της συμβατικής μεθόδου εγκλεισμού γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης διαλύτη με τη χρήση Φυσικών Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών (NaDES), οι οποίοι ανήκουν στην κατηγορία των πράσινων διαλυτών και χαρακτηρίζονται από χαμηλή τοξικότητα, είναι ανακυκλώσιμοι και βιοαποικοδομήσιμοι.

Ο πλήρης χαρακτηρισμός των νανοσυστημάτων πραγματοποιήθηκε με διάφορες τεχνικές όπως φασματοφωτομετρία UV/Vis, Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FT-IR), μέτρηση μεγέθους, δείκτη πολυδιασποράς και δυναμικού ζ μέσω Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (DLS), φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR), Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC), Θερμοβαρυμετρική Ανάλυση (TGA) και Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM). Επίσης, πραγματοποιήθηκε μελέτη αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το DNA καθώς και μελέτη της ικανότητας φωτοδιάσπασης των νανοσωματιδίων κινναζολινονών στο DNA.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι ιδιαίτερα ικανοποιητικά για τα διαφορετικά νανοσωματίδια και τη διεργασία σύνθεσής τους, για την απόδοση εγκλεισμού και το ποσοστό φόρτωσης. Η προστασία της κιναζολινόνης στο εσωτερικό του φορέα επιβεβαιώθηκε μέσω τεχνικών θερμικής ανάλυσης και χαρακτηρισμού δομής, ενώ μελετήθηκε η απελευθέρωσή της. Τα νανοσωματίδια λειτουργούν ως DNA φωτοδιασπαστές, ενώ διαπιστώθηκε φωτοδιασπαστική ικανότητα τόσο του φορέα PLA όσο και της κιναζολινόνης, καθώς και του NaDES.

**Λέξεις-κλειδιά:** νανοσωματίδια, σύστημα μεταφοράς φαρμάκων, κιναζολινόνη, πολύ(γαλακτικό οξύ),  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνη, Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες, φωτοδυναμική θεραπεία.

## ABSTRACT

Nanotechnology has been very popular lately in a variety of fields, such as materials science, food science and medicine. Extensive research is being conducted on the design of new structures and the development of new nanoparticle-based technologies due to the unique properties of the nanoscale. A widespread application is the inclusion of an active substance in suitable carriers for the formulation of nanoparticles, in order to achieve size comparable to that of biological systems. The aim is to develop systems with targeted and controlled action, reduced side effects and extended time of action.

The aim of the present work is to study for the first time, the encapsulation process of new quinazolinone derivatives which act as photosensitizers, in two naturally occurring carriers: the biopolymer poly(lactic acid) and the cyclic oligosaccharide  $\beta$ -cyclodextrin. The advantages of using natural molecules are their biodegradability, low toxicity and their compatibility with biological systems.

Photodynamic therapy is a targeted modality for cancer treatment, which has attracted great interest because of its unique features, including low systemic toxicity, minimal invasiveness and lack of initiating resistance. The ability of quinazolinone derivatives to act as DNA photocleavage agents, makes them possible candidates for photodynamic therapy. Encapsulation of quinazolinone in a suitable drug delivery system is expected to improve drug's therapeutic profile and minimize defects such as poor solubility, as well as to promote green chemistry's principles during in vitro experiments.

The aim of the research was the successful encapsulation process of quinazolinone derivatives, characterization of nanoparticles, observation of properties before and after the encapsulation. Main part of this research was the modification of emulsification-solvent evaporation general method with the use of Natural Deep Eutectic Solvents which belong to the category of green solvents and are characterized by low toxicity, recyclability and biodegradability.

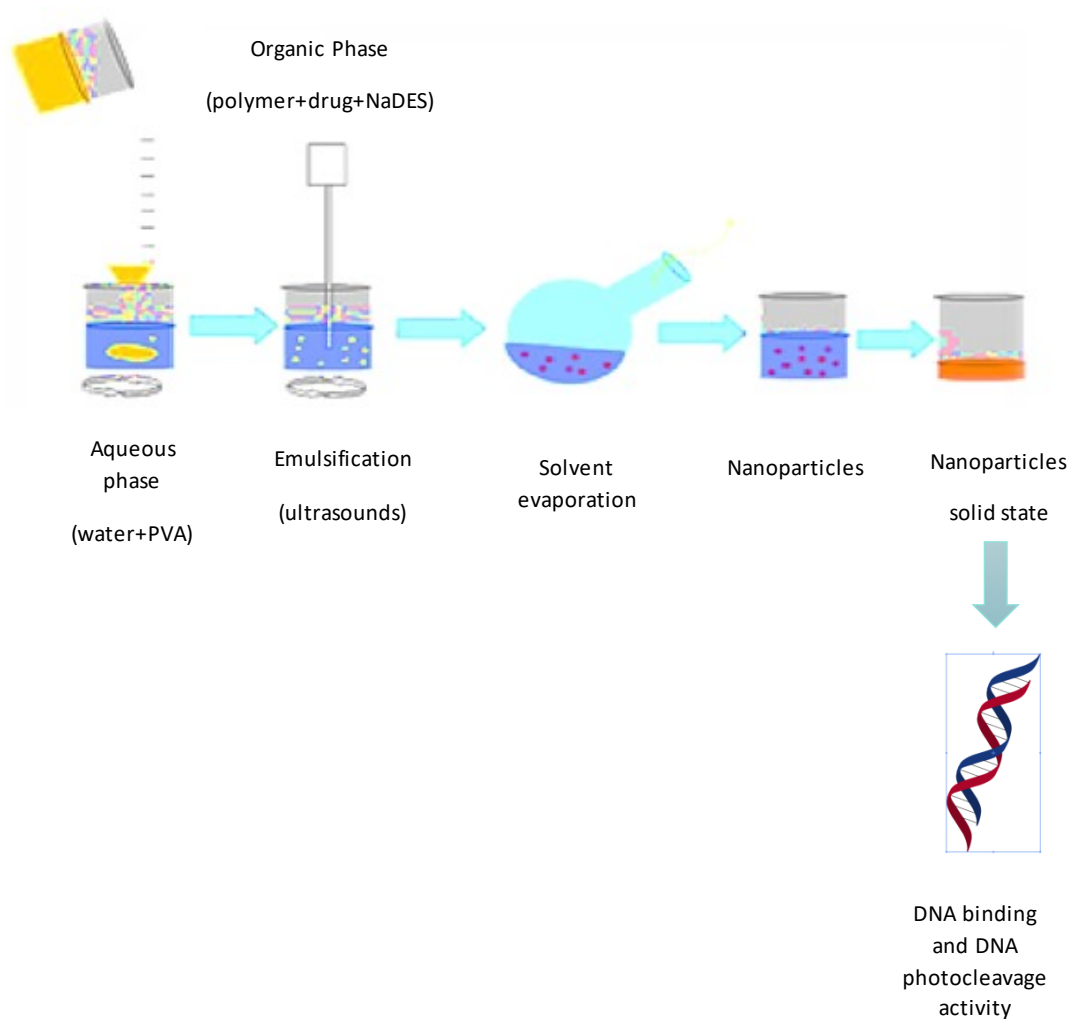
Complete characterization of the systems was performed by various methods and techniques, such as UV/Vis spectroscopy, Infrared Spectroscopy (FT-IR), Dynamic Light Scattering (DLS) for the measurement of size, polydispersity index and  $\zeta$ -potential, Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR), Differential Scanning

Calorimetry (DSC), Thermogravimetric Analysis (TGA) and Scanning Electron Microscopy (SEM). In addition, biological experiments were conducted in order to study the complexation between DNA and quinazolinones, as well as the ability of quinazolinone nanoparticles to cleave DNA, when activated by UV irradiation.

Finally, useful conclusions about the different kinds of nanoparticles and the synthetic process, the encapsulation efficiency and drug loading were evaluated. The protection of quinazolinone inside the carriers was confirmed by thermal analysis and structural characterization techniques, and the release profile was studied. Nanoparticles can operate as DNA photocleavage agents, also PLA matrix, quinazolinone and NaDES photocleavage activity was confirmed.

**Key-words:** nanoparticles, drug delivery system, quinazolinone, poly(lactic acid),  $\beta$ -cyclodextrin, Natural Deep Eutectic Solvents, photodynamic therapy.

## GRAPHICAL ABSTRACT



# 1. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ (DRUG DELIVERY SYSTEMS)

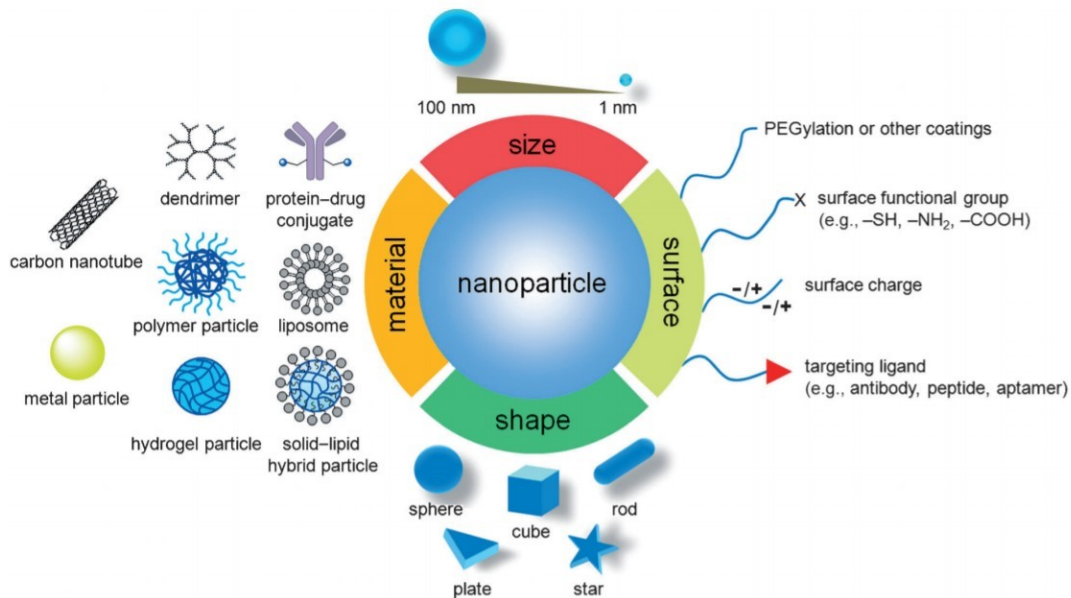
## 1.1. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ

Τις τελευταίες δεκαετίες, νέα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων βρίσκονται στο επίκεντρο της θεραπευτικής έρευνας, καθώς αναζητούνται λύσεις σε μειονεκτήματα των παραδοσιακών φαρμάκων, όπως η χαμηλή διαλυτότητα, η μη εκλεκτική διάθεση στα κύτταρα-στόχους, η συστηματική τοξικότητα και ο χαμηλός θεραπευτικός δείκτης (λόγος της θανατηφόρας, προς την αποτελεσματική δόση). Οι συμβατικές θεραπείες, απεικονιστικές και διαγνωστικές μέθοδοι εγκαταλείπονται λόγω χαμηλής αποτελεσματικότητας, σοβαρών παρενεργειών, μεγάλου κόστους και μακροχρόνιας αναμονής για επιθυμητά αποτελέσματα.

Πιο αναλυτικά, στα παραδοσιακά συστήματα χορήγησης φαρμάκων, τα θεραπευτικά μόρια διανέμονται από τις διάφορες οδούς χορήγησης (από το στόμα, δέρμα, ρηνική κοιλότητα, παρεντερικά κ.α.) σε ολόκληρο τον οργανισμό, μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας του αίματος. Ως εκ τούτου, σε περίπτωση αποτυχίας επίτευξης του στόχου τους παραμένουν στον οργανισμό, προκαλώντας ανεπιθύμητες παρενέργειες, συχνά σοβαρές και επικίνδυνες. Επιπλέον, απομακρύνονται ταχέως από το πλάσμα του αίματος, παρουσιάζουν έλλειψη σταθερότητας στον ορό, αδιαλυτότητα στο νερό και ανοσογονικότητα με αποτέλεσμα να οδηγούνται σε ταχεία αποικοδόμηση και αποτυχία. Η καινούργια γενιά φαρμάκων, βασισμένη στη νανοτεχνολογία, έρχεται να αντιμετωπίσει αυτά τα προβλήματα και να εξασφαλίσει ακριβέστερες, ασφαλείς και αποτελεσματικές θεραπείες.<sup>1,9</sup>

## 1.2. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Τα νανοσωματίδια είναι στερεά κολλοειδή σωματίδια με διαστάσεις που κυμαίνονται από 10 nm μέχρι <1000 nm. Ιδιαίτερα, στο εύρος διαστάσεων 1-100 nm, αποκτούν μοναδικές ιδιότητες καθώς λαμβάνουν χώρα ασυνήθιστα φυσικά και βιοχημικά φαινόμενα. Η μεγάλη αναλογία επιφάνειας προς όγκο τα καθιστά ελκυστικά για την ρύθμιση και διαχείριση της ύλης σε ατομική κλίμακα και τα διαφοροποιεί σημαντικά από τα μακροσκοπικά (bulk) υλικά. Την ιδιαιτερότητα της φύσης τους καθορίζει η ηλεκτρονιακή τους δομή, οι μαγνητικές, ηλεκτρικές και οπτικές τους ιδιότητες, η δραστηριότητα της επιφάνειάς τους και το συγκρίσιμο μέγεθός τους με αυτό των βιολογικών μορίων. Έχουν τη δυνατότητα να μεταφέρουν επιτυχώς μόρια φαρμάκου, μέσω της επιφανειακής προσρόφησης και δέσμευσης σε λιπίδια ή πολυμερή, ή της διάλυσης σε οργανική φάση η οποία εγκλωβίζεται στον πυρήνα πολυμερούς. Τα νανοσωματίδια μπορούν επίσης να τροποποιηθούν επιφανειακά, με σκοπό τη βελτίωση των φαρμακοκινητικών τους ιδιοτήτων.<sup>73</sup>



Εικόνα 1: Νανοσωματίδια ως συστήματα μεταφοράς φαρμάκων.

Στο τομέα της φαρμακευτικής τεχνολογίας, τα νανοσωματίδια σχεδιάζονται με στόχο να μιμηθούν ή να μεταβάλλουν βιολογικές διεργασίες. Αξίζει να σημειωθεί ότι με τα νέα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων, παρασκευάζονται βελτιωμένα φαρμακευτικά σκευάσματα για ήδη υπάρχουσες δραστικές ουσίες.

Λόγω της ιδιαίτερης φύσης τους, προσελκύουν το ενδιαφέρον πολλών επιστημόνων καθώς έχουν αποδειχθεί ότι δρουν εντοπισμένα στον πάσχοντα ιστό ή οργανισμό, καθορίζουν με ακρίβεια τη συγκέντρωση της θεραπευτικής ουσίας ενώ ελέγχουν τη διάρκεια δράσης του θεραπευτικού παράγοντα στον οργανισμό. Ακόμη, αυξάνουν τη σταθερότητα και τη βιοσυμβατότητα πολλών φαρμάκων ενώ ελαττώνονται δυσάρεστες παρενέργειες σε πολλές περιπτώσεις.<sup>4</sup>

### 1.3. ΜΕΓΕΘΟΣ-ΣΧΗΜΑ

Το μέγεθος και το σχήμα επηρεάζει την απόκριση του οργανισμού στα νανοσωματίδια και υπαγορεύει τη βιο-διανομή τους, την τοξικότητα και την ικανότητα να φτάσουν στα κύτταρα-στόχους.

Για διάμετρο μεγαλύτερη από 200 nm, έχει παρατηρηθεί ότι ενεργοποιείται το λεμφικό σύστημα και απομακρύνονται ταχύτερα τα νανοσωματίδια με τη κυκλοφορία του αίματος. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η ιδανική διάμετρος θεωρείται ότι βρίσκεται στη περιοχή κοντά στα 100 nm. Σε αυτό το μέγεθος, μπορεί να διαπεράσει επαρκή ποσότητα φαρμάκου τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, να εισέλθει μέσω του αναπνευστικού και να απορροφηθεί μέσω των στενών διασυνδέσεων των ενδοθηλιακών κυττάρων.<sup>2,73</sup>

### 1.4. ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ

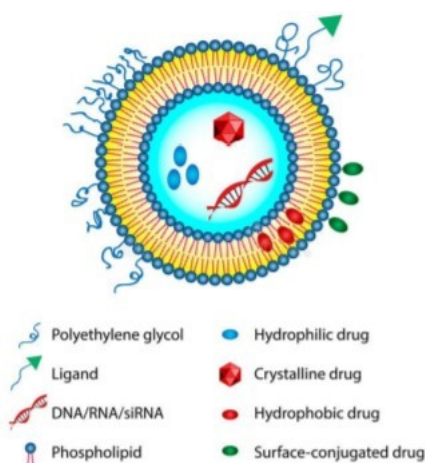
Νανοσωματίδια με δυναμικό ζ πάνω από 30 mV σε απόλυτη τιμή, έχουν δείξει αυξημένη σταθερότητα σε εναιώρημα, καθώς το επιφανειακό φορτίο αποτρέπει συσσωμάτωση. Το δυναμικό ζ μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να διευκρινιστεί



εάν μια δραστική ουσία που διαθέτει φορτίο, έχει εγκλειστεί στο εσωτερικό του νανοσωματιδίου ή έχει προσδεθεί επιφανειακά.

Τα νανοσωματίδια θα πρέπει να σχεδιαστούν κατάλληλα προκειμένου να μην προκαλέσουν ανοσολογική αντίδραση και απομακρυνθούν άμεσα από τον οργανισμό. Μια σημαντική παράμετρος που θα πρέπει να ρυθμιστεί για το σκοπό αυτό είναι η υδροφιλικότητα της επιφάνειάς τους. Όσο περισσότερο υδρόφοβα είναι τα νανοσωματίδια, τόσο πιο πιθανό είναι να απομακρυνθούν. Καθιστώντας τα νανοσωματίδια υδρόφιλα, παραμένουν για περισσότερο χρόνο μέσω του κυκλοφοριακού στον οργανισμό. Πράγματι επικαλύπτοντας την επιφάνεια με πολυμερή, επιφανειοδραστικές ουσίες ή συμπολυμερή όπως η πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (PEG), τα νανοσωματίδια προστατεύονται από την ανίχνευση από ειδικά αντισώματα και την απομάκρυνση ως ξένοι οργανισμοί (opsonization). Η πολυ(αιθυλενογλυκόλη) είναι υδρόφιλο και σχετικά αδρανές πολυμερές, το οποίο εμποδίζει την πρόσδεση των αντισωμάτων του πλάσματος με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η διέλευση του φαρμάκου στο αίμα μέχρι τα κύτταρα-στόχους.

Ένας άλλος ενδιαφέρων μηχανισμός ώστε να μην απορριφθεί το νανοσωματίδιο από τον οργανισμό είναι τα λιποσώματα, τα οποία μιμούνται την κυτταρική μεμβράνη. Τα λιποσώματα είναι φωσφολιπιδικά σφαιρικά κυστίδια, με μέγεθος εύρους 50-1000 nm και περιβάλλονται από μονή ή πολλαπλή λιπιδική διπλοστοιβάδα. Αποτελούνται από αμφίφιλα φωσφολιπίδια και στερόλη, τα οποία είναι δομικά υλικά της κυτταρικής μεμβράνης. Εκμεταλλευόμαστε το γεγονός αυτό καθώς επιταχύνεται έτσι η ροή φαρμάκου από το νανοφορέα στο κύτταρο-στόχο. Μπορούν επίσης να σχεδιαστούν κατάλληλα τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του λιποσώματος, όπως το μέγεθος και το φορτίο, καθώς και να τροποποιηθεί επιφανειακά όπως αναφέρθηκε παραπάνω.<sup>2,3,4</sup>



Εικόνα 2: Δομή λιποσώματος.

## 1.5. ΦΟΡΤΩΣΗ ΦΑΡΜΑΚΟΥ ΚΑΙ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ

Το μέγεθος και οι επιφανειακές ιδιότητες των νανοσωματιδίων εξετάζονται προκειμένου να βελτιωθεί η βιοδιαθεσιμότητα, να μην απορριφθεί από τον οργανισμό και να αυξηθεί η σταθερότητά τους. Με τη ρύθμιση των συγκεκριμένων χαρακτηριστικών, είναι πολύ πιθανό να φτάσει ο νανοφορέας σε ιστούς που δεν ήταν

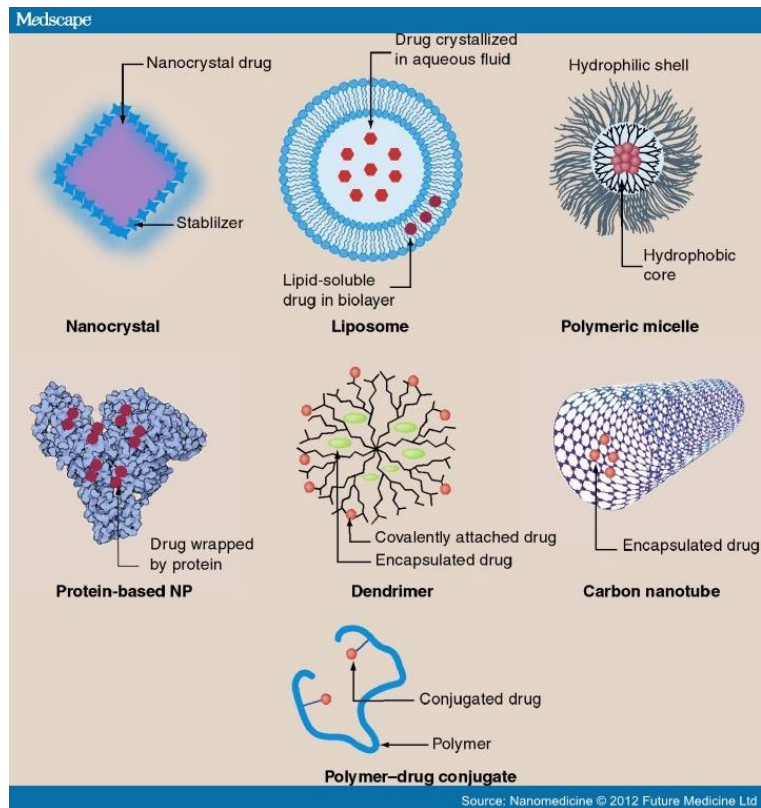


προσβάσιμοι νωρίτερα. Ωστόσο για να είναι ικανοποιητική η μέθοδος, θα πρέπει το φάρμακο να απελευθερωθεί αποτελεσματικά από τη μήτρα. Το προφίλ απελευθέρωσης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία, η διαλυτότητα, η πρόσδεση του φαρμάκου στη μήτρα, η δυνατότητα διάχυσης του φαρμάκου εκτός της μήτρας, η διόγκωση, τα χαρακτηριστικά του πολυμερούς και η αποικοδόμησή του.<sup>5</sup>

Ένας επιτυχημένος νανο-μεταφορέας φαρμάκου θα πρέπει να διαθέτει υψηλή ικανότητα φόρτωσης φαρμάκου και παράλληλα μειωμένη ποσότητα φορέα που απαιτείται για τον εγκλεισμό. Η φόρτωση του φαρμάκου μπορεί να συμβεί με δύο δυνατούς τρόπους. Σύμφωνα με τη μέθοδο εισαγωγής (incorporation method), η δραστική ουσία εγκλείεται κατά το σχηματισμό των νανοσωματιδίων. Στη μέθοδο της προσρόφησης (adsorption/absorption), πρώτα σχηματίζεται το σωματίδιο και έπειτα προσδένεται σε αυτό η δραστική ουσία. Για το σκοπό αυτό επωάζεται η νανο-μήτρα με πυκνό διάλυμα δραστικής ουσίας. Η διαλυτότητα της δραστικής ουσίας στη μήτρα καθορίζει τη φόρτωση φαρμάκου και την ικανότητα πρόσδεσης, ενώ εξαρτάται από παραμέτρους όπως το είδος του πολυμερούς, το μοριακό βάρος, τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους και την παρουσία λειτουργικών ομάδων (π.χ. εστέρες, καρβοξύλια) τόσο στο πολυμερές όσο και στην ουσία.<sup>6,9</sup>

## 1.6. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΝΑΝΟΦΟΡΕΩΝ

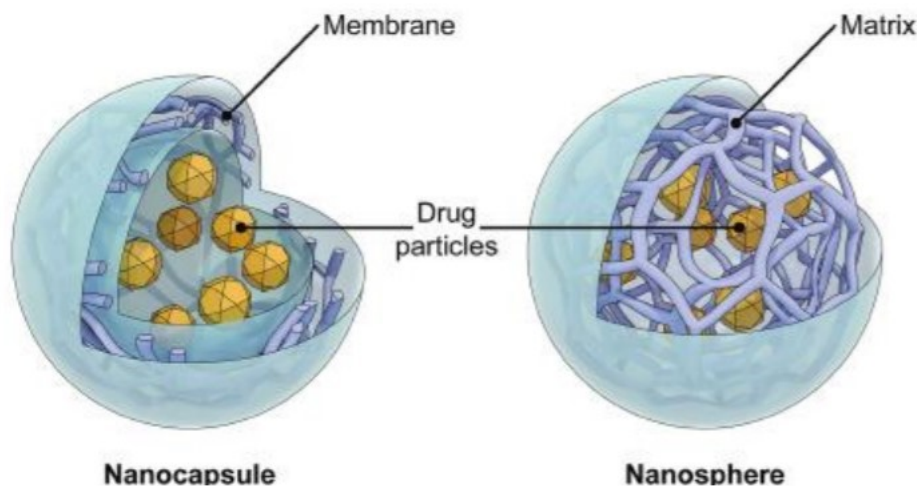
Τα νανοσωματίδια παρουσιάζουν κατάλληλες ιδιότητες προκειμένου να λειτουργήσουν ως «όχημα» για την μεταφορά φαρμάκων και τη διάγνωση σοβαρών ασθενειών όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, οι νευρολογικές παθήσεις, κλπ. Μερικές από τις κυριότερες κατηγορίες που έχουν αναπτυχθεί είναι τα μεταλλικά NPs, τα μαγνητικά NPs (Magnetic Nanoparticles, MNPs), τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs), τα νανοσωματίδια με βάση τα λιπίδια (λιποσώματα), τα δενδριμερή (διακλαδισμένα μακρομόρια), οι κβαντικές τελείες (Quantum dots, QDs), τα νανοσωματίδια άνθρακα (Carbon-based NPs).



Εικόνα 3: Κατηγορίες νανοφορέων.

### Πολυμερικά Νανοσωματίδια (Polymeric NPs)

Τα πολυμερικά νανοσωματίδια είναι κολλοειδή συστήματα με διάμετρο μικρότερη του 1  $\mu\text{m}$ . Διακρίνονται σε νανοκάψουλες (nanocapsules), νανοσφαίρες (nanospheres) και πολυμερικά μικκύλια ανάλογα με τη δομή τους. Αποτελούνται κυρίως από βιοσυμβατά και βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή όπως PLA, PLGA, πολυ(καπρολακτόνη), χιτοζάνη κ.α. Ο υγρός πυρήνας, στις νανοκάψουλες οδηγεί σε φυσαλιδώδη δομή, σε αντίθεση με τις νανοσφαίρες που είναι σωματίδια μήτρας (matrix particles), με ολόκληρη τη μάζα τους να είναι ομοιογενής. Τα πολυμερικά μικκύλια αποτελούνται από αμφίφυλα συμπολυμερή και διατάσσονται αυθόρμητα σε υδατικό περιβάλλον σε δομή μικκυλίου. Οι τύποι αυτοί πολυμερικών νανοσωματιδίων είναι ικανοί να εγκλείσουν υδρόφοβα μικρά μόρια ή μόρια με χαμηλή διαλυτότητα, πρωτεΐνες και μακρομόρια νουκλεϊκού οξέος αλλά και υδρόφιλα μόρια για στοχευμένη μεταφορά φαρμάκου. Η δραστική ουσία μπορεί να παγιδευτεί, να διασπαρθεί, να διαλυθεί ή να προσροφηθεί στα νανοσωματίδια ανάλογα με τη μέθοδο εγκλεισμού. Συγκεκριμένα, στις νανοκάψουλες το φάρμακο εγκλείεται στην κοιλότητα του υγρού πυρήνα και στις νανοσφαίρες εγκλωβίζεται ομοιόμορφα στη μήτρα του πολυμερούς.



Εικόνα 4: Σύγκριση δομής νανοκάψουλας και νανοσφαίρας.

Το βασικότερο πλεονέκτημα των πολυμερικών NPs είναι ότι επιτρέπουν την αργή και ελεγχόμενη απελευθέρωση του εκάστοτε φαρμάκου στις θέσεις-στόχους. Αναλυτικότερα, η αρχιτεκτονική τους δομή, τους προσδίδει την ικανότητα να μεταφέρουν με ασφάλεια και αποτελεσματικότητα τη φαρμακευτική ουσία στα κύτταρα-στόχους, ενώ η ενίσχυσή τους με ειδικούς προσδέτες, μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη πρόσληψη της ουσίας.<sup>6,7,8</sup>

Στις νανοσφαίρες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από ομοιόμορφη διασπορά του φαρμάκου στη μήτρα, η αποδέσμευση συμβαίνει λόγω αποικοδόμησης ή υδρόλυσης του πολυμερούς. Συνήθως το προφίλ απελευθέρωσης χαρακτηρίζεται από μία έντονη τάση αποδέσμευσης η οποία ακολουθείται από μία διαρκή, ελεγχόμενη ροή φαρμάκου σε χρονικό διάστημα ωρών ή ημερών, γεγονός που επηρεάζεται σημαντικά από τις αλληλεπιδράσεις του φαρμάκου στη μεγάλη επιφάνεια του πολυμερούς. Από την άλλη πλευρά στις νανοκάψουλες το προφίλ απελευθέρωσης εξαρτάται από την ικανότητα διάχυσης του φαρμάκου διαμέσου του στρώματος πολυμερούς.<sup>10</sup>

### Κυκλοδεξτρίνες

Διάφορες μήτρες αναμένεται να αυξήσουν τη διαλυτότητα και τη σταθερότητα ενώσεων για την αποτελεσματική μεταφορά τους. Οι κυκλοδεξτρίνες (Cyclodextrins, CD) είναι κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες φυσικής προέλευσης οι οποίοι τείνουν να σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού (Inclusion Complexes, ICs) τύπου ξενιστή-ξενιζομένου (host-guest). Ως φορέας, χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στη φαρμακευτική βιομηχανία, με σκοπό την προστασία της ένωσης, την κάλυψη δυσάρεστης γεύσης και οσμής, την μεταφορά της στον οργανισμό και τη διαλυτοποίησή της όταν πρόκειται για δυσδιάλυτο μόριο. Να σημειωθεί ότι οι κυκλοδεξτρίνες δε μπορούν να διαπεράσουν τις κυτταρικές μεμβράνες, ωστόσο αυξάνουν σημαντικά τη σταθερότητα και τη βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου στα κύτταρα-στόχους.<sup>11</sup>

## 2. ΝΑΝΟΦΟΡΕΙΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

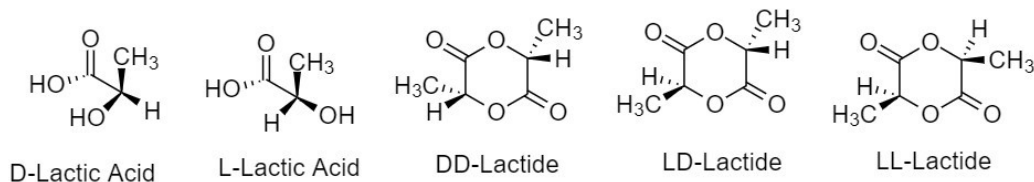
### 2.1. ΠΟΛΥ(ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ) (PLA)

#### 2.1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Το πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA) ανήκει στην κατηγορία των αλειφατικών πολυεστέρων αποτελούμενων κυρίως από α-υδροξυοξέα όπως το πολυ(γλυκολικό οξύ) (PGA), τα οποία θεωρούνται βιοδιασπώμενα και ασφαλή. Παρασκευάζεται από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας όπως το καλαμπόκι, το σάρι και το ζαχαροκάλαμο, είναι ανακυκλώσιμο και αποτελεί φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική σε σχέση με τα πετροχημικά πολυμερή. Είναι διαφανές σε άμορφη κατάσταση, ενώ με την αύξηση της κρυσταλλικότητας μειώνεται η διαφάνειά του και αποκτάει υπόλευκη απόχρωση.<sup>12</sup>

#### 2.1.2. ΔΟΜΗ

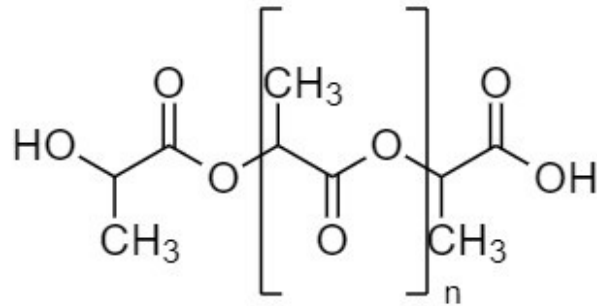
Λόγω της ύπαρξης στερεογονικού ατόμου άνθρακα, υπάρχουν δύο ισομερή του γαλακτικού οξέος, το L- και D- γαλακτικό οξύ. Καθώς τα μονομερή γαλακτικού οξέος είναι εναντιομερή μόρια, περιστρέφουν το επίπεδο πόλωσης του φωτός σε αντίθετες κατευθύνσεις. Όταν παράγεται λακτίδιο από το οπτικά ενεργό γαλακτικό οξύ, τρεις διαφορετικές στερεομορφές είναι πιθανές: Το LL-λακτίδιο, το οποίο προκύπτει από L-γαλακτικό οξύ, το DD-λακτίδιο που προέρχεται από D-γαλακτικό οξύ και το LD-λακτίδιο (μέσο-λακτίδιο), το οποίο σχηματίζεται από το συνδυασμό μίας L- και μίας D-λακτιδικής μονάδας. Οι ιδιότητες του παραγόμενου πολυμερούς, εξαρτώνται από την αναλογία των στερεοδομών, οι οποίες παρουσιάζονται παρακάτω:



Σχήμα 1: Στερεοχημεία του γαλακτικού οξέος και των λακτιδίων.<sup>13</sup>

Τα πολυμερή που προέρχονται από καθαρό L- ή καθαρό D- γαλακτικό οξύ ονομάζονται PLLA και PDLA αντίστοιχα ενώ ο πολυμερισμός του L,D-λακτιδίου (μέσο-λακτιδίου) σχηματίζει το ατακτικό PDLLA το οποίο είναι άμορφο. Τα εμπορικά διατιθέμενα PLA είναι συνήθως πλούσια σε L-ισομερές καθώς τα βακτήρια κατά τη ζύμωση παράγουν κυρίως L-γαλακτικό οξύ.<sup>14</sup>

Το πολυ(γαλακτικό οξύ) είναι ένα χειρόμορφο πολυμερές η δομή του οποίου παρουσιάζεται παρακάτω :



PLA

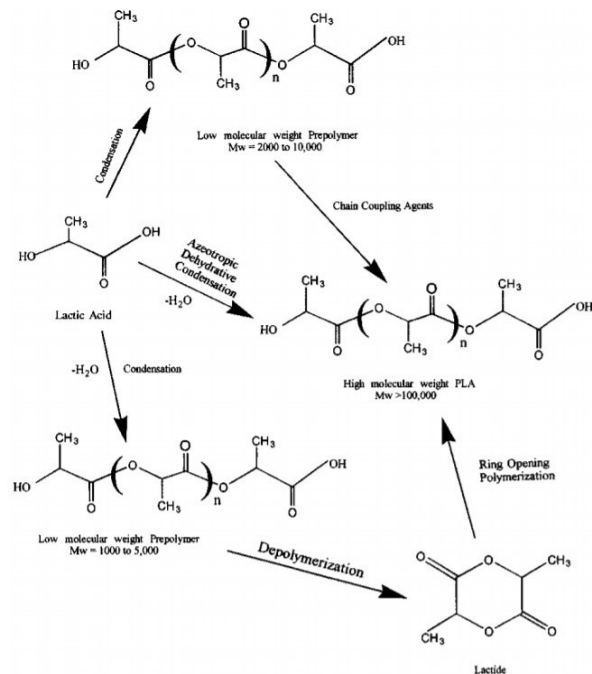
Σχήμα 2: Δομή PLA.

### 2.1.3. ΣΥΝΘΕΣΗ

Η σύνθεση του PLA σε υψηλά μοριακά βάρη ( $MW > 100,000$ ) πραγματοποιείται με δύο τρόπους:

A) Με τη διάνοιξη του δακτυλίου του λακτιδίου. Το γαλακτικό οξύ μετατρέπεται στο αφυδατωμένο κυκλικό διμερές, το λακτίδιο, μέσω πολυσυμπύκνωσης ακολουθούμενης από αποπολυμερισμό. Ακολουθεί πολυμερισμός του λακτιδίου με διάνοιξη δακτυλίου, με χρήση μεταλλικών καταλυτών. Η τεχνική αυτή μπορεί να διεξαχθεί με πολυμερισμό διαλύματος, αιωρήματος ή τήγματος ενώ ο μηχανισμός του πολυμερισμού μπορεί να είναι ιοντικός, συντονισμού ή ελευθέρων ριζών, ανάλογα με τον χρησιμοποιούμενο καταλύτη.

B) Με άμεση πολυσυμπύκνωση του γαλακτικού οξέος. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει δύο στάδια: Πρώτα σχηματίζεται ένα oligομερές με αντίδραση εστεροποίησης, και έπειτα ακολουθεί πολυσυμπύκνωση παρουσία καταλύτη, σε χαμηλή πίεση και υψηλή θερμοκρασία. Οι καταλύτες που χρησιμοποιούνται ευρέως για το 2<sup>ο</sup> στάδιο είναι ενώσεις με κασσίτερο (IV) οι οποίες επιδεικνύουν χαμηλή τοξικότητα καθώς και τιτάνιο (IV) όπως τετραβουτοξείδιο του τιτανίου ( $Ti(BuO)_4$ ).



Σχήμα 3: Μέθοδοι σύνθεσης PLA.

Η σύνθεση με διάνοιξη του δακτυλίου εφαρμόζεται εμπορικά αλλά απαιτεί μεγάλο κόστος λόγω της δύσκολης διαδικασίας καθαρισμού του λακτιδίου, η παρουσία του οποίου υποβαθμίζει τις μηχανικές ιδιότητες και την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Από την άλλη πλευρά, η πολυσυμπύκνωση είναι λιγότερο δαπανηρή διεργασία, όμως παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα λόγω υψηλών θερμοκρασιών και απότομης αύξησης του ιξώδους, με αποτέλεσμα να παίρνουμε μειωμένα μοριακά βάρη. Αναπτύχθηκε λοιπόν μία νέα διεργασία, αναφερόμενη ως πολυσυμπύκνωση τήγματος, με σκοπό την παραλαβή υψηλού μοριακού βάρους PLLA με χαμηλό κόστος. Να σημειωθεί ότι οι ιδιότητες του πολυ(γαλακτικού οξέος) και των συμπολυμερών του που συντίθενται με τη μέθοδο της πολυσυμπύκνωσης, δεν διαφέρουν σημαντικά από εκείνες των πολυμερών που λαμβάνονται μέσω πολυμερισμού του λακτιδίου.<sup>12</sup>

#### 2.1.4. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Διάφοροι παράγοντες καθορίζουν το βαθμό κρυσταλλικότητας, όπως το μοριακό βάρος, η θερμική προϊστορία του υλικού, η θερμοκρασία και ο χρόνος ανόπτησης. Αναλόγως την κρυσταλλικότητα, διαφέρουν οι μηχανικές ιδιότητες και ο ρυθμός αποικοδόμησης. Γενικά παρατηρείται μεγαλύτερη σταθεροποίηση των μηχανικών και θερμικών ιδιοτήτων του PLLA για μοριακά βάρη μεγαλύτερα από 70,000. Παρακάτω παρατίθεται ένας συνοπτικός πίνακας με τις κυριότερες ιδιότητες του PLLA και του PDLLA:

**Πίνακας 1: Σύγκριση φυσικοχημικών ιδιοτήτων των PLLA και PDLLA.<sup>16</sup>**

<b>ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ</b>	<b>L-PLA</b>	<b>D,L-PLA</b>
Σημείο ναλώδους μετάπτωσης ( $T_g$ )	60-65 °C	50-60 °C
Σημείο τήξεως ( $T_m$ )	184 °C	άμορφο
Ειδικό βάρος	1.24	1.25
Αντοχή σε εφελκυσμό (MPa)	55.2-82.7	27.6-41.4
Επιμήκυνση (%)	5-10	3-10
Μέτρο ελαστικότητας (MPa)	2758-4137	1379-2758
Εσωτερικό ιξώδες (dl/g)	0.90-1.2	0.55-0.75

Η διαλυτότητα του PLA εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη μοριακή μάζα, το βαθμό κρυσταλλικότητας, καθώς και από την παρουσία άλλων μονομερών μέσα στο πολυμερές. Χλωριωμένοι ή φθοριωμένοι οργανικοί διαλύτες, διοξάνιο και φουράνιο αποτελούν καλούς διαλύτες του L εναντιομερούς. Αντίθετα, το άμορφο PDLLA είναι διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες, όπως η ακετόνη, η πυριδίνη, το τετραϋδροφουράνιο, ο οξικός αιθυλεστέρας, το διμεθυλο σουλφοξείδιο.

Ως προς τις θερμικές ιδιότητες, το εναντιομερές PLA είναι ένα ημικρυσταλλικό, θερμοπλαστικό πολυμερές με κρυσταλλικότητα γύρω στο 37%, θερμοκρασία ναλώδους μετάπτωσης  $T_g=60-65$  °C και θερμοκρασία τήξης  $T_m=173-184$  °C η οποία επιτρέπει την εύκολη επεξεργασία του. Μορφοποιείται εύκολα με εκβολή, έγχυση σε καλούπι και μόρφωση με έγχυση, έκταση και φύσημα (injection stretch blow molding) σε ίνες, φιλμ, μπουκάλια.

Αποικοδομείται με υδρόλυση του εστερικού δεσμού σε γαλακτικό οξύ, με θερμική επεξεργασία πάνω από 200 °C, ενώ υπόκειται σε οξειδωτική διάσπαση της κύριας αλυσίδας και αντιδράσεις διεστεροποίησης (transesterification). Το PLA διαθέτει σχετικά χαμηλό ρυθμό αποικοδόμησης που εξαρτάται από την κρυσταλλικότητα, το μοριακό βάρος, τη μορφολογία, το ρυθμό διάχυσης του νερού μέσα στο πολυμερές και την αναλογία σε στερεοϊσομερή.

Ως προς τις μηχανικές του ιδιότητες, διαθέτει ένα εύρος ιδιοτήτων, από εύκαμπτα και μεγάλης ελαστικότητας πολυμερή μέχρι σκληρά και ανθεκτικά. Η δομή του μπορεί να ελεγχθεί στερεοχημικά με κατάλληλη αναλογία των L- και D- ισομερών κατά τον πολυμερισμό, προκειμένου να πάρουμε υψηλού μοριακού βάρους, άμορφα ή κρυσταλλικά πολυμερή.<sup>15,16,18</sup>

### **2.1.5. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥ PLA ΣΤΗ ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ**

Το PLA είναι σχετικά υδρόφοβο, με αποτέλεσμα τη χαμηλή συγγένεια με τα κύτταρα και την πιθανότητα πρόκλησης φλεγμονώδους αντίδρασης στο ζωντανό οργανισμό. Επιπλέον είναι βιοσυμβατό και χημικά αδρανές εάν δεν υποστεί επιφανειακή τροποποίηση και μπορούμε να ελέγξουμε το ρυθμό αποικοδόμησης.<sup>19</sup> Η επιλογή του PLA ως πολυμερική μήτρα στα συστήματα μεταφοράς φωτοευαίσθητων ουσιών είναι



μία καινοτόμα εφαρμογή, η οποία μπορεί να συμβάλλει στη βέλτιστη αξιοποίηση των πλεονεκτημάτων της φωτοδυναμικής θεραπείας (PDT) στη θεραπεία του καρκίνου και άλλων χρόνιων νοσημάτων.<sup>20</sup>

Η υπερικίνη είναι μία φυσική φωτοδιασπαστική ουσία της οικογένειας των ναφθοδιανθρονών που προέρχεται από το φυτό *Hypericum perforatum* ή κοινώς βάλσαμο, η οποία εμφανίζει θεραπευτική και διαγνωστική αντικαρκινική δράση. Η υδροφοβικότητα ωστόσο της ένωσης, αποτελεί εμπόδιο στην αποτελεσματική χορήγησή της στα κύτταρα-στόχους. Προκειμένου να ξεπεραστεί το εμπόδιο αυτό, πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός σε νανοσωματίδια PLA με μέγεθος σωματιδίων 200-300 nm και ποσοστό φόρτωσης φαρμάκου 0.03 με 0.15% (w/w). Η φωτοδιάσπαση μελετήθηκε *in vitro* σε καρκινικές σειρές κυττάρων των ωοθηκών NuTu-19 και διαπιστώθηκε ότι τα νανοσωματίδια παρουσίασαν υψηλότερη δραστηριότητα σε σχέση με την καθαρή ένωση. Κύρια παράμετρος της φωτοδιασπαστικής δράσης αποτελεί η συγκέντρωση της δραστηρικής ουσίας που εγκλείεται.<sup>21</sup>

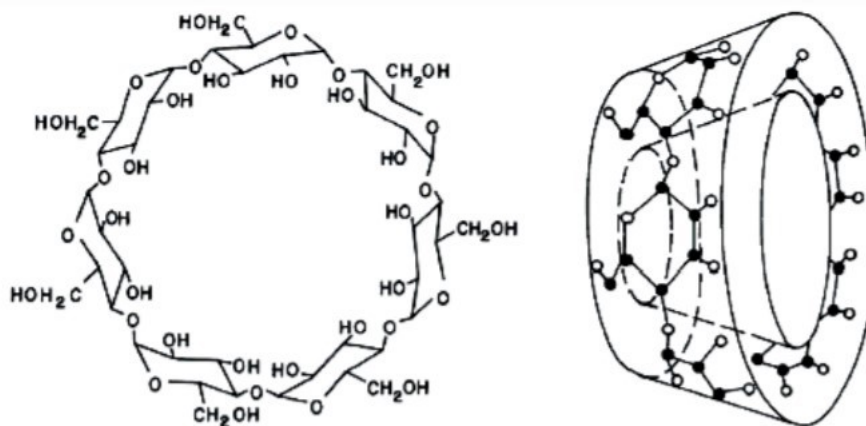
Προκλινικές μελέτες με εγκλεισμό πορφυρινών ως φωτοδιασπαστικές ουσίες, σε νανοσωματίδια PLA έχουν διεξαχθεί για την αντιμετώπιση της ραγοειδίτιδας με χοριοειδική νεοαγγείωση, μιας σπάνιας φλεγμονής που σχετίζεται με τον εκφυλισμό της ωχράς κηλίδας. Η ουσία με τα πιο ενθαρρυντικά αποτελέσματα ήταν η meso-τετραφαινυλοπορφυρίνη (TPP). Η επίδραση της λιποφιλικότητας της φωτοδιασπαστικής ουσίας στην απόδοση εγκλεισμού, η ικανότητα φωτοθρόμβωσης και οι επιπτώσεις εξαγγείωσης μελετώνται με χρήση χωριοαλλαντοϊκής μεμβράνης εμβρύου κοτόπουλου (chick chorioallantoic membrane) ως *in vivo* μοντέλο.<sup>22</sup>

## 2.2. ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ

### 2.2.1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί (Κεφ. 1.6.) οι κυκλοδεξτρίνες (Cyclodextrins, CD) είναι μία οικογένεια κυκλικών ολιγοσακχαριτών, που αποτελούνται από μόρια D-γλυκοπυρανόζης συνδεδεμένα μεταξύ τους με  $\alpha$ -1,4-γλυκοζιτικό δεσμό. Προκύπτουν από την υδρολυτική διάσπαση του αμύλου, παρουσία του ενζύμου γλυκοζυλοτρανσφεράση. Τα πιο κοινά φυσικά μόρια είναι οι  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - CD, οι οποίες σχηματίζονται από έξι, επτά και οκτώ μονάδες γλυκοπυρανόζης αντίστοιχα, και δημιουργούν κοιλότητες διαμέτρου 0.6, 0.8, 1.0 nm. Λόγω της δομής ανακλίντρου της μονάδας γλυκοπυρανόζης (Σχήμα 5a), το σχήμα του μορίου στο χώρο μοιάζει με κόλουρο κώνο, όπως φαίνεται παρακάτω:





Σχήμα 4: Χημική και τρισδιάστατη δομή των φυσικών CD.

Οι δευτεροταγείς υδροξυλομάδες των ατόμων C2 και C3 της γλυκόζης εντοπίζονται στη φαρδιά πλευρά του κώνου (δευτεροταγής πλευρά), ενώ εκείνες των ατόμων C6 είναι τοποθετημένες στη στενή πλευρά (πρωτοταγής πλευρά). Τα άτομα H1, H2 και H4 των C-H ομάδων που είναι τοποθετημένα στο εξωτερικό της κοιλότητας του μορίου και οι πολικές υδροξυλομάδες των σακχάρων που είναι διευθετημένες επίσης προς το εξωτερικό του κώνου προσδίδουν στην εξωτερική επιφάνεια των προσόψεων των CD's υδρόφιλο χαρακτήρα (Σχήμα 5b). Αυτή η διασπορά των πολικών ομάδων παρέχει την υδατοδιαλυτότητα σε αυτά τα υλικά. Το εσωτερικό του κώνου παρέχει ένα περιβάλλον χαμηλότερης πολικότητας από εκείνο του νερού και έτσι μπορεί να θεωρηθεί ως υδρόφοβη κοιλότητα, που ορίζεται στα δύο άκρα από τα H3, H5 των δεσμών C-H και στη μέση από τα οξυγόνα-γέφυρες των γλυκοζιτικών μονάδων, αιθερικά οξυγόνα (O4 και O5).<sup>11</sup> Παρακάτω παρουσιάζεται συνοπτικός πίνακας με τα κυριότερα χαρακτηριστικά των φυσικών κυκλοδεξτρινών:

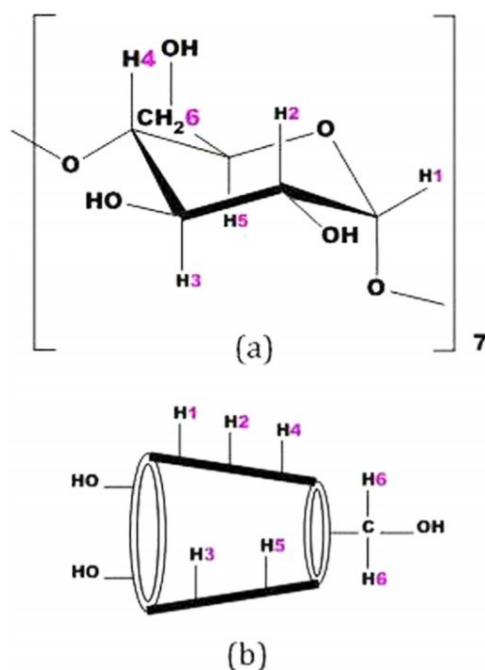
Πίνακας 2: Ιδιότητες κυκλοδεξτρινών.

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Μονάδες γλυκοπυρανόζης	6	7	8
Μοριακό βάρος (g/mol)	972	1135	1297
Διαλυτότητα στο νερό (T=25 °C), (%w/v)	14.5	1.85	23.2
Εξωτερική διάμετρος (Å)	14.6	15.4	17.5
Εσωτερική διάμετρος (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Ύψος κώνου (Å)	7.9	7.9	7.9
Όγκος κοιλότητας (Å <sup>3</sup> )	174	262	427

### 2.2.2. ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΣΥΜΠΛΟΚΟΥ

Σε υδατικό περιβάλλον, οι κυκλοδεξτρίνες σχηματίζουν σύμπλοκα εγκλεισμού με πολλά φάρμακα, φιλοξενώντας το μόριο ή το λιπόφιλο μέρος του μορίου στο εσωτερικό της κοιλότητας. Μη ομοιοπολικοί δεσμοί (π.χ. Van der Waals)

σχηματίζονται ενώ τα μόρια που δεσμεύονται από την CD βρίσκονται σε ισορροπία με τα ελεύθερα μόρια στο υδατικό περιβάλλον. Η δημιουργία του συμπλόκου ευνοείται θερμοδυναμικά λόγω της απελευθέρωσης των μορίων νερού από το εσωτερικό της άπολης κοιλότητας, την αύξηση των δεσμών H καθώς τα μόρια νερού επιστρέφουν στο υδατικό περιβάλλον και την σταθεροποίηση μέσω των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων που επικρατούν μεταξύ της ένωσης και της εσωτερικής επιφάνειας της κοιλότητας.



Σχήμα 5: (α) Στερεοχημική διαμόρφωση της β-CD.  
(β) Δομή κώλου κώνου της CD και θέση εσωτερικών και εξωτερικών πρωτονίων.<sup>24</sup>

Το μέγεθος της κοιλότητας καθορίζει την ικανότητα δημιουργίας συμπλόκου, ενώ το ύψος της κοιλότητας είναι το ίδιο και για τις τρεις φυσικές κυκλοδεξτρίνες, αλλάζει η διάμετρος της κοιλότητας. Έτσι, με α-CD μπορούν να συμπλοκοποιηθούν ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους ή με αλειφατικές δομές, σε β-CD φιλοξενούνται ιδανικά αρωματικές ή ετεροκυκλικές ενώσεις και σε γ-CD μεγαλύτερα μόρια όπως μακροκυκλικές ενώσεις και στεροειδή.

### 2.2.3. ΚΥΚΛΟΔΕΞΤΡΙΝΕΣ ΩΣ ΦΟΡΕΙΣ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ

Είναι μη τοξικά συστατικά, δεν απορροφώνται από το γαστρεντερικό σύστημα και μεταβολίζονται πλήρως από τη μικροχλωρίδα του παχέως εντέρου. Ακόμη έχει αποδειχθεί ότι δε προκαλούν ερεθισμό και έτσι βελτιώνουν την απορρόφηση του φαρμάκου όταν πρόκειται για διαδερμική, ρινική ή στοματική χορήγηση. Φιλοξενούν αποτελεσματικά αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικούς παράγοντες ενώ *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για αντιεπιληπτικά και αντικαρκινικά σύμπλοκα CD.<sup>23,25</sup>

Να σημειωθεί ότι οι κυκλοδεξτρίνες δε μπορούν να διαπεράσουν τις κυτταρικές μεμβράνες λόγω της χημικής τους δομής και του μοριακού βάρους. Μόνο η ελεύθερη μορφή του φαρμάκου είναι δυνατό να διαπεράσει τις λιπόφιλες μεμβράνες. Ωστόσο

αυξάνουν σημαντικά τη σταθερότητα και τη βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου μέχρι να προσεγγίσουν τα κύτταρα-στόχους. Για να επιτευχθεί σωστή βιοδιαθεσιμότητα θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί μόνο η απαραίτητη ποσότητα κυκλοδεξτρίνης για τη διαλυτοποίηση της ένωσης, καθώς περίσσεια του φορέα μπορεί να επιδράσει αντιστρόφως.<sup>11</sup>

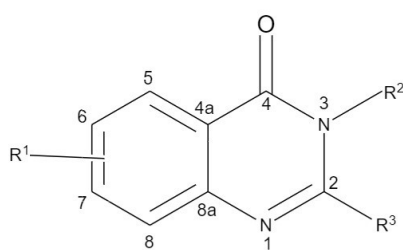
Η υδατοδιαλυτότητα και η εκλεκτικότητα των CD (κυρίως της β-) στον ξενισμό βιοδραστικών ουσιών μπορεί να βελτιωθεί με αλκυλίωση και υδροξυαλκυλίωση. Οι υδροξυλομάδες C2, C3, C6 είναι πιθανά σημεία τροποποίησης. Οι υδροξυλομάδες των C6 είναι πιο δραστικές από αυτές των C2, C3. Δημιουργούνται έτσι παράγωγα με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες και βελτιωμένη ικανότητα εγκλεισμού υδρόφοβων μορίων.<sup>26</sup> Ακόμη, με τον τρόπο αυτό μπορεί να ελεγχθεί το προφίλ απελευθέρωσης της ουσίας αναλόγως τη διαλυτότητα της ένωσης, την εφαρμογή και τον τρόπο χορήγησης του φαρμάκου. Μία ακόμη μέθοδος βελτίωσης της βιοδιαθεσιμότητας και της ικανότητας απορρόφησης του εγκλεισμένου φαρμάκου είναι με τροποποίηση της κυκλοδεξτρίνης με πολυμερή.<sup>27</sup>

Τέλος, τα αποτελέσματα μελετών δείχνουν ότι η μη τροποποιημένη β-CD βιοαποικοδομείται μέχρι και 100%, σε σύντομο χρονικό διάστημα (εντός ολίγων ημερών). Ενισχύεται λοιπόν η καταλληλότητά της για φαρμακευτική χρήση.<sup>28</sup>

### 3. ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΟΝΕΣ

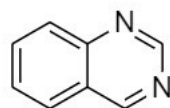
#### 3.1. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Οι κιναζολινόνες είναι συντηγμένες ετεροκυκλικές αζωτούχες ενώσεις οι οποίες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη φαρμακευτική χημεία καθώς διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών και θεραπευτικών ιδιοτήτων. Οι δομές αυτές διακρίνονται για τη δυνατότητά τους να λειτουργούν ως αντιβακτηριακά, αντιμυκητιακά, αντιφλεγμονώδη, σπασμολυτικά, υπνωτικά, αντιφυματικά, αντιδιαβητικά, αντικαρκινικά, αντί-HIV φάρμακα κ.α.<sup>29,33</sup>

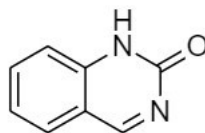


Σχήμα 6: Βασική δομή κιναζολινόνης.

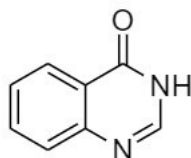
Το 1869 ο P. Gries σύνθεσε την πρώτη κινολινόνη, την 2-κυάνοκινολιν-4(3H)-όνη. Οι κινολινόνες διαθέτουν τη βασική δομή της κινολίνης, μιας κατηγορίας ετεροκυκλικών ενώσεων, στην οποία προστίθεται μία καρβονυλική ομάδα. Διαφορετικό προφίλ υποκατάστασης του καρβονυλίου έχει ως αποτέλεσμα διαφορετικές ισομερείς μορφές, όπως για παράδειγμα η 2(1H)κινολινόνη και η 4(3H)κινολινόνη, ενώ έχει καταγραφεί και μία δικαρβονυλική ένωση, η 2,4(1H,3H)κινολινοδιόνη.<sup>30</sup> Οι δομές των μορίων αυτών παρατίθενται παρακάτω:



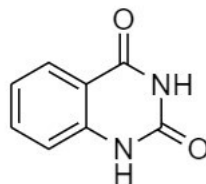
κιναζολίνη



2(1H)κιναζολινόνη



4(3H)κιναζολινόνη



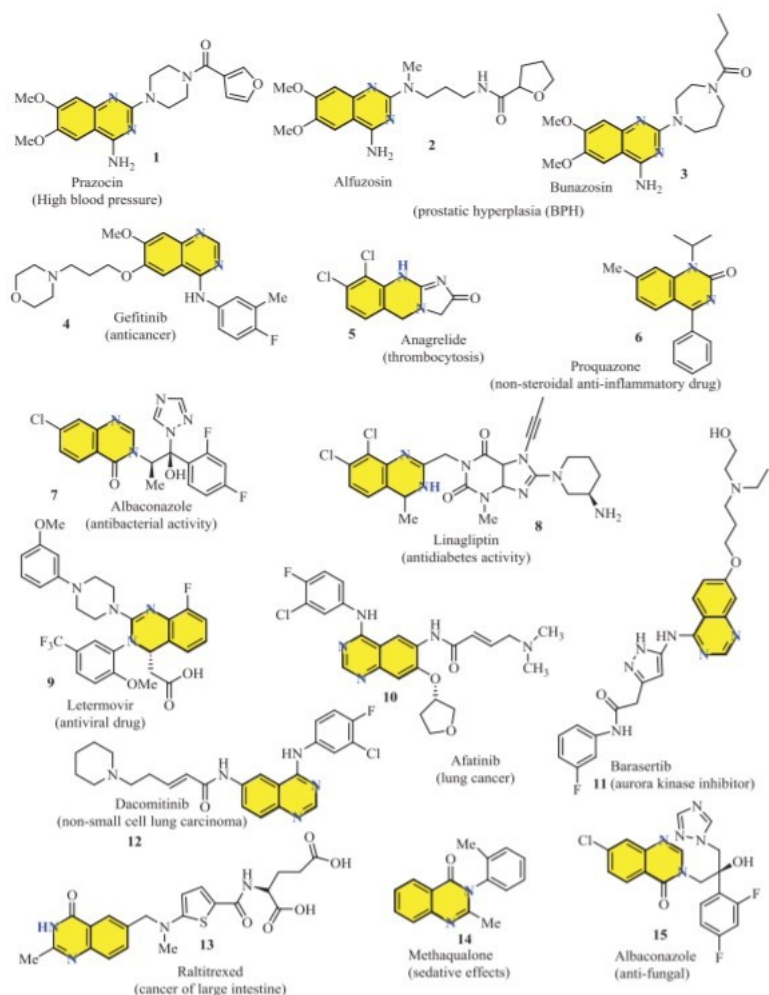
2,4(1H,3H)κιναζολινοδιόνη

Σχήμα 7: Δομές κιναζολίνης, ισομερών κιναζολινονών και κιναζολινοδιόνης.

## 3.2. ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

### 3.2.1. ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ

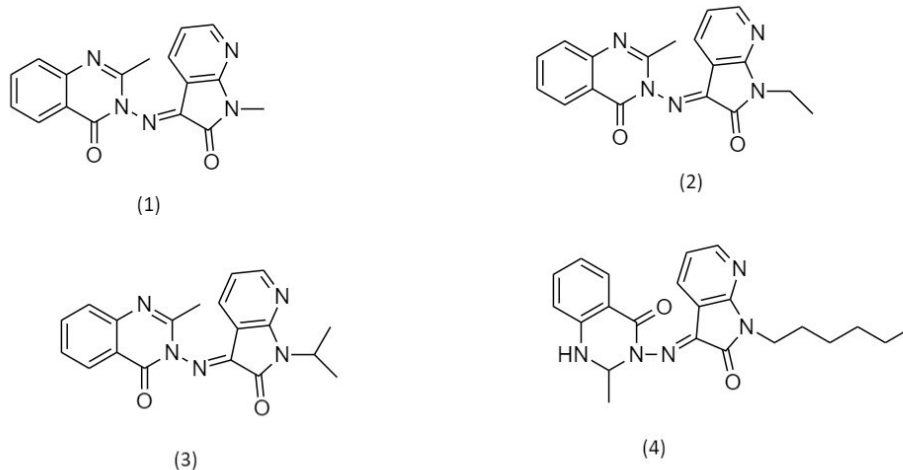
Διάφορα φάρμακα διακινούνται εμπορικά τα οποία αποτελούν κιναζολινονικά παράγωγα, όπως η υδροχλωρική πραζοσίνη, η αλφουζοσίνη, η γεφτινίμπη κ.α. Ορισμένες διαδεδομένες ενώσεις κιναζολινόνης με εμπορική διάθεση είναι η ραλιτιρεξίδη που χορηγείται για τη θεραπεία του καρκίνου του παχέως εντέρου, η μεθακαλόνη που διαθέτει ηρεμιστικές ιδιότητες και η ένωση προquazone η οποία είναι μια μη στεροειδής, αντιφλεγμονώδης ουσία. Οι δομές ορισμένων κιναζολινών/κιναζολινονικών δραστικών ουσιών του εμπορίου παρουσιάζονται παρακάτω:



Σχήμα 8: Δομές εμπορικά διαθέσιμων φαρμάκων παραγώγων κιναζολινών/κιναζολινονών.<sup>30</sup>

### 3.2.2. ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ

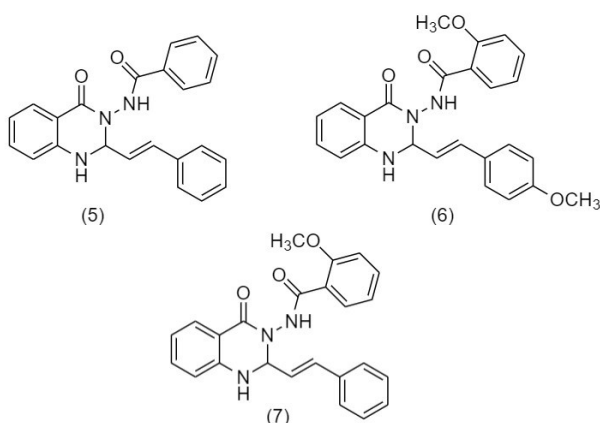
Οι ενώσεις azaisatins είναι βιολογικά ενεργά μόρια με αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Συντέθηκαν παράγωγα 4(3*H*)-κιναζολινονών με τις ενώσεις azaisatins, τα οποία μελετήθηκαν *in vivo* και *in vitro*, για τη δυνατότητα αντιφλεγμονώδους δράσης σε θετικά (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*) και αρνητικά (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) κατά Gram βακτήρια, καθώς και σε ορισμένα μυκητιακά είδη (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans* και *Fusarium oxysporium*). Οι δομές που μελετήθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω:



Σχήμα 9: Νέα κιναζολινονικά παράγωγα με αντιμικροβιακή δράση.

Από τις παραπάνω, η ένωση (4) με υποκαταστάτη  $-C_6H_{13}$  παρουσίασε τη μεγαλύτερη δράση, τόσο στα θετικά όσο και στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, αλλά και στους τέσσερις μύκητες. Τα αποτελέσματα μετρήθηκαν με βάση πρότυπων ουσιών σιπροφλοξασίνης και φλουκοναζόλης.<sup>31</sup>

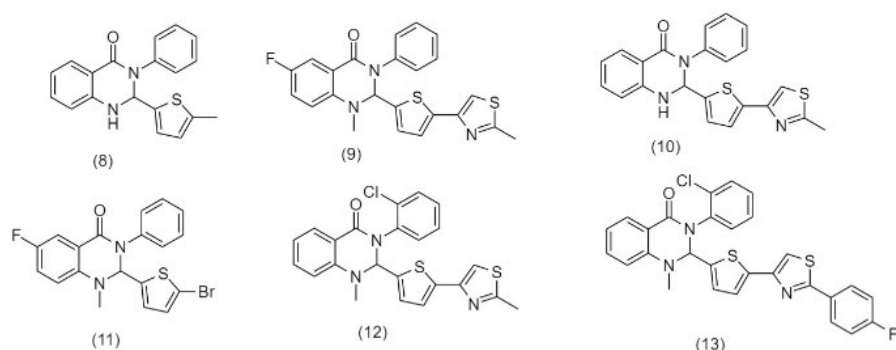
Κιναζολινονικά παράγωγα που περιέχουν 3-ακρυλαμιδικούς υποκαταστάτες αξιολογήθηκαν ως προς τη δράση τους έναντι τεσσάρων φυτοπαθογόνων μυκήτων με μέτρηση της ελάχιστης ανασταλτικής πυκνότητας ΕΑΠ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC). Ένα εύρος αντιμυκητιακών ιδιοτήτων παρουσίασαν οι ενώσεις (5-7) ενώ το προφίλ της υποκατάστασης παίζει καθοριστικό ρόλο στις ιδιότητες αυτές.<sup>32</sup>



Σχήμα 10: Κιναζολινονικά παράγωγα με αντιμυκητιακή δράση.

Τα Χλαμύδια είναι μέλη της οικογένειας *Chlamydiaceae* και είναι μικροί, μη κινητοί, Gram αρνητικοί, υποχρεωτικά ενδοκυττάριοι οργανισμοί που προσβάλλουν αποκλειστικά τον άνθρωπο και αντιμετωπίζεται συνήθως με αντιβιοτικά. Άλλα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα όπως π.χ. η Ναϊσσερία της γονόρροιας ή το Μυκόπλασμα των γεννητικών οργάνων επιδεικνύουν αυξημένη ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά. Η ραγδαία εξάπλωση της ανθεκτικότητας των βακτηρίων αυτών στο αντιβιοτικό αζιθρομυκίνη, αποδίδεται στην συχνή χρήση του από τους ασθενείς με λοίμωξη από χλαμύδια. Καθίσταται σημαντική η ανακάλυψη ορισμένων νέων

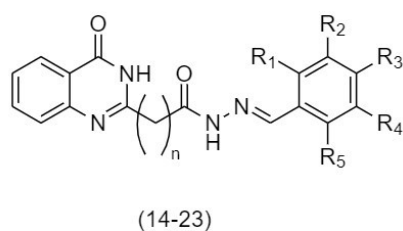
ενώσεων προκειμένου να ξεπεραστεί η βακτηριακή ανθεκτικότητα.<sup>30</sup> Κιναζολινονικά παράγωγα με υποκαταστάτες θειόλες και θειαζόλες, λειτουργούν ως αντι-χλαμυδικοί παράγοντες, οι δομές των οποίων παρατίθενται παρακάτω:



Σχήμα 11: Μόρια με αντι-χλαμυδική δράση.

### 3.2.3. ΑΝΤΙΟΞΙΝΗ ΔΡΑΣΗ

Μία σειρά κιναζολινονικών παραγώγων βάσεων κατά Schiff συντέθηκε και αξιολογήθηκε *in vitro* για τη ρύθμιση της γαστρικής έκκρισης οξέος. Ο μηχανισμός δράσης περιλαμβάνει την αναστολή του ενζύμου H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPάση, της αντλίας δηλαδή των πρωτονίων του κυτταρικού τοιχώματος, το οποίο είναι υπεύθυνο για το όξινο pH του στομάχου. Τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένη δραστηριότητα ορισμένων παραγώγων, ακόμη και σε σύγκριση με την πρότυπη φαρμακευτική ουσία ομεπραζόλη. Η δομή των ενώσεων αυτών παρουσιάζεται παρακάτω:



n=2	n=3	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
14	15	H	H	OH	H	H
16	17	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H
18	19	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H
20	21	H	H	Cl	H	H
22	23	H	H	NO <sub>2</sub>	H	H

Σχήμα 12: Δομή κιναζολινονικών παραγώγων με αντιόξινη δράση.

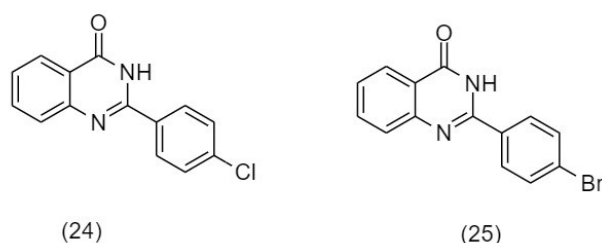
Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι οι ενώσεις 14-19 οι οποίες διαθέτουν υποκαταστάτες δότες ηλεκτρονίων (OH, CH<sub>3</sub>) συνεισφέρουν θετικά στην αναστολή του ενζύμου, ενώ οι ενώσεις 20-23 με υποκαταστάτες δέκτες ηλεκτρονίων (Cl και NO<sub>2</sub>), εμφάνισαν λιγότερη δραστηριότητα.



Ορισμένα κιναζολινονικά παράγωγα βάσεις κατά Schiff εμφανίζουν επίσης αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Οι *in vitro* μετρήσεις της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ενώσεων αυτών πραγματοποιήθηκαν με μετρήσεις προτύπου ασκορβικού οξέος, γαλλικού οξέος, βουτυλιωμένου υδροξυτολουόλιου (BHT), με μέθοδο DPPH κ.α. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ενώσεις με υποκαταστάτες δότες ηλεκτρονίων (OH, CH<sub>3</sub>) είχαν καλό αντιοξειδωτικό χαρακτήρα και οι ενώσεις με υποκαταστάτες δέκτες ηλεκτρονίων (Cl, NO<sub>2</sub>), διέθεταν καλή αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα.<sup>34</sup>

### 3.2.4. ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Η α-γλυκοσιδάση είναι ένα ένζυμο το οποίο βρίσκεται στο επιθήλιο του λεπτού εντέρου και καταλύει την υδρόλυση των δισακχαριτών και πολυσακχαριτών σε γλυκόζη. Η αναστολή της είναι σημαντική για τη ρύθμιση της μεταγευματικής γλυκόζης στο αίμα που ακολουθεί τη λήψη ενός υδατανθρακικού γεύματος. Οι ενώσεις 2-(4-χλωροφαίνυλο)-κιναζολιν-4(3*H*)-όνη και 2-(4-βρωμοφαίνυλο)-κιναζολιν-4(3*H*)-όνη επέδειξαν σημαντική ανασταλτική δράση της α-γλυκοσιδάσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ενώσεις αυτές λειτουργούν με αντιστρεπτό και μη ανταγωνιστικό τρόπο ως αναστολείς της α-γλυκοσιδάσης και καθίστανται πιθανοί φορείς της θεραπείας του διαβήτη.<sup>35</sup>

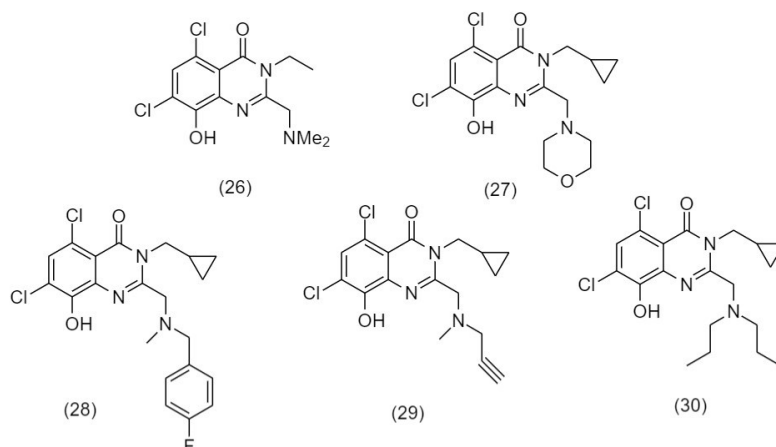


Σχήμα 13: Ενώσεις κιναζολινονης με αντιδιαβητική δράση.

### 3.2.5. ΔΡΑΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝ

Η νόσος Πάρκινσον είναι μία προοδευτική νευροεκφυλιστική διαταραχή που σχετίζεται με την έλλειψη ντοπαμίνης και τη συσσώρευση παθολογικών σωμάτων πρωτεϊνών, των Lewy Bodies, στους νευρώνες. Αποτελεί μία ιδιοπαθή νόσο του νευρικού συστήματος και χαρακτηρίζεται από κινητικές και μη κινητικές εκδηλώσεις. Τα φάρμακα για τη θεραπεία της νόσου Πάρκινσον βασίζονται στην λεβοντόπα ή L-DOPA, η οποία είναι μία κατεχολαμίνη, πρόδρομο μόριο ντοπαμίνης, καθώς και άλλους ντοπαμινεργικούς αγωνιστές. Η θεραπεία υποκατάστασης με ντοπαμίνη, έχουν εκδηλώσει παρενέργειες κυρίως στην περίπτωση μακροχρόνιας θεραπείας. Μελετήθηκαν κιναζολινονικά παράγωγα τα οποία διαθέτουν νευρολογική ενεργότητα (μέσω δοκιμασιών νευροτοξικότητας, με κύτταρα νευρώνων του φλοιού του εγκεφάλου και ανθρώπινα κύτταρα M17 νευροβλαστώματος), ως πιθανοί θεραπευτικοί παράγοντες για τη νόσο του Πάρκινσον.<sup>30,36</sup> Οι δομές ορισμένων δραστικών μορίων παρουσιάζονται παρακάτω:

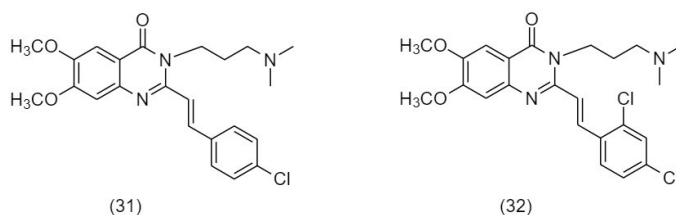




Σχήμα 14: Μόρια που μελετήθηκαν με αντιπαρκινσονική δράση.

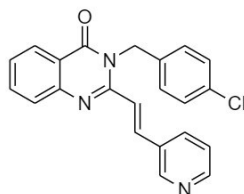
### 3.2.6. ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Το p53 είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο, το οποίο βρίσκεται μεταλλαγμένο σε όλους τους ανθρώπινους όγκους με τη μεγαλύτερη συχνότητα. Η παρεμπόδιση της δράσης του μεταλλαγμένου γονιδίου p53 και ο έλεγχος της απόκρισης των καρκινικών κυττάρων με μη τοξικές ουσίες αναμένεται να αντιμετωπίσει αποτελεσματικά διάφορους τύπους καρκίνου. Οι ενώσεις (31) και (32) παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα αντικαρκινικών επιδράσεων. Επιπλέον, η ένωση (31) δρα εκλεκτικά παρεμποδίζοντας την έκφραση του μεταλλαγμένου γονιδίου p53 με αποτέλεσμα την απόπτωση του καρκινικού κυττάρου.<sup>37</sup>



Σχήμα 15: Μόρια με αντικαρκινική δράση.

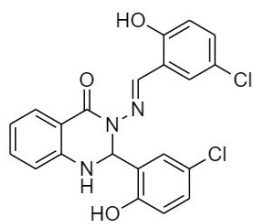
Το RAD51 είναι ένα ευκαρυωτικό γονίδιο το οποίο είναι υπεύθυνο για την έκφραση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση βλαβών της διπλής έλικας του DNA και το οποίο υπερεκφράζεται σε καρκινικούς όγκους που έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα σε φάρμακα, όπως στον καρκίνο του μαστού. Μελετήθηκαν σειρές ενώσεων κιναζολινονικών παραγώγων, τα οποία λειτουργούν ως πιθανοί παρεμποδιστές της έκφρασης του RAD51. Ενδεικτικά, τα αποτελέσματα μελέτης δομής δραστηριότητας έδειξαν ότι η ένωση (33) προκαλεί παρεμπόδιση της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων, έως και 15 φορές ισχυρότερη. Επιπλέον μειώθηκε σημαντικά η ευαισθησία στην επιδιόρθωση του DNA στον καρκίνο του μαστού. Δίνεται λοιπόν η δυνατότητα για μια νέα στοχευμένη αντικαρκινική θεραπεία με τη χρήση αυτών των ενώσεων ως πιθανών παραγόντων.<sup>38</sup>



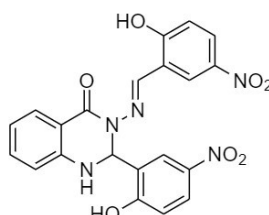
(33)

Σχήμα 16: Παράγωγο κιναζολινόνης με αντικαρκινικές ιδιότητες.

Σε άλλη έρευνα για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, μελετήθηκαν ορισμένα κιναζολινονικά παράγωγα βάσεις κατά Schiff, τα οποία αξιολογήθηκαν ως προς την κυτταροτοξικότητά τους έναντι υγιών και καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα συντέθηκαν οι ενώσεις 3-(5-χλώρο-2-υδροξυβενζυλιδεαμίνο)-2-(5-χλώρο-2-υδροξυφαινυλ)-2,3-διυδροκιναζολιν-4(1*H*)-όνη και η 3-(5-νιτρο-2-υδροξυβενζυλιδεαμίνο)-2-(5-νιτρο-2-υδροξυφαινυλ)-2,3-διυδροκιναζολιν-4(1*H*)-όνη οι οποίες μελετήθηκαν ως προς την επίδρασή τους στις κυτταρικές σειρές MCF-7, MDA-MB-231, MCF-10A και WRL-68 υγιών και καρκινικών κυττάρων. Παρατηρήθηκε ότι οι ενώσεις μπορούν να προκαλέσουν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων MCF-7 τόσο με ενδογενή (έλεγχος από τα μιτοχόνδρια) όσο και με εξωγενή (μέσω υποδοχέων TNFR και Fas) βιοχημικά μονοπάτια. Πιο αναλυτικά ενεργοποιούνται οι κασπάσες, οι οποίες είναι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην μεταβίβαση των αποπτωτικών σημάτων, με ακόλουθη παρεμπόδιση της πρωτεΐνης NF-κB, που ρυθμίζει τη μεταγραφή του DNA. Τέλος, οι ενώσεις δεν εμφάνισαν τοξική δράση στα υγιή κύτταρα κατά τα *in vivo* πειράματα, στις μετρούμενες συγκεντρώσεις.<sup>39,40</sup>



(34)



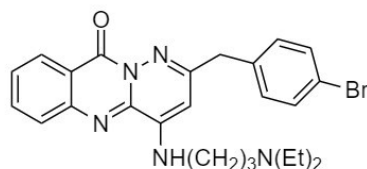
(35)

Σχήμα 17: Νέες συνθετικές κιναζολινόνες για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού.

### 3.2.7. DNA ΠΑΡΕΜΒΟΛΗ

Οι αλληλεπιδράσεις μικρών μορίων με το DNA είναι καθοριστικής σημασίας στις βιολογικές διεργασίες. Καθώς το DNA είναι ο στόχος πολλών αντικαρκινικών και αντικών θεραπειών, καθίσταται απαραίτητη η μελέτη των αλληλεπιδράσεων φαρμακευτικών ουσιών και DNA. Ως DNA παρεμβολείς συντέθηκαν και μελετήθηκαν *in vitro* και *in vivo* οι πυριδάζινο[1,6-*b*]κιναζολινόνες. Τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά, με τιμή IC<sub>50</sub> για τις ισχυρότερες ενώσεις κάτω του 1 μM. Ορισμένα παράγωγα των ενώσεων αυτών εμφάνισαν επίσης δράση αναστολέα τοποϊσομεράσης I. Οι τοποϊσομεράσες είναι μία ομάδα ενζύμων όπου δρα

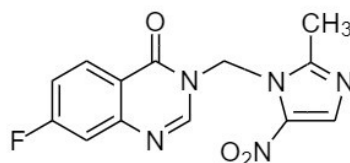
στην τοπολογία του DNA και προκαλεί ή καταργεί ρήγματα των ελικών του DNA. Έχουν εντοπιστεί πέντε είδη τοποϊσομεράσης, και αποτελούν σημαντικό στόχο των αντικαρκινικών παραγόντων. Η ένωση (36) που έφερε τη μεγαλύτερη δραστικότητα, επέδειξε δράση αναστολής του κυτταρικού κύκλου στη μεσόφαση (φάση G2) με αποτέλεσμα την απόπτωση σε καρκινικές σειρές γαστρικών κυττάρων (MGC-803). Συνοπτικά, η μελέτη υποστηρίζει την περαιτέρω αξιοποίηση των ενώσεων πυριδάζινο[1,6-*b*]κιναζολινόνης για την εφαρμογή τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες.<sup>41</sup>



(36)

Σχήμα 18: Δομή πυριδάζινο[1,6-*b*]κιναζολινόνης με αντικαρκινικές ιδιότητες.

Οι Peng και οι συνεργάτες του, συνέθεσαν μία νέα κατηγορία αζολο-κιναζολινονών οι οποίες εξετάστηκαν ως την ικανότητα να δράσουν ως παρεμβολείς του DNA. Ιδιαίτερα, η ένωση (37), η οποία είναι παράγωγο κιναζολινόνης με υποκατάστατη νιτρομιδαζόλιο, αναστέλλει την αντιγραφή του DNA μέσω της παρεμβολής της ένωσης στο DNA, ώστε να επιφέρει αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δραστικότητα.<sup>42</sup>



(37)

Σχήμα 19: Δομή αζολο-κιναζολινόνης με αντιμικροβιακή δράση DNA παρεμβολής.

## 4. ΦΥΣΙΚΟΙ ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΟΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ (Natural Deep Eutectic Solvents, NaDES)

### 4.1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ-ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

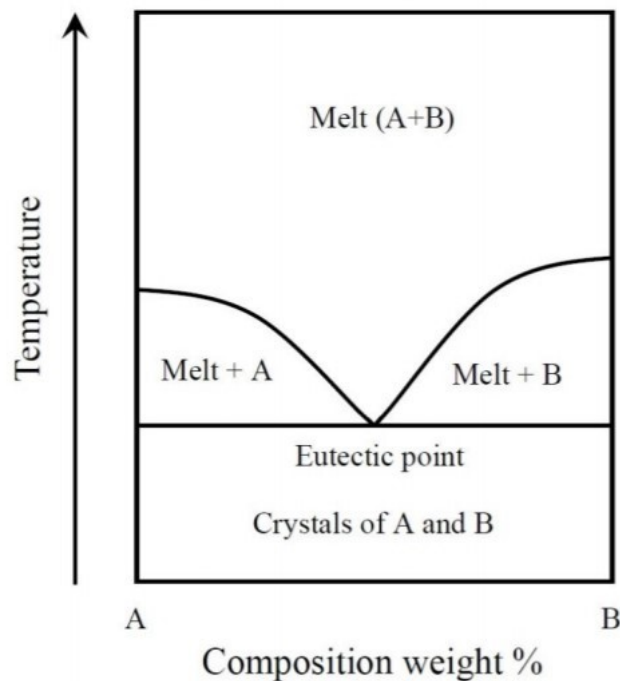
Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NaDES) αποτελούν μία νέα κατηγορία ευτηκτικών μειγμάτων, τα συστατικά των οποίων είναι φυσικά προϊόντα και κυρίως μεταβολίτες όπως σάκχαρα, πολυαλκοόλες, οργανικά οξέα, αμινοξέα, οργανικές βάσεις και παράγωγα χολίνης που απαντώνται στους οργανισμούς, με αποτέλεσμα να είναι πλήρως βιοαποικοδομήσιμα. Το σημείο τήξεως του μείγματος είναι σημαντικά χαμηλότερο από αυτό των καθαρών συστατικών και κάτω από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η πρώτη αναφορά στα NaDES δημοσιεύτηκε το 2011 από τον Choi και τους συνεργάτες του,<sup>43</sup> όπου μελετήθηκε η ύπαρξη ενός υποστρώματος στα

κύτταρα ζωντανών οργανισμών αποτελούμενου από φυσικά συστατικά που αφθονούν στους οργανισμούς όπως σάκχαρα, οργανικά οξέα, αμινοξέα κ.α.<sup>44</sup>

Τα NaDES προέκυψαν με την προοπτική να αντικαταστήσουν τους οργανικούς διαλύτες σε πλήθος εφαρμογών, καθώς και τα συνθετικά ιοντικά υγρά και DES κυρίως λόγω της τοξικότητας, της χαμηλής βιοσυμβατότητας και του περιβαλλοντικού αποτυπώματος των τελευταίων. Μερικές εφαρμογές των NaDES που ερευνώνται περισσότερο είναι η εκχύλιση βιοδραστικών ουσιών από φυσικά προϊόντα, η χρήση τους στο υπόστρωμα ενζυμικών και χημικών αντιδράσεων, η σταθεροποίηση ασταθών ενώσεων, η διαλυτοποίηση μακρομορίων όπως πολυσακχαρίτες και λιγνίνη, η μεταφορά δυσδιάλυτων φαρμακευτικών μορίων κ.α. Χρησιμοποιούνται επιπλέον σε ηλεκτροχημικές εφαρμογές ως αγωγίμο υλικό σε μπαταρίες, στις κυψέλες καυσίμων ή σε φωτοβολταϊκά κελιά άλλα και στη δέσμευση του ατμοσφαιρικού CO<sub>2</sub>.<sup>45,46</sup>

## 4.2. ΕΥΤΗΚΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Ένα ευτηκτικό σύστημα αντιπροσωπεύει ένα μείγμα δύο ή περισσότερων συστατικών που εμφανίζει ενιαία χημική σύσταση, και στερεοποιείται σε χαμηλότερη θερμοκρασία από οποιαδήποτε άλλη αναλογία. Το μείγμα βρίσκεται σε υγρή κατάσταση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ένα τυπικό διμερές διάγραμμα φάσεων μας παρέχει το ευτηκτικό σημείο, όπως φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 5: Διάγραμμα φάσης δυαδικού συστήματος.

Τα ευτηκτικά συστήματα με πολύ μεγάλη καταστολή του σημείου τήξεως στην περιοχή των 200°C ονομάζονται βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DES). Με βάση το διάγραμμα φάσεων που δίνεται, μπορούν να περιγραφούν πλήρως οι μεταβολές που συμβαίνουν κατά την άνοδο ή πτώση της θερμοκρασίας σε ένα μείγμα γνωστής σύστασης.

### 4.3. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΤΩΝ DES

Στις περισσότερες περιπτώσεις τα DES σχηματίζονται με την ανάμειξη ενός τεταρτοταγούς αμμωνιακού άλατος (π.χ. Χλωριούχος χολίνη) και ενός μεταλλικού άλατος ή ενός δότη δεσμών υδρογόνου (HBD) και του ανιόντος αλογόνου ενός μεταλλικού ή οργανικού άλατος, το οποίο λειτουργεί ως δέκτης δεσμών υδρογόνου (HBA). Παρακάτω παρουσιάζεται ο πίνακας ταξινόμησης των τύπων DES:

Πίνακας 3: Βασικοί τύποι των DES.

ΤΥΠΟΣ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
I	Μεταλλικό άλας + Οργανικό άλας (π.χ. $ZnCl_2$ + Χλωριούχος χολίνη)
II	Ένυδρο μεταλλικό άλας + Οργανικό άλας (π.χ. $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ + Χλωριούχος χολίνη)
III	Οργανικό άλας + HBD (π.χ. Χλωριούχος χολίνη + Ουρία)
IV	Ένυδρο μεταλλικό άλας + HBD (π.χ. $ZnCl_2$ + Ουρία)

Στις βιοχημικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές θεωρείται πλεονέκτημα η αποφυγή της ύπαρξης μετάλλου, συνεπώς μας ενδιαφέρει κυρίως ο τύπος III.

### 4.4. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ NaDES

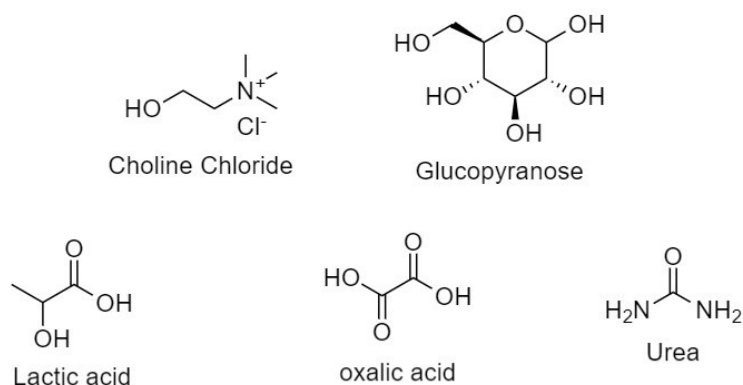
Μία από τις συνηθέστερες μεθόδους παρασκευής των DES (όπως και των NaDES) γίνεται με ανάμειξη των συστατικών στην κατάλληλη αναλογία, και χαμηλή θέρμανση υπό συνεχή ανάδευση, μέχρι να σχηματιστεί ένα διαυγές, ομοιογενές υγρό, συνήθως σε χρόνο 30-90 min. Τα αρχικά συστατικά συστήνεται να είναι υψηλής καθαρότητας και χωρίς ίχνη υγρασίας. Σε κάποιες παρασκευές, μπορεί να προστεθεί και συγκεκριμένη ποσότητα νερού δημιουργώντας ένα τριαδικό μίγμα. Οι παράμετροι των αντιδράσεων όπως ο χρόνος και η θερμοκρασία, μπορεί να ποικίλουν ανάλογα με τα διάφορα συστήματα. Η θέρμανση που επιλέγεται συνήθως είναι χαμηλότερη από 50°C αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να φτάσει και μέχρι 100°C. Η μέθοδος παρασκευής με θέρμανση και ανάδευση δεν είναι μόνο φθηνότερη, αλλά και ασφαλέστερη για συστατικά που είναι θερμικά ασταθή, όπως τα σάκχαρα ή τα αμινοξέα.<sup>48</sup>

### 4.5. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των DES επηρεάζονται από ορισμένους παράγοντες, οι κυριότεροι από τους οποίους είναι η φύση των HBA και HBD, η γραμμομοριακή αναλογία, η θερμοκρασία και η περιεκτικότητα σε νερό. Η πυκνότητα σχετίζεται κυρίως με την αναλογία HBA/HBD όπως και με την περιεκτικότητα σε νερό. Επιπλέον, τα περισσότερα DES παρουσιάζουν χαμηλή ιοντική αγωγιμότητα (<2 mS/cm σε T περιβάλλοντος) λόγω υψηλού ιξώδους. Επομένως με την αύξηση της θερμοκρασίας, μειώνεται το ιξώδες και αυξάνεται η αγωγιμότητα ενώ η προσθήκη νερού αυξάνει την αγωγιμότητα του DES.<sup>47</sup>

### 4.6. ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Όλα αυτά τα χρόνια έχει δημιουργηθεί ένας τεράστιος αριθμός NaDES, αναλόγως με τις ανάγκες της εκάστοτε εφαρμογής. Στο σχήμα παρουσιάζονται μερικές τυπικές δομές συστατικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή NaDES:



Σχήμα 20: Δομές συνηθών συστατικών NaDES.

Ένα από τα πιο διαδεδομένα συστατικά για την παρασκευή των DES είναι η χλωριούχος χολίνη (Choline Chloride, CC). Η χλωριούχος χολίνη είναι ένα φθινό, βιοδιασπώμενο, χαμηλής τοξικότητας τεταρτοταγές αμμωνιακό άλας, το οποίο μπορεί να απομονωθεί από τη βιομάζα ή να συντεθεί εύκολα από ορυκτά καύσιμα.<sup>48</sup>

## 5. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ

### 5.1. ΦΩΤΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η φωτοθεραπεία περιλαμβάνει την έκθεση μη ιονίζουσας ακτινοβολίας για θεραπευτικές εφαρμογές, σε μήκη κύματος υπεριώδους UVB. Ιστορικά έχει εφαρμοστεί κυρίως για δερματικές παθήσεις όπως το έκζεμα και στο τομέα της ψυχιατρικής για την αντιμετώπιση της κατάθλιψης και των διαταραχών του ύπνου.

Η φωτοχημειοθεραπεία αποτελεί μία θεραπευτική τεχνική η οποία επιτυγχάνεται με τη λήψη μιας φωτοευαίσθητης χημικής ουσίας, ακολουθούμενη από ακτινοβολία υπεριώδους, μη ιονίζουσας ακτινοβολίας κυρίως στο UVA. Η συγκεκριμένη τεχνική εφαρμόστηκε ευρέως για τη θεραπεία της ψωρίασης από το 1970 με τη φωτοδιέγερση του ψωραλένιου, μιας φωτοευαίσθητης ένωσης. Έτσι πιο συγκεκριμένα το εύρος του μήκους κύματος λ που χρησιμοποιείται στα είδη φωτοθεραπείας είναι:

- UVB 320-290 nm για φωτοθεραπεία
- UVA 400-320 nm για τη φωτοχημειοθεραπεία
- Ορατή ακτινοβολία για φωτοδυναμική θεραπεία.<sup>49</sup>

### 5.2. ΦΩΤΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

#### 5.2.1. ΟΡΙΣΜΟΣ-ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Οι συμβατικές μέθοδοι αντιμετώπισης του καρκίνου, όπως η χημειοθεραπεία, η χειρουργική και η ραδιοθεραπεία παρουσιάζουν σε πολλές περιπτώσεις ορισμένα σημαντικά μειονεκτήματα για τον ασθενή, όπως σοβαρές παρενέργειες, την εμφάνιση μεταστάσεων, περιορισμό δόσης λόγω συσσώρευσης ακτινοβολίας. Η φωτοδυναμική

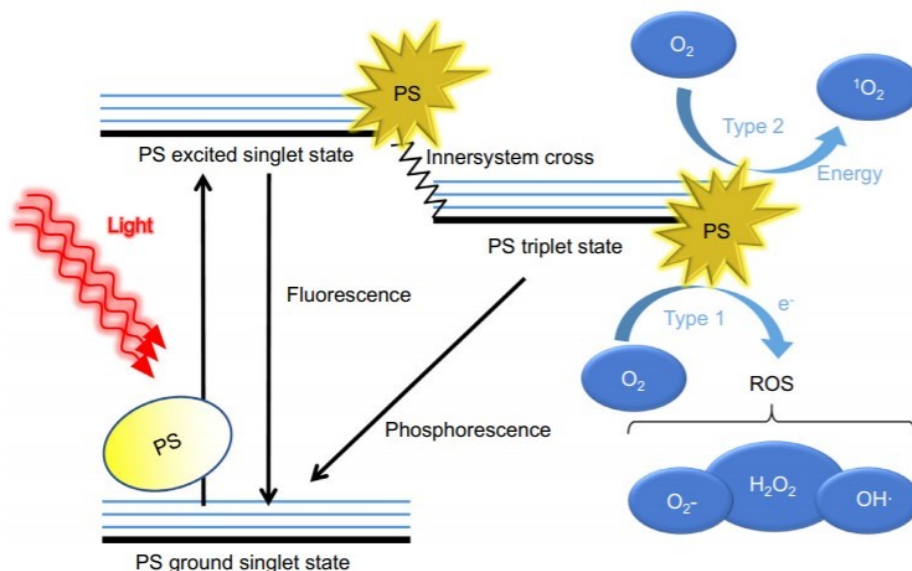
θεραπεία (Photodynamic Therapy, PDT) είναι μία εναλλακτική μέθοδος μη επεμβατικής αντικαρκινικής θεραπείας, η οποία περιλαμβάνει τη χορήγηση μίας χημικής ουσίας, του φωτοευαισθητοποιητή (Photosensitizer, PS) ακολουθούμενη από τοπική ακτινοβολία σε συγκεκριμένο μήκος κύματος του ορατού.

Η φωτοδυναμική θεραπείας εφαρμόζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως της ουροδόχου κύστης, του εγκεφάλου, του δέρματος, του πνεύμονα, στις μεταστάσεις μαστού, γυναικολογικούς καρκίνους, παχέως εντέρου κ.α. Έχει επίσης χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στη θεραπεία μη καρκινικών παθήσεων όπως η εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, η ψωρίαση, η αθηροσκλήρωση και έχει δείξει κάποια αποτελέσματα σε αντι-ϊικές θεραπείες. Τα πλεονεκτήματά της έγκειται στη μη επεμβατικότητα, την επανάληψη της δόσης χωρίς αθροιστική δράση τοξικότητας, τα εξαιρετικά λειτουργικά και αισθητικά αποτελέσματα, τη μακροχρόνια μείωση της θνησιμότητας και τελικά τη βελτίωση της ποιότητας ζωής για τους ασθενείς. Ένα ακόμη πλεονέκτημα της φωτοδυναμικής θεραπείας σε σύγκριση με τις συμβατικές θεραπείες είναι η βελτίωση του ανοσοποιητικού μέσω φλεγμονωδών αποκρίσεων του υγιούς οργανισμού στη δράση του PS στα καρκινικά κύτταρα, το οποίο συμβάλλει σε μακροχρόνια οφέλη.<sup>50</sup>

### 5.2.2. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ

Ο μηχανισμός διάσπασης του DNA περιλαμβάνει i) τη δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) ή ριζών υδροξυλίου ( $\cdot\text{OH}$ ), ii) την άντληση πρωτονίων και iii) τη μεταφορά ενέργειας ηλεκτρονίων. Σε αερόβιες συνθήκες, η αποδιέγερση του φωτοευαισθητοποιητή στη θεμελιώδη τριπλή κατάσταση, παράγει οξυγόνο απλής κατάστασης ( $^1\text{O}_2$ ), το οποίο είναι ασταθές. Ενδιάμεσες ρίζες υδροξυλίου οι οποίες είναι ιδιαίτερα δραστικές, μπορούν να παραχθούν λόγω ομολυτικής διάσπασης του υπεροξειδίου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) στη διεγερμένη κατάσταση ή με μεταφορά ενέργειας ηλεκτρονίων μέσω ετερολυτικής διάσπασης. Διαφορετικά, οι φωτοδιασπαστές μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό ριζών υδροξυλίου με μεταφορά ηλεκτρονίου από την ρίζα ανιόντος σουπεροξειδίου ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) το οποίο μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), το οποίο παράγει με τη σειρά του τις ρίζες υδροξυλίου με αντίδραση Fenton. Οι ελεύθερες ρίζες, που χαρακτηρίζονται από ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στιβάδα, είναι πολύ ασταθή μόρια με σύντομη διάρκεια ζωής, αφού αντιδρούν άμεσα με παρακείμενα μόρια, αποσπώντας από αυτά ένα ηλεκτρόνιο για να ζευγαρώσουν το δικό τους. Τα παρακείμενα μόρια μετατρέπονται έτσι τα ίδια σε ελεύθερες ρίζες και με αυτόν τον τρόπο διαταράσσεται η μοριακή τάξη και ξεκινά μία αλυσιδωτή αντίδραση που έχει ως αποτέλεσμα την κυτταρική βλάβη.<sup>51,52</sup>





Εικόνα 6: Μηχανισμός φωτοδιάσπασης.<sup>55</sup>

Ο PS εντοπίζεται είτε στο εσωτερικό των καρκινικών κυττάρων όπου επιφέρει άμεσα κυτταρική απόπτωση, ή στο ενδοθήλιο των αγγείων όπου προκαλεί αναστολή της αγγειογένεσης.<sup>50</sup>

### 5.3. DNA ΦΩΤΟΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΤΕΣ

#### Φωτονουκλεάσες

Οι φωτονουκλεάσες είναι αυτές οι ενώσεις οι οποίες αντιδρούν άμεσα με το DNA ενώ βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση, και προκαλούν τη διάσπαση της αλυσίδας του νουκλεϊκού οξέος. Οι φωτονουκλεάσες αντιδρούν καταλυτικά, χωρίς να καταναλώνονται, με τρόπο όμοιο όπως κατά τις ενζυμικές αντιδράσεις. Στην πραγματικότητα ο ρόλος των φωτονουκλεασών, όπως και γενικά των ενδονουκλεασών, είναι η υδρόλυση φωσφοδιεστερικών δεσμών στην αλυσίδα του DNA. Ένα πλεονέκτημα των φωτονουκλεασών είναι ότι μπορούμε να ελέγξουμε την αντίδραση διάσπασης χωρικά και χρονικά.<sup>52</sup>

#### Φωτοευαισθητοποιητές

Αρκετοί τύποι φωτοενεργών ενώσεων αναφέρονται βιβλιογραφικά, αλλά λίγες ενώσεις διασπών το DNA καταλυτικά. Ως εκ τούτου, η πλειοψηφία των ενώσεων μπορεί να αναφέρεται ως φωτοευαισθητοποιητές ή φωτοδιασπαστές και ορίζονται ως εκείνες οι ενώσεις των οποίων οι διεγερμένες καταστάσεις μπορούν να εκκινήσουν μια σειρά χημικών αντιδράσεων, οι οποίες τελικά οδηγούν στη διάσπαση του νουκλεϊκού οξέος.<sup>52</sup>

Η θεραπευτική τεχνική που θα εφαρμοστεί εξαρτάται από την ικανότητα του PS να παράγει δραστικές ελεύθερες ρίζες σε επαρκή ποσότητα, το είδος των οποίων εξαρτάται από το μηχανισμό δράσης της και την ύπαρξη αερόβιων ή αναερόβιων συνθηκών. Επιθυμητό χαρακτηριστικό είναι ο PS να απορροφά στο UVB, UVA ή το ορατό φάσμα, ανάλογα τη θεραπευτική τεχνική που θα εφαρμοστεί προκειμένου να εξασφαλιστεί η διείσδυση της ακτινοβολίας βαθύτερα στους ιστούς. Να σημειωθεί ότι ο PS θα πρέπει να είναι ένα χημικά σταθερό, καθαρό συστατικό και να μη



συσσωματώνεται σε βιολογικά συστήματα καθώς αυτό θα υποβάθμιζε τη δράση του. Ισχυρό σήμα απορρόφησης της ένωσης οδηγεί σε ελάττωση της απαραίτητης φαρμακευτικής δόσης. Η φαρμακοκινητική του PS θα πρέπει να δείχνει γρήγορη απομάκρυνση από τον οργανισμό του ασθενούς, σε λιγότερο από μία μέρα, προκειμένου να αποφευχθούν προβλήματα ευαισθησίας από την έκθεση στο φως.<sup>50,51,53</sup>

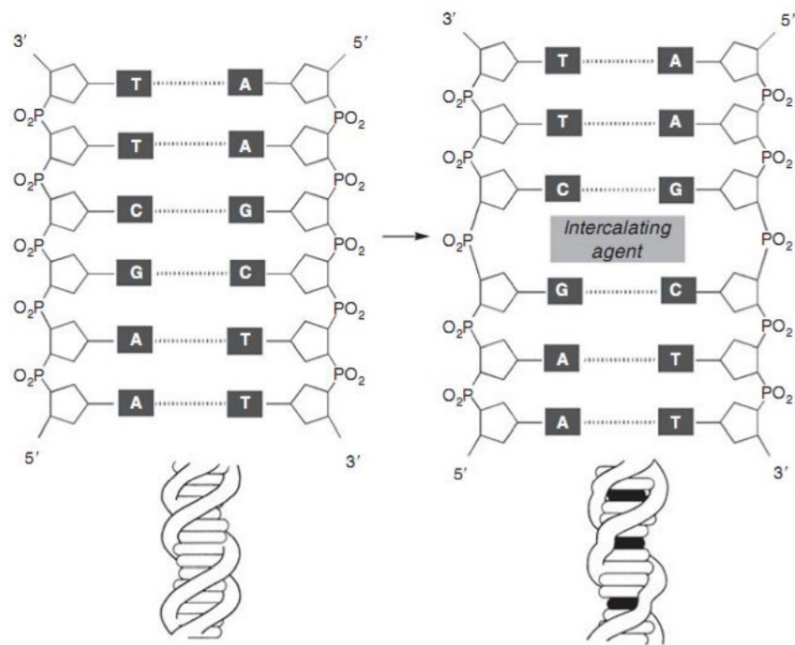
Από τα μέσα της δεκαετίας του 1970 και έπειτα, με τη συστηματική πρόοδο της φωτοδυναμικής θεραπείας, έχει συντεθεί ένα πλήθος μορίων με φωτοδιασπαστική δράση. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι πρόσφατες μελέτες οργανικών δομών όπως πορφυρίνες, ανθρακινόνες, φαινοθειαζίνες, ξανθένια, κυανίνες, κουρκουμιοειδή, κινναζολινόνες κ.α.<sup>50</sup>

Ένα παράδειγμα κινναζολινόνης με δράση PS με εμπορική διάθεση είναι η ένωση afloqualone (AFQ). Το μόριο αυτό διαθέτει μυοχαλαρωτική δράση, ανάλογη της μεθακαλόνης ενώ εμφανίζει και δράση φωτοευαισθητοποιητή όταν ακτινοβολείται σε UVA σε βακτηριοφάγους ιούς.<sup>54</sup>

#### 5.4. DNA ΠΑΡΕΜΒΟΛΗ

Πολλές θεραπευτικές εφαρμογές, ιδιαίτερα αντικαρκινικές ή αντιμικροβιακές, στοχεύουν στην αλληλεπίδραση του DNA με τη φαρμακευτική ουσία, με ένα πλήθος μηχανισμών, τόσο με οργανικά μόρια όσο και με μεταλλικά σύμπλοκα. Η παρεμβολή, που προτάθηκε για πρώτη φορά το 1961 από τον Lerman<sup>55</sup>, λαμβάνει χώρα όταν ένα αρωματικό συνήθως μόριο βρεθεί ανάμεσα στα στοιβαγμένα ζεύγη βάσεων του DNA. Ένας τυπικός παράγοντας παρεμβολής διαθέτει επίπεδη, συντηγμένη αρωματική δομή, δύο ή περισσότερων δακτυλίων και απορροφά φωτεινή ακτινοβολία στο UV/Vis φάσμα. Οι συγκεκριμένες ενώσεις είναι γνωστές και ως χρωμοφόρες. Η αλληλεπίδραση με το DNA έχουν μελετηθεί τόσο για οργανικά μόρια όσο και ανόργανα μεταλλικά σύμπλοκα.

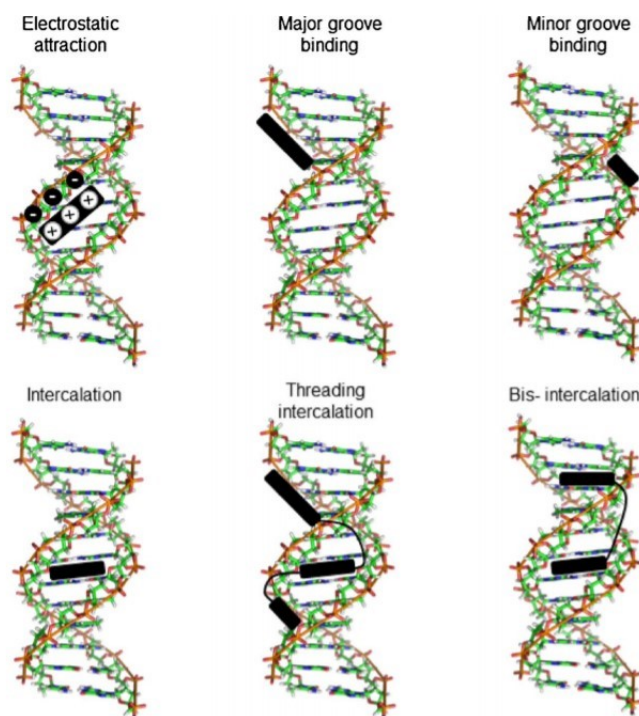
Η παρεμβολή είναι μία επιτρεπόμενη θερμοδυναμικά διεργασία καθώς η χρωμοφόρα ένωση μεταφέρεται από το υδατικό περιβάλλον, στο εσωτερικό της διπλής έλικας, το οποίο είναι υδρόφοβο. Προκειμένου να φιλοξενήσει κατάλληλα το μόριο, η δομή της έλικας δημιουργεί μία κοιλότητα στο εσωτερικό της, ενώ απομακρύνονται οι διαδοχικές βάσεις μεταξύ τους, με αποτέλεσμα την επιμήκυνση της αλυσίδας. Προκαλούνται έτσι παραμορφώσεις στο σκελετό μεταξύ σακχάρου και ομάδας φωσφόρου και μεταβολή της γωνίας στροφής της διπλής έλικας. Εφόσον το μόριο έχει παρεμβληθεί, οι δυνάμεις που επικρατούν είναι μη ομοιοπολικές, όπως η αλληλεπικάλυψη των π-ηλεκτρονίων, υδρόφοβες και πολικές αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου καθώς και ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ κατιονικών παρεμβολέων με τη φωσφορική ομάδα των νουκλεοτιδίων. Είναι προφανές ότι πιθανότεροι φορείς DNA παρεμβολής είναι θετικά φορτισμένα μόρια ή βάσεις οι οποίες πρωτονιώνονται. Η παρεμβολή στο DNA είναι λιγότερο εκλεκτική από τη πρόσδεση στην αύλακα του DNA (groove binding), ενώ δείχνει μια προτίμηση για την περιοχή βάσεων γουανίνης-κυτοσίνης. Επιπλέον, η παρεμβολή περιορίζεται από την αρχή αποκλεισμού γειτονικών θέσεων (neighbor exclusive principle), δηλαδή για κάθε κατειλημμένη θέση παρεμβολής, οι γειτονικές θέσεις εκατέρωθεν παραμένουν κενές.



**Εικόνα 7:** Παραμόρφωση της αλυσίδας DNA με παρεμβολή και αρχή του αποκλεισμού γειτονικών θέσεων ενός μορίου παρεμβολέα (με μαύρο χρώμα).

Η παρεμβολή στο DNA είναι λιγότερο εκλεκτική από τη πρόσδεση στην αύλακα του DNA (groove binding), ενώ δείχνει μια προτίμηση για την περιοχή βάσεων γουανίνης-κυτοσίνης. Επιπλέον, η παρεμβολή περιορίζεται από την αρχή αποκλεισμού γειτονικών θέσεων (neighbor exclusive principle), δηλαδή για κάθε κατειλημμένη θέση παρεμβολής, οι γειτονικές θέσεις εκατέρωθεν παραμένουν κενές.

Οι προσδέτες στην αύλακα του DNA είναι μία νέα κατηγορία αντινεοπλασματικών φαρμάκων, αντιβιοτικών και αντιμολυσματικών παραγόντων, οι οποίοι διαθέτουν κοίλη δομή προκειμένου να προσαρτώνται κατάλληλα στη μικρή ή τη μεγάλη αύλακα του DNA. Συνήθως, τα πρωτεϊνικά μόρια μεγάλου μοριακού βάρους δεσμεύονται στην μεγάλη αύλακα, ενώ τα μικρά οργανικά αρωματικά μόρια με μικρό μοριακό βάρος ( $M.B. < 1000$ ), στη μικρή αύλακα της διπλής έλικας. Η δέσμευση στην αύλακα του DNA επιτρέπει αλλά δεν απαιτεί εκτεταμένες αλλαγές στη διαμόρφωση της διπλής έλικας.<sup>56,57</sup>



Εικόνα 8: Απεικόνιση του μοντέλου αλληλεπίδρασης DNA-φαρμάκου.

Η αλληλεπίδραση μικρών μορίων με το DNA μεταβάλλει τη διαμόρφωση της διπλής έλικας, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ροής της γενετικής πληροφορίας μέσα από την αντιγραφή, τη μεταγραφή και τη μετάφραση, και τελικά το θάνατο των ανεξέλεγκτα αναπτυσσόμενων κυττάρων. Για το σχεδιασμό επίπεδων αρωματικών μορίων με ικανότητα αναγνώρισης του DNA, ενώσεις όπως κινολίνες, κινάζολιόνες και βενζιμιδαζόλες έχουν προσελκύσει αρκετά το ενδιαφέρον ως παράγοντες που οδηγούν στην κυτταρική απόπτωση. Μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις η δράση τους έχει αξιολογηθεί αντίστοιχη με τους αναστολείς τοποϊσομερασών, μίας νέας σημαντικής αντινεοπλασματικής κατηγορίας φαρμάκων. Έχει διαπιστωθεί ότι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν εκλεκτική αναγνώριση της αλληλουχίας του DNA καθώς και ικανότητα πρόσδεσης και φωτοδιάσπασης των νουκλεϊκών οξέων διευρύνοντας σημαντικά τις δυνατότητες για ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών παραγόντων.<sup>58</sup>

## 6. ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

### 6.1. ΑΠΟΔΟΣΗ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ (ENCAPSULATION EFFICIENCY, EE%)

#### 6.1.1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Η απόδοση εγκλεισμού στα νανοσωματίδια μπορεί να μελετηθεί με έμμεσο ή με άμεσο προσδιορισμό. Στον άμεσο προσδιορισμό, τα νανοσωματίδια διαλύονται σε οργανικό διαλύτη στον οποίο η εγκλεισμένη ένωση καθιζάνει και εκχυλίζεται έπειτα σε κατάλληλο μέσο όπως buffer, H<sub>2</sub>O ή διάλυμα NaOH. Για το προσδιορισμό της απόδοσης εγκλεισμού έμμεσα, μετά την παρασκευή των νανοσωματιδίων

συλλέγονται τα υπερκείμενα των φυγοκεντρίσεων και μετράται η ποσότητα της ένωσης που δεν εγκλείστηκε. Η απόδοση εγκλεισμού με έμμεσο προσδιορισμό υπολογίζεται ως εξής:

$$\% \text{ EE} = \frac{\text{Συνολικά mg ουσίας} - \text{mg ουσίας στο υπερκείμενο}}{\text{Συνολικά mg ουσίας}} \%$$

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν παραδείγματα προσδιορισμού της απόδοσης εγκλεισμού, με ιχνηθέτηση της δραστικής ουσίας με κάποιο ραδιενεργό ισότοπο, όπως το <sup>125</sup>I. Έπειτα από την παρασκευή των νανοσωματιδίων με την ιχνηθετημένη δραστική ουσία, ακολουθεί μέτρηση της απόδοσης με έμμεσο ή με άμεσο προσδιορισμό, με μετρητές εκπομπής ακτίνων γάμμα. Αντίστοιχοι προσδιορισμοί έχουν πραγματοποιηθεί με χρήση ισοθειοκυανικής φλουορεσκειΐνης (FITC) η οποία προστίθεται στην ένωση και ανιχνεύεται με φθορισμόμετρο στο υπερκείμενο.

Σε ορισμένες περιπτώσεις ο υπολογισμός της απόδοσης εγκλεισμού αποδεικνύεται απαιτητική διαδικασία και είναι απαραίτητες μετρήσεις τόσο με έμμεσο όσο και με άμεσο προσδιορισμό προκειμένου να εξασφαλιστεί μεγαλύτερη ακρίβεια.<sup>59</sup>

### 6.1.2. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΠΟΔΟΣΗ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ

Η απόδοση εγκλεισμού επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους, οι κυριότεροι από τις οποίες συνοψίζονται στο παρακάτω σχήμα:

Υψηλή διαλυτότητα του πολυμερούς σε οργανικό διαλύτη	Χαμηλή διαλυτότητα του πολυμέρους σε οργανικό διαλύτη
Χαμηλή διαλυτότητα του οργανικού διαλύτη στο νερό	Υψηλή διαλυτότητα του οργανικού διαλύτη στο νερό
Χαμηλή συγκέντρωση πολυμερούς	Υψηλή συγκέντρωση του πολυμερούς
Υψηλή DP/CP αναλογία	Χαμηλή DP/CP αναλογία
Αργή απομάκρυνση του διαλύτη	Γρήγορη απομάκρυνση του διαλύτη
⇓	⇓
Αργός σχηματισμός νανοσωματιδίων	Γρήγορος σχηματισμός νανοσωματιδίων
⇓	⇓
Χαμηλή απόδοση εγκλεισμού	Υψηλή απόδοση εγκλεισμού

Πίνακας 4: Παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση εγκλεισμού.

#### Διαλυτότητα

Η απόδοση εγκλεισμού και οι παράγοντες που τη διαμορφώνουν, καθορίζουν τη θεραπευτική δόση που διατίθεται για τα κύτταρα-στόχους, και για το λόγο αυτό είναι πρωταρχικής σημασίας χαρακτηριστικό των νανοσωματιδίων. Όπως φαίνεται και από τον παραπάνω πίνακα, επηρεάζεται από τη διαλυτότητα του πολυμερούς στον οργανικό διαλύτη. Ο Mehta και οι συνεργάτες του,<sup>60</sup> μελέτησαν τη διαλυτότητα διαφορετικών PLGA σε διχλωρομεθάνιο (DCM) ως διαλύτης αναφοράς. Διαπιστώθηκε το ότι πολυμερή με υψηλότερη διαλυτότητα σε DCM καθυστέρησαν το σχηματισμό τους κατά τη γαλακτωματοποίηση, με αποτέλεσμα χαμηλή απόδοση εγκλεισμού, και αντίστροφα. Το μέγεθος του σωματιδίου και η πυκνότητα, επίσης επηρεάζονται από τη διαλυτότητα του πολυμερούς. Αντίθετα, PLGA τα οποία διέθεταν περισσότερες ελεύθερες καρβοξυλικές ομάδες και μεγαλύτερη υδροφιλικότητα, οδήγησαν σε αυξημένη σταθερότητα στο πρωταρχικό γαλάκτωμα και βελτίωση της απόδοσης εγκλεισμού.<sup>6</sup>

Σε άλλη μελέτη,<sup>62</sup> εξετάστηκαν διαφορετικοί οργανικοί διαλύτες ως προς την απόδοση εγκλεισμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μεγαλύτερη διαλυτότητα του οργανικού διαλύτη στο νερό επιτρέπει μεγαλύτερη μεταφορά μάζας μεταξύ της διεσπαρμένης φάσης (Dispersed phase, DP) και της συνεχούς φάσης (Continuous phase, CP), με αποτέλεσμα τα νανοσωματίδια να καταβυθίζονται ταχύτερα στο γαλάκτωμα. Ταυτόχρονα, ο διαλύτης του πολυμερούς καθορίζει και τον όγκο της υδατικής φάσης που απαιτείται. Είναι γενικά αποδεκτό ότι όσο δυσκολότερα διαλύεται το πολυμερές στο διαλύτη του, τόσο λιγότερη ποσότητα νερού χρειάζεται για την καταβύθιση των νανοσωματιδίων. Σε άλλα πειράματα, χρησιμοποιήθηκε σύστημα διαλυτών (co-solvent system) για να βελτιωθούν τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων όπως η απόδοση εγκλεισμού, το μέγεθος, και το προφίλ απελευθέρωσης. Για παράδειγμα, παρασκευάστηκαν μικροσωματίδια PLGA-λυσοζύμης σε γαλάκτωμα (o/w), με σύστημα διαλυτών DCM/DMSO. Το DCM λειτουργεί ως διαλύτης του πολυμερούς ενώ το DMSO διαλύει το ένζυμο λυσοζύμης και παράλληλα βοηθάει την εκχύλιση των οργανικών διαλυτών στην υδατική φάση, το οποίο οδήγησε σε μεγαλύτερη απόδοση εγκλεισμού. Προφανώς, θα πρέπει η ένωση προς εγκλεισμό, να διαλύεται περισσότερο στο διαλύτη της παρά στη συνεχή φάση, προκειμένου να αποφευχθεί η απώλεια φαρμάκου κατά τη γαλακτωματοποίηση.<sup>63</sup>

Μελέτες έχουν γίνει και στην επίδραση της αναλογίας διεσπαρμένης προς συνεχούς φάσης, DP/CP. Η απόδοση εγκλεισμού βελτιώνεται σημαντικά με την αύξηση του συνεχούς μέσου καθώς ο διαλύτης αραιώνεται αρκετά, διευκολύνοντας έτσι το σχηματισμό των νανοσωματιδίων. Στα πειράματα του Mehta και των συνεργατών του<sup>60</sup>, με μείωση της αναλογίας DP/CP από 1/50 σε 1/300, η απόδοση εγκλεισμού διπλασιάστηκε. Ωστόσο σε πολύ μεγάλη ποσότητα υδατικής φάσης, τα νανοσωματίδια σκληραίνουν απότομα και αποκτούν ανομοιόμορφη κατανομή μεγέθους και σχήματος.

### Μοριακό Βάρος

Οι Fu και οι συνεργάτες του,<sup>64</sup> εξέτασαν την επίδραση του μοριακού βάρους (Molecular Weight, MW) του πολυμερούς στην απόδοση εγκλεισμού σε νανοσωματίδια PLGA-Υπερζίνης Α, για τη θεραπεία του Alzheimer. Όπως έδειξαν τα αποτελέσματα, η απόδοση εγκλεισμού είναι άμεσα εξαρτώμενη από το MW του πολυμερούς. Για πολυμερή με MW 15,000, 20,000, 30,000 η απόδοση βρέθηκε 62.75, 27.52 και 16.63%, αντίστοιχα. Ταυτόχρονα, για μεγαλύτερα MW παρατηρείται ταχεία απελευθέρωση του φαρμάκου το πρώτο 24ωρο, λόγω ανομοιογενούς διασποράς της δραστικής ουσίας στη μήτρα. Αντίθετα, με MW 15,000 το προφίλ απελευθέρωσης διαρκεί έως και 3 εβδομάδες. Επιπλέον η απόδοση εγκλεισμού βελτιώθηκε όσο αυξήθηκε η συγκέντρωση του πολυμερούς στην οργανική φάση και μειώθηκε η συγκέντρωση του PVA στην υδατική φάση. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι όσο προχωράμε σε υψηλότερα MW και μεγαλύτερη συγκέντρωση του πολυμερούς, προκαλείται αύξηση του ιξώδους της διεσπαρμένης φάσης, το οποίο επιφέρει εκθετική αύξηση του μεγέθους του νανοσωματιδίου και καθυστέρηση της απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας.<sup>65</sup> Ανατρέχοντας όμως τη βιβλιογραφία, βλέπουμε ότι δεν ισχύει ένας γενικός κανόνας επίδρασης του MW, ενώ θα πρέπει να μελετάται πειραματικά, αναλόγως την εφαρμογή.

### Θερμοκρασία

Η διεργασία της γαλακτωματοποίησης και ο σχηματισμός των νανοσωματιδίων, μπορεί να επιταχυνθεί είτε με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας του συνεχούς μέσου ή με μείωση της πίεσης στο σύστημα. Με τον τρόπο αυτό, απομακρύνεται ταχύτερα ο διαλύτης από τη διεσπαρμένη φάση. Ωστόσο εάν αυξηθεί απότομα η θερμοκρασία, προκύπτουν αρκετά μειονεκτήματα όπως η μείωση της απόδοσης εγκλεισμού και η δημιουργία ανομοιομορφιών στο μέγεθος και τη μορφολογία του δείγματος, όπως το σχηματισμό σκληρού εξωτερικού περιβλήματος και κενής εσωτερικής κοιλότητας.<sup>60</sup> Η θερμοκρασία της υδατικής φάσης, θα πρέπει λοιπόν να είναι αρκετά χαμηλότερη από το σημείο ζέσεως του διαλύτη και να μη μεταβάλλει φυσικοχημικά το φάρμακο.<sup>65</sup>

Από την άλλη, η πολύ αργή απομάκρυνση του διαλύτη σε χαμηλή T και συνεπώς ο αργός σχηματισμός των νανοσωματιδίων, μπορεί να συντελέσει στη δημιουργία πορώδους, μαλακής δομής σε μορφή κηρήθρας.<sup>67</sup>

### Αλληλεπιδράσεις

Σημαντικό ρόλο παίζουν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του πολυμερούς και της δραστικής ουσίας. Μεγαλύτερο ποσοστό ελεύθερων τελικών καρβοξυλικών ομάδων στο πολυμερές προκαλεί περισσότερες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μήτρας-φαρμάκου. Ωστόσο, εάν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις σταθεροποιούν περισσότερο το φάρμακο στη μήτρα, προτιμώνται πολυμερή με τελικά άκρα που δεν είναι ελεύθερα (end-capped polymers). Ωστόσο, είναι πιθανό οι έντονες αλληλεπιδράσεις μεταξύ ουσίας και πολυμερούς να περιορίσουν το προφίλ απελευθέρωσης.<sup>60,68</sup>

## **6.2. ΠΟΣΟΣΤΟ ΦΟΡΤΩΣΗΣ (DRUG LOADING, DL)**

Το ποσοστό φόρτωσης ορίζεται ως το πηλίκο της μάζας της ουσίας που εγκλείεται προς τη μάζα του πολυμερούς. Δηλαδή:

$$\% \text{ Ποσοστό φόρτωσης} = \frac{\text{mg δραστικής ουσίας}}{\text{Συνολικά mg νανοσωματιδίων}} \%$$

Είναι συχνό φαινόμενο η διάχυση του φαρμάκου στην υδατική φάση κατά τη γαλακτωματοποίηση, συνεπώς αυξάνοντας την ποσότητα του φαρμάκου προς εγκλεισμό, βελτιώνεται η απόδοση εγκλεισμού. Ωστόσο εάν προστεθεί πολύ μεγάλη ποσότητα φαρμάκου, η απόδοση εγκλεισμού θα μειωθεί. Ένα πολύ μεγάλο ποσοστό φόρτωσης φαρμάκου είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία πορώδους και ανομοιομορφής δομής, με τάση διαρροής της δραστικής ουσίας, λόγω περιορισμένου χώρου στο εσωτερικό της νανοσφαίρας. Σύμφωνα με υπολογισμούς, το μέγιστο θεωρητικό ποσοστό φόρτωσης φαρμάκου δε θα πρέπει να ξεπερνά το 50%.<sup>65,69</sup>

## **6.3. ΠΡΟΦΙΛ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ (RELEASE PROFILE, RP)**

Σημαντικός παράγοντας που πρέπει να εξετάζεται στα νανοσωματίδια είναι η απελευθέρωση της εγκλεισμένης ουσίας. Εξετάζεται δηλαδή, αν η ουσία είναι εφικτό να απελευθερωθεί, υπό ποιες συνθήκες και με τί ρυθμό. Τα νανοσωματίδια σχεδιάζονται έτσι ώστε να απελευθερώνουν τη δραστική ουσία στα κύτταρα-στόχους με την επίδραση ενός συγκεκριμένου εξωτερικού ερεθίσματος, όπως το pH, η θερμοκρασία, η ακτινοβολία κ.α. Η διάχυση της ουσίας εξαρτάται από τον τρόπο που αλληλεπιδρά το φάρμακο με τη μήτρα πολυμερούς καθώς και το είδος της μήτρας. Μπορεί λοιπόν να συμβεί απελευθέρωση λόγω πορώδους δομής ή μέσω αποικοδόμησης και διάβρωσης του πολυμερούς. Το ελεγχόμενο προφίλ



απελευθέρωσης των πολυμερικών νανοσωματιδίων παρέχει χρονικό και χωρικό έλεγχο της συγκέντρωσης της δραστικής ουσίας, επιτυγχάνοντας στοχευμένη χορήγηση, χωρίς παρενέργειες. Συνήθως, χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα για προσομοίωση του pH βιολογικών συστημάτων, σταθερή θερμοκρασία και τυχόν άλλες παράμετροι. Η ποσοτικοποίηση της ουσίας που απελευθερώνεται μπορεί να πραγματοποιηθεί με φασματοφωτομετρία UV/Vis ή άλλη μέθοδο ανάλογα τα μόρια προς μελέτη.<sup>9,61,73</sup>

#### 6.4. ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ (DYNAMIC LIGHT SCATTERING, DLS)

Η δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) βασίζεται στην κίνηση Brown των διασκορπισμένων σωματιδίων. Όταν τα σωματίδια διασκορπίζονται σε ένα υγρό κινούνται τυχαία προς όλες τις κατευθύνσεις. Η αρχή της κίνησης Brown είναι ότι τα σωματίδια συγκρούονται συνεχώς με τα μόρια του διαλύτη. Αυτές οι συγκρούσεις προκαλούν μεταφορά ποσότητας ενέργειας με αποτέλεσμα την κίνηση των σωματιδίων. Η μεταφορά ενέργειας είναι περισσότερο ή λιγότερο σταθερή και έχει μεγαλύτερη επίδραση στα μικρότερα σωματίδια, τα οποία κινούνται σε υψηλότερες ταχύτητες. Η σχέση μεταξύ της ταχύτητας και του μεγέθους των σωματιδίων δίνεται από την εξίσωση Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H}$$

Όπου D ο συντελεστής διάχυσης,  $k_B$  η σταθερά Boltzmann, T η θερμοκρασία, η το ιξώδες και  $R_H$  η υδροδυναμική ακτίνα.

Η ταχύτητα δίνεται από τον συντελεστή διάχυσης D. Περαιτέρω η εξίσωση περιλαμβάνει το ιξώδες του παράγοντα διασποράς και τη θερμοκρασία επειδή και οι δύο παράγοντες επηρεάζουν άμεσα την κίνηση των σωματιδίων. Βασική προϋπόθεση για να ισχύει η εξίσωση Stokes-Einstein είναι να μην υπάρχει καθίζηση, για να υπάρχει τυχαία κίνηση. Τα μικρά σωματίδια δε διασκορπίζουν πολύ φως γεγονός που οδηγεί σε ανεπαρκές σήμα μέτρησης.

Στη δυναμική σκέδαση φωτός γίνεται χρήση μονοχρωματικής ακτινοβολίας σε αραιά διαλύματα και μετράται υπό συγκεκριμένη γωνία  $\theta$ , η χρονική διακύμανση της έντασης της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας. Η χρονική αυτή διακύμανση οφείλεται στο γεγονός ότι η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός στον ανιχνευτή είναι αποτέλεσμα της συμβολής της ακτινοβολίας που προέρχεται από τα διάφορα σωματίδια, τα οποία κινούνται άτακτα λόγω θερμικής κίνησης. Καθώς τα σωματίδια κινούνται από ή προς τον ανιχνευτή προκύπτει μία διεύρυνση των συχνοτήτων λόγω του φαινομένου Doppler.

##### Μέγεθος (Size)

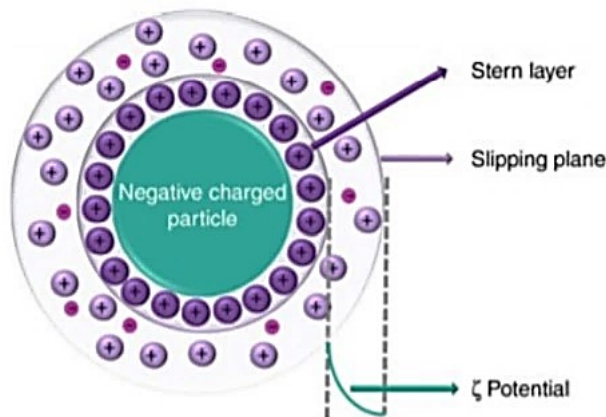
Κατά τη δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) μετράται το υδροδυναμικό μέγεθος όπου ορίζεται ως το «μέγεθος μιας υποθετικά σκληρής σφαίρας που διαχέεται με τον ίδιο τρόπο όπως το σωματίδιο που μετράται». Στη πράξη όμως τα σωματίδια ή τα μακρομόρια είναι μη σφαιρικά, δυναμικά και διαλυτοποιημένα. Εξαιτίας αυτών, η διάμετρος που υπολογίζεται από τις ιδιότητες διάχυσης του σωματιδίου είναι ενδεικτική του εμφανούς μεγέθους του δυναμικού ενυδατωμένου/επιδιαλυτωμένου σωματιδίου. Έτσι προκύπτει και η ορολογία «υδροδυναμική διάμετρος». Συνεπώς η

υδροδυναμική διάμετρος ή διάμετρος Stokes είναι αυτή της σφαίρας που έχει τον ίδιο συντελεστή διάχυσης με το σωματίδιο που μετράται, υποθέτοντας ότι ένα στρώμα ενυδάτωσης περιβάλλει το σωματίδιο ή μόριο.

### Δυναμικό ζ (Zeta Potential)

Το ζ δυναμικό είναι η διαφορά δυναμικού μεταξύ των ορίων φάσης στερεών και υγρών. Είναι ένα μέτρο του ηλεκτρικού φορτίου των αιωρούμενων σωματιδίων σε υγρό.

Τα περισσότερα υγρά διαλύματα περιέχουν ιόντα. Όταν ένα φορτισμένο σωματίδιο αιωρείται σε ένα διάλυμα, ιόντα αντίθετου φορτίου προσελκύνονται στην επιφάνεια του σωματιδίου αυτού. Τα ιόντα που βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια του σωματιδίου θα προσδεθούν ισχυρά σε αυτό, ενώ ιόντα που είναι πιο μακριά θα έχουν πιο χαλαρή πρόσδεση σχηματίζοντας ένα στρώμα διάχυσης. Εντός του στρώματος διάχυσης υπάρχει μια οριακή περιοχή εντός της οποίας οποιοδήποτε ιόν θα κινείται μαζί με το σωματίδιο μέσα στο διάλυμα. Οποιοδήποτε ιόν εκτός της περιοχής αυτής θα παραμένει στην αρχική του θέση και η περιοχή αυτή ονομάζεται περιοχή ολίσθησης. Ανιχνεύεται ένα δυναμικό μεταξύ της επιφάνειας του σωματιδίου και του υγρού διαλύτη, το οποίο διαφέρει ανάλογα με την απόσταση από την επιφάνεια του σωματιδίου. Το δυναμικό αυτό στη ζώνη ολίσθησης ονομάζεται δυναμικό ζ.



Εικόνα 9: Απεικόνιση της κατανομής φορτίων σε σωματίδιο.

Το δυναμικό ζ υπολογίζεται χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό των τεχνικών ηλεκτροφόρησης και ροομετρίας Laser Doppler. Η μέθοδος αυτή υπολογίζει την ταχύτητα ενός σωματιδίου μέσα σε ένα υγρό όταν εφαρμοστεί στο σύστημα ηλεκτρικό πεδίο. Παράγοντες που επηρεάζουν το δυναμικό ζ είναι το pH, η αγωγιμότητα του διαλύματος και η συγκέντρωση ενός θεμελιώδους συστατικού που μπορεί να βοηθάει στη σταθερότητα αυτού.<sup>72</sup>

Το δυναμικό ζ αποτελεί ένδειξη σταθερότητας του συστήματος. Πολύ μεγάλες απόλυτες τιμές του ζ δυναμικού έχουν ως αποτέλεσμα την απόθεση των σωματιδίων (σταθερά σωματίδια) ενώ τιμές κοντά στο 0 δείχνουν να υπάρχει τάση συσσωμάτωσης.

### Πολυδιασπορά (Polydispersity Index, PDI)

Μας ενδιαφέρει η κατανομή των μεγεθών των σωματιδίων. Ο δείκτης PDI είναι ένα στατιστικό, αδιάστατο μέγεθος που αντιπροσωπεύει το μέτρο της ομοιογένειας ή

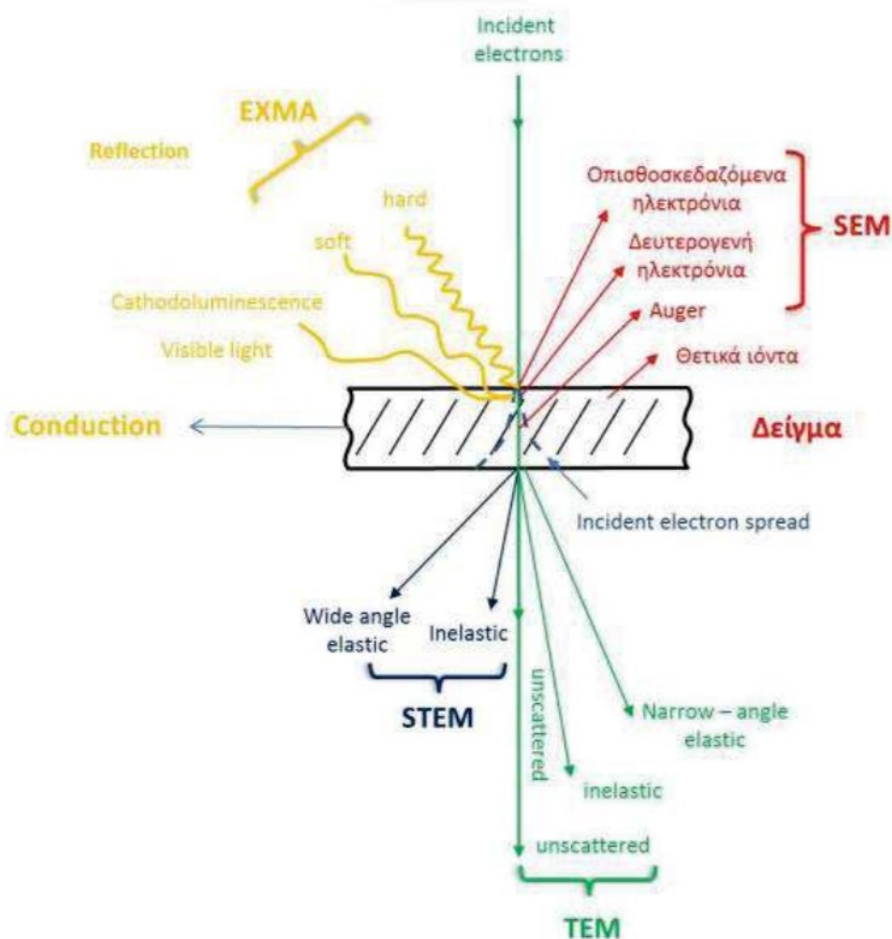


ετερογένειας των σωματιδίων και λαμβάνει τιμές από 0 (πλήρης ομοιογένεια) έως 1 (πλήρης ανομοιογένεια, πολυδιάσπαρτα σωματίδια).<sup>70,71</sup>

## 6.5. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ (SCANNING ELECTRON MICROSCOPY, SEM)

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης είναι μία από τις σύγχρονες μεθόδους ανάλυσης μορφολογίας και μικροδομής μεγάλου αριθμού υλικών, η οποία ξεπερνά κατά πολύ τις ικανότητες του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Βασική αρχή της είναι η χρησιμοποίηση δέσμης ηλεκτρονίων, έναντι φωτονίων (οπτική μικροσκοπία) προκειμένου να φτάσει σε μεγαλύτερη ανάλυση, μέχρι και 0.2 nm. Απαραίτητη προϋπόθεση για τη λειτουργία του οργάνου είναι να δημιουργείται ικανοποιητικό κενό μετά την εισαγωγή του δείγματος στο μικροσκόπιο. Για καλύτερη απεικόνιση, το δείγμα επικαλύπτεται αρχικά με ένα στρώμα χρυσού ή πλατίνας, ώστε να ενισχυθεί ο λόγος σήμα προς θόρυβο άρα και η αντίθεση κατά την απεικόνιση.

Σε ένα ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μία δέσμη ταχέως κινούμενων ηλεκτρονίων που ονομάζονται πρωτογενή, εισέρχεται στο δείγμα και αλληλεπιδρά με αυτό όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



Εικόνα 10: Τρόποι αλληλεπίδρασης ακτινοβολίας-ύλης.

Εκτός και αν πρόκειται για ένα τέλειο κρυσταλλικό υλικό, οι σκεδάσεις των ηλεκτρονίων που συμβαίνουν είναι ανελαστικές. Στις ανελαστικές σκεδάσεις το

ηλεκτρόνιο της δέσμης αλληλεπιδρά με το δείγμα και χάνει μετρήσιμη ενέργεια ( $>0.1$  eV). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη θέρμανση του δείγματος λόγω εκπομπής ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

Δευτερογενή είναι τα φαινόμενα που οφείλονται στα ηλεκτρόνια της δέσμης και μπορούν να ανιχνευτούν εκτός δείγματος, από τα διαφορετικά σήματα των οποίων παίρνουμε πληροφορίες για το SEM.

Ονομάζουμε δευτερογενή (secondary), τα ηλεκτρόνια που διαφεύγουν από την πλευρά εισόδου της δέσμης και έχουν ενέργεια μικρότερη από 50 eV. Οπισθοσκεδαζόμενα (backscattered) είναι τα ηλεκτρόνια, τα οποία διαφεύγουν επίσης από την πλευρά εισόδου της δέσμης και έχουν μεγάλη ενέργεια. Τα ηλεκτρόνια αυτά μπορεί να προέρχονται από μεγάλο βάθος μέσα στο δείγμα και μπορεί να έχουν υποστεί σκέδαση στον πυρήνα των ατόμων (Rutherford).

Εάν η δέσμη ηλεκτρονίων ionίσει ένα άτομο διεγείροντας ένα ηλεκτρόνιο, τότε το άτομο θα βρεθεί σε διεγερμένη κατάσταση. Μετά από κάποιο χρόνο η άδεια θέση θα καταληφθεί από ένα άλλο ηλεκτρόνιο εξωτερικής στοιβάδας και η επιπλέον ενέργεια θα αποδοθεί σε δευτερογενές φαινόμενο. Υπάρχουν τρεις συνηθισμένοι τρόποι αποδιέγερσης. Εάν η αρχική άδεια ηλεκτρονιακή κατάσταση είναι σε εξωτερική στοιβάδα απελευθερώνεται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία χαμηλής ενέργειας που αντιστοιχεί στο ορατό (καθοδοφωταύγεια). Ενώ αν ανήκει σε εσωτερική στοιβάδα τότε η ηλεκτρομαγνητική ενέργεια αντιστοιχεί στο φάσμα ακτίνων X ή εκπέμπεται ένα ηλεκτρόνιο Auger. Η ενέργεια των ακτίνων X είναι χαρακτηριστική του είδους του ατόμου και της στοιβάδας, οπότε εάν διαθέτουμε κατάλληλο ανιχνευτή είναι δυνατό να ταυτοποιήσουμε το στοιχείο από το οποίο προήλθε. Εάν το υλικό αποτελείται από πολλά στοιχεία, γνωρίζοντας την ενεργή διατομή σκέδασης για τα στοιχεία αυτά, είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης των στοιχείων, δηλαδή η εύρεση της χημικής σύστασης του υλικού.

Στην περίπτωση της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) το δείγμα είναι παχύ και τα ηλεκτρόνια θα σκεδαστούν πολλές φορές μέχρι να μηδενιστεί η ταχύτητά τους, ενώ είναι πολύ πιθανό να σκεδαστούν μέσω διαφορετικών μηχανισμών σκέδασης. Έτσι παίρνουμε τα απαιτούμενα σήματα.

Η εικόνα που παίρνουμε από τα δευτερογενή ηλεκτρόνια είναι μια εικόνα που παρουσιάζει το ανάγλυφο της επιφάνειας του δείγματος. Οι φωτεινές περιοχές αντιστοιχούν σε προεξοχές ενώ οι σκοτεινές σε εσοχές της επιφάνειας. Τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια προέρχονται από μεγαλύτερο βάθος και εξαρτώνται από το Z του υλικού. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας το σήμα από τον ανιχνευτή ακτίνων X, είναι δυνατό είτε να προσδιορίσουμε τη χημική σύσταση του απεικονιζόμενου δείγματος είτε να χαρτογραφήσουμε την κατανομή των στοιχείων από τα οποία αποτελείται.<sup>74</sup>

## 6.6. ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ FOURIER (FT-IR)

### Εισαγωγή

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου IR είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για το χαρακτηρισμό των υλικών και παρέχει πληροφορίες για την μοριακή δομή και το περιβάλλον μιας ένωσης. Γενικά, όταν υπέρυθρη ακτινοβολία προσπίπτει σε ένα υλικό μπορεί να διαπεράσει, να σκεδαστεί ή και να απορροφηθεί από αυτό. Η απορροφούμενη υπέρυθρη ακτινοβολία συνήθως διεγείρει μόρια σε υψηλότερες

στάθμες δόνησης ή περιστροφής. Αυτό συμβαίνει όταν η ενέργεια (συχνότητα) της ακτινοβολίας είναι ίση με τη διαφορά δύο ενεργειακών σταθμών. Η φασματοσκοπία υπέρυθρου είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για τον προσδιορισμό των διαφόρων χαρακτηριστικών ομάδων πολύπλοκων μορίων.

Υπέρυθρη φασματοσκοπία αποκαλείται η τεχνική που καλύπτει το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα μεταξύ του ορατού ( $\lambda=800$  nm) και των μικρού μήκους κύματος μικροκυμάτων ( $\lambda=300$   $\mu\text{m}$ ). Η υπέρυθρη φασματοσκοπία διαιρείται σε τρεις περιοχές, οι οποίες είναι οι εξής:

- Το εγγύς υπέρυθρο (near-infrared ή NIR) που αντιστοιχεί στα 800 nm έως 2,5  $\mu\text{m}$  ( $12500\text{--}4000$   $\text{cm}^{-1}$ ).
- Το κύριο υπέρυθρο (mid-infrared ή MIR) που αντιστοιχεί στα 2,5  $\mu\text{m}$  έως 50  $\mu\text{m}$  ( $4000\text{--}400$   $\text{cm}^{-1}$ ).
- Το άπω υπέρυθρο (far-infrared) που αντιστοιχεί σε μήκος κύματος 50  $\mu\text{m}$  έως 300  $\mu\text{m}$  ( $400\text{--}10$   $\text{cm}^{-1}$ ).

Στο IR χρησιμοποιείται συνήθως η έννοια του κυματάριθμου  $\tilde{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) για να εκφράσει τη συχνότητα. Ουσιαστικά πρόκειται για το αντίστροφο του μήκους κύματος ( $1/\lambda$ ).

Στην περιοχή του εγγύς και κυρίως IR παρατηρούνται μεταβολές στη δόνηση των μορίων λόγω απορρόφησης ακτινοβολίας, ενώ στο άπω IR παρατηρούνται μεταβολές στην περιστροφή των μορίων. Όταν ένας δεσμός ταλαντώνεται, τότε λόγω της ταλάντωσης του διπόλου του μορίου παράγεται μια ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Όσο μεγαλύτερη η αλλαγή της διπολικής ροπής τόσο ισχυρότερη η δόνηση. Δονήσεις που δε μεταβάλλουν τη διπολική ροπή, δεν παρατηρούνται στο φάσμα IR.

#### Σύγκριση μεθόδου IR με FT-IR

Η ευαισθησία του φασματοφωτόμετρου IR είναι περιορισμένη και οι εντάσεις των απορροφήσεων πολύ μικρές, με αποτέλεσμα ο «θόρυβος» να σκεπάζει τις ταινίες απορρόφησης. Η αδυναμία των κοινών φασματοφωτομέτρων IR υπερνικήθηκε με τη φασματοσκοπία IR με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform IR Spectroscopy, FT-IR).

Τα φασματοφωτόμετρα FT-IR παρουσιάζουν σαφή πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές φασματοσκοπίας IR κυρίως ως προς την υψηλή ευαισθησία και ταχύτητα που παρουσιάζουν, καθώς και το βελτιωμένο λόγο σήματος προς θόρυβο ανά μονάδα χρόνου. Αυτή η υπεροχή τους οφείλεται στα βασικά χαρακτηριστικά κατασκευής και λειτουργίας τους που επιτρέπουν τη λήψη ενός πλήρους φάσματος κατά τη διάρκεια μίας μόνο κατοπτρικής σάρωσης, ενώ ο ανιχνευτής μπορεί να παρατηρεί όλες τις συχνότητες ταυτόχρονα.<sup>75,76</sup>

## **6.7. ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ (DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY, DSC)**

Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC) είναι μια μέθοδος χαρακτηρισμού υλικών που βασίζεται στη θερμική ανάλυση μέσω θέρμανσης και ψύξης του υλικού με σταθερό ρυθμό, γραμμικά με τον χρόνο, όπου παρατηρούμε την απόκρισή του με την μεταβολή της θερμοκρασίας. Η διάταξη DSC αποτελείται από ένα θάλαμο μέτρησης (φούρνο), όπου τοποθετείται το δοκίμιο προς μελέτη, και έναν υπολογιστή, ο οποίος μέσω κατάλληλου λογισμικού παρέχει τον έλεγχο της πειραματικής διαδικασίας εισάγοντας τις διάφορες παραμέτρους, όπως αρχική - τελική θερμοκρασία, ρυθμός ψύξης - θέρμανσης κ.ά. Στο θάλαμο μέτρησης υπάρχουν δύο

θερμαινόμενοι υποδοχείς σε κάθε έναν εκ των οποίων τοποθετείται από ένα καψίδιο - δισκίο. Το ένα περιέχει το δοκίμιο προς εξέταση που έχει βάρος περίπου 10 - 12 mg. Το άλλο καψίδιο, γνωστό και ως καψίδιο αναφοράς, περιέχει συνήθως μία ουσία, η οποία θα πρέπει να είναι αδρανής στο μετρούμενο θερμοκρασιακό εύρος του πειράματος. Η θερμοκρασία των υποδοχέων μετράται με τη χρήση θερμοζυγών. Επίσης, στο θάλαμο μέτρησης ρέει ένα αδρανές αέριο (π.χ. άζωτο) ώστε να εξασφαλίζεται ατμοσφαιρική αδράνεια και βέλτιστη θερμική αγωγιμότητα όσο διαρκεί το πείραμα. Κατά τη διάρκεια της θέρμανσης με σταθερό ρυθμό, συμβαίνουν φαινόμενα ενδόθερμα (π.χ. τήξη) και εξώθερμα (π.χ. κρυστάλλωση). Το καψίδιο που περιέχει το εξεταζόμενο υλικό λόγω αυτών των φαινομένων απαιτεί περισσότερη ροή θερμότητας για να διατηρήσει το ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας του ίσο με το ρυθμό του καψιδίου αναφοράς. Αντίστοιχα, κατά την ψύξη, όπου και συμβαίνουν κατά κύριο λόγο εξώθερμα φαινόμενα, η ροή θερμότητας του υλικού προς το περιβάλλον καταγράφεται. Αποτέλεσμα των ανωτέρω πειραμάτων αποτελεί η καταγραφή της ροής θερμότητας από και προς το υλικό συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους ή/και του χρόνου. Η σύμβαση που έχει επιλεγεί για τα θερμογράμματα, είναι να παρουσιάζονται οι ενδόθερμες διεργασίες με κορυφή ή βήμα προς τα πάνω, ενώ οι εξώθερμες προς τα κάτω.<sup>77,78,79</sup>

## 6.8. ΘΕΡΜΟΒΑΡΥΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (THERMOGRAVIMETRIC ANALYSIS, TGA)

Η θερμοβαρυμετρική ανάλυση είναι μία αναλυτική τεχνική στην οποία καταγράφεται η μεταβολή της μάζας με τη γραμμική αύξηση (ή μείωση σπανιότερα) της θερμοκρασίας στο χρόνο. Τα θερμογράμματα είναι μοναδικά για κάθε υλικό και μας παρέχουν ένδειξη για τη θερμική σταθερότητα, τη σύσταση, το χρόνο ζωής, τη κινητική διάσπασης και την ύπαρξη υγρασίας και πτητικών ενώσεων. Καταγράφεται η μεταβολή της μάζας με τη γραμμική αύξηση της θερμοκρασίας στο χρόνο, λόγω κάποιας μεταβολής στις ιδιότητες του υλικού. Η μέτρηση πραγματοποιείται σε ελεγχόμενη ατμόσφαιρα που είναι αέρας ή αδρανές αέριο όπως άζωτο, ήλιο ή αργό. Μπορούμε επίσης να προσδιορίσουμε την οξειδωτική σταθερότητα με μέτρηση σε ατμόσφαιρα ηλίου ή αζώτου που περιέχει 1-5 % οξυγόνο, με σκοπό τη πραγματοποίηση αργής οξειδωσης. Σε οξειδωτικό περιβάλλον, τα μέταλλα αυξάνουν την οξειδωτική τους κατάσταση και τη μάζα τους. Τα όργανα που χρησιμοποιούνται για θερμοβαρυμετρική ανάλυση χωρίζονται σε δύο τύπους: κατακόρυφης και οριζόντιας ισορροπίας. Η μέγιστη θερμοκρασία που μπορεί να φτάσει ένα όργανο μέτρησης είναι στους 1250 °C. Ο ρυθμός θέρμανσης κυμαίνεται από 1 έως 100 °C/min.<sup>80,81</sup>

Τα θερμογράμματα μπορούν να χωριστούν σε ορισμένες περιοχές:

1. Κάτω από τους 150 °C, παρατηρείται η διάσπαση του φυσικώς προσροφημένου νερού, των πτητικών συστατικών χαμηλού μοριακού βάρους και πιθανώς παγιδευμένων αερίων.
2. Μεταξύ των 150-250 °C, η μεταβολή της μάζας οφείλεται στο χημικώς προσροφημένο νερό και στα χαμηλού μοριακού βάρους παραπροϊόντα διάσπασης.
3. Πάνω από τους 250 °C τα συστατικά αρχίζουν να διασπώνται σε ένα καθορισμένο θερμοκρασιακό εύρος. Για καθένα συστατικό του υλικού, βλέπουμε ένα διαφορετικό εύρος.
4. Το υπόλοιπο της μάζας που παραμένει, αποτελείται από μη πτητικά, ανόργανα και μέταλλα.

## 7. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΥΨΗΛΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ

### 7.1. ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΑ

Η θέρμανση με μικροκύματα για πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκε στην οργανική σύνθεση το 1986, από τις ομάδες των Gedye και Giguere-Majetich. Σήμερα χρησιμοποιείται ευρύτατα και με μεγάλη επιτυχία γιατί δίνει υψηλές αποδόσεις υπό ηπιότερες και φιλικότερες προς το περιβάλλον συνθήκες, συχνά χωρίς την χρήση διαλυτών, άλλοτε με ανακύκλωση τους, αλλά και με μικρότερη κατανάλωση ενέργειας. Τέτοιες εφαρμογές μικροκυματικής θέρμανσης περιλαμβάνουν αντιδράσεις κυκλοπροσθήκης, τη σύνθεση ραδιοϊσοτόπων, τη χημεία πολυμερών, ετεροκυκλικών ενώσεων και υδρογονανθράκων, την ομογενή και ετερογενή κατάλυση, την ιατρική, αλλά και την πράσινη χημεία. Η περιοχή των μικροκυμάτων του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος βρίσκεται μεταξύ της υπέρυθρης ακτινοβολίας και των ραδιοκυμάτων και αντιστοιχεί σε μήκη κύματος μεταξύ 1mm έως 1m (συχνότητες από 300 MHz έως 300 GHz, αντίστοιχα).

Η θέρμανση με μικροκύματα, η οποία είναι μια μορφή διηλεκτρικής θέρμανσης, εξηγείται σαν παραγωγή θερμότητας σε υλικά με χαμηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα, από την ενέργεια ενός ηλεκτρικού πεδίου υψηλής συχνότητας. Η ενέργεια μικροκυμάτων μπορεί να επηρεάσει τα μόρια με δύο κυριότερους μηχανισμούς, τη διπολική πόλωση και την ιοντική αγωγιμότητα. Μια ουσία, για να μπορεί να απορροφήσει τη θερμότητα από τα μικροκύματα, πρέπει να διαθέτει διπολική ροπή, όπως για παράδειγμα το μόριο του νερού. Η διπολική πόλωση προκαλείται ουσιαστικά από τη διαφορά φάσης μεταξύ των μορίων με διπολική ροπή και του εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου, με εφαρμογή κατάλληλης συχνότητας. Αυτή η διαφορά φάσης μεταξύ του διπόλου και του πεδίου προκαλεί μοριακές τριβές και συγκρούσεις με αποτέλεσμα τη διηλεκτρική θέρμανση. Εκτός από τα δίπολα μόρια, ένα δείγμα διαθέτει και φορτισμένα σωματίδια τα οποία επηρεάζονται κυρίως από την ιοντική μεταγωγή. Τα διαλυμένα φορτισμένα σωματίδια σε ένα δείγμα (συνήθως ιόντα) ταλαντεύονται υπό την επίδραση του πεδίου μικροκυμάτων και συγκρούονται με τα γειτονικά μόρια ή άτομα. Αυτή η σύγκρουση προκαλεί διέγερση ή κίνηση, δημιουργώντας θερμότητα. Ο μηχανισμός ιοντικής αγωγιμότητας παράγει εντονότερα θερμότητα σε σχέση με τον μηχανισμό διπολικής πόλωσης.

Οι επιτυγχανόμενες υψηλές αποδόσεις, οι ηπιότερες (περιβαλλοντικές) συνθήκες και οι συντομότεροι χρόνοι της αντίδρασης αποδεικνύονται πολύ χρήσιμα στοιχεία, που επιτρέπουν την ουσιαστική βελτίωση πολλών χημικών διεργασιών. Ακόμη, επιτυγχάνεται ομοιόμορφη θέρμανση και μεγαλύτερη επαναληψιμότητα, ενώ μπορούν να ρυθμιστούν περαιτέρω παράμετροι, όπως συνθήκες αδρανούς ατμόσφαιρας. Οι ιδιότητες αυτές της μικροκυματικής θέρμανσης καθιστούν εφικτές ακόμη και αντιδράσεις που δε θα πραγματοποιούνταν με συμβατικό τρόπο θέρμανσης, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρείται και αλλαγή της εκλεκτικότητας των αντιδράσεων.<sup>82,83</sup>

### 7.2. ΥΠΕΡΗΧΟΙ

Η εφαρμογή των υπερήχων στην χημεία τόσο για σκοπούς καθαρισμού όσο για την επιτάχυνση των υφιστάμενων και εισαγωγή νέων χημικών αντιδράσεων και διαδικασιών είναι πλέον καλά εδραιωμένη. Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί πρόοδος στον τομέα της ηχοχημείας και έχουν βρεθεί νέα πεδία



εφαρμογής. Η ηχοχημεία είναι ένα είδος χημικών αντιδράσεων (τρόπος εισαγωγής ενέργειας σε ένα σύστημα με σκοπό τη δυνατότητα διεξαγωγής μιας χημικής αντίδρασης) μέσω εφαρμογής υπέρηχης ακτινοβολίας (20kHz-10MHz). Ο ήχος, ως κύμα, διαδίδεται σε ένα μέσο ως μεταβολή πίεσης, προκαλώντας μικρές περιοχές συμπίεσης και αραιώσης. Η ενέργεια του ήχου μεταφέρεται δημιουργώντας δονήσεις στα μόρια του μέσου. Το φυσικό φαινόμενο που εκμεταλλευόμαστε είναι αυτό της ακουστικής σπηλαιώσης (acoustic cavitation). Το κύριο γεγονός στην ηχοχημεία είναι η δημιουργία, η διάδοση και η κατάρρευση της φυσαλίδας που δημιουργείται στο υγρό. Το στάδιο που οδηγεί στην ανάπτυξη της φυσαλίδας συμβαίνει μέσω της διάχυσης του διαλύτη στον όγκο της φυσαλίδας. Κατά τη διάρκεια της αποσυμπίεσης (rarefaction), η φυσαλίδα στον υγρό διαλύτη μεγαλώνει μέχρι να φτάσει να έχει μια κρίσιμη ακτίνα οπότε και καταρρέει. Αυτή τη στιγμή έχουμε συνθήκες μεγάλης θερμοκρασίας (μέχρι 15.000 K), υψηλής πίεσης (2.000 atm) και ρυθμούς ψύξης της τάξης των 10-12 K/s. Έτσι όταν μια φυσαλίδα καταρρεύσει, οι χημικοί δεσμοί διασπώνται. Η ακαριαία φύση της σπηλαιώσης δεν επιτρέπει συμβατικές μεθόδους καταμέτρησης των συνθηκών που επικρατούν κατά τη διάρκεια της κατάρρευσής της. Όμως οι επί μέρους χημικές αντιδράσεις που συμβαίνουν εντός, εκτός και επί της επιφάνειας της φυσαλίδας μπορούν από μόνες τους να καταδείξουν τις συνθήκες της ηχοχημικής αντίδρασης.

Η ηχοχημεία είναι ένα είδος χημικών αντιδράσεων το οποίο συνδυάζει μικρούς χρόνους, υψηλές ενέργειες και υψηλές πιέσεις. Λόγω του περιβάλλοντος της ηχοβόλησης, τα υλικά που έχουν παραχθεί δεν έχουν χρόνο να μεγαλώσουν και παραμένουν νανο-υλικά. Το όλο σύστημα δεν θερμαίνεται πάνω από 80-100 °C.<sup>84</sup>



Εικόνα 11: Όργανο υπέρηχων.

## 8. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 8.1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της διεργασίας εγκλεισμού νέων κινναζολινονικών παραγώγων με φωτοδιασπαστική δράση, σε νανοσωματίδια PLA. Οι υποψήφιες προς εγκλεισμό κινναζολιόνες (Πίνακας 6), έχουν παρουσιάσει θετική φωτοδιασπαστική ικανότητα στο DNA ενώ ερευνώνται περαιτέρω ως προνομιακοί φορείς φαρμακευτικών δράσεων. Είναι απαραίτητος ο σχεδιασμός και η υλοποίηση ενός συστήματος μεταφοράς των μορίων αυτών, προκειμένου να βελτιωθούν ορισμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, όπως η χαμηλή διαλυτότητα σε υδατικό περιβάλλον, και να αποδοθούν με αποτελεσματικό και ελεγχόμενο τρόπο οι επιθυμητές ιδιότητές τους στον οργανισμό. Επιλέχθηκε το PLA ως φορέας των ενώσεων καθώς είναι ένα βιοδιασπώμενο, βιοσυμβατό πολυμερές με ευρεία εφαρμογή στη μεταφορά θεραπευτικών μορίων. Πιο συγκεκριμένα, με εφαρμογή της τεχνικής γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης διαλύτη, παρασκευάστηκαν νανοσωματίδια PLA και χαρακτηρίστηκαν ως προς τη δομή και τις ιδιότητές τους. Μελετήθηκαν παράμετροι όπως η απόδοση εγκλεισμού, το μέγεθος και το δυναμικό ζ των νανοσωματιδίων, η μορφολογία, το προφίλ απελευθέρωσης, ο τρόπος εγκλεισμού αλλά και η θερμική σταθερότητα των σωματιδίων. Παράλληλα, αναπτύχθηκε νέα μέθοδος εγκλεισμού πράσινης χημείας, στην οποία αντικαταστάθηκε ο συμβατικός διαλύτης της ένωσης με φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες (NaDES). Εξετάστηκε λοιπόν η επίδραση διαφορετικών διαλυτών NaDES στη διεργασία εγκλεισμού. Ως ένα επιπρόσθετο μέτρο σύγκρισης, συντέθηκαν σύμπλοκα εγκλεισμού κινναζολιόνης σε β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD).

## 8.2. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Πίνακας 5: Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν.

Μέτρηση-Ανάλυση	Μοντέλο-Κατασκευαστής	Εργαστήριο
UV-Vis	V-770 UV/Vis/NIR, Κυψελίδα: χαλαζία	Οργανικής Χημείας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ
DLS	Zetasizer Nano ZS, Malvern, Κυψελίδα DTS1070	Γενικής Χημείας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ
NMR	Gemini 600 MHz, Varian	Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών
FT-IR	Jasco FT-IR 4000	Τομέας Ι, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ
TGA/DSC	TGA/DSC 1 STAR <sup>e</sup> System, Mettler Toledo	Τεχνολογίας Πολυμερών, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ
Συσκευή υπερήχων με probe	Vibra-Cell VCX 750, Sonics and Materials Inc	Οργανικής Χημείας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ
Λουτρό υπερήχων	2210 Ultrasonic Bath, Branson	Οργανικής Χημείας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ



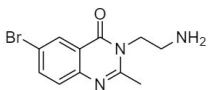
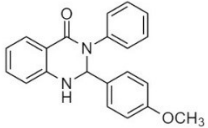
Freeze Drying	Lablyo Mini, Frozen in time Ltd	Οργανικής Χημείας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ
Incubator	Gallenkamp	Οργανικής Χημείας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ
Υπερφυγόκεντρος	Thermo Scientific Sorvall LYNX 6000 centrifuge	Οργανικής Χημείας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ
Αναδευτήρας τύπου Vortex	ZX4, Velp	Οργανικής Χημείας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ
Μαγνητικός αναδευτήρας	RCT basic, IKA	Οργανικής Χημείας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ
Ζυγός ακριβείας (μέχρι 210g)	ADB 200-4, Kern	Οργανικής Χημείας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ
Ζυγός ακριβείας (μέχρι 2g)	M2P, Sartorius	Οργανικής Χημείας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ
Πεχάμετρο	744, Metrohm	Οργανικής Χημείας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ
Συσκευή Σημείου Τήξης	Gallenkamp	Οργανικής Χημείας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν για τους εγκλεισμούς τα αντιδραστήρια: Polyvinyl Alcohol 72,000 (BioChemica), Polylactic acid 46,000, β-cyclodextrin (Assay  $\geq 99\%$ , Fluka).

### 8.3. ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΟΝΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΠΡΟΣ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο εγκλεισμός των κιναζολινονών οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 6:

Πίνακας 6: Ανάλογα κιναζολινονών που εγκλείστηκαν.

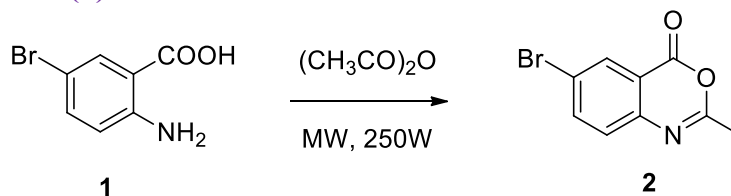
Ένωση	Δομή
3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκιναζολιν-4(3H)-όνη ( <b>3</b> )	
2-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-φαινυλο-2,3-δωδροκιναζολιν-4(1H)-όνη ( <b>4</b> )	

Από τις κιναζολινόνες που παρουσιάζονται στον Πίνακα 6, συντέθηκε το μόριο **3**, ενώ το μόριο **4** χρησιμοποιήθηκε στον εγκλεισμό έτοιμο και χαρακτηρισμένο.

## 8.4. ΣΥΝΘΕΣΗ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σύνθεση σε δύο στάδια. Πρώτα πραγματοποιείται η σύνθεση της 6-Βρωμο-2-μεθυλο-4H-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνης (**2**), η οποία έπειτα στο δεύτερο στάδιο αντιδρά για να παραχθεί η 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκιναζολιν-4(3H)-όνη (**3**).

### 8.4.1. ΣΥΝΘΕΣΗ 6-ΒΡΩΜΟ-2-ΜΕΘΥΛΟ-4H-BENZO[D][1,3]ΟΞΑΖΙΝ-4-ΟΝΗΣ (**2**)



Σχήμα 21: Σύνθεση της 6-Βρωμο-2-μεθυλο-4H-βενζο[d][1,3]οξαζιν-4-όνης (**2**).

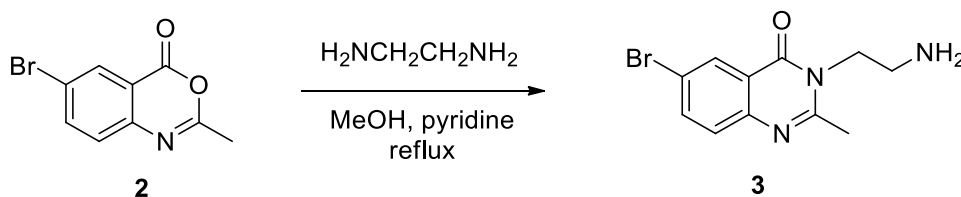
Η σύνθεση της βενζοξαζινόνης πραγματοποιήθηκε με θέρμανση με μικροκυματική ακτινοβολία. Ειδικότερα, για τη σύνθεση του μορίου απαιτείται η αντίδραση 5-βρωμο ανθρανιλικού οξέος (**1**) (9.30mmol) σε 10mL οξικού ανυδρίτη. Οι συνθήκες πειράματος είναι: 250W ισχύς αντιδραστήρα, 150°C θερμοκρασία θέρμανσης και 17min χρόνος αντίδρασης. Στη συνέχεια το δείγμα ψύχεται και ακολουθεί διήθηση και έκπλυση με πετρελαϊκό αιθέρα.

Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται αρχικά με την ανάλυση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (το δείγμα διαλύεται σε διχλωρομεθάνιο ενώ το σύστημα διαλυτών στο TLC είναι: οξικός αιθυλεστέρας 40% και πετρελαϊκός αιθέρας 60%) και έπειτα η ταυτοποίηση της ένωσης γίνεται με τη χρήση φασματοσκοπίας  $^1\text{H}$  NMR. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 80%

Σημείο τήξης: 122-124°C

### 8.4.2. ΣΥΝΘΕΣΗ 3-(2-ΑΜΙΝΟΑΙΘΥΛΟ)-6-ΒΡΩΜΟ-2-ΜΕΘΥΛΟΚΙΝΑΖΟΛΙΝ-4(3H)-ΟΝΗΣ (**3**)



Σχήμα 22: Σύνθεση της 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκιναζολιν-4(3H)-όνης (**3**).

Η σύνθεση των παραγώγων κιναζολινόνης πραγματοποιήθηκε με θέρμανση υπό κάθετο ψυκτήρα με τη βοήθεια ελαιόλουτρου (reflux). Για τη σύνθεση των μορίων πραγματοποιείται η αντίδραση της 5-βρωμο-βενζοξαζινόνης (1 mmol) με

αιθυλενοδιαμίνη (2 mmol). Η 5-βρωμο-βενζοξαζινόνη διαλύεται σε MeOH σε αναλογία 0.83mmol/1mL αντιστοίχως. Τέλος προστίθενται καταλυτική ποσότητα πυριδίνης. Τα μόρια ανακρυσταλλώνονται με τη χρήση μεθανόλης.

Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται αρχικά με την ανάλυση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (τα δείγματα διαλύονται σε μείγμα μεθανόλης / διχλωρομεθανίου ενώ το σύστημα διαλυτών στο TLC είναι: οξικός αιθυλεστέρας 60% και πετρελαϊκός αιθέρας 40%) και έπειτα η ταυτοποίηση της ένωσης γίνεται με τη χρήση φασματοσκοπίας  $^1\text{H}$  NMR.

Ποσότητα 1.79g (7.45mmol) μορίου **2** διαλύονται σε 8.95mL μεθανόλης μέσα σε σφαιρική φιάλη. Στη συνέχεια προστίθενται 1 ml αιθυλενοδιαμίνης (14.9mmol-1:2eq) και καταλυτική ποσότητα πυριδίνης. Το διάλυμα θερμαίνεται για 24h στους 65°C, στη συνέχεια εξατμίζεται και εκχυλίζεται με νερό και οξικό αιθυλεστέρα. Τέλος πραγματοποιείται ανακρυστάλλωση με μεθανόλη. Παραλαμβάνονται 1.0207g στερεού, λευκού χρώματος, μορίου **3**.

**Απόδοση:** 48%

**Σημείο τήξης:** 150-154°C

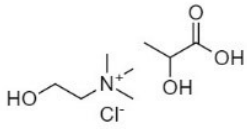
$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 600MHz):  $\delta$  8.28 (d, J=8.9 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.90 (d, J=2.0 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 7.64 (dd, J=8.9, 2.2 Hz, 1H, H<sub>8</sub>), 3.25 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.69 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.07 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

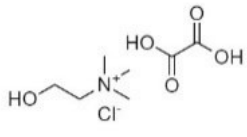
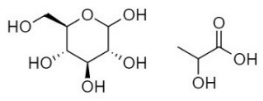
UV/Vis:  $\lambda_{\text{max}}$ =259.6nm

## 8.5. ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ (NaDES)

Για το σκοπό αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικοί φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NaDES). Χρησιμοποιήθηκαν παρασκευασμένα NaDES Χλωριούχου χολίνης / Γαλακτικού οξέος, 1:1.5 και Χλωριούχου χολίνης / Οξαλικού οξέος, 1:1 ενώ συντέθηκε NaDES Γλυκόζης / Γαλακτικού οξέος σε αναλογία 1:5. Τα NaDES, ως φυσικά υλικά, αποτελούν έναν εναλλακτικό τρόπο εγκλεισμού των υδρόφοβων κινναζολινονών στα νανοσωματίδια PLA. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα NaDES και η σύστασή τους:

Πίνακας 7: Σύνοψη των NaDES που χρησιμοποιήθηκαν.

NaDES	Συστατικό 1	Συστατικό 2	Αναλογία	Δομή
CC/LA	Χλωριούχος χολίνη (CC)	Γαλακτικό οξύ (LA)	1:1.5	

CC/OA	Χλωριούχος χολίνη (CC)	Οξαλικό οξύ (OA)	1:1	
G/LA	Γλυκόζη (G)	Γαλακτικό οξύ (LA)	1:5	

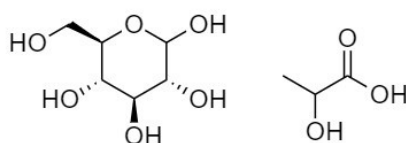
## 8.6. ΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΒΑΘΕΩΣ ΕΥΤΗΚΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ (NaDES)

Η επιτυχημένη σύνθεση των NaDES εξαρτάται σημαντικά από την αναλογία των συστατικών που αντιδρούν καθώς και την εξασφάλιση εντροπίας στο σύστημα, είτε με παροχή θερμότητας ή με σωστή ομογενοποίηση του μείγματος. Στην παρούσα εργασία, όπως ήδη αναφέρθηκε, συντέθηκε το **NaDES Γλυκόζη / Γαλακτικό οξύ 1:5**.

### 8.6.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ

Για την παρασκευή του NaDES χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος θέρμανσης και ανάδευσης. Πιο συγκεκριμένα, ζυγίζονται οι κατάλληλες ποσότητες των συστατικών που απαρτίζουν το NaDES και τοποθετούνται σε σφαιρική φιάλη, στο ελαιόλουτρο ή υδατόλουτρο. Αξίζει να σημειωθεί ότι για τα συστατικά που είναι υγροσκοπικά, όπως η χλωριούχος χολίνη, απαιτείται απομάκρυνση της υγρασίας τοποθετώντας το δείγμα σε αντλία κενού Edwards, μέχρι σταθερού βάρους. Έπειτα γίνεται ανάμειξη των συστατικών υπό ήπια ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα, σε χαμηλή θερμοκρασία έως ότου μετατραπούν σε διαυγή, ομοιόμορφα ρευστά. Σε περίπτωση που χρειαστεί, αυξάνεται σταδιακά η θερμοκρασία από τους 50°C. Η θερμοκρασία και ο χρόνος ανάδευσης ποικίλουν ανάλογα με το σύστημα των συστατικών που χρησιμοποιείται. Το NaDES που δημιουργείται αποθηκεύεται σε ξηραντήρα, χαρακτηρίζεται με NMR και είναι έτοιμο να χρησιμοποιηθεί στη σύνθεση των νανοσωματιδίων. Στο τέλος της διεργασίας και ύστερα από κατάλληλη επεξεργασία, το χρησιμοποιημένο ευτηκτικό διάλυμα μπορεί να ανακυκλωθεί και να επαναχρησιμοποιηθεί σε επόμενη αντίδραση. Ο κύκλος αυτός μπορεί να επαναληφθεί έως και τρεις φορές, δίνοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά την απόδοση διεργασίας αλλά και την ποσοτική ανάκτηση του NaDES.

Παρασκευάστηκε λοιπόν στην παρούσα εργασία το NaDES:



G/LA 1:5

Σχήμα 23: NaDES G/LA 1:5.

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετούνται κατάλληλες ποσότητες γλυκόζης (Glucose, G) και γαλακτικού οξέος (Lactic acid, LA) σε γραμμομοριακή αναλογία 1:5. Το μείγμα τοποθετείται υπό ήπια ανάδευση και χαμηλή θέρμανση στους 50 °C για 2-3 h. Το τελικό NaDES είναι διαυγές και καθαρό.

**TGA:** Tonset = 259.2°C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) 4.05-4.02(m, -CH [LA], 1H), 3.82(br, -CH<sub>2</sub> [CC], 2H), 3.42(t, J = 4.8Hz, -CH<sub>2</sub> [CC], 2H), 3.13(s, -CH<sub>3</sub> [CC], 9H), 1.22(d, J=7.2Hz, -CH<sub>3</sub> [LA], 3H).

**FT-IR-ATR:** ν (cm<sup>-1</sup>) 3374.8(N-R, O-H), 2985.3, 1739.5(C=O), 1479.1, 1128.2, 954.6



Εικόνα 12: NaDES G/LA, 1:5.

## 8.7. ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΟΝΗΣ ΣΕ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ PLA (PLA NPs)

Ο εγκλεισμός της κιναζολιμόνης σε νανοσωματίδια PLA βασίστηκε στη μέθοδο της γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης διαλύτη (emulsification-solvent evaporation technique)<sup>8,66</sup>. Κατά την παρασκευή των νανοσωματιδίων με προσθήκη NaDES, τροποποιήθηκε η μέθοδος λαμβάνοντας υπόψιν τα χαρακτηριστικά των ευτηκτικών διαλυτών σε σχέση με τους συμβατικούς διαλύτες.

### 8.7.1. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Σε σφαιρική φιάλη διαλύεται κατάλληλη ποσότητα PLA σε ακετόνη, ώστε να προκύψει διάλυμα πολυμερούς 10 mg/mL. Αναλόγως το επιθυμητό ποσοστό φόρτωσης, σε δεύτερη σφαιρική φιάλη διαλύεται ποσότητα κιναζολιμόνης, σε ελάχιστο όγκο διαλύτη. Στο όργανο υπερήχων, προστίθεται η οργανική φάση σε πενταπλάσια ποσότητα υδατικού PVA 1%(w/v), για 6 min με ανάδευση 40%, υπό ψύξη σε πάγο. Το γαλάκτωμα αφήνεται στο incubator για 24 h, στους 40°C υπό

ανάδευση 60 rpm, προκειμένου να εξατμιστεί ο διαλύτης. Ακολουθεί επεξεργασία με φυγοκέντριση στις 17000 rpm για 20 min και θερμοκρασία 4°C. Παραλαμβάνεται το στερεό και επαναδιασπείρεται σε υπερκάθαρο νερό. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται συνολικά τρεις φορές. Η επαναδιασπορά, εάν χρειαστεί, υποβοηθάται στο λουτρό υπερήχων (bath). Με το τέλος των φυγοκεντρίσεων, το υλικό επαναδιασπείρεται και μεταφέρεται σε κρυσταλλωτήριο για να ακολουθήσει λυοφιλίωση (freeze-drying). Τα υπερκείμενα συλλέγονται και αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου. Σε περίπτωση που το freeze-drying δε πραγματοποιηθεί την ίδια μέρα, τα NPs διατηρούνται στην κατάψυξη. Τα κενά (blank) νανοσωματίδια παρασκευάζονται με τον ίδιο τρόπο, χωρίς προσθήκη δραστικής ουσίας.



Εικόνα 13: Η διασπορά των NPs μετά το στάδιο της γαλακτωματοποίησης.

Η μέθοδος εγκλεισμού πραγματοποιήθηκε με δύο διαφορετικούς τρόπους, αναλόγως εάν ο διαλύτης της ένωσης είναι συμβατικός (Μέθοδος 1) ή φυσικός βαθέως ευτηκτικός διαλύτης (Natural Deep Eutectic Solvents, NaDES) (Μέθοδος 2).

1. Κατά τη Μέθοδο 1, η ένωση διαλύεται σε DMSO ή ακετόνη και αναμειγνύεται με το διάλυμα του PLA, τα οποία προστίθενται στην υδατική φάση κατά το στάδιο της γαλακτωματοποίησης.
2. Κατά τη Μέθοδο 2, δοκιμάστηκε η διάλυση της κινναζολινόνης σε φυσικούς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες (NaDES). Κατά την ανάμειξη σχηματίζεται ένα λευκό, ομοιογενές γαλάκτωμα. Το διάλυμα κινναζολινόνης στο NaDES προστίθεται στην υδατική φάση κατά τη γαλακτωματοποίηση, χωρίς προηγουμένως να ενωθεί με το οργανικό διάλυμα PLA. Ακόμη, παρασκευάζονται νανοσωματίδια που δεν περιέχουν εγκλεισμένη την κινναζολινόνη (blank NPs).



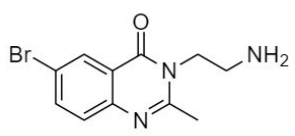


Εικόνα 14: Ξηρά νανοσωματίδια PLA.

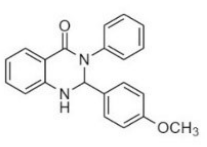
### 8.7.2. ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΟΝΩΝ ΜΕ PLA

Πραγματοποιήθηκε η παρασκευή των παρακάτω δειγμάτων:

Πίνακας 8: Ποσότητες για την παρασκευή νανοσωματιδίων 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκινναζολιν-4(3H)-όνης (Μόριο 3).

NPs 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκινναζολιν-4(3H)-όνης (Μόριο 3)		Ποσότητα ένωσης (mg)	Διαλύτης	Όγκος (mL)
LS17		60.1	DMSO	3
LS5		60.1	CC/LA 1:1.5	4
LS16		60.5	CC/OA 1:1	5
LS18		60.5	G/LA 1:5	4

Πίνακας 9: Ποσότητες για την παρασκευή νανοσωματιδίων 2-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-φαινυλο-2,3-διδροκινναζολιν-4(1H)-όνης (Μόριο 4).

NPs 2-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-φαινυλο-2,3-διδροκινναζολιν-4(1H)-όνης (Μόριο 4)		Ποσότητα ένωσης (mg)	Διαλύτης	Όγκος (mL)
LS3		60.1	Ακετόνη	6



LS7	59.8	CC/LA 1:1.5	5
LS14	59.9	CC/OA 1:1	5

**Πίνακας 10: Ποσότητες για την παρασκευή των κενών νανοσωματιδίων.**

Κενά NPs	Διαλύτης	Όγκος (mL)
LS4	-	-
LS6	CC/LA 1:1.5	4
LS19	G/LA 1:5	3

## 8.8. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ PLA

### Απόδοση Εγκλεισμού (Encapsulation Efficiency, EE%)

Προσδιορίστηκε έμμεσα, παραλαμβάνοντας τα υπερκείμενα των φυγοκεντρίσεων και μετρώντας τη συγκέντρωση της μη εγκλεισμένης κινάζολινονης στο φασματοφωτόμετρο UV/Vis. Με γνωστή την αρχική ποσότητα της κινάζολινονης που προστίθεται, υπολογίζεται η % Απόδοση εγκλεισμού, όπως αναφέρθηκε στην υποενότητα 6.1.1.

### Ποσοστό Φόρτωσης (Drug Loading, DL%)

Το ποσοστό φόρτωσης των νανοσωματιδίων υπολογίζεται ως το πηλίκο της ουσίας που εγκλείστηκε προς το συνολικό βάρος του υλικού που ζυγίζεται στο ξηρό προϊόν. Στην παρούσα εργασία, ζυγίστηκαν ποσότητες για θεωρητικό ποσοστό φόρτωσης 40%. Είναι σημαντικό το θεωρητικό και το πραγματικό ποσοστού φόρτωσης να συγκλίνουν. Το ποσοστό φόρτωσης επηρεάζει σημαντικά το προφίλ απελευθέρωσης. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Κεφ. 6.2.), το πραγματικό ποσοστό φόρτωσης, υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ Ποσοστό Φόρτωσης} = \frac{\text{mg εγκλεισμένης δραστικής ουσίας}}{\text{Συνολικά mg νανοσωματιδίων}} \%$$

### Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)

Τα νανοσωματίδια PLA που παρασκευάστηκαν μετρήθηκαν με DLS ως προς το μέγεθος, το δείκτη πολυδιασποράς (Polydispersity Index, PDI) και το δυναμικό ζ. Η μέτρηση γίνεται είτε σε 20 ml διασποράς NPs / 2980 ml υπερκάθαρο νερό ή σε 1 mg ξηρών NPs / 20 ml υπερκάθαρο νερό. Η διασπορά παραλαμβάνεται πριν την επεξεργασία με λυοφιλίωση, ενώ ως ξηρό, θεωρείται το τελικό προϊόν. Τα δείγματα φιλτράρονται με πορώδες 0.2 μm, αναδεύονται με vortex και μεταφέρονται με σύριγγα σε κυβελίδα DTS1070, προς μέτρηση. Πραγματοποιούνται τρεις τουλάχιστον μετρήσεις από κάθε δείγμα τόσο του μεγέθους, όσο και του δυναμικού ζ, προκειμένου να βρεθεί ένας μέσος όρος τιμών.

Για τις μετρήσεις, χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένες συνθήκες (Standard Operation Procedure, SOP):

Πίνακας 11: Συνθήκες μέτρησης DLS σε μήτρα PLA.

Μέτρηση	Δείκτης Διάθλασης	Απορρόφηση	Θερμοκρασία	Χρόνος σταθεροποίησης	Ιξώδες (cP)
Size	1.333	0.009	25 °C	120 sec	0.8872
Zeta Potential	1.333	0.009	25 °C	120 sec	0.8872

#### Υπέρυθρη Φασματοσκοπία με Μετασχηματισμό Fourier (Fourier-transform Infrared Spectroscopy, FT-IR)

Για το χαρακτηρισμό της δομής των νανοσωματιδίων PLA, μελετώνται τα δείγματα **LS5** και **LS7**, όπως και τα κενά νανοσωματίδια **LS6** με μέθοδο FT-IR. Στη συγκεκριμένη μέθοδο, παρασκευάζεται ομογενής παστίλια, με λειοτρίβηση κόκκους νανοσωματιδίων και KBr σε αναλογία 1/40 αντίστοιχα, και συμπίεση με πρέσα. Βασίζομενοι στις κορυφές των καθαρών ενώσεων και των κενών NPs, παρατηρούνται οι μεταβολές στο φάσμα FT-IR του φορτωμένου νανοσωματιδίου και συμπεραίνουμε ως προς τον τρόπο εγκλεισμού.

#### Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)

Λήφθηκαν εικόνες SEM έπειτα από επιχρύσωση μικρής ποσότητας δείγματος ξηρών νανοσωματιδίων **LS5** και των κενών **LS4**. Οι αναλύσεις προέκυψαν από διαφορετικά σημεία του υλικού με διαφορετικό εστιακό βάθος και μεγέθυνση. Κατά την χρήση του SEM, η στήλη πρέπει να βρίσκεται υπό κενό για να μπορεί να παραχθεί και διατηρηθεί σταθερή η ακτίνα των ηλεκτρονίων.

#### Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry, DSC)

Μελετάται η θερμική συμπεριφορά του υλικού κατά τη διάρκεια θέρμανσης και ψύξης με σταθερό ρυθμό. Μικρή ποσότητα δειγμάτων **LS4** και **LS5** τοποθετείται σε καψίδιο στο θάλαμο μέτρησης. Πραγματοποιείται μέτρηση με τη βοήθεια καψιδίου αναφοράς το οποίο περιέχει μία ουσία αδρανή στο μετρούμενο θερμοκρασιακό περιβάλλον. Η θερμοκρασία υποδοχέων μετράται με τη χρήση θερμοζυγών. Στο θάλαμο μέτρησης (φούρνος) ρέει αδρανές αέριο ώστε να εξασφαλίζεται ατμοσφαιρική αδράνεια και βέλτιστη θερμική αγωγιμότητα.

Οι ρυθμοί θέρμανσης και ψύξης είναι τέτοιοι ώστε να μπορεί η διάταξη να παρακολουθήσει και να καταγράψει τις αλλαγές στο υλικό συναρτήσει της θερμοκρασίας, αλλά και να μην έχουμε αλλαγές στη δομή του υλικού όπως δομική χαλάρωση ή γήρανση. Ο βαθμός κρυσταλλικότητας των PLA NPs υπολογίζεται ως εξής:

$$x_c = \frac{\Delta H}{\Delta H_0} \times 100$$

όπου  $\Delta H$  η ενθαλπία τήξης του δείγματος σε (J/g) και  $\Delta H_0$  η ενθαλπία τήξης του 100% κρυσταλλικού πολυμερούς, (J/g). Για το PLA,  $\Delta H_0=93.1$  J/g.

Οι συνθήκες του πειράματος στον κύκλο θέρμανσης-ψύξης παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 12: Συνθήκες πειράματος DSC σε ένα κύκλο θέρμανσης-ψύξης.

Κωδικός NPs	Μάζα (mg)	Αρχική θερμοκρασία (°C)	Τελική θερμοκρασία (°C)	Ρυθμός θέρμανσης-ψύξης (°C/min)
LS4	0.81	0	200	10.00
		200	0	
LS5	3.65	0	200	10.00
		200	0	

### Θερμοβαρμετρική Ανάλυση (Thermogravimetric analysis, TGA)

Πραγματοποιήθηκε θερμοβαρμετρική ανάλυση για το δείγμα **LS5** και για τα κενά ναοσωματίδια **LS4** για να διαπιστωθεί η απώλεια μάζας του υλικού με αύξηση της θερμοκρασίας και κατ' επέκτασιν η προστασία της ένωσης στη μήτρα του πολυμερούς.

Σε αυτή τη μέθοδο ανάλυσης, η ουσία σε στερεή μορφή ζυγίζεται και τοποθετείται σε καψίδιο. Η καρδιά του οργάνου είναι ένας αναλυτικός ζυγός μέσα σε ένα φούρνο και για το λόγο αυτό το TG όργανο αποκαλείται και θερμοζυγός. Το δείγμα εναποτίθεται σε ζυγό μέσα στο όργανο σε αδρανή ατμόσφαιρα (N<sub>2</sub>). Το δείγμα θερμαίνεται με σταθερό ρυθμό και υπολογίζεται η απώλεια μάζας του κατά την αποικοδόμησή του.

Πίνακας 13: Συνθήκες πειράματος TGA.

Κωδικός NPs	Αρχική μάζα (mg)	Αρχική θερμοκρασία (°C)	Τελική θερμοκρασία (°C)	Ρυθμός θέρμανσης (°C/min)
LS4	6.64	30	600	10.00
LS5	7.51	30	600	10.00

## 8.9. ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΟΝΗΣ ΣΕ ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ β-CD (β-CD Inclusion Complexes, ICs)

Πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός κιναζολινονών σε β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD) με την τεχνική της συγκαταβύθισης όπως αυτή παρουσιάζεται στην εργασία των *Li et al.*<sup>85</sup> και περιγράφεται παρακάτω.

### 8.9.1. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ποσότητα της β-CD (200 mg) διαλύεται σε 40 mL υπερκάθαρο νερό. Ζυγίζονται 8 mg κιναζολινόνης σε ζυγό ακριβείας, τα οποία διαλύονται σε 10 mL ακετόνη και προστίθενται στο διάλυμα της β-CD. Το διάλυμα τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για 5 min και αναδεύεται με μαγνητική ανάδευση για 1 ώρα στα 200 rpm. Στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρείται στις 4000 στροφές, αρχικά για 15 min και έπειτα για άλλα 10 min. Το υπερκείμενο που περιέχει τα σύμπλοκα κιναζολινόνης-βCD, φιλτράρεται με μέγεθος πόρων 0.45 μm ώστε να απομακρυνθεί η αδέσμευτη ποσότητα κιναζολινόνης. Αποθηκεύεται στην κατάψυξη μέχρι τη λυοφυλίωση.

### 8.9.2. ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΟΝΗΣ-βCD

Με την παραπάνω μέθοδο της συγκαταβύθισης συντέθηκαν σύμπλοκα εγκλεισμού με τις ενώσεις 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκινναζολιν-4(3H)-όνη (Μόριο 3) και 2-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-φαινυλο-2,3-διυδροκινναζολιν-4(1H)-όνη (Μόριο 4) σε β-CD.

### 8.10. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΟΝΗΣ-βCD

#### Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS)

Το σύμπλοκο **LS13** που παρασκευάστηκε, μετρήθηκαν με DLS ως προς το μέγεθός τους, το PDI και το ζ-δυναμικό. Διαλύεται ελάχιστη ποσότητα συμπλόκου σε υπερκάθαρο νερό, φιλτράρεται σε πορώδες 0.2 μm, τοποθετείται στην κυψελίδα και μετρούνται τα παραπάνω χαρακτηριστικά.

Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένες συνθήκες (Standar Operation Procedure, SOP):

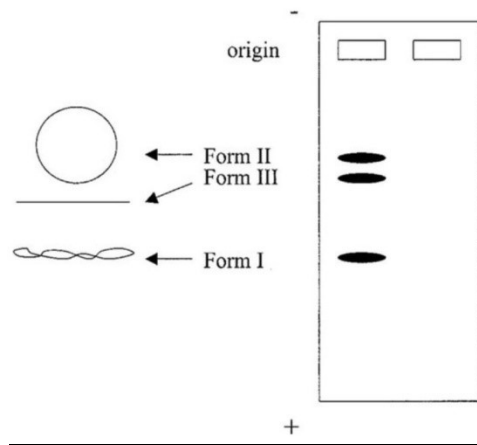
Πίνακας 14: Πίνακας συνθηκών μέτρησης DLS σε β-CD σύμπλοκα.

Μέτρηση	Δείκτης Διάθλασης	Απορρόφηση	Θερμοκρασία	Χρόνος σταθεροποίησης	Διηλεκτρική Σταθερά
Size	1.332	0.0157 (633 nm)	25 °C	120 sec	-
Zeta Potential	1.332	0.0157 (633 nm)	25 °C	120 sec	78.5

### 8.11. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

#### 8.11.1. ΦΩΤΟΒΟΛΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

Η ικανότητα φωτοδιάσπασης του DNA διερευνάται σε υπερελικωμένο DNA πλασμιδίου pBR322, με φωτοβόληση υπεριώδους ακτινοβολίας (UVA, UVB) παρουσία του φωτοδιασπαστή, σε pH=6.8 με Tris buffer. Η διάσπαση του DNA έπειτα από την προσθήκη της ένωσης μπορεί να γίνει ορατή με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Το DNA του πλασμιδίου που χρησιμοποιείται εμφανίζεται στις τρεις παρακάτω μορφές: Το κυκλικό υπερελικωμένο DNA (Μορφή I) μετατρέπεται σε κυκλικό με 'χαλαρή μορφή' (Μορφή II) με θραύση στον έναν κλώνο, και σε γραμμικό (Μορφή III) με διάσπαση και στους δύο κλώνους. Εκτεταμένη διάσπαση οδηγεί σε κατακερματισμό του πλασμιδιακού DNA. Η μέτρηση της φωτοδιάσπασης γίνεται με λάμπες υπεριώδους στα 312 nm στο UVB και στα 365 nm στο UVA, σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και ύψος από το δείγμα. Η συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Περισσότερες πληροφορίες για τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της βιολογικής μελέτης, παρατίθεται στο Παράρτημα 11.5.

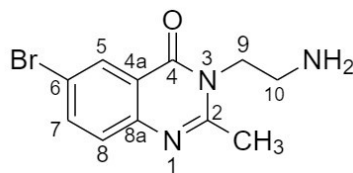


Εικόνα 15: Μορφές πλασμιδιακού DNA και gel αгарόζης.

## 9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 9.1. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ 3-(2-ΑΜΙΝΟΑΙΘΥΛΟ)-6-ΒΡΩΜΟ-2-ΜΕΘΥΛΟΚΙΝΑΖΟΛΙΝ-4(3H)-ΟΝΗΣ (3)

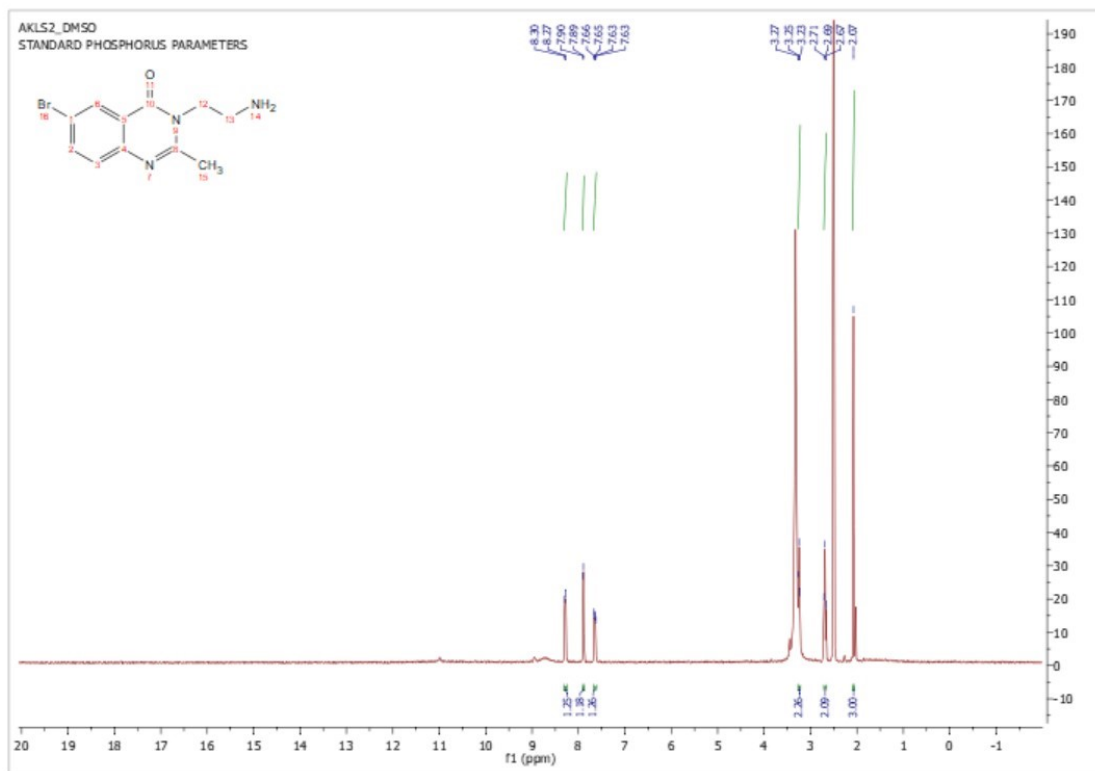
Molecular Weight 282.14



(Μόριο 3)

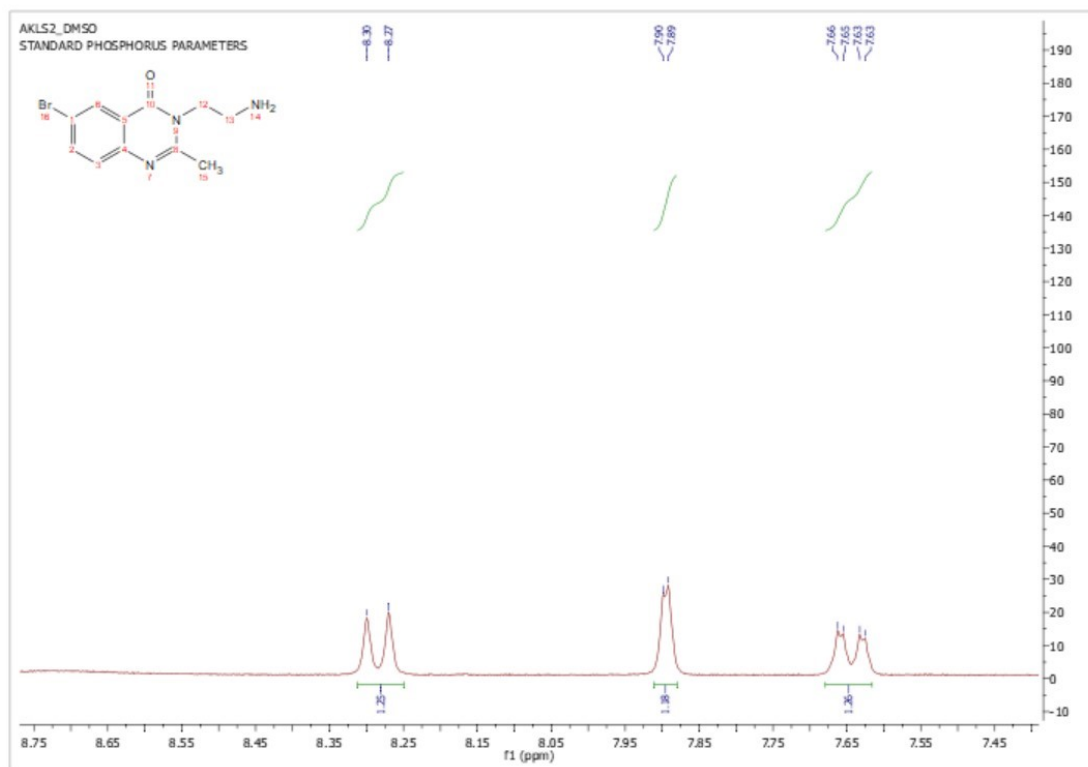
Σχήμα 24: Δομή του μορίου 3.

Στην Εικόνα 16, παρουσιάζεται το φάσμα πρωτονίου  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO) της 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκιναζολιν-4(3H)-όνης (Μόριο 3) (Σχήμα 24) σε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO- $d_6$ ).



Εικόνα 16: Φάσμα <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) του μορίου 3.

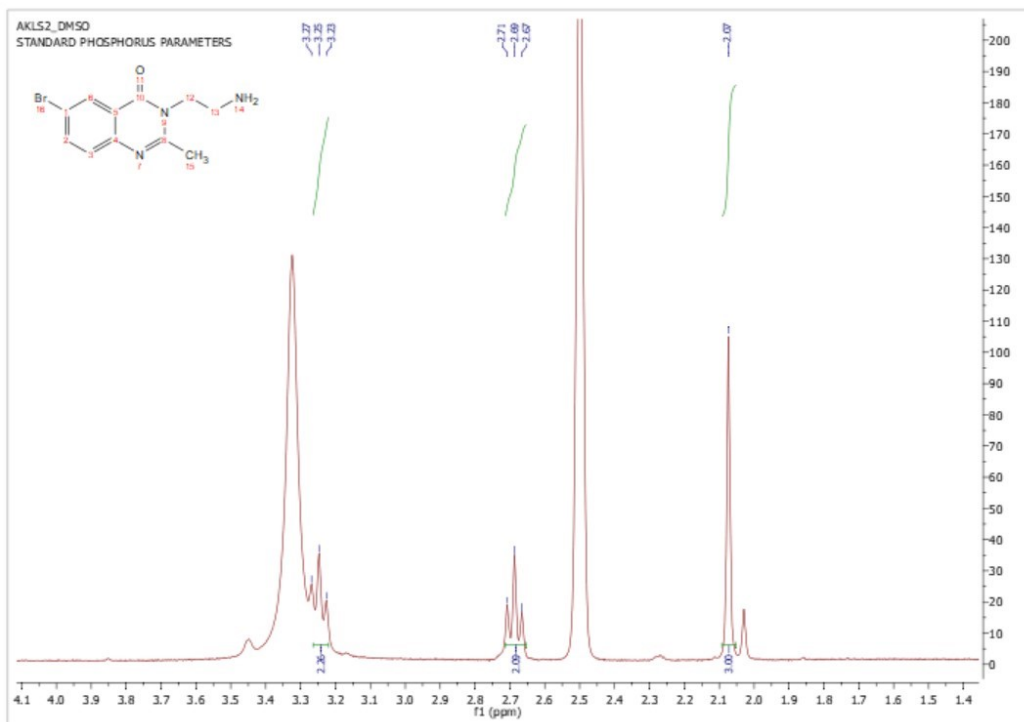
Τα αρωματικά πρωτόνια της ένωσης εμφανίζονται μεταξύ των 8.30-7.63 ppm (Εικόνα 17). Στα 8.30-8.27 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή, με σταθερά σύζευξης  $J=8.9$  Hz, που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης C-5. Στα 7.90-7.89 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή, με σταθερά σύζευξης  $J=2.0$  Hz, που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης C-7. Τέλος, στα 7.66-7.63 ppm εμφανίζεται κορυφή διπλή διπλών, με μία μεγάλη σταθερά σύζευξης,  $J=8.9$  Hz και μία μικρή στα  $J=2.2$  Hz, που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο αρωματικό πρωτόνιο της θέσης C-8.



Εικόνα 17: Μεγέθυνση του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR της κιναζολινόνης 3 (περιοχή 9-7ppm).

Στη συνέχεια του φάσματος (Εικόνα 18), παρουσιάζεται μια πολλαπλή κορυφή στα 3.27-3.23 ppm που ολοκληρώνεται για 2 πρωτόνια της ομάδας  $-\text{CH}_2$  και μια πολλαπλή κορυφή στα 2.71-2.67 ppm που ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια αντιστοίχως. Στα υψηλότερα πεδία, ως πιο προστατευμένα εμφανίζονται τα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της ομάδας του μεθυλίου της θέσης 2. Αυτά εμφανίζονται με μια απλή κορυφή στα 2.07 ppm.





Εικόνα 18: Μεγέθυνση του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR της κιναζολινόνης 3 (περιοχή 4-1 ppm).

## 9.2. ΑΠΟΔΟΣΗ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΠΟΣΟΣΤΟ ΦΟΡΤΩΣΗΣ NPs

Η απόδοση εγκλεισμού (Encapsulation Efficiency, EE%) και το πραγματικό ποσοστό φόρτωσης (Drug Loading, DL%) υπολογίστηκαν με βάση τους τύπους:

$$\%EE = \frac{\text{Συνολικά } mg \text{ ουσίας} - mg \text{ ουσίας στο υπερκείμενο}}{\text{Συνολικά } mg \text{ ουσίας}} \%$$

$$\%DL = \frac{mg \text{ εγκλεισμένης ουσίας}}{\text{Συνολικά } mg \text{ υλικού}} \%$$

Πίνακας 15: % Απόδοση εγκλεισμού % Ποσοστό φόρτωσης για τα νανοσωματίδια PLA με εγκλεισμένη την κιναζολινόνη 3.

NPs 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκιναζολιν-4(3H)-όνης (3)	Διαλύτης	% Απόδοση Εγκλεισμού	% Ποσοστό φόρτωσης
LS17	DMSO	43.1	21.4
LS5	CC/LA (1:1.5)	55.4	42.3
LS16	CC/OA (1:1)	48.8	23.9
LS18	G/LA (1:5)	51.9	28.4

**Πίνακας 16: % Απόδοση εγκλεισμού % Ποσοστό φόρτωσης για τα νανοσωματίδια PLA με εγκλεισμένη την κινναζολινόνη 4.**

ΝPs 2-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-φαινυλο-2,3-διυδροκινναζολιν-4(1H)-όνης (4)	Διαλύτης	% Απόδοση Εγκλεισμού	% Ποσοστό φόρτωσης
LS3	Ακετόνη	74.2	41.3
LS7	CC/LA (1:1.5)	48.8	16.7
LS14	CC/OA (1:1)	-	-

Το θεωρητικό ποσοστό φόρτωσης του 40% συγκλίνει με αυτό που υπολογίστηκε πειραματικά, για τα δείγματα LS5 και LS3. Η μέθοδος εγκλεισμού της ένωσης 4 με συμβατικό διαλύτη (ΝPs **LS3**), παρουσιάζει τη μεγαλύτερη απόδοση εγκλεισμού, με 74.2%. Το γεγονός αυτό, επιβεβαιώνει την επιτυχία της μεθόδου γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης διαλύτη στον εγκλεισμό της κινναζολινόνης 4, με τις συνθήκες που επιλέχθηκαν.

Το δείγμα **LS5** με εγκλεισμό της κινναζολινόνης 3, με διαλύτη NaDES CC/LA (1:1.5) δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα στην απόδοση εγκλεισμού και το ποσοστό φόρτωσης, σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα με NaDES. Υψηλή απόδοση εγκλεισμού, παρατηρείται και στην περίπτωση του **LS18**, με NaDES G/LA (1:5). Μάλιστα, οι αποδόσεις εγκλεισμού όλων των δειγμάτων με NaDES στην ένωση 3, είναι υψηλότερες σε σχέση με τη μέθοδο εγκλεισμού με διαλύτη DMSO (**LS17**). Φαίνεται λοιπόν ότι η τροποποιημένη μέθοδος με τη χρήση NaDES να επιτρέπει τον εγκλεισμό των κινναζολινονών που μελετήθηκαν, χωρίς να υποβαθμίζεται η ικανότητα φόρτωσης των ΝPs.

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η μέθοδος έμμεσου προσδιορισμού, δεν είναι πάντα κατάλληλη για τον υπολογισμό των παραπάνω αποδόσεων, ιδιαίτερα με τη χρήση των NaDES καθώς είναι πιθανό οι προσδιοριζόμενες ενώσεις να αλληλεπιδρούν με τα συστατικά του ευτηκτικού μείγματος και να προκύπτουν μεταβολές στο μήκος κύματος που απορροφούν αλλά και στη συγκέντρωση που μετράται στα υπερκείμενα με φασματοφωτομετρία UV/Vis..

Στην περίπτωση του δείγματος **LS14**, στο οποίο η ένωση 4 εγκλείστηκε με NaDES CC/OA (1:1), δεν ήταν εφικτός ο υπολογισμός της απόδοσης εγκλεισμού με έμμεσο τρόπο.

Αντίστοιχα προβλήματα μετατόπισης του μήκους κύματος κοντά στα 275 nm, παρουσίασε η κινναζολινόνη 4 και στο δείγμα **LS7**, με το NaDES CC/LA (1:1.5). Ωστόσο σε αυτή την περίπτωση, ήταν εφικτή η μέτρηση της απόδοσης εγκλεισμού, ενδέχεται όμως η τιμή της να εμπεριέχει πειραματική απόκλιση.

### 9.3. ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΚΕΛΑΣΗ ΦΩΤΟΣ (DYNAMIC LIGHT SCATTERING, DLS)

Στους παρακάτω πίνακες, παρουσιάζονται συνοπτικά οι μετρήσεις του DLS ως προς το μέγεθος (nm), το δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και το δυναμικό ζ (mV), οι μέσοι όροι (M.O.) αυτών, και οι τυπικές αποκλίσεις των μεγεθών (S.T.D.) για τα νανοσωματίδια με εγκλεισμένες τις ενώσεις 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκιναζολιν-4(3H)-όνη **(3)** και 2-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-φαινυλο-2,3-διυδροκιναζολιν-4(1H)-όνη **(4)** καθώς και τα κενά νανοσωματίδια, αντίστοιχα.

Πίνακας 17: Αποτελέσματα DLS για τα δείγματα νανοσωματιδίων PLA με εγκλεισμένη την κινναζολιόνη 3.

PLA NPs Μορίου 3	Μέγεθος (nm)	M.O.	PDI	M.O.	Δυναμικό ζ (mV)	M.O.
LS17 (DMSO)	390.9	291.9±137.8	0.350	0.465	-17.5	-16.3±6.36
	333.4		0.613		-29.8	
	151.3		0.431		-1.61	
LS18 (G/LA 1:5)	310.5	306.3±108.2	0.119	0.117	-0.999	-2.27±4.58
	304.6		0.115		-0.630	
	303.8		0.118		-0.645	
LS5 (CC/LA 1:1.5)	340.0	311.9±93.40	0.410	0.374	-15.4	-14.8±4.16
	261.1		0.347		-12.5	
	334.7		0.364		-16.5	

Πίνακας 18: Αποτελέσματα DLS για τα δείγματα νανοσωματιδίων PLA με εγκλεισμένη την κινναζολιόνη 4.

PLA NPs Μορίου 4	Μέγεθος (nm)	M.O.	PDI	M.O.	Δυναμικό ζ (mV)	M.O.
LS3 (Ακετόνη)	215.7	225.53±75.84	0.1	0.086	-3.03	-2.75±4.6
	217.5		0.081		-2.36	
	234.4		0.076		-2.86	
LS7 (CC/LA 1:1.5)	640.2	518±294.35	0.646	0.674	-36.9	-34.3±5.14
	558.1		0.589		-32.6	
	355.7		0.788		-33.3	
LS14 (CC/OA 1:1)	287.7	235.95±104.9	0.945	0.914	-19.6	-20.3±4.82
	184.2		0.884		-19.6	
	-		-		-21.8	

Πίνακας 19: Αποτελέσματα DLS των κενών νανοσωματιδίων PLA.

Κενά NPs PLA	Μέγεθος (nm)	M.O.	S.T.D. (nm)	PDI	M.O.	Δυναμικό ζ (mV)	M.O.
LS4	219.4	219.03±51.98		0.045	0.039	-3.09	-
	217.8			0.030		-2.44	2.80±5.21

	219.9			0.042		-2.88	
LS6 (CC/LA 1:1.5)	786.5	840.3±468.1		0.155	0.119	-9.67	-
	859.7			0.065		-11.7	
	874.8			0.139		-3.76	
LS19 (G/LA 1:5)	411.6	348.9±121.54		0.447	0.58	-16.2	-
	332			0.454		-7.45	
	303			0.841		-6.23	

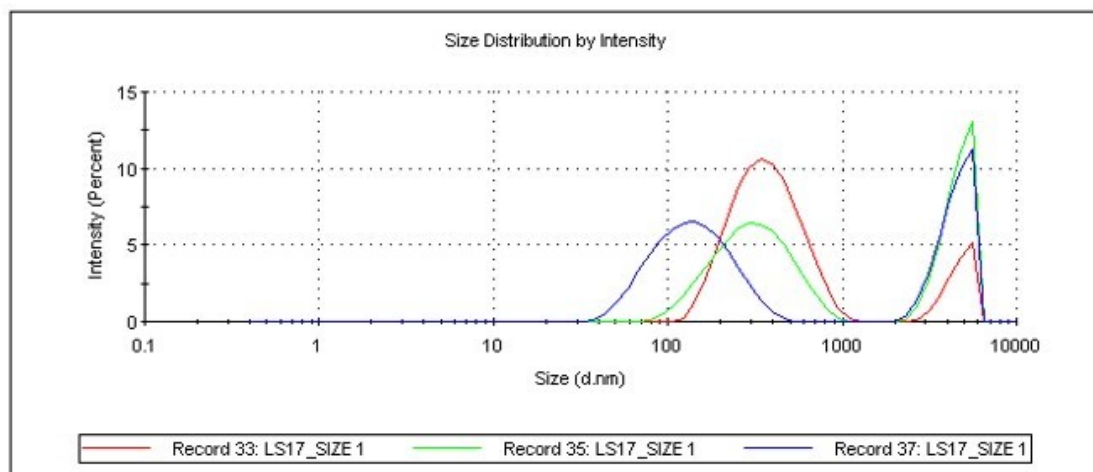
### 9.3.1. ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ PLA ΜΕ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟ ΤΗΣ 3-(2-ΑΜΙΝΟΑΙΘΥΛΟ)-6-ΒΡΩΜΟ-2-ΜΕΘΥΛΟΚΙΝΑΖΟΛΙΝ-4(3H)-ΟΝΗΣ (3)

Σύμφωνα με τον πίνακα 17, τα νανοσωματίδια PLA με εγκλεισμένη την κινάζολινονη **3**, έχουν μέγεθος που κυμαίνεται κυρίως στην περιοχή των 300 nm, με λίγες τιμές να αποκλίνουν. Ο δείκτης πολυδιασποράς PDI εμφανίζεται χαμηλότερα από 0.5 αντιπροσωπεύοντας ανεκτή ομοιογένεια μεγεθών στην υδατική διασπορά. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι διασπορές εμφανίζουν μία δεύτερη κορυφή στα 4.5-5.5 μm, το οποίο είναι ένδειξη συσσωμάτωσης του ξηρού προϊόντος ή διόγκωσης λόγω της επεξεργασίας με φυγοκεντρίσεις και λυοφιλίωση. Ωστόσο στις περισσότερες περιπτώσεις, η δεύτερη αυτή κορυφή, παρουσιάζεται χαμηλότερης έντασης σε σχέση με την κύρια κορυφή στην περιοχή των νανομέτρων. Ενδεχομένως λοιπόν, η τάση συσσωμάτωσης να μην είναι η επικρατέστερη στο δείγμα ή να μπορεί να ελαχιστοποιηθεί με περαιτέρω βελτιώσεις κατά την επεξεργασία των νανοσωματιδίων, όπως την προσθήκη σταθεροποιητικού ή αντιδιογκωτικού παράγοντα. Το δυναμικό ζ παίρνει αρνητικές χαμηλές τιμές, λόγω των εστερικών ομάδων του PLA, το οποίο επιβεβαιώνεται πειραματικά από την τιμή δυναμικού ζ των κενών νανοσωματιδίων **LS4**. Ωστόσο παρατηρείται μία αύξηση του δυναμικού ζ σε περισσότερο αρνητικές τιμές στα εγκλεισμένα NPs, το οποίο δηλώνει εντονότερη τάση απώθησης μεταξύ των νανοσωματιδίων, το οποίο μπορεί να οφείλεται και στα NaDES. Στη συνέχεια θα αναφερθούν ορισμένα συμπεράσματα από τη σύγκριση και την παρατήρηση των αποτελεσμάτων DLS.

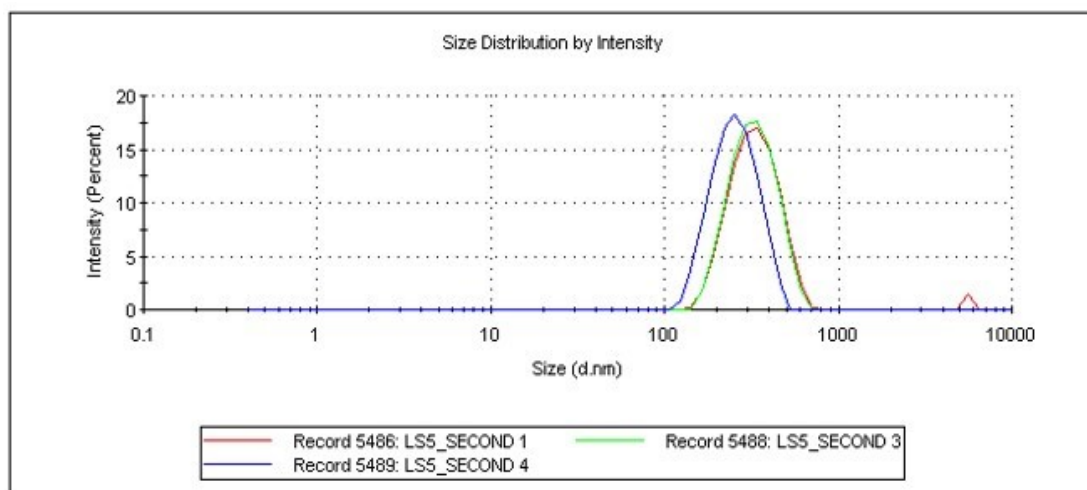
Τα νανοσωματίδια PLA στα οποία χρησιμοποιήθηκε διαλύτης DMSO (**LS17**) κατά τη μέθοδο γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης διαλύτη, παρουσίασαν τάση συσσωμάτωσης, με δεύτερη κορυφή μεγέθους κοντά στα 4500 nm καθώς και αρκετά εμφανή πολυδιασπορά μεγεθών, στην κύρια κορυφή στα 300 nm.

Παράλληλα, παρατηρώντας τα δείγματα **LS5** και **LS18**, στα οποία πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός με χρήση των NaDES Χλωριούχος χολίνη / Γαλακτικό οξύ 1:1.5 και Γλυκόζη / Γαλακτικό οξύ 1:5 αντίστοιχα, βλέπουμε τάση εξάλειψης της συσσωμάτωσης και ικανοποιητικότερη κατανομή μεγεθών. Οι συγκεκριμένες μετρήσεις προέκυψαν από τη διασπορά των NPs πριν την επεξεργασία με λυοφιλίωση. Συγκεκριμένα, το δείγμα **LS18** διαθέτει τη μεγαλύτερη ομοιομορφία, το οποίο υποδεικνύει ότι η γλυκόζη βοηθάει στη διασπορά των νανοσωματιδίων λόγω μεγάλης διαλυτότητας στο υδατικό περιβάλλον, με αποτέλεσμα καλύτερη ομοιογένεια. Ενδεχομένως να σταθεροποιεί περαιτέρω τα νανοσωματίδια, με αλληλεπιδράσεις όπως δεσμοί υδρογόνου, με τις αλυσίδες του πολυμερούς.

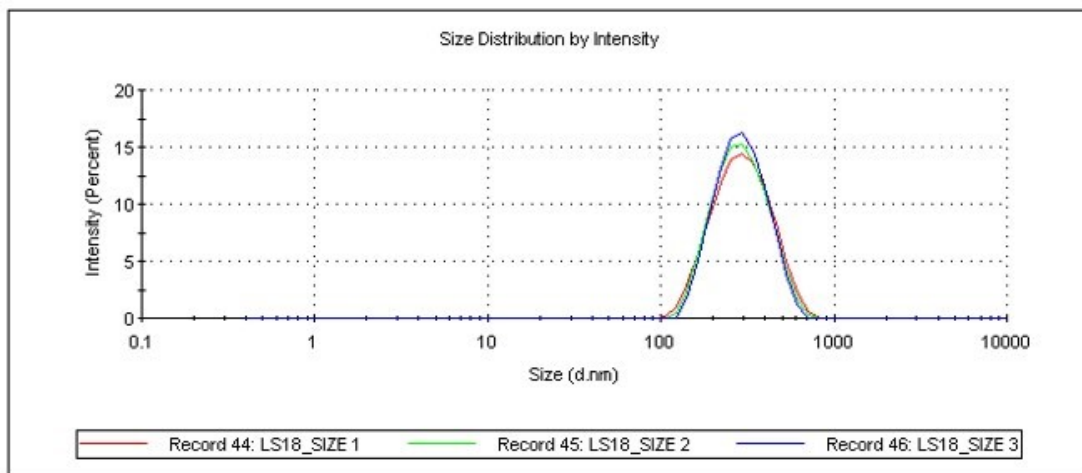
Μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η τροποποιημένη μέθοδος της γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης διαλύτη με προσθήκη NaDES, θα μπορούσε να βελτιώσει ορισμένα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων που σχηματίζονται με διαλύτη DMSO, όπως το μέγεθος και η ομοιογένεια. Θα μπορούσε να εξεταστεί επίσης η χρήση του NaDES ως επιφανειοδραστικού παράγοντα κατά τη γαλακτωματοποίηση, ωστόσο, είναι δύσκολο να αντικαταστήσει τη δράση του PVA.



Εικόνα 19: Κατανομή μεγεθών του δείγματος LS17 (νανοσωματίδια PLA με εγκλεισμένη την κινιζολινόνη 3 σε διαλύτη DMSO).



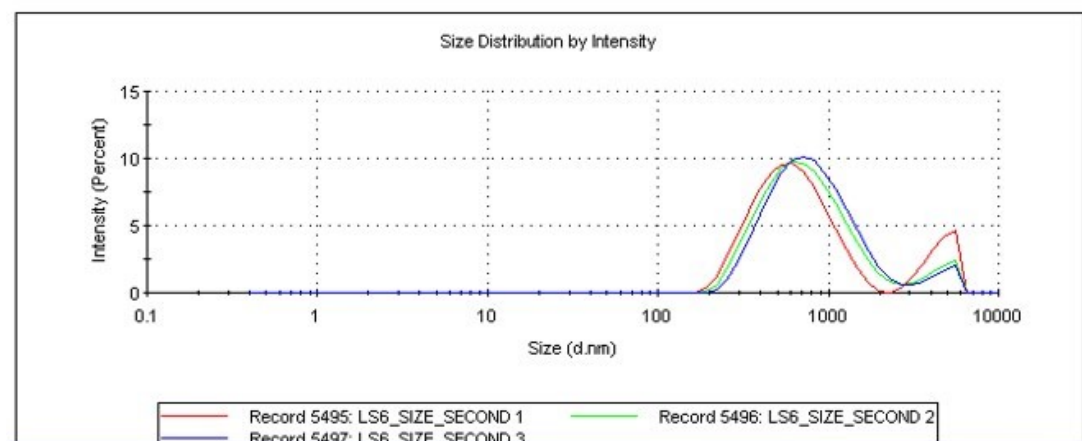
Εικόνα 20: Κατανομή μεγεθών του δείγματος LS5 (νανοσωματίδια PLA με εγκλεισμένη την κινιζολινόνη 3 σε διαλύτη NaDES CC/LA 1:1.5).



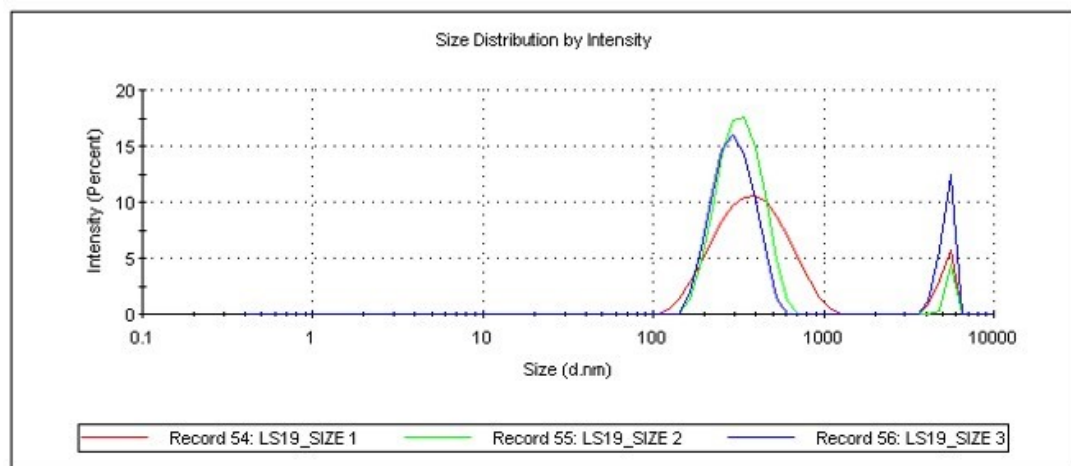
Εικόνα 21: Κατανομή μεγεθών του LS18 (νανοσωματίδια PLA με εγκλεισμένη την κινναζολινόνη 3 σε διαλύτη NaDES G/LA 1:5).

Σύγκριση κενών νανοσωματιδίων με νανοσωματίδια PLA που περιέχουν εγκλεισμένη ουσία

Τα κενά δείγματα **LS6** με προσθήκη NaDES CC/LA 1:1.5 και **LS19** με G/LA 1:5, παρουσίασαν επίσης κορυφές λόγω συσσωμάτωσης στην περιοχή των μm, το οποίο επιβεβαιώνει ότι η πολυδιασπορά μεγεθών δεν οφείλεται στον εγκλεισμό των κινναζολινονών. Στην περίπτωση των κενών νανοσωματιδίων PLA χωρίς προσθήκη NaDES, η κατανομή μεγεθών ήταν πολύ καλή, όπως φαίνεται από την Εικόνα 24.



Εικόνα 22: Μέγεθος κενών νανοσωματιδίων PLA, LS6 (με προσθήκη NaDES CC/LA 1:1.5).



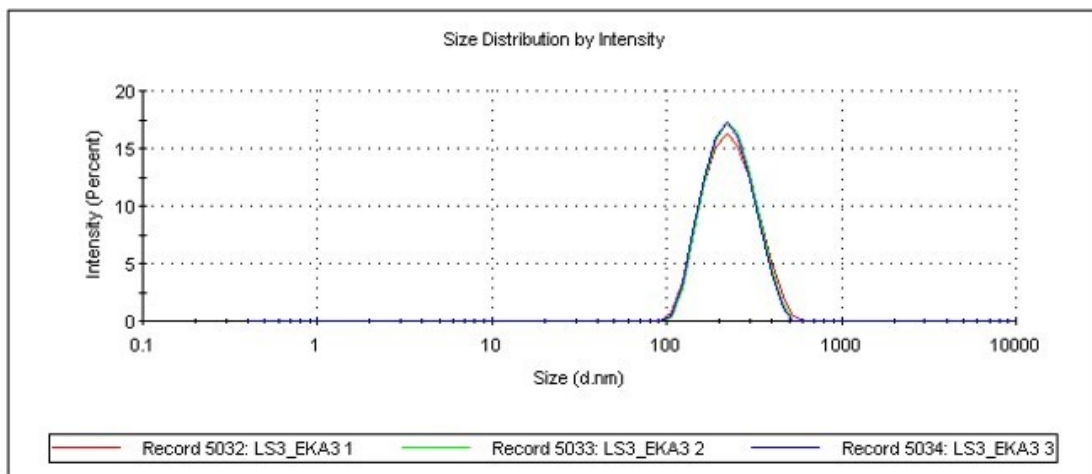
Εικόνα 23: Κατανομή μεγέθους κενών νανοσωματιδίων PLA, LS19 (με προσθήκη NaDES G/LA 1:5).

### Σύγκριση φορτωμένων νανοσωματιδίων PLA με διαφορετικά είδη NaDES

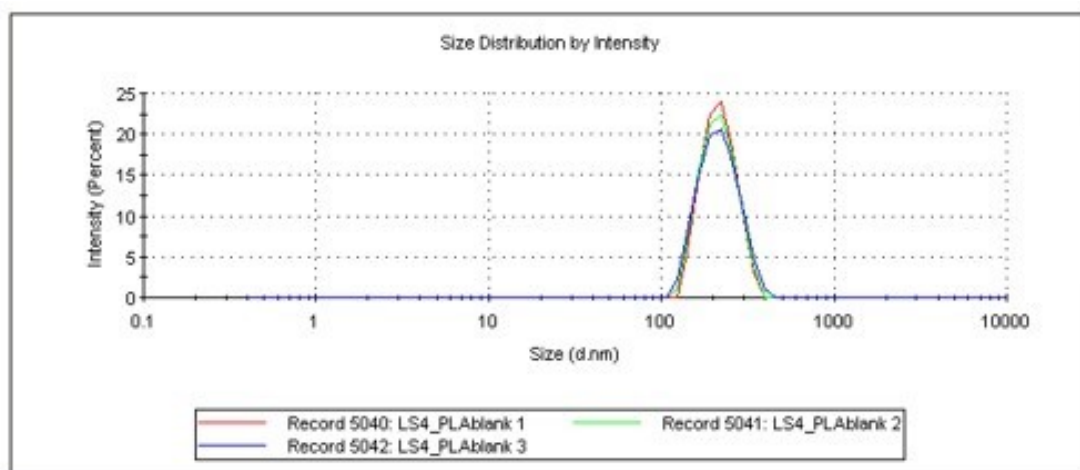
Τόσο τα νανοσωματίδια με το NaDES CC/LA 1:1.5 (**LS5**) όσο και με τη G/LA 1:5 (**LS18**) δείχνουν να επιδρούν θετικά στη βελτίωση του μεγέθους των νανοσωματιδίων και του δείκτη πολυδιασποράς. Οι DLS μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν και σε νανοσωματίδια με NaDES, Χλωριούχος χολίνη / Οξαλικού οξέος 1:1 (**LS16**) όπου στο ξηρό προϊόν παρουσίασαν έντονη πολυδιασπορά ως προς το μέγεθος.

#### **9.3.2. ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ PLA ΜΕ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟ ΤΗΣ 2-(4-ΜΕΘΟΞΥΦΑΙΝΥΛΟ)-3-ΦΑΙΝΥΛΟ-2,3-ΔΙΥΔΡΟΚΙΝΑΖΟΛΙΝ-4(1H)-ΟΝΗΣ (4)**

Τα ξηρά νανοσωματίδια **LS3** με συμβατικό εγκλεισμό της 2-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-φαινυλο-2,3-διυδροκιναζολιν-4(1H)-όνης (Μόριο **4**), αξιολογούνται ως ιδιαίτερα ομοιογενή με δείκτη πολυδιασποράς κάτω από 0.1 και μέγεθος 225.5 nm. Το γεγονός αυτό δείχνει την επιτυχία της μεθόδου γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης διαλύτη στη συγκεκριμένη ένωση, ενώ η επεξεργασία μέχρι του ξηρού προϊόντος δε φαίνεται να επηρεάζει τόσο τα χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων. Να σημειωθεί ότι συγκρίνοντας το **LS3** με το δείγμα κενών νανοσωματιδίων χωρίς NaDES (**LS4**), παρατηρούμε ότι δε μεταβάλλονται λόγω εγκλεισμού της κιναζολινόνης **4** διαλυμένης σε συμβατικό διαλύτη, το μέγεθος, ο δείκτης πολυδιασποράς και το δυναμικό ζ των νανοσωματιδίων.



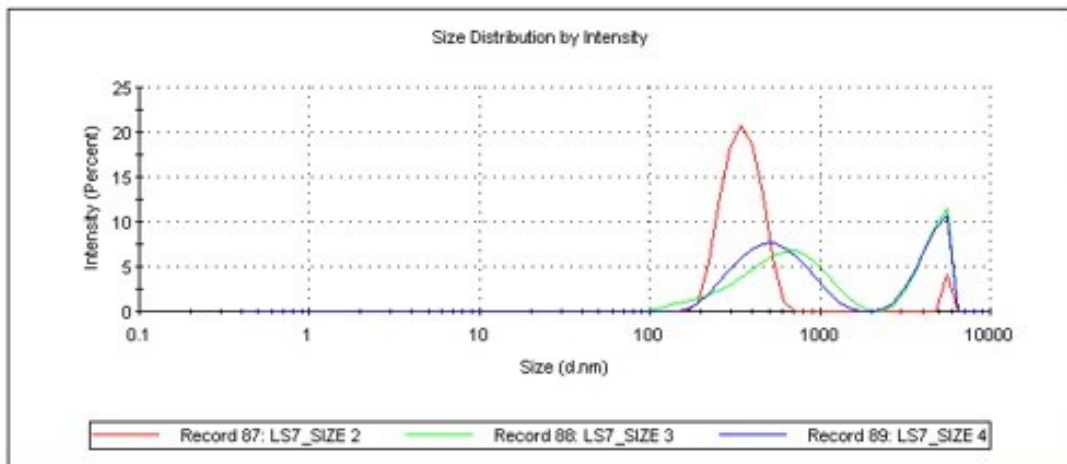
Εικόνα 24: Κατανομή μεγεθών του δείγματος LS3 (νανοσωματίδια PLA με εγκλεισμένη την κιναζολινόνη 4 σε συμβατικό διαλύτη).



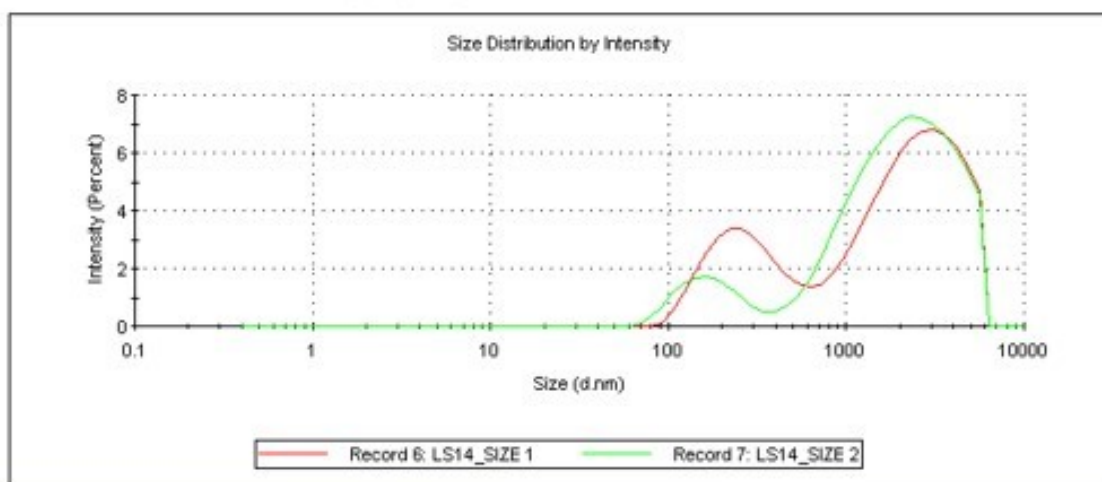
Εικόνα 25: Κατανομή μεγεθών του δείγματος LS4 (κενά νανοσωματίδια PLA).

Η κιναζολινόνη 4 εγκλείστηκε και με διαλύτη NaDES CC/LA (1:1.5) (**LS7**) και τα αποτελέσματα στα αντίστοιχα ξηρά νανοσωματίδια έδειξαν τάση συσσωμάτωσης και πολυδιασπορά. Αλλά και το προφίλ του δείγματος (**LS14**) με CC/OA (1:1) ως διαλύτης της κιναζολινόνης 4, έδειξε γενική τάση συσσωμάτωσης. Σε κάθε περίπτωση, η μέθοδος με τη χρήση των NaDES ως διαλύτες για την πραγματοποίηση του εγκλεισμού, δεν παρουσιάζει μία γενικευμένη τάση και με τις δύο ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν. Θα πρέπει να πραγματοποιηθούν περισσότερες δοκιμές εγκλεισμού με NaDES, ώστε να καταστεί σαφέστερη η κατεύθυνση των βελτιώσεων.





Εικόνα 26: Κατανομή μεγεθών NPs LS7 (νανοσωματίδια PLA με εγκλεισμένη την ένωση 4 με διαλύτη NaDES CC/LA 1:1.5).



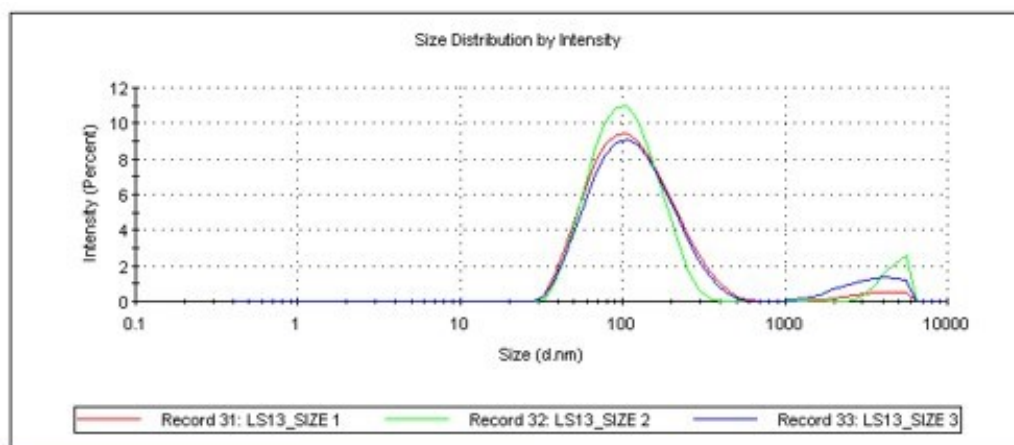
Εικόνα 27: Κατανομή μεγεθών του δείγματος LS14 (νανοσωματίδια PLA με εγκλεισμένη την ένωση 4 με διαλύτη NaDES CC/OA 1:1).

### 9.3.3. ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΥ $\beta$ -CD

Παρασκευάστηκαν ICs 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκιναζολιν-4(3H)-όνης- $\beta$ CD με τη μέθοδο της συγκαταβύθισης, όπως περιεγράφηκε στην υποενότητα 8.9.1. και μετρήθηκαν με DLS. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται παρακάτω, στον πίνακα 20:

Πίνακας 20: Αποτελέσματα DLS μεγέθους (nm), δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και δυναμικού  $\zeta$  (mV) στα σύμπλοκα  $\beta$ -CD.

ICs Μόριο 3- $\beta$ CD	Μέγεθος (nm)	M.O.	PDI	M.O.	Δυναμικό $\zeta$ (mV)	M.O.
LS13 (4 μήνες μετά)	131.4	124.5	0.287	0.284	-12.1	-12.72 $\pm$ 9.05
	112.2	$\pm$ 68.9	0.205		-19.5	
	129.9	0	0.359		-6.55	

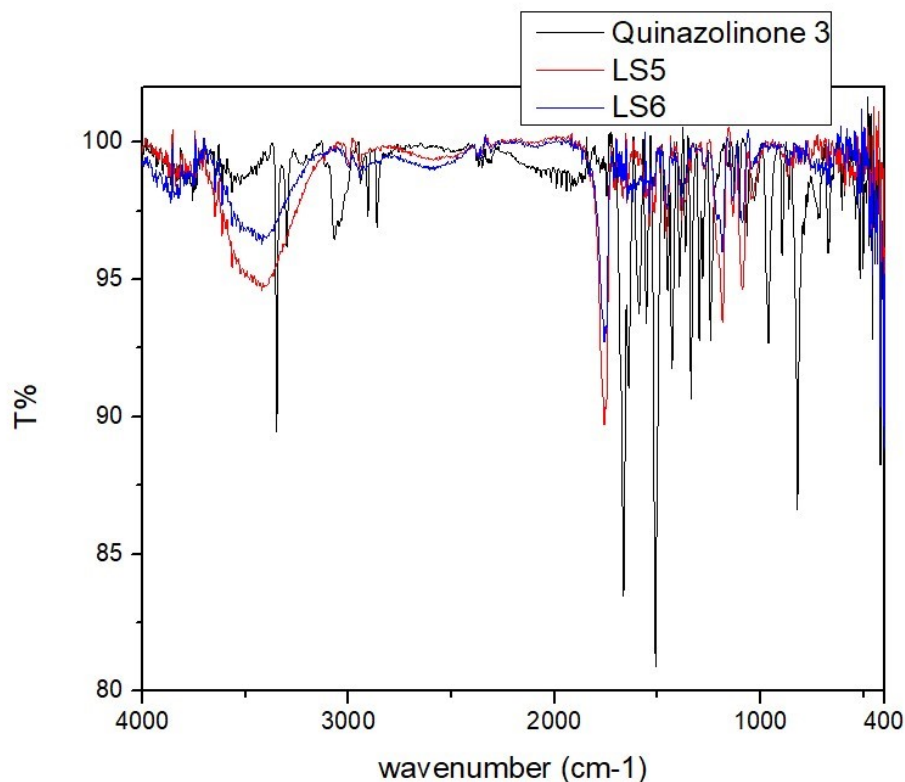


Εικόνα 28: Κατανομή μεγεθών του δείγματος LS13 (σύμπλοκα της κιναζολινόνης 3 με  $\beta$ CD).

Από την Εικόνα 28, είναι φανερό ότι με εγκλεισμό της κιναζολινόνης 3 με  $\beta$ -CD με τη μέθοδο της συγκαταβύθισης προκύπτει ιδιαίτερα ικανοποιητικό μέγεθος συμπλόκου, με μέση ακτίνα 124.5 nm. Το δυναμικό ζ είναι αρνητικό, μέσου μεγέθους -12.7 mV, το οποίο είναι ένδειξη ενός αρκετά σταθερού συστήματος εγκλεισμού. Παρατηρείται επίσης μία κορυφή πολύ χαμηλής έντασης κοντά στα 4000 nm.

#### 9.4. ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΦΑΡΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ FOURIER (FT-IR)

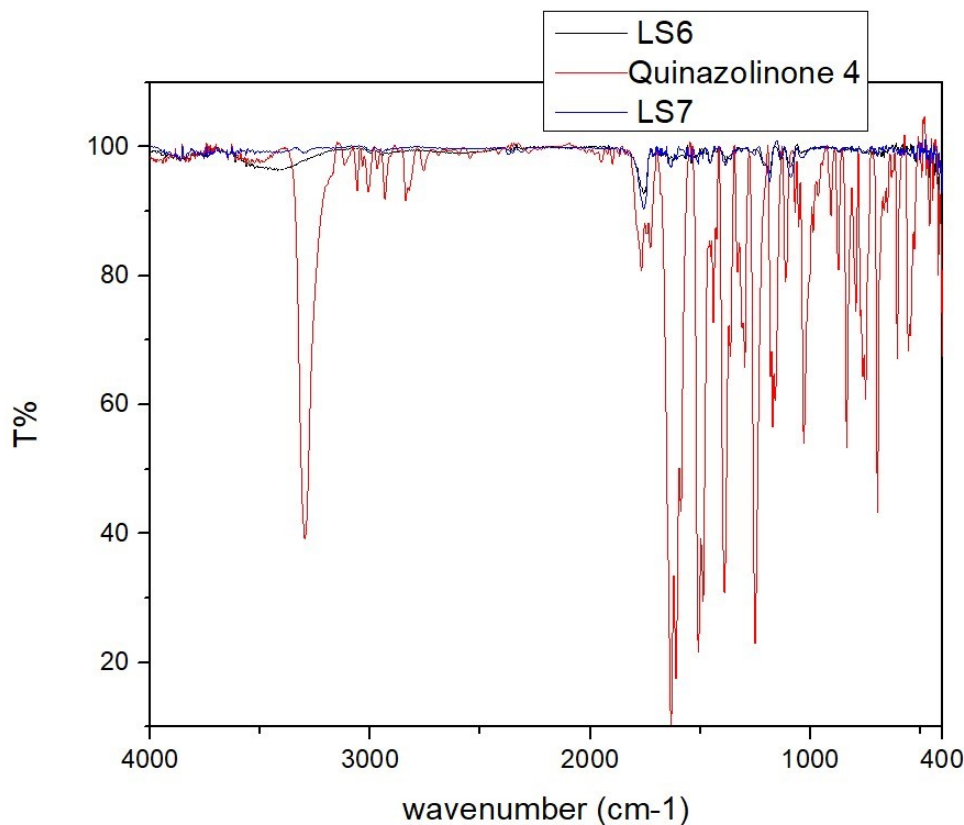
Λαμβάνονται φάσματα IR για τις 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκιναζολιν-4(3H)-όνη (3) και 2-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-φαινυλο-2,3-δωδροκιναζολιν-4(1H)-όνη (4), τα νανοσωματίδια PLA LS5 (Μόριο 3/ CC/LA 1:1.5), τα κενά νανοσωματίδια PLA LS6 με NaDES (CC/LA 1:1.5), τα νανοσωματίδια PLA LS7 (Μόριο 4/ CC/LA 1:1.5). Παρακάτω παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα φάσματα IR (Εικόνες 31, 32), προκειμένου να γίνει σύγκριση του φορέα εγκλεισμού, των καθαρών κιναζολινονών και των νανοσωματιδίων με εγκλεισμένη ένωση. Για περαιτέρω διευκρινίσεις των κορυφών, τα φάσματα καθενός εκ των παραπάνω δειγμάτων, παρατίθενται στο Παράρτημα 11.3.



Εικόνα 29: FTIR φάσμα του LS6 (κενά νανοσωματίδια PLA), της καθαρής κιναζολιόνης 3, και των νανοσωματιδίων LS5 (με εγκλεισμένη την κιναζολιόνη 3).

Στο φάσμα FTIR των κενών νανοσωματιδίων LS6, οι κορυφές που οφείλονται στην αλυσίδα του PLA εμφανίζονται στα  $2946.7\text{ cm}^{-1}$  και  $3003.59\text{ cm}^{-1}$ , λόγω δόνησης τάσης του δεσμού C-H, ενώ το καρβονύλιο C=O εμφανίζει έντονη απορρόφηση λόγω δόνηση τάσης που εντοπίζεται στα  $1757.8\text{ cm}^{-1}$ . Επιπλέον, χαρακτηριστική κορυφή λόγω τάσης δεσμού της εστερικής ομάδας C-(C=O)-O διακρίνεται στα  $1185.04\text{ cm}^{-1}$ . Η πολύ ευρεία κορυφή στα  $\sim 3420\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στην τάση δεσμού του O-H μεταξύ των άκρων της πολυμερικής αλυσίδας.

Είναι εμφανές ότι το φάσμα των νανοσωματιδίων LS5 και των κενών νανοσωματιδίων LS6 παρουσιάζουν τις ίδιες κορυφές, γεγονός που αποδεικνύει ότι η ένωση έχει εγκλειστεί αποτελεσματικά στο εσωτερικό του φορέα PLA. Σε πολλές περιπτώσεις οι κορυφές της ένωσης και της μήτρας αλληλεπικαλύπτονται, κυρίως στην περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος, δυσκολεύοντας την αποτίμηση στο δείγμα LS5.

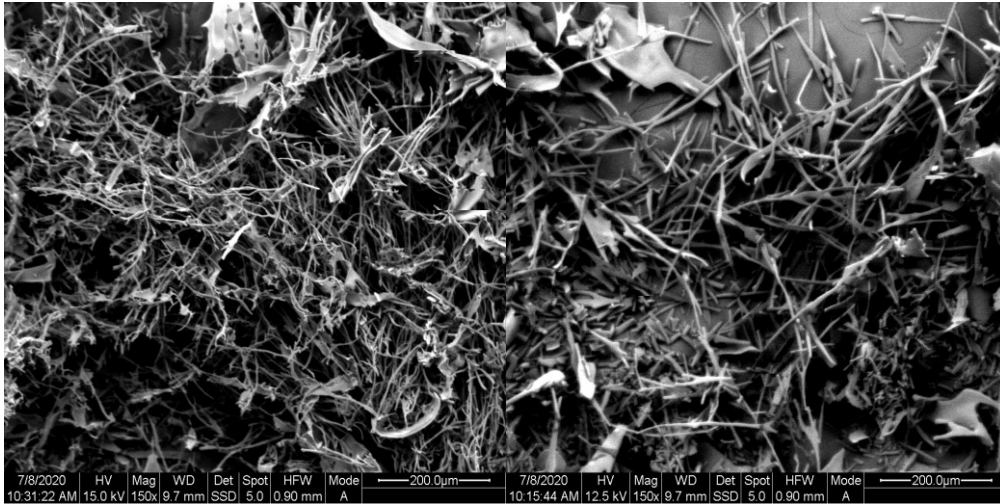


Εικόνα 30: FTIR φάσμα του LS6 (κενά νανοσωματίδια PLA), της καθαρής κιναζολιόνης 4, και των νανοσωματιδίων LS7 (με εγκλεισμένη την κιναζολιόνη 4).

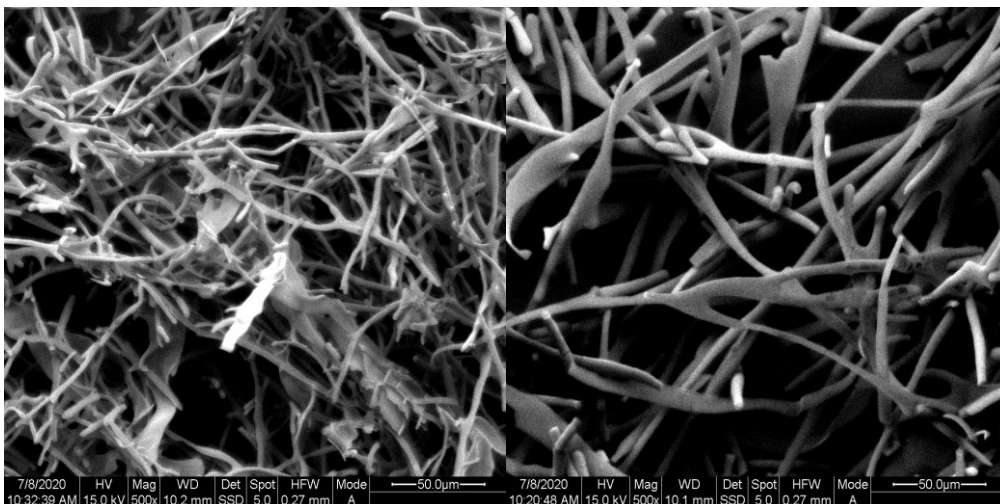
Παρατηρώντας το φάσμα FTIR της ένωσης 4, διακρίνεται μία έντονη κορυφή στα  $\sim 3297 \text{ cm}^{-1}$  λόγω δόνησης τάσης N-H, καθώς και κορυφές στα  $3010$  και  $3060 \text{ cm}^{-1}$  λόγω δόνησης τάσης του δεσμού C-H στους αρωματικούς δακτυλίους. Χαρακτηριστική είναι επίσης η απορρόφηση τάσης C=O που εντοπίζεται στα  $1633.41 \text{ cm}^{-1}$ . Οι οξείες κορυφές στα  $\sim 1251 \text{ cm}^{-1}$  και στα  $\sim 1170 \text{ cm}^{-1}$  πιθανότατα προκύπτουν από τάσεις των δεσμών C-N στον αρωματικό δακτύλιο.

## 9.5. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ (SCANNING ELECTRON MICROSCOPY, SEM)

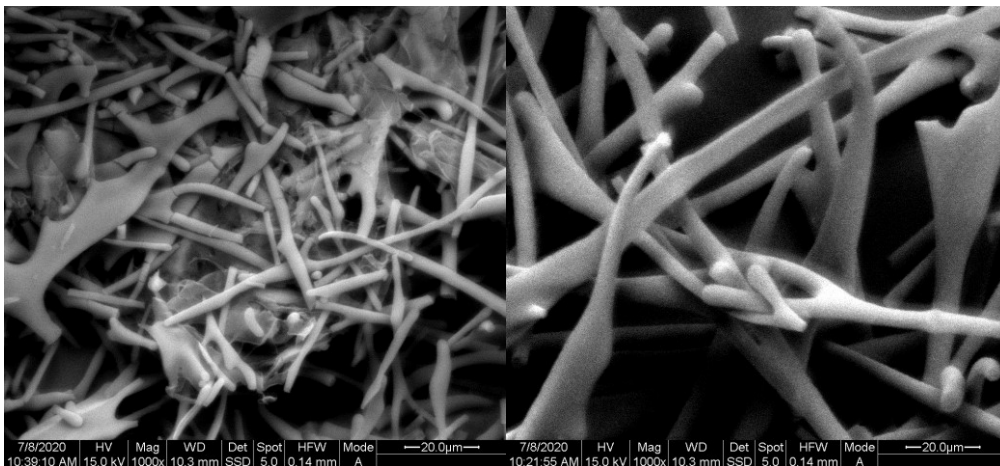
Η μορφολογία των ξηρών νανοσωματιδίων LS5 με εγκλεισμένη την 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκιναζολιν-4(3H)-όνη (3) και των κενών νανοσωματιδίων LS4 εξετάστηκε με SEM, έπειτα από επιχρύσωση. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του SEM με σύγκριση των δύο δοκιμίων. Η μεγέθυνση των εικόνων είναι: Εικόνα 33: x150, Εικόνα 34: x500, Εικόνα 35: x1000, αντίστοιχα.



**Εικόνα 31:** Απεικόνιση SEM δειγμάτων LS4 (κενών νανοσωματιδίων PLA) αριστερά και LS5 δεξιά, μεγέθυνση x150.



**Εικόνα 32:** Απεικόνιση SEM δειγμάτων LS4 (κενών νανοσωματιδίων PLA) αριστερά και LS5 δεξιά, μεγέθυνση x500.



**Εικόνα 33:** Απεικόνιση SEM δειγμάτων LS4 (κενών νανοσωματιδίων PLA) αριστερά και LS5 δεξιά, μεγέθυνση x1000.

Παρατηρούμε τη μορφολογία και τη μικροδομή στην κλίμακα των μm. Από τις παραπάνω φωτογραφίες είναι φανερό ότι τα νανοσωματίδια διαθέτουν ινώδη δομή,

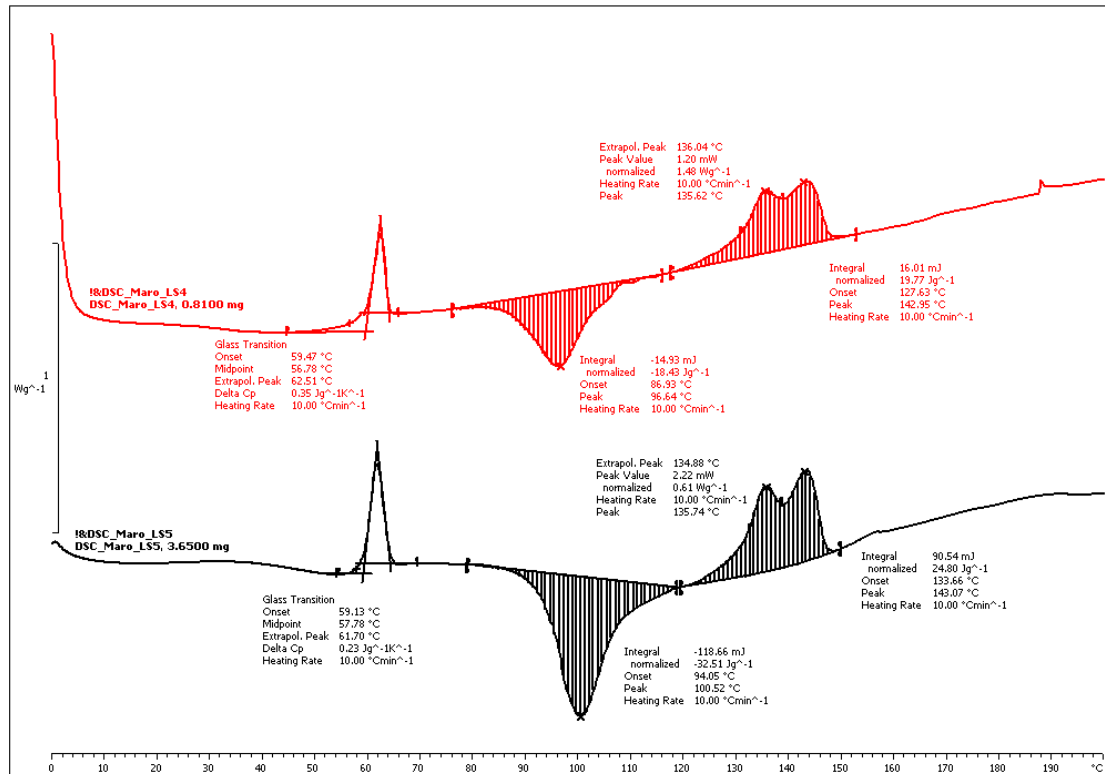
ενώ μοιάζει να σχηματίζεται ένα πλέγμα από ίνες. Η επιφάνεια των δομών που σχηματίζονται φαίνεται λεία, χωρίς πορώδες. Σε ορισμένες περιοχές διακρίνουμε το υλικό να έχει συσσωματωθεί, και στα δύο δείγματα. Αυξάνοντας τη διακριτική ικανότητα, παρατηρούνται ορισμένες αστοχίες στα ινίδια του υλικού, το οποίο ενδεχομένως δικαιολογείται από το μεγάλο μήκος των νανοδομών αυτών. Να σημειωθεί ότι η διαδικασία της επιχρύσωσης δεν ήταν απόλυτα επιτυχής, με αποτέλεσμα την παρατηρούμενη θραύση του υλικού σε ορισμένες περιοχές.

Τα νανοσωματίδια τα οποία μελετήθηκαν έχουν υποστεί επεξεργασία με υπερφυγοκέντριση και ξήρανση με λυοφιλίωση. Οι διεργασίες αυτές επηρεάζουν την μορφολογία, λόγω διόγκωσης και παρατηρούμενης ανομοιόμορφης κατανομής μεγεθών, σε σχέση με τα αρχικώς σχηματιζόμενα νανοσωματίδια, μετά την γαλακτωματοποίηση και εξάτμιση διαλύτη. Σε κάθε περίπτωση, το επιθυμητό αποτέλεσμα των νανοσωματιδίων που αναμένεται μετά τη γαλακτωματοποίηση, είναι σφαιρικής δομής και ομοιόμορφης κατανομής μεγεθών.

Από τη σύγκριση των εικόνων των κενών νανοσωματιδίων LS4 και των νανοσωματιδίων με εγκλεισμένη την **(3)**, δε φαίνεται να μεταβάλλεται ιδιαίτερα η μορφολογία του υλικού λόγω του εγκλεισμού ή της χρήσης NaDES, γεγονός ιδιαίτερα επιθυμητό στο τελικό προϊόν.

## 9.6. ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ (DIFFERENTIAL SCANNING SPECTROSCOPY, DSC)

Πραγματοποιήθηκε θερμική ανάλυση με DSC στα κενά νανοσωματίδια χωρίς την προσθήκη του NaDES (**LS4**) και στα νανοσωματίδια με εγκλεισμένη ένωση την 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκιναζολιν-4(3H)-όνη (**3**) με διαλύτη NaDES CC/LA, 1 : 1.5 (**LS5**). Το διάγραμμα είναι παρεχόμενης ισχύς (σε W/g) συναρτήσει της θερμοκρασίας (°C). Ο ρυθμός θέρμανσης των δειγμάτων ρυθμίστηκε στους 10.00 °C/min.



Lab: METTLER

STAR<sup>e</sup> SW 9.20

Εικόνα 34: Θερμογράμματα θέρμανσης-ψύξης σε ρυθμό 10.00°C/min.

Τα αποτελέσματα της θερμικής ανάλυσης με DSC παρατίθενται παρακάτω:

Πίνακας 21: Πίνακας αποτελεσμάτων πειράματος DSC.

Κωδικός	T <sub>g</sub> (°C)	ΔC <sub>p</sub> (J/gK)	T <sub>m1</sub> (°C)	T <sub>m2</sub> (°C)	ΔH <sub>m</sub> (J/g)	x <sub>c</sub> %	T <sub>c</sub> (°C)	Ρυθμός θέρμανσης- ψύξης (°C/min)
LS4	59.47	0.35	135.62	142.95	19.77	21.23	96.64	10.00
LS5	59.13	0.23	135.74	143.07	24.80	26.63	100.52	10.00

### Θέρμανση

Σε ένα σύστημα με εγκλεισμένη δραστική ουσία σε πολυμερές, είναι δυνατό να υπάρχουν, άμορφη ουσία σε άμορφο ή κρυσταλλικό πολυμερές, ή/και κρυσταλλική ένωση σε άμορφο ή κρυσταλλικό πολυμερές. Κατά τη θέρμανση από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, το ημικρυσταλλικό PLA μεταβαίνει από την υαλώδη στην ελαστομερή κατάσταση. Σταδιακά λοιπόν αρχίζουν να κινούνται τμήματα των αλυσίδων του άμορφου ποσοστού, χωρίς να μετακινείται συνολικά η αλυσίδα. Κατά την ενδόθερμη αυτή μετάβαση εντοπίζεται η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, T<sub>g</sub>. Για τα κενά νανοσωματίδια **LS4**, η T<sub>g</sub> = 59.47 °C, ενώ σχεδόν όμοια τιμή διακρίνεται για το δείγμα με εγκλεισμένη ένωση **LS5**, με T<sub>g</sub> = 59.13 °C. Η διαφορά που παρουσιάζεται πριν και μετά την υαλώδη μετάπτωση αντιπροσωπεύει τη μεταβολή στην ειδική θερμοχωρητικότητα υπό σταθερή πίεση, ΔC<sub>p</sub> (J/gK). Για το κενό δείγμα LS4, η ΔC<sub>p</sub> = 0.35 J/gK ενώ για το LS5 υπολογίζεται ΔC<sub>p</sub> = 0.23 J/gK.



Αυτή η μείωση της απαιτούμενης ενέργειας για την υαλώδη μετάβαση στο δείγμα με εγκλεισμό της **3**, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι κατά τη διεργασία του εγκλεισμού, ένα μεγαλύτερο ποσοστό του πολυμερούς αποκτά κρυσταλλικότητα. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με το προφίλ των νανοσωματιδίων με εγκλεισμένη ένωση καθώς η παρατηρούμενη αύξηση στην κρυσταλλικότητα, είναι λογικό να οφείλεται στην προσθήκη της δραστικής κινολίνης.

Με περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας, τα δείγματα παρουσιάζουν δύο γειτονικές ενδόθερμες κορυφές. Σε αυτή την περιοχή, το υλικό τήκεται. Κατά πάσα πιθανότητα λόγω της παρουσίας δύο διαφορετικών ειδών κρυσταλλιτών, με διαφορετική κρυστάλλωση, εμφανίζονται δύο θερμοκρασίες τήξης  $T_m$  στο κάθε δείγμα. Η τήξη είναι ένα αποκλειστικά θερμοδυναμικό φαινόμενο, κατά το οποίο η ροή θερμότητας θα οδηγήσει στο σπάσιμο των δεσμών και στην τήξη των κρυστάλλων. Για το κενό δείγμα LS4 οι δύο θερμοκρασίες τήξης είναι  $T_{m1} = 135.62$  °C και  $T_{m2} = 142.95$  °C, ενώ για το δείγμα LS5 οι τιμές είναι αντίστοιχα  $T_{m1} = 135.74$  °C και  $T_{m2} = 143.07$  °C. Η μεταβολή ενθαλπίας του συστήματος κατά την τήξη  $\Delta H_m$  (J/g) υπολογίζεται ποσοτικά από το εμβαδό της περιοχής κάτω από την καμπύλη. Για τα κενά νανοσωματίδια LS4, η πειραματική ενθαλπία τήξης μετρήθηκε  $\Delta H_m = 19.77$  J/g, με βαθμό κρυσταλλικότητας,  $x_c = 21.23\%$ . Στο LS5 υπολογίστηκε με ελαφρώς υψηλότερη τιμή  $\Delta H_m = 24.80$  J/g και βαθμός κρυσταλλικότητας  $x_c = 26.63\%$ , γεγονός που ενισχύει την υπόθεση μικρής αύξησης του βαθμού κρυσταλλικότητας κατά τον εγκλεισμό.

### Ψύξη

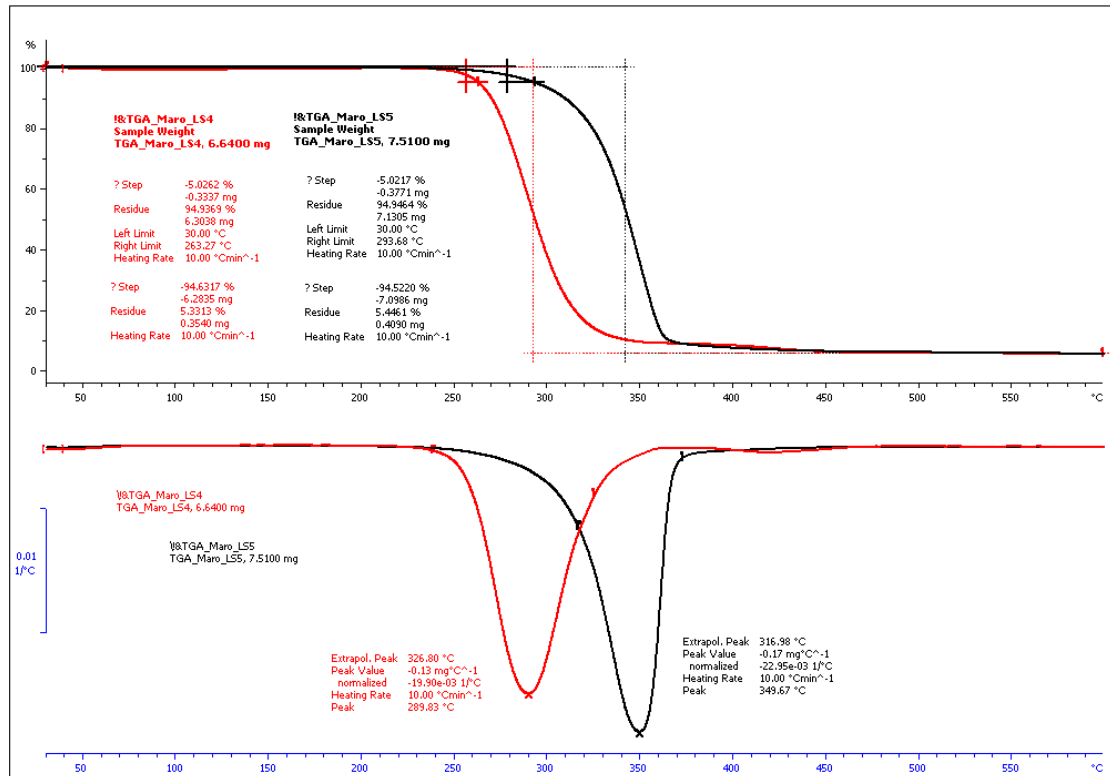
Καθώς το πολυμερές ψύχεται εμφανίζεται μία έντονα εξώθερμη κορυφή. Στην περιοχή αυτή, ποσοστό του άμορφου πολυμερούς επανακρυσταλλώνεται στη θερμοκρασία κρυστάλλωσης,  $T_c$ . Η κρυστάλλωση εκτός από θερμοδυναμικό είναι και κινητικό φαινόμενο. Αυτό σημαίνει ότι η  $T_c$  μεταβάλλεται ανάλογα με το ρυθμό ψύξης ώστε να σχηματιστούν και να αναπτυχθούν οι πυρήνες των κρυστάλλων. Για τον ίδιο ρυθμό ψύξης, οι θερμοκρασίες που κρυσταλλώνονται τα δύο υλικά είναι για το κενά νανοσωματίδια LS4,  $T_c = 96.64$  °C και για το δείγμα LS5,  $T_c = 100.52$  °C.

## 9.7. ΘΕΡΜΟΒΑΡΥΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (THERMOGRAVIMETRIC ANALYSIS, TGA)

Η θερμοβαρυσμετρική ανάλυση είναι μία αναλυτική τεχνική στην οποία καταγράφεται η μεταβολή της μάζας με τη γραμμική αύξηση (ή μείωση σπανιότερα) της θερμοκρασίας στο χρόνο. Στον Πίνακα 22, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος TGA, για τα νανοσωματίδια LS4 και LS5.

Πίνακας 22: Αποτελέσματα και παράμετροι πειράματος TGA.

Κωδικός	Αρχική μάζα (mg)	Υπόλοιπο %	Ρυθμός θέρμανσης (°C/min)	$T_{αρχ}$ αποδόμησης (°C)	$T_{τελ}$ αποδόμησης (°C)	Μέση $T$ αποδόμησης (°C)
LS4	6.6400	5.3313	10.00	263.27	370	289.83
LS5	7.5100	5.4461	10.00	293.68	370	349.67



Lab: METTLER

STAR<sup>e</sup> SW 9.20

**Εικόνα 35: Θερμογράμματα θέρμανσης-μεταβολής μάζας σε ρυθμό 10.00 °C/min, των κενών νανοσωματιδίων LS4 και LS5 νανοσωματιδίων (που περιέχουν εγκλεισμένη την κιναζολινόνη 3).**

Στην Εικόνα 37, βλέπουμε το θερμόγραμμα TGA του δείγματος LS5 που περιέχει εγκλεισμένη ουσία την 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκιναζολιν-4(3H)-όνη (3) σε σύγκριση με τα κενά νανοσωματίδια PLA LS4. Στο διάγραμμα βλέπουμε μόνο ένα κύριο βήμα, αυτό της μήτρας. Παρατηρούμε ότι τα δείγματα ακολουθούν ομοιόμορφα το βήμα ως προς τη μεταβολή μάζας, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ένωση έχει εγκλειστεί στο εσωτερικό της μήτρας, με ομοιόμορφο τρόπο. Ταυτόχρονα η θερμική σταθερότητα του LS5 παρουσιάζεται αυξημένη σε σχέση με το κενό δείγμα LS4. Παρατηρούμε δηλαδή ότι καθυστερείται η αποδόμηση του LS5 καθώς αρχίζει να συμβαίνει σε ελαφρώς υψηλότερη θερμοκρασία από τα κενά NPs (263.27 °C και 293.68 °C αντίστοιχα), παρόλο που ο ρυθμός θέρμανσης είναι ο ίδιος. Η ενιαία εικόνα του βήματος κατά την αποδόμηση του υλικού, ενδεχομένως σχετίζεται με τις αλληλεπιδράσεις που επικρατούν στο σύστημα κιναζολινόνης 3/PLA, οι οποίες δεν είναι πλήρως γνωστές.

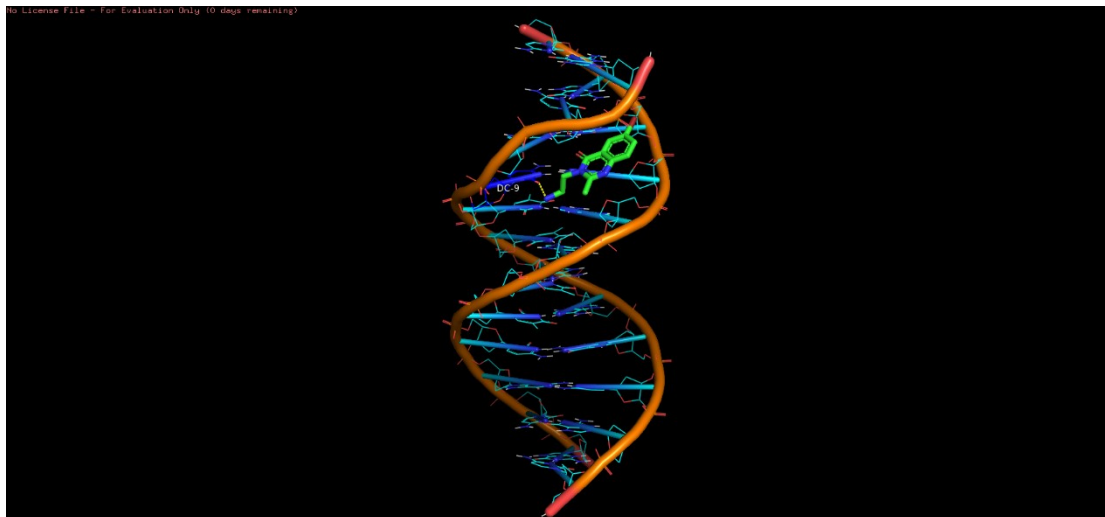
## 9.8. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΚΙΝΑΖΟΛΙΝΟΝΩΝ ΜΕ ΤΟ DNA

Στις μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του DNA και ενώσεων περιλαμβάνονται η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση, η συναρμογή στην αύλακα και η παρεμβολή. Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (electrostatic interactions) λαμβάνουν χώρα στην εξωτερική επιφάνεια του DNA με την ανάπτυξη ηλεκτροστατικών δεσμών μεταξύ των φωσφορικών ομάδων του DNA και θετικά φορτισμένου συμπλόκου ή ιόντος. Κατά τη συναρμογή μιας ένωσης στην κύρια ή τη δευτερεύουσα αύλακα (groove binding) αναπτύσσονται ασθενείς αλληλεπιδράσεις (π.χ. δεσμοί υδρογόνου,

δυνάμεις van der Waals). Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζεται η πιθανή αλληλεπίδραση της 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκινναζολιν-4(3H)-όνης (**3**) με το DNA, όπου παρατηρήθηκε πιθανή συναρμογή της ένωσης στην κύρια και στη δευτερεύουσα αύλακα (groove binding) με το σχηματισμό ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ του υποκαταστάτη ελεύθερης αμινομάδας στη θέση 3 της κινναζολινόνης και της βάσης DC-9.



Εικόνα 36: Τρισδιάστατη αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης της 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκινναζολιν-4(3H)-όνης με τη διπλή έλικα του DNA, μέσω groove binding.



Εικόνα 37: Τρισδιάστατη απεικόνιση της συναρμογής της 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκινναζολιν-4(3H)-όνης στη διπλή έλικα του DNA.

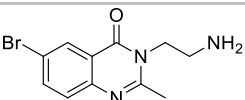
## 9.9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΦΩΤΟΔΙΑΣΠΑΣΗΣ

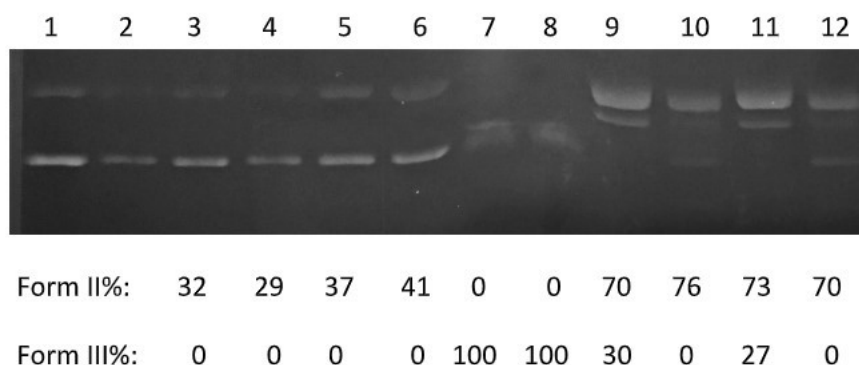
Όπως έχει ήδη αναφερθεί (Κεφ. 8.1.), ο σχεδιασμός των νανοσωματιδίων βασίστηκε σε αποτελέσματα προηγούμενης εργασίας, όπου παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά φωτοδιάσπασης DNA πλασμιδίου, από την 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκινναζολιν-4(3H)-όνη (**3**), που φέρει βρωμο-ομάδα στη θέση C-6.

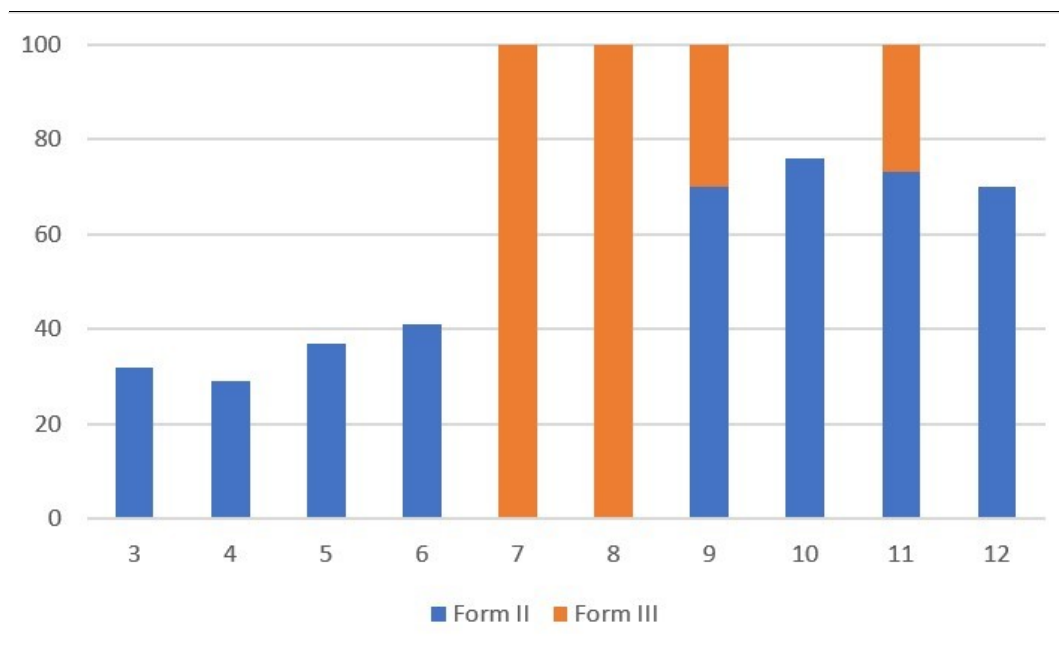
Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η φωτοδιασπαστική ικανότητα των νανοσωματιδίων **LS5**, με εγκλεισμένη 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μέθυλο-κινολινίνη-4(3H)-όνη (**3**), διαλυμένη σε NaDES CC/LA 1:1.5. Για το σκοπό αυτό, μελετάται τόσο η δράση των νανοσωματιδίων LS5, όσο και των κενών νανοσωματιδίων LS4, του NaDES, ενώ γίνεται σύγκριση με τη φωτοδιασπαστική ικανότητα της ένωσης **3**.

Πραγματοποιήθηκε φωτοβόληση UVB ακτινοβολίας των δειγμάτων, η οποία κυμαίνεται στο εύρος μεταξύ 280-315 nm. Το πείραμα εκτελείται στα 312 nm, σε απόσταση 15 cm, για χρονικό διάστημα 30 λεπτών. Η φωτοβόληση στα 312 nm πραγματοποιήθηκε μετά από μελέτη που είχε πραγματοποιηθεί για την κινολινίνη **3**, η οποία είχε δώσει υψηλά ποσοστά διάσπασης και στους δύο κλώνους σε συγκέντρωση 25μM. Το pH που χρησιμοποιείται για τη φωτοδιάσπαση του DNA είναι 6.8 σε Tris buffer. Τα δείγματα που ακτινοβολήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 23:

**Πίνακας 23:** Δείγματα που εξετάζονται με φωτοβόληση στο UVB

Κωδικός	Ένωση
LS4	Blank NPs PLA
LS5	NPs PLA&Ένωση 3, CC/LA (1:1.5)
DES	Choline chloride/Lactic acid (1:1.5)
Ένωση 3	





Εικόνα 38: Ραβδόγραμμα ποσοστών κυκλικού (Form II) και γραμμικού (Form III) πλασμιδιακού DNA έπειτα από φωτοβόληση των δειγμάτων στα 312 nm.

Πίνακας 24: Περιγραφή των δειγμάτων και των συγκεντρώσεων που πραγματοποιήθηκε η φωτοβόληση στο UVB, στα 312 nm, σε απόσταση 15 cm και χρονική διάρκεια 30 min.

Σειρά	Περιγραφή	Σειρά	Περιγραφή
1	DNA+Tris	9	DNA+ 25 μM Ένωση 3 (DMSO)
2	DNA+Tris+UV	10	DNA+ 25 μM Ένωση 3 (DES)
3	DNA+ 25 μM LS4	11	DNA+ 25 μM Ένωση 3 (DMSO)
4	DNA+ 25 μM LS4	12	DNA+ 25 μM Ένωση 3 (DES)
5	DNA+ 25 μM LS5		
6	DNA+ 25 μM LS5		
7	DNA+ DES (20%)		
8	DNA+ DES		

Η συγκέντρωση των 25 μM επιλέχθηκε καθώς στα 500 μM, η δράση της ένωσης 3 ήταν πολύ υψηλή και κατακερμάτισε πλήρως το DNA. Χρειαζόμαστε λοιπόν την ελάχιστη δυνατή συγκέντρωση η οποία προκαλεί ικανοποιητικό ποσοστό φωτοδιάσπασης του DNA πλασμιδίου.

Ο μηχανισμός της φωτοδιάσπασης της ένωσης 3 στα 312 nm, αν και δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως, περιλαμβάνει την ομολυτική διάσπαση του δεσμού C-Br στη

θέση 6 της κινναζολινόνης, και τη δημιουργία φαινυλικής ρίζας, η οποία παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα και σπάει το υπερελικωμένο DNA. Αναλόγως εάν σπάσει τη μία ή και τις δύο έλικες του υπερελικωμένου DNA, θα προκύψει αντίστοιχα κυκλική (Form II) ή γραμμική μορφή (Form III).

Παρατηρώντας την εικόνα, βλέπουμε στη θέση 3 και 4, τη δράση των κενών νανοσωματιδίων PLA (**LS4**). Παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, ότι το PLA από μόνο του δίνει ένα ποσοστό κοντά στο 30%, κυκλικού DNA. Στη συνέχεια, οι θέσεις 5 και 6, αφορούν τη φωτοδιασπαστική δράση των νανοσωματιδίων **LS5** με προσθήκη εγκλεισμένης ένωσης **3**, από τα οποία προκύπτει ποσοστό, περίπου 40% κυκλικού DNA. Βλέπουμε λοιπόν μία μικρή αύξηση της δράσης σε σχέση με τα κενά νανοσωματίδια PLA. Τα NPs LS5, πριν τη φωτοβόληση επώαστηκαν για 3 ώρες, σε ρυθμιστικό διάλυμα pH=6.8, προκειμένου να απελευθερωθεί η ένωση. Θα πρέπει ωστόσο να γίνουν βελτιώσεις στο προφίλ απελευθέρωσης, για να αποδοθεί η μέγιστη φωτοδιασπαστική δράση των νανοσωματιδίων LS5. Ένα αξιοσημείωτο αποτέλεσμα της παρούσας βιολογικής μελέτης, είναι η δράση του NaDES CC/LA 1:1.5, το οποίο έδειξε να κατακερματίζει εντελώς το πλασμιδιακό DNA, στα 500  $\mu\text{M}$ . Θα είχε ενδιαφέρον να μελετηθεί η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία το DES προκαλεί διάσπαση του DNA. Έπειτα συγκρίθηκε η δράση της 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκινναζολινόνη-4(3H)-όνης (**3**) διαλυμένης σε DMSO και σε DES CC/LA 1:1.5. Τα αποτελέσματα της (**3**) σε DMSO στις θέσεις 9 και 11 δίνουν πολύ υψηλή δράση με 70% κυκλικό και 30% γραμμικό DNA. Παρατηρούμε επίσης ότι με διάλυση της (**3**) σε DES CC/LA 1:1.5 (θέσεις 10, 12), προκύπτει πολύ ικανοποιητική δράση, με 70% ποσοστό κυκλικού DNA, το οποίο δεν επανέρχεται σε υπερελικωμένη μορφή. Το DES CC/LA 1:1.5 λοιπόν, μπορεί να αντικαταστήσει το συμβατικό διαλύτη στην εφαρμογή της φωτοδιάσπασης με την κινναζολινόνη (**3**), ενώ λειτουργεί αυτόνομα και σαν ισχυρός φωτοδιασπαστής του DNA.

## 10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο εγκλεισμός συνθετικών κινναζολινονών με πιθανή φωτοδιασπαστική δράση, σε διαφορετικούς φορείς. Συγκεκριμένα οι ενώσεις: 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκινναζολιν-4(3H)-όνη (**3**) και 2-(4-μεθοξυφαινυλο)-3-φαινυλο-2,3-διυδροκινναζολιν-4(1H)-όνη (**4**) εγκλείστηκαν σε νανοσωματίδια PLA και σύμπλοκα  $\beta$ -CD.

Τα νανοσωματίδια PLA παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο γαλακτωματοποίησης-εξάτμισης διαλύτη ενώ μελετήθηκε η χρήση πράσινων διαλυτών κατά τον εγκλεισμό, με σκοπό την αύξηση της βιοσυμβατότητας, και τη μείωση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος.

Τα σύμπλοκα  $\beta$ -CD παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο της συγκαταβύθισης. Η δομή και η μορφολογία των νανοσωματιδίων μελετήθηκε με πληθώρα τεχνικών χαρακτηρισμού και εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

- Όσον αφορά τα νανοσωματίδια Κινναζολινόνης **3**/PLA, τη μεγαλύτερη απόδοση εγκλεισμού και ποσοστό φόρτωσης εμφάνισε το **LS5** με EE%=55.39%, σε διαλύτη NaDES CC/LA 1:1.5. Η απόδοση εγκλεισμού, σε

αυτή την περίπτωση, είναι υψηλότερη σε σύγκριση με τα νανοσωματίδια της **(3)** σε συμβατικό διαλύτη DMSO, με 43.14%. Οι αποδόσεις εγκλεισμού προσδιορίστηκαν φωτομετρικά.

- Στα νανοσωματίδια Κιναζολινόνης **4/PLA** από την άλλη, η απόδοση εγκλεισμού ήταν υψηλότερη με χρήση συμβατικού διαλύτη ακετόνης κατά τη διεργασία εγκλεισμού (**LS3**), όπου υπολογίστηκε 74.19%. Επιπλέον, τα νανοσωματίδια **LS3** με προσθήκη εγκλεισμένης Κιναζολινόνης **4**, διαθέτουν πολύ καλή κατανομή μεγεθών στα ξηρά NPs με PDI 0.086 και μέγεθος 225.53 nm.
- Ο έμμεσος προσδιορισμός της απόδοσης δε δίνει πάντοτε ακριβή αποτελέσματα, ιδιαίτερα με την προσθήκη των DES κατά την παρασκευή. Χρειάζεται λοιπόν εναλλακτικός τρόπος επιβεβαίωσης της απόδοσης.
- Η παρασκευή των νανοσωματιδίων με γαλακτωματοποίηση-εξάτμιση διαλύτη, είναι σημαντικό να τροποποιηθεί όταν χρησιμοποιούνται τα DES.
- Τα νανοσωματίδια PLA, διογκώνονται μέσω της επεξεργασίας με φυγοκεντρίσεις και λυοφιλίωση και παρουσιάζουν συσσωματώματα. Καθίσταται αναγκαία η προσθήκη ενός σταθεροποιητικού παράγοντα σε κατάλληλη αναλογία (π.χ. γλυκόζη, σακχαρόζη, τρεχαλόζη) στο στάδιο της λυοφιλίωσης.
- Το μικρότερο μέγεθος νανοσωματιδίων Κιναζολινόνης **3/PLA** αποκτήθηκε για το δείγμα σε διαλύτη G/LA 1:5 (**LS18**), με υδροδυναμική ακτίνα 306.3 nm και PDI 0.117. Φαίνεται ότι η γλυκόζη, σταθεροποιεί περαιτέρω τη δομή του νανοσωματιδίου με δεσμούς υδρογόνου, ενώ διευκολύνει τη διασπορά τους. Το τελευταίο αυτό χαρακτηριστικό είναι σημαντικό για την επεξεργασία των NPs καθώς μειώνεται ο χρόνος και η ενέργεια που χρειάζεται κατά την επαναδιασπορά.
- Με εγκλεισμό της 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκιναζολιν-4(3H)-όνης σε σύμπλοκα β-CD μειώνεται περαιτέρω το μέγεθος των νανοσωματιδίων, με υδροδυναμική διάμετρο 124.5 nm. Επιπλέον, η μέθοδος της συγκαταβύθισης είναι αρκετά απλή και γρήγορη διεργασία, όπου μπορούν να εγκλειστούν αποτελεσματικά πληθώρα λιπόφιλων μορίων, εφόσον πραγματοποιηθεί σε κατάλληλες συνθήκες και αναλογία διαλυμάτων δραστικής ουσίας και β-CD.
- Η απελευθέρωση της ένωσης στα νανοσωματίδια κινναζολινόνης **3/PLA** με διαλύτη NaDES CC/LA 1:1.5 (**LS5**) επιβεβαιώθηκε, ωστόσο σε χαμηλά ποσοστά απελευθέρωσης. Το υλικό που παρασκευάστηκε ήταν αρκετά συσσωματωμένο, όπως φάνηκε από τις εικόνες SEM, γεγονός που δυσκολεύει την απελευθέρωση, αλλά αυτό οφείλεται στην επεξεργασία που υπόκειται για την παραλαβή των ξηρών NPs και όχι στη μέθοδο παρασκευής.
- Όπως προέκυψε από το FT-IR φάσμα, τόσο στα νανοσωματίδια κινναζολινόνης **3/PLA** με διαλύτη NaDES CC/LA 1:1.5 (**LS5**) όσο και στα νανοσωματίδια κινναζολινόνης **4/PLA** με διαλύτη NaDES CC/LA 1:1.5 (**LS7**), οι κινναζολινόνες εγκλείονται στο εσωτερικό του φορέα και όχι επιφανειακά, γεγονός που συμβάλλει στην προστασία και τη σταθερότητα του φαρμάκου.
- Κατά το binding στο DNA της ένωσης 3-(2-αμινοαιθυλο)-6-βρωμο-2-μεθυλοκιναζολιν-4(3H)-όνης (**3**), η οποία είναι καινούργια και μελετάται για



πρώτη φορά ως προς τις αλληλεπιδράσεις με το DNA, είδαμε εξωτερική αλληλεπίδραση (groove binding).

- Εντυπωσιακή είναι η φωτοδιασπαστική ικανότητα του NaDES CC/LA 1:1.5 με ακτινοβολία στο UVB, στα 312 nm, όπου προέκυψε κατακερματισμός του πλασμιδιακού DNA. Ακόμη, το PLA παρουσίασε ενδιαφέρουσα φωτοδιασπαστική δράση με ποσοστό κυκλικού DNA 30%, ενώ τα NPs LS5, εμφάνισαν επαρκή δράση φωτοδιασπαστή, δίνοντας ποσοστό 40% κυκλικού πλασμιδιακού DNA.

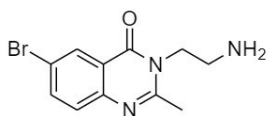
Μερικές προτάσεις για τη συνέχιση της παραπάνω έρευνας και τη βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων είναι:

- Προσδιορισμός της δομής των NPs LS5, με φασματομετρία MALDI MS για περαιτέρω κατανόηση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης και του πολυμερούς.<sup>86</sup>
- Μέτρηση της απόδοσης εγκλεισμού των PLA NPs με άμεσο προσδιορισμό.
- Χρήση αντιδιογκωτικού παράγοντα κατά τη λυοφιλίωση.
- Προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής δράσης των νανοσωματιδίων με εγκλεισμένες κιναζολινόνες με μέθοδο DPPH.
- Μελέτη του προφίλ απελευθέρωσης των συμπλόκων Κιναζολινόνης 3/ $\beta$ CD που παρασκευάστηκαν, της απόδοσης εγκλεισμού και της φωτοδιασπαστικής ικανότητας DNA πλασμιδίου, στο UVB.
- Να μελετηθεί το προφίλ απελευθέρωσης των νανοσωματιδίων κιναζολινόνης 3/PLA με διαλύτη NaDES G/LA 1:5 (LS18).
- Διερεύνηση των DES ως DNA φωτοδιασπαστές.
- Μελέτη της παρεμβολής σε CT-DNA των PLA NPs με τις κιναζολινόνες 3, 4.
- Εγκλεισμός των κιναζολινονών σε μήτρα PLGA πολυμερούς, η οποία είναι περισσότερο υδρόφιλη από το PLA. Εναλλακτικά, επιφανειακή τροποποίηση του PLA με PEG, το οποίο καθιστά την επιφάνειά του υδρόφιλη, ενώ βελτιώνει την κυκλοφορία του φαρμάκου στον οργανισμό.
- Μελέτη της διεργασίας εγκλεισμού με διαφορετικά NaDES, αποτελούμενα από ένα τουλάχιστον σάκχαρο.
- Μελέτη τη διεργασίας εγκλεισμού σε PLA σε διαφορετικά μοριακά βάρη.
- Χρήση φωτοβιοδιασπώμενου PLA, για τον έλεγχο της αποδόμησης του πολυμερούς και της απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας, με ακτινοβολία UV.<sup>87</sup>

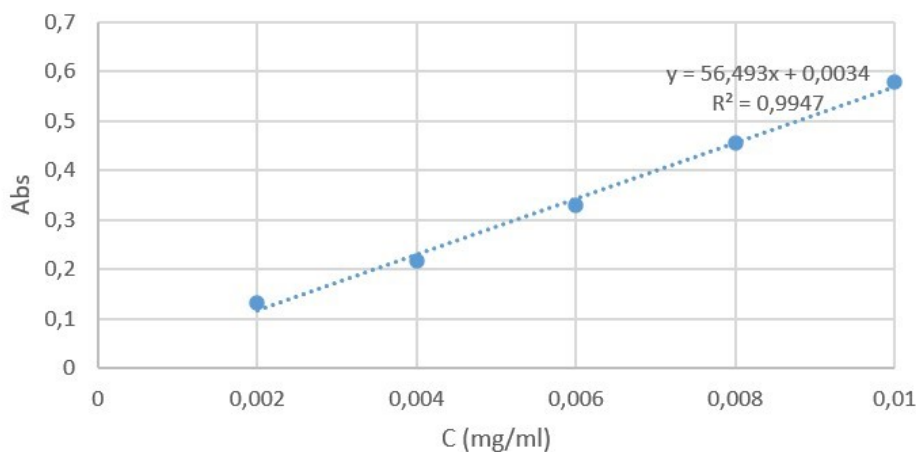
## 11. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### 11.1. ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΚΑΘΑΡΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

#### 3-(2-ΑΜΙΝΟΑΙΘΥΛΟ)-6-ΒΡΩΜΟ-2-ΜΕΘΥΛΟΚΙΝΑΖΟΛΙΝ-4(3H)-ΟΝΗ (3)



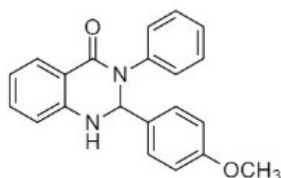
Ένωση 3 (259.6 nm)

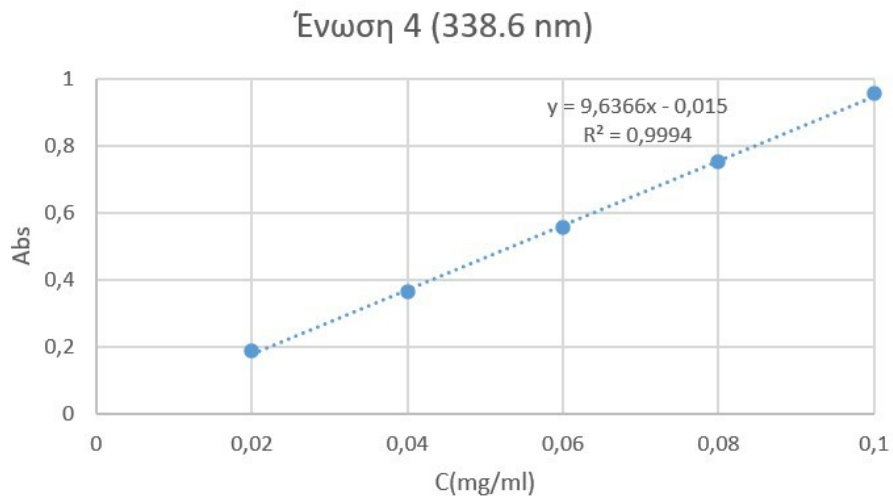


Εικόνα 39: Καμπύλη αναφοράς της καθαρής ένωσης 3, σε DMSO.

Σημειώνεται ότι η ένωση 3, απορροφά σε δύο περιοχές, με κύρια κορυφή στα 259.6 nm και δευτερεύουσα κορυφή κατά προσέγγιση στα 307 nm. Ο λόγος που δεν επιλέχθηκε η δεύτερη κορυφή για την καμπύλη αναφοράς είναι η πολύ χαμηλότερη έντασή της, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 43, συγκριτικά με την κορυφή στα 259.6 nm.

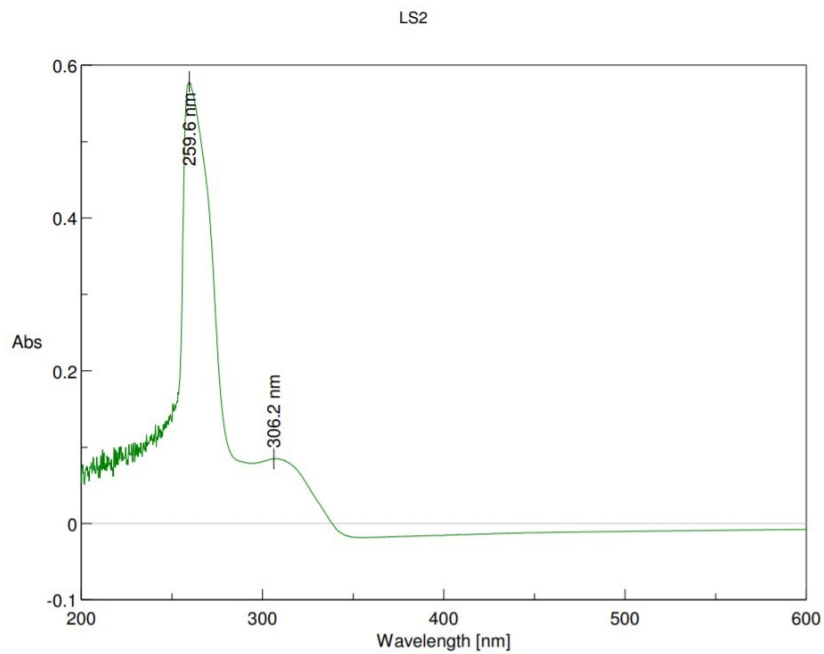
#### 2-(4-ΜΕΘΟΞΥΦΑΙΝΥΛΟ)-3-ΦΑΙΝΥΛΟ-2,3-ΔΙΥΔΡΟΚΙΝΑΖΟΛΙΝ-4(1H)-ΟΝΗ (4)



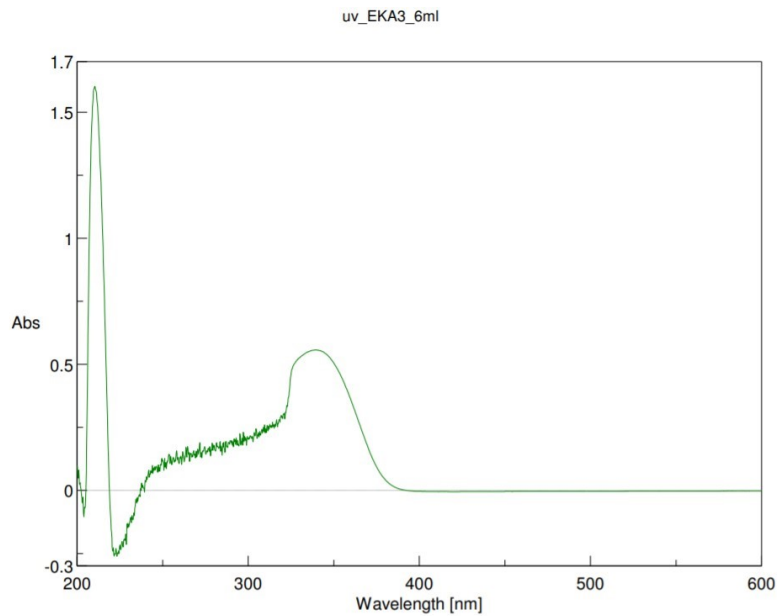


**Εικόνα 40:** Καμπύλη αναφοράς της καθαρής ένωσης 4, σε ακετόνη.

## 11.2. ΦΑΣΜΑΤΑ UV/Vis

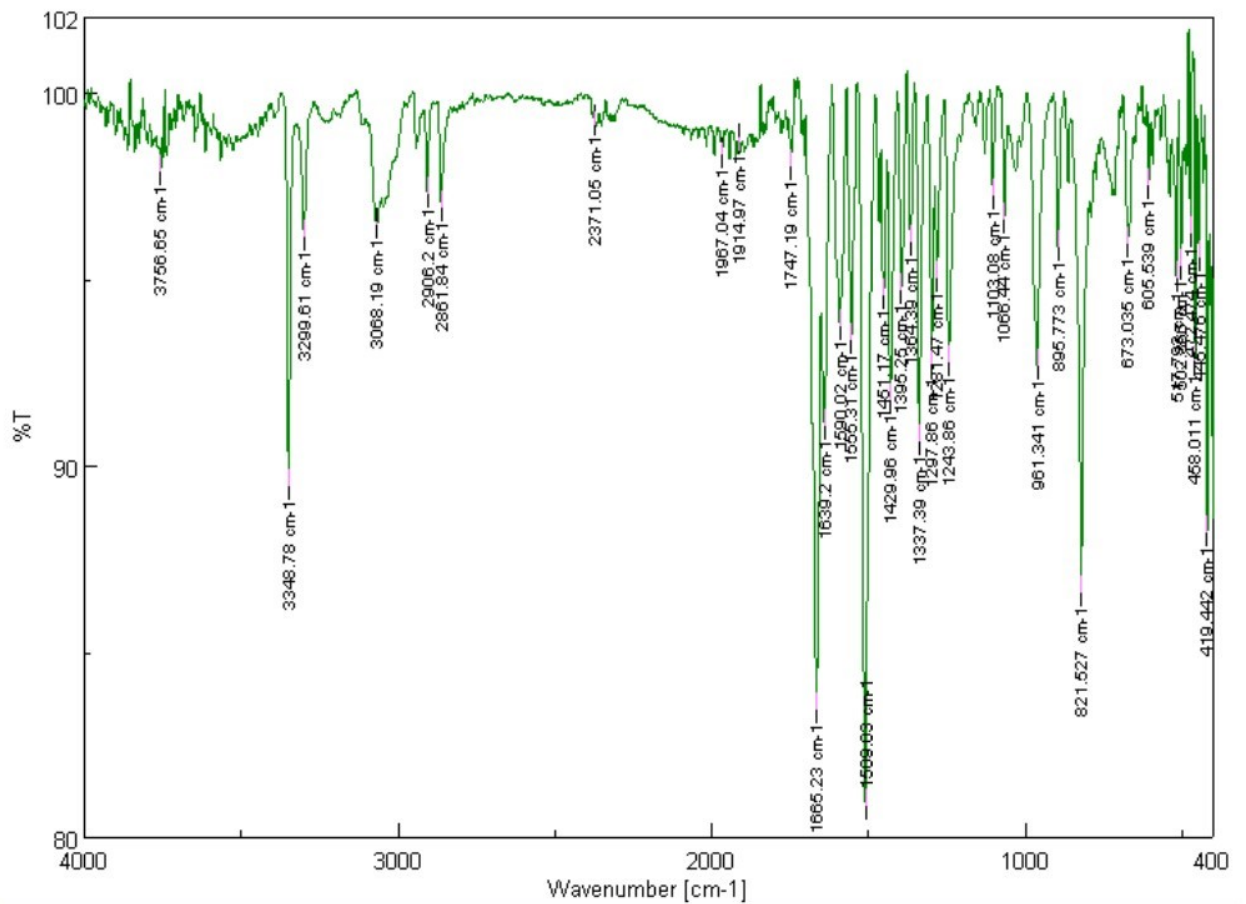


**Εικόνα 41:** Φάσμα UV/Vis της ένωσης 3.

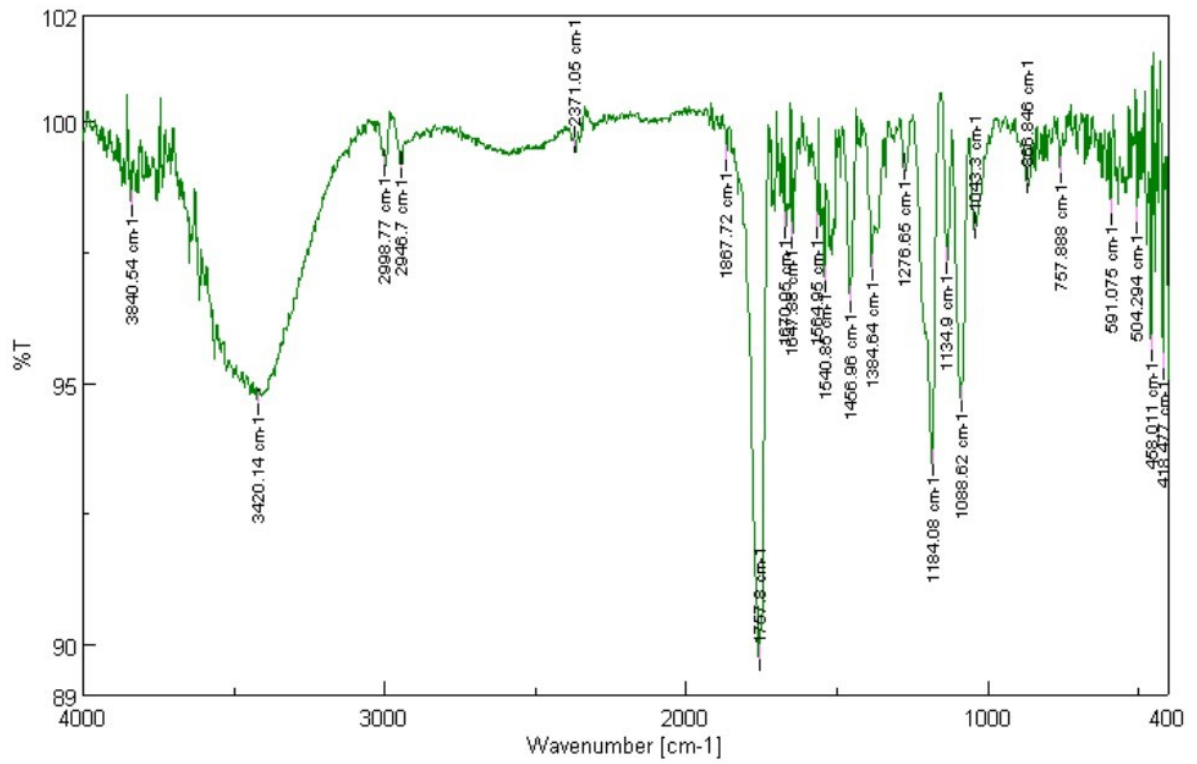


Εικόνα 42: Φάσμα UV/Vis της ένωσης 4.

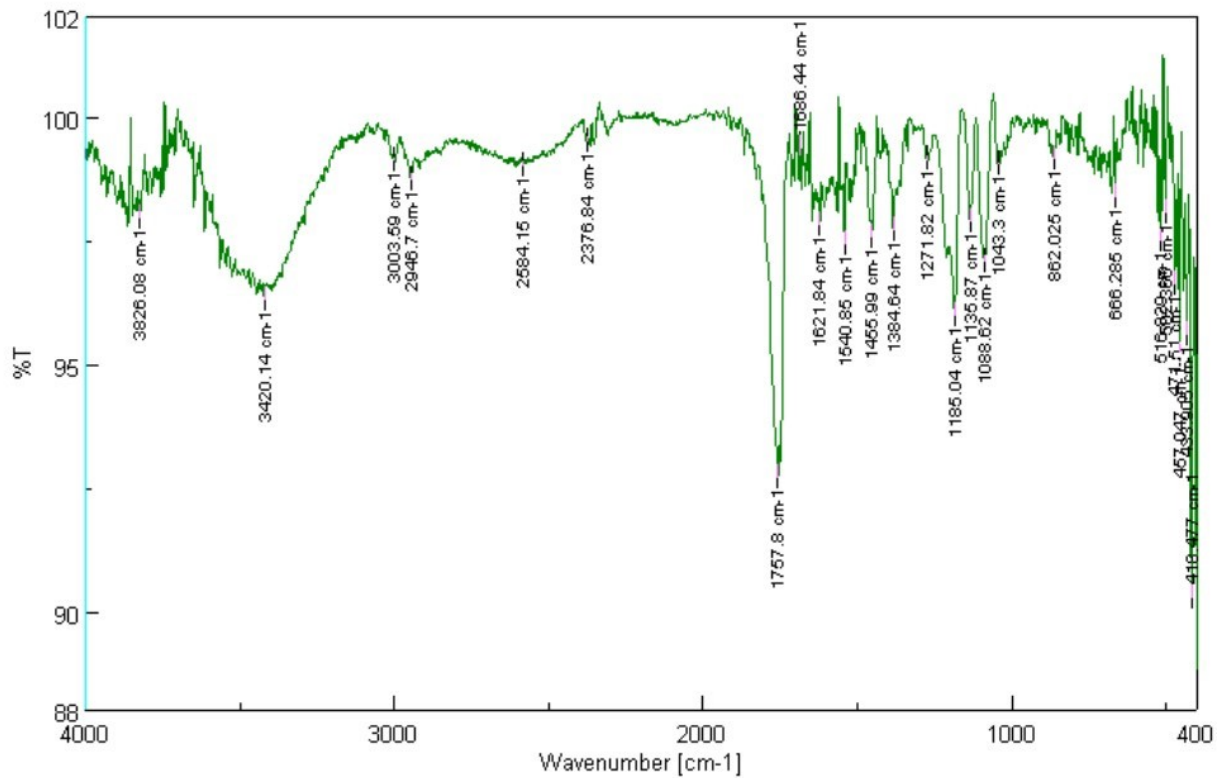
### 11.3. ΦΑΣΜΑΤΑ FT-IR



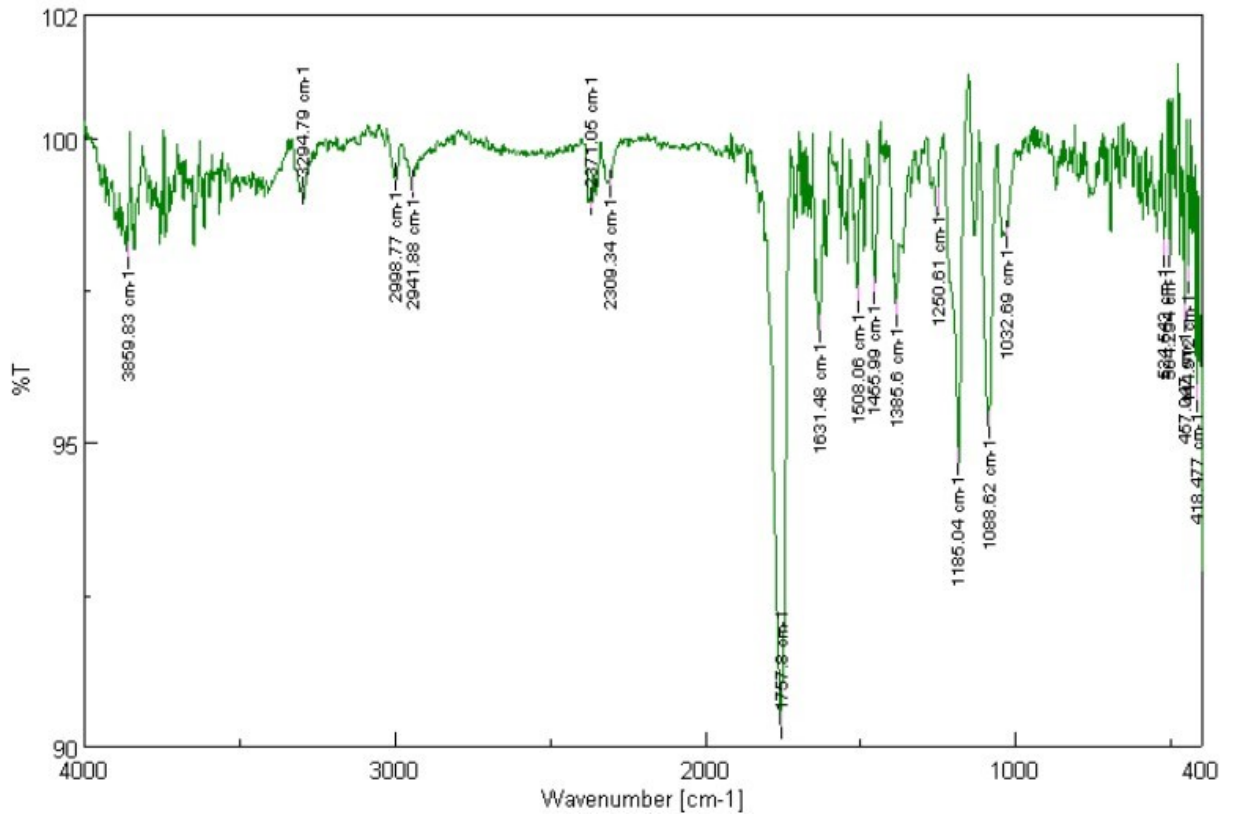
Εικόνα 43: FT-IR φάσμα της ένωσης 3.



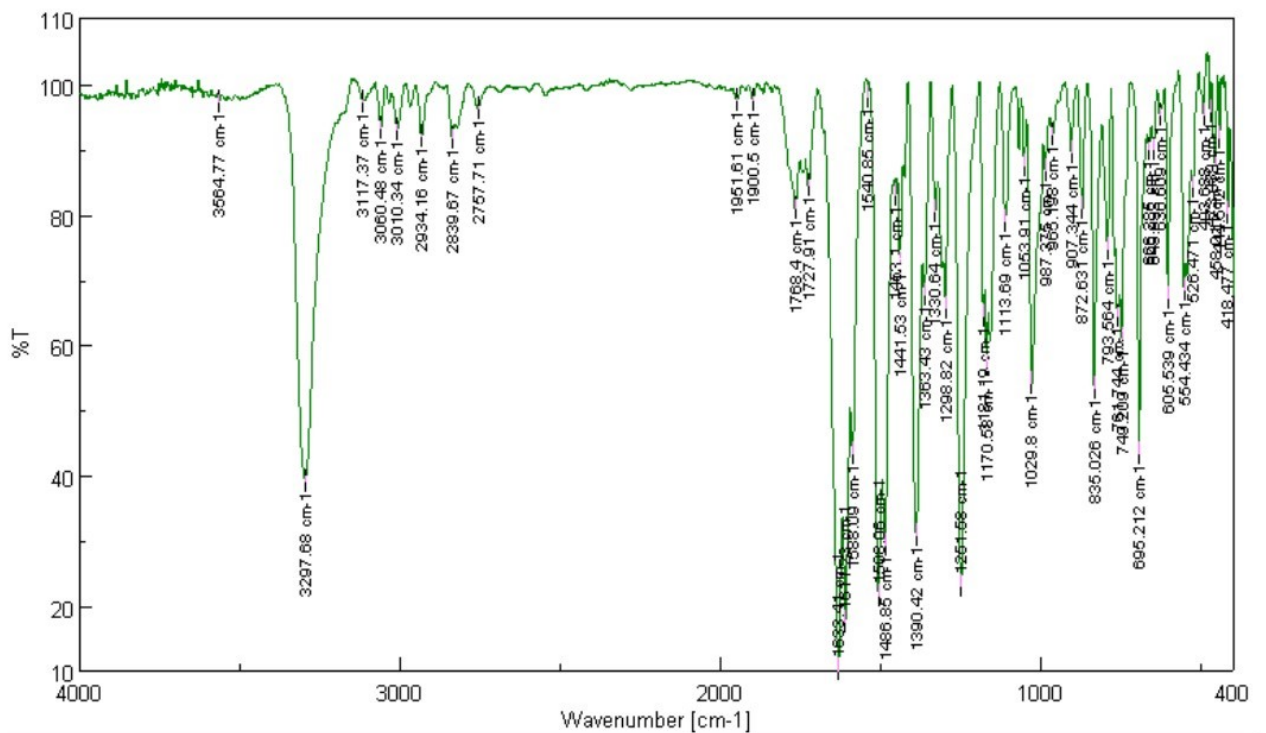
Εικόνα 44: FT-IR φάσμα των νανοσωματιδίων LS5.



Εικόνα 45: FT-IR φάσμα των κενών νανοσωματιδίων LS6.

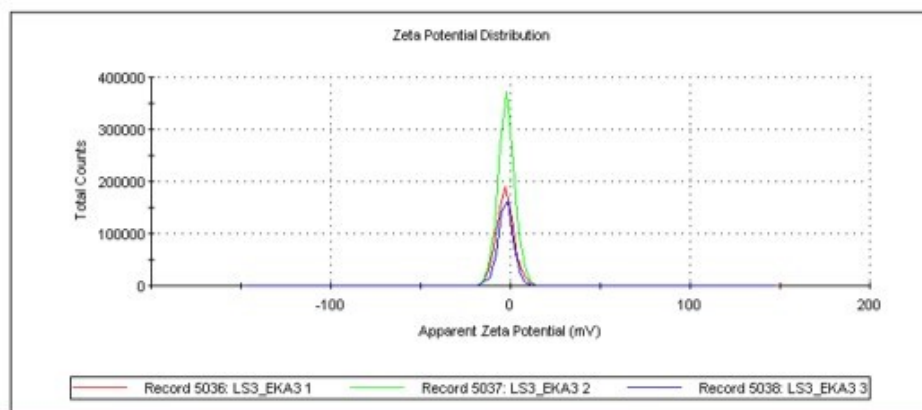


Εικόνα 46: FT-IR φάσμα τωννανοσωματιδίων LS7.

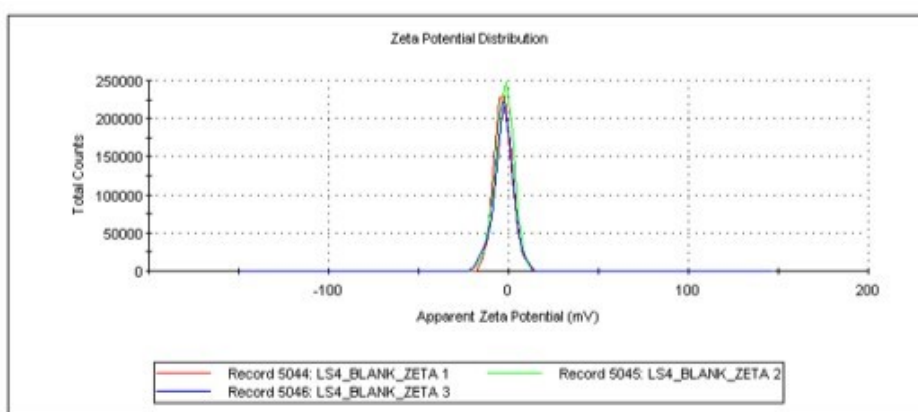


Εικόνα 47: FT-IR φάσμα της ένωσης 4.

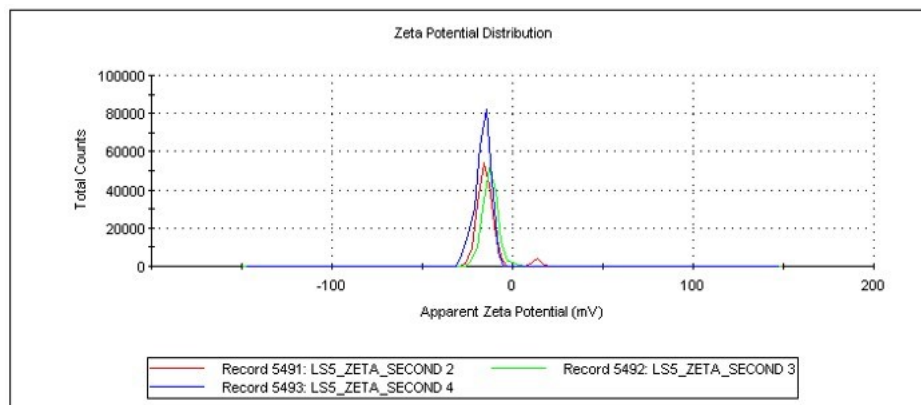
## 11.4. ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ Ζ



Εικόνα 48: Δυναμικό ζ των νανοσωματιδίων LS3.

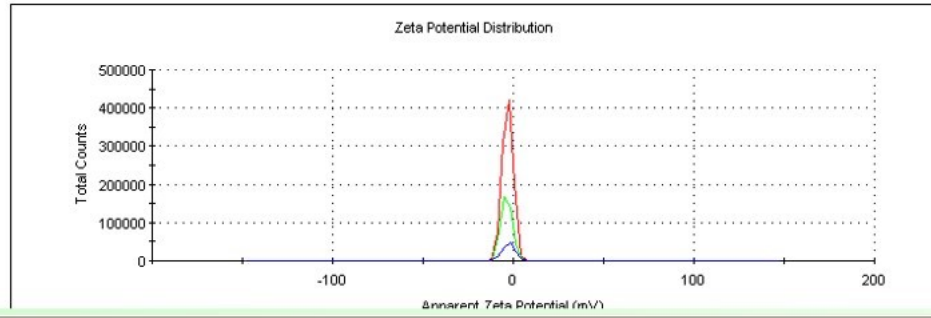


Εικόνα 49: Δυναμικό ζ των κενών νανοσωματιδίων NPs LS4.

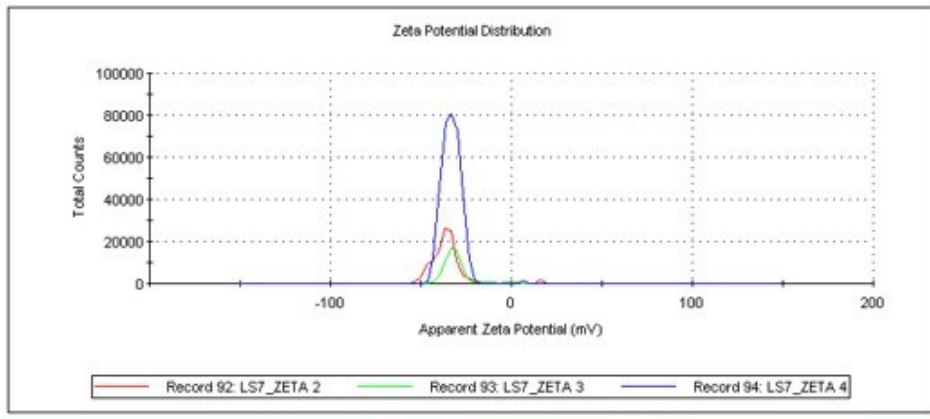


Εικόνα 50: Δυναμικό ζ των νανοσωματιδίων LS5.

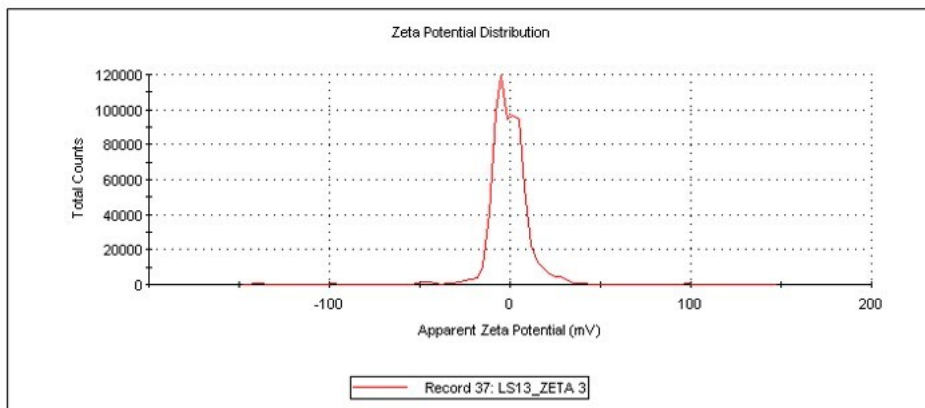




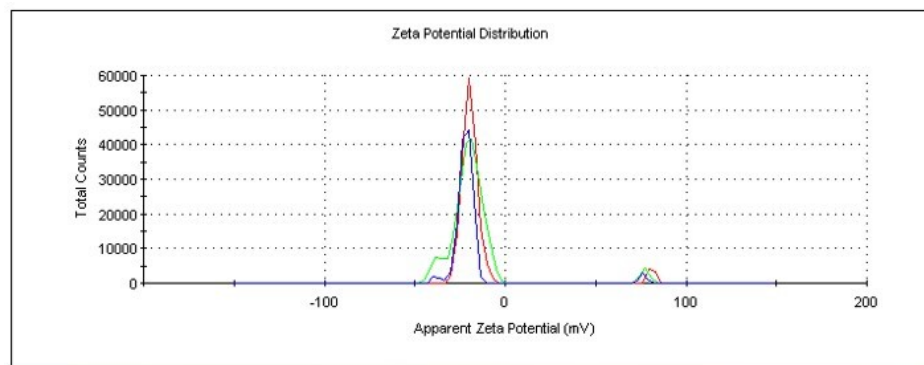
**Εικόνα 51: Δυναμικό ζ των νανοσωματιδίων LS6.**



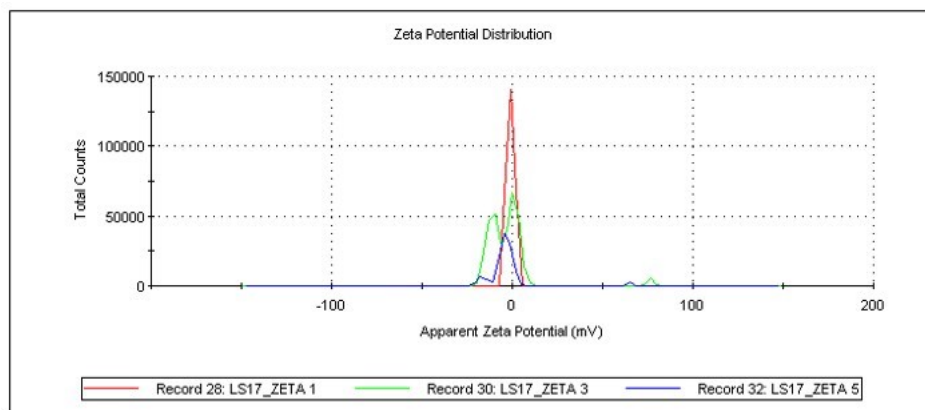
**Εικόνα 52: Δυναμικό ζ των νανοσωματιδίων LS7.**



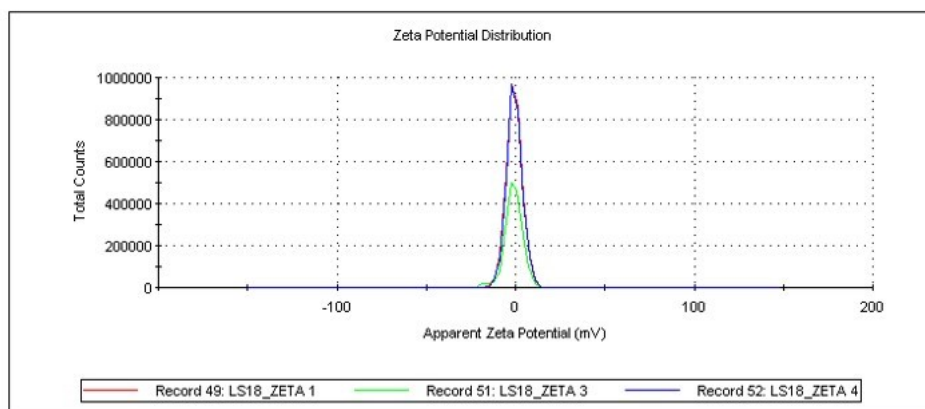
**Εικόνα 53: Δυναμικό ζ των νανοσωματιδίων LS13.**



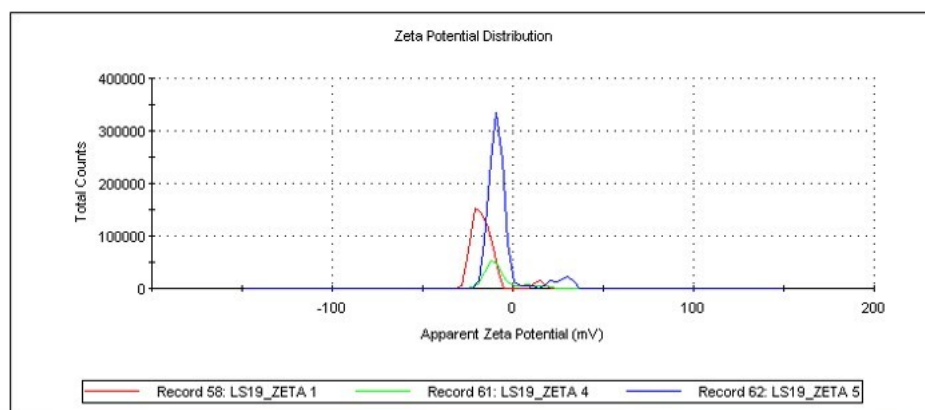
**Εικόνα 54: Δυναμικό ζ των νανοσωματιδίων LS14.**



Εικόνα 55: Δυναμικό ζ των νανοσωματιδίων LS17.



Εικόνα 56: Δυναμικό ζ των νανοσωματιδίων LS18.



Εικόνα 57: Δυναμικό ζ των νανοσωματιδίων LS19.

## 11.5. ΦΩΤΟΒΟΛΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

### 11.5.1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα του ρυθμιστικού Tris. Για το σκοπό αυτό ζυγίζονται 6 mg σκόνης 2-αμινο-2-(υδροξυμέθυλο)-1,3-προπανοδιόλης (Trizma base, SIGMA) σε 20 mL αποστειρωμένου νερού (Διάλυμα A, 2.5 mM). Ακολουθεί αραιώση 1:10 σε τελικό όγκο 20 mL (Διάλυμα B, 250 μM). Το διάλυμα B αραιώνεται

επίσης 10 φορές, σε τελικό όγκο 20 mL, ώστε να έχουμε συγκέντρωση 25  $\mu$ M (Διάλυμα Γ). Στο βήμα αυτό, ρυθμίζεται το pH με τιμή 6.8.

Στη συνέχεια παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα TBE (Tris Boric EDTA). Σε 700 mL αποστειρωμένου νερού προστίθενται 108 g Tris, 55 g βορικό οξύ και 40 mL EDTA 0.5 M. Το μείγμα αναδεύεται έως ότου τα υλικά διαλυθούν και το διάλυμα γίνει διαυγές. Στη συνέχεια γίνεται μέτρηση του pH και ρύθμιση εάν είναι απαραίτητο στο 8.3. Συμπληρώνεται και η υπόλοιπη ποσότητα νερού μέχρι όγκο 1 L και ακολουθεί φιλτράρισμα με χαρτί whatman. Για το διάλυμα TBE 1 X γίνεται αραιώση 1:10 σε τελικό όγκο 1 L, οπότε σε 900 mL απιονισμένου νερού προσθέτουμε 100 mL TBE 10 X.

Για την παρασκευή πηκτής αγαρόζης 1 % χρησιμοποιείται σκόνη αγαρόζης (Invitrogen). Διαλύουμε 500 mg αγαρόζης σε 50 mL διαλύματος TBE 1 X με θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για ένα λεπτό. Στη συνέχεια, αφού το διάλυμα γίνει διαυγές ψύχεται κάτω από τρεχούμενο νερό για λιγότερο από δύο λεπτά και τότε προσθέτουμε 5  $\mu$ L βρωμιούχου αιθιδίου (αραιώση 1: 10.000). Τοποθετούμε το διάλυμα στο κατάλληλο εκμαγείο το οποίο έχουμε ήδη προετοιμάσει ώστε να είναι κλειστό στις άκρες και να υπάρχει το «χτενάκι» που θα δημιουργήσει τις θέσεις τοποθέτησης των διαλυμάτων. Αφού το διάλυμα γίνει στερεό μπορούμε να το τοποθετήσουμε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης προσθέτοντας TBE μέχρι να καλυφθεί η πηκτή, δημιουργώντας έτσι κύκλωμα ώστε το ρεύμα να διέρχεται από το TBE και την πηκτή.

Η κιναζολινόνη **3** που μελετάται διαλύεται σε DMSO. Αρχικά, ετοιμάζουμε διαλύματα με όγκο 5 mL και συγκέντρωση ουσίας 5 mM. Ζυγίζουμε την κατάλληλη ποσότητα με βάση το μοριακό της βάρος και προσθέτουμε 5 mL του διαλύτη (διάλυμα Α). Αυτό αραιώνεται 10 φορές δίνοντας το διάλυμα Β συγκέντρωσης 500  $\mu$ M, σε τελικό όγκο 5 mL (προστίθεται 0.5 mL από το διάλυμα Α σε 4.5 mL αποστειρωμένου νερού) και συγκέντρωση DMSO 10%. Ακολουθεί περαιτέρω αραιώση, μέχρι συγκεντρώσεως 25  $\mu$ M στο διάλυμα.

Για τα νανοσωματίδια LS5 με εγκλεισμένη την ένωση **3** χρειαζόμαστε το % ποσοστό φόρτωσης του υλικού. Αφού τα NPs επώαστηκαν πρώτα σε buffer Tris (pH=6.8) για 3 ώρες προκειμένου να απελευθερωθεί η μέγιστη ποσότητα ένωσης, παραλαμβάνεται το υπερκείμενο και παρασκευάζεται μία αρχική συγκέντρωση 5000  $\mu$ M της ένωσης **3**, σε 5 mL Tris. Ποσότητα από το διάλυμα και αραιώνεται ώστε να προκύψει συγκέντρωση 25  $\mu$ M σε όγκο 1 mL, ώστε να μπορεί να συγκριθεί με τη συγκέντρωση 25  $\mu$ M της καθαρής ένωσης σε DMSO.

Μετρώνται επίσης τα κενά νανοσωματίδια PLA (LS4), η ένωση **3** διαλυμένη στο DES CC/LA 1:1.5 και DMSO, όλα σε συγκέντρωση 25  $\mu$ M, όπως επίσης και το ίδιο DES σε περιεκτικότητα 20% στον τελικό όγκο ( $V_{\text{τελ}}=20 \mu\text{L}$ ).

Κατά τη φόρτωση των διαλυμάτων στην πηκτή, προσθέτουμε στο φιαλίδιο 4  $\mu$ L Orange Loading Dye 6 X (Fermentas) και τοποθετούμε όλο το διάλυμα στη θέση φόρτωσης.

### 11.5.2. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΦΩΤΟΒΟΛΗΣΗΣ

Τα διαλύματα τοποθετούνται σε γυάλινα φιαλίδια σε τελικό όγκο 20 μL. Το διάλυμα περιέχει την κατάλληλη ποσότητα ουσίας ανάλογα με τη ζητούμενη συγκέντρωση, 500 ng πλασμιδίου και διάλυμα Tris. Η φωτοβόλησή τους λαμβάνει χώρα για την κατάλληλη ώρα και απόσταση ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος με υπεριώδη ακτινοβολία 312 nm ή 365 nm. Τα φιαλίδια στερεώνονται σε 'floater' (τετραγωνο επίπεδο σφουγγαράκι με θέσεις για τα φιαλίδια) έτσι ώστε να παρεμβάλλεται μόνο αέρας μεταξύ του πυθμένα και της επιφάνειας ακτινοβόλησης.

Η ακτινοβόληση πραγματοποιήθηκε στο UVB στα 312 nm σε ύψος 15 cm και για χρονικό διάστημα 30 min.

### 11.5.3. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων η πηκτή αγαρόζης φωτογραφίζεται από ειδική κάμερα σε ακτινοβολία UV. Η επεξεργασία των εικόνων πραγματοποιείται με το πρόγραμμα 'Image J'. Επιλέγεται με κατάλληλη διαδικασία ο αλγόριθμος του προγράμματος για τη μέτρηση της έντασης των ζωνών. Εισάγονται οι τιμές των εντάσεων στο πρόγραμμα 'Microsoft Excel' και υπολογίζουμε τους λόγους των τιμών για να κατασκευάσουμε τα διαγράμματα. Το ποσοστό μετατροπής της μορφής I («υπερελικωμένης») στην μορφή II («χαλαρή») του DNA υπολογίστηκε με τους λόγους που αναγράφονται δίπλα στα διαγράμματα.

## 12. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Sun, T., Zhang, Y. S., Pang, B., Hyun, D. C., Yang, M., & Xia, Y. (2014). Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, n/a–n/a. doi:10.1002/anie.201403036
2. Rizvi, S. A. A., & Saleh, A. M. (2018). Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(1), 64–70. doi:10.1016/j.jsps.2017.10.012
3. Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z., & Shin, D. M. (2008). Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(5), 1310–1316. doi:10.1158/1078-0432.ccr-07-1441
4. Begines, B., Ortiz, T., Pérez-Aranda, M., Martínez, G., Merinero, M., Argüelles-Arias, F., & Alcudia, A. (2020). Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery: Recent Developments and Future Prospects. *Nanomaterials*, 10(7), 1403. doi:10.3390/nano10071403
5. Mura, S., Nicolas, J., & Couvreur, P. (2013). Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nature Materials*, 12(11), 991–1003. doi:10.1038/nmat3776
6. Singh, R., & Lillard, J. W., Jr (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and molecular pathology*, 86(3), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.004>

7. Wang, A. Z., Gu, F., Zhang, L., Chan, J. M., Radovic-Moreno, A., Shaikh, M. R., & Farokhzad, O. C. (2008). Biofunctionalized targeted nanoparticles for therapeutic applications. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 8(8), 1063–1070. doi:10.1517/14712598.8.8.1063
8. Kefalas, P., & Detsi, A. (2014). Encapsulation of the natural antioxidant aureusidin in biodegradable PLA nanoparticles. *Polymer Degradation and Stability*, 108, 182–187. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2014.08.004
9. Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., & Farokhzad, O. C. (2016). Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chemical Reviews*, 116(4), 2602–2663. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00346
10. Lee, J. H., & Yeo, Y. (2015). Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chemical Engineering Science*, 125, 75–84. doi:10.1016/j.ces.2014.08.046
11. Chatzidaki, M., Kostopoulou, I., Kourtesi, C., Pitterou, I., Avramiotis, S., Xenakis, A., & Detsi, A. (2020).  $\beta$ -Cyclodextrin as carrier of novel antioxidants: A structural and efficacy study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 125262. doi:10.1016/j.colsurfa.2020.125262
12. Castro-Aguirre, E., Iñiguez-Franco, F., Samsudin, H., Fang, X., & Auras, R. (2016). Poly(lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 333–366. doi:10.1016/j.addr.2016.03.010
13. Saeidlou, S., Huneault, M. A., Li, H., & Park, C. B. (2012). Poly(lactic acid) crystallization. *Progress in Polymer Science*, 37(12), 1657–1677. doi:10.1016/j.progpolymsci.2012.07.005
14. Murariu, M., & Dubois, P. (2016). PLA composites: From production to properties. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 17–46. doi:10.1016/j.addr.2016.04.003
15. Athanasoulia, I., Giachalis, K., Korres, D., Todorova, N., Giannakopoulou, T., Tarantili, P. A., & Christos Trapalis. (2020). Study of thermomechanical, structural and antibacterial properties of poly(lactic acid) reinforced with graphene oxide nanoparticles via melt mixing. *Polymer International*. doi:10.1002/pi.6054
16. Maharana, T., Mohanty, B., & Negi, Y. S. (2009). Melt–solid polycondensation of lactic acid and its biodegradability. *Progress in Polymer Science*, 34(1), 99–124. doi:10.1016/j.progpolymsci.2008.10.001
17. Hu, Y., Daoud, W., Cheuk, K., & Lin, C. (2016). Newly Developed Techniques on Polycondensation, Ring-Opening Polymerization and Polymer Modification: Focus on Poly(Lactic Acid). *Materials*, 9(3), 133. doi:10.3390/ma9030133
18. Rasal, R. M., Janorkar, A. V., & Hirt, D. E. (2010). Poly(lactic acid) modifications. *Progress in Polymer Science*, 35(3), 338–356. doi:10.1016/j.progpolymsci.2009.12.003
19. Vouyiouka, S., Theodoulou, P., Symeonidou, A., Papaspyrides, C. D., & Pfaendner, R. (2013). Solid state polymerization of poly(lactic acid): Some

- fundamental parameters. *Polymer Degradation and Stability*, 98(12), 2473–2481. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2013.06.012
20. Bechet, D., Couleaud, P., Frochot, C., Viriot, M. L., Guillemin, F., & Barberi-Heyob, M. (2008). Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends in biotechnology*, 26(11), 612–621. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.07.007>
  21. Zeisser-Labouèbe, M., Lange, N., Gurny, R., & Delie, F. (2006). Hypericin-loaded nanoparticles for the photodynamic treatment of ovarian cancer. *International journal of pharmaceutics*, 326(1-2), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.07.012>
  22. Pegaz, B., Debefve, E., Borle, F., Ballini, J.-P., van den Bergh, H., & Kouakou-Konan, Y. N. (2005). Encapsulation of porphyrins and chlorins in biodegradable nanoparticles: The effect of dye lipophilicity on the extravasation and the photothrombic activity. A comparative study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 80(1), 19–27. doi:10.1016/j.jphotobiol.2005.02.003
  23. Tian, B., Hua, S., & Liu, J. (2019). Cyclodextrin-based delivery systems for chemotherapeutic anticancer drugs: A review. *Carbohydrate Polymers*, 115805. doi:10.1016/j.carbpol.2019.115805
  24. Saha, S., Roy, A., Roy, K., & Roy, M. N. (2016). Study to explore the mechanism to form inclusion complexes of  $\beta$ -cyclodextrin with vitamin molecules. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep35764
  25. Carneiro, S., Costa Duarte, F., Heimfarth, L., Siqueira Quintans, J., Quintans-Júnior, L., Veiga Júnior, V., & Neves de Lima, Á. (2019). Cyclodextrin–Drug Inclusion Complexes: In Vivo and In Vitro Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 642. doi:10.3390/ijms20030642
  26. Fenyvesi, É., Szemán, J., Csabai, K., Malanga, M., & Szente, L. (2014). Methyl-Beta-Cyclodextrins: The Role of Number and Types of Substituents in Solubilizing Power. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(5), 1443–1452. doi:10.1002/jps.23917
  27. Saokham, P., Muankaew, C., Jansook, P., & Loftsson, T. (2018). Solubility of Cyclodextrins and Drug/Cyclodextrin Complexes. *Molecules*, 23(5), 1161. doi:10.3390/molecules23051161
  28. Zhang, J., & Ma, P. X. (2013). Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(9), 1215–1233. doi:10.1016/j.addr.2013.05.001
  29. Jafari, E., Khajouei, M. R., Hassanzadeh, F., Hakimelahi, G. H., & Khodarahmi, G. A. (2016). Quinazolinone and quinazoline derivatives: recent structures with potent antimicrobial and cytotoxic activities. *Research in pharmaceutical sciences*, 11(1), 1–14.
  30. Hameed, A., Al-Rashida, M., Uroos, M., Ali, S. A., Arshia, Ishtiaq, M., & Khan, K. M. (2018). Quinazoline and quinazolinone as important medicinal scaffolds: a comparative patent review (2011-2016). *Expert opinion on*

- therapeutic patents, 28(4), 281–297.  
<https://doi.org/10.1080/13543776.2018.1432596>
31. Devi KA, Sarangapani M, Sriram. Synthesis and antimicrobial activity of some quinazolinones derivatives. *International Journal of Drug Development and Research*. 2012;4(3):324-327.
  32. Zhang, J., Liu, J., Ma, Y., Ren, D., Cheng, P., Zhao, J., ... Yao, Y. (2016). One-pot synthesis and antifungal activity against plant pathogens of quinazolinone derivatives containing an amide moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(9), 2273–2277. doi:10.1016/j.bmcl.2016.03.052
  33. Gatadi, S., Lakshmi, T. V., & Nanduri, S. (2019). 4(3H)-Quinazolinone derivatives: Promising antibacterial drug leads. *European Journal of Medicinal Chemistry*. doi:10.1016/j.ejmech.2019.03.018
  34. Rakesh, K. P., Shantharam, C. S., & Manukumar, H. M. (2016). Synthesis and SAR studies of potent H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibitors of quinazolinone-Schiff's base analogues. *Bioorganic Chemistry*, 68, 1–8. doi:10.1016/j.bioorg.2016.07.001
  35. Wei, M., Chai, W.-M., Wang, R., Yang, Q., Deng, Z., & Peng, Y. (2017). Quinazolinone derivatives: Synthesis and comparison of inhibitory mechanisms on  $\alpha$ -glucosidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(4), 1303–1308. doi:10.1016/j.bmc.2016.09.042
  36. Annotated Patent Selections. (2010). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 20(10), 1421–1427. doi:10.1517/13543776.2010.520562
  37. Zhang, G. H., Xue, W. B., An, Y. F., Yuan, J. M., Qin, J. K., Pan, C. X., & Su, G. F. (2015). Distinct novel quinazolinone exhibits selective inhibition in MGC-803 cancer cells by dictating mutant p53 function. *European journal of medicinal chemistry*, 95, 377–387.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.03.053>
  38. Ward, A., Dong, L., Harris, J. M., Khanna, K. K., Al-Ejeh, F., Fairlie, D. P., ... Liu, L. (2017). Quinazolinone derivatives as inhibitors of homologous recombinase RAD51. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(14), 3096–3100. doi:10.1016/j.bmcl.2017.05.039
  39. Zahedifard, M., Lafta Faraj, F., Paydar, M., Yeng Looi, C., Hajrezaei, M., Hasanpourghadi, M., ... Ameen Abdulla, M. (2015). Synthesis, characterization and apoptotic activity of quinazolinone Schiff base derivatives toward MCF-7 cells via intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. *Scientific Reports*, 5(1). doi:10.1038/srep11544
  40. Mishra, S. (2020). Quinazolinone and Quinazoline Derivatives: Synthesis and Biological Application. *Quinazolinone and Quinazoline Derivatives*. doi:10.5772/intechopen.89203
  41. Huang, W.-Y., Zhang, X.-R., Lyu, L., Wang, S.-Q., & Zhang, X.-T. (2020). Pyridazino[1,6-b]quinazolinones as new anticancer scaffold: Synthesis, DNA intercalation, topoisomerase I inhibition and antitumor evaluation in vitro and in vivo. *Bioorganic Chemistry*, 99, 103814. doi:10.1016/j.bioorg.2020.103814



42. Peng, L.-P., Nagarajan, S., Rasheed, S., & Zhou, C.-H. (2015). Synthesis and biological evaluation of a new class of quinazolinoneazoles as potential antimicrobial agents and their interactions with calf thymus DNA and human serum albumin. *MedChemComm*, 6(1), 222–229. doi:10.1039/c4md00281d
43. Vanda, H., Dai, Y., Wilson, E. G., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2018). Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. *Comptes Rendus Chimie*, 21(6), 628–638. doi:10.1016/j.crci.2018.04.002
44. Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I. W. C. E., ... Verpoorte, R. (2011). Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? *PLANT PHYSIOLOGY*, 156(4), 1701–1705. doi:10.1104/pp.111.178426
45. Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., & Duarte, A. R. C. (2014). Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(5), 1063–1071. doi:10.1021/sc500096j
46. Liu, Y., Friesen, J. B., McAlpine, J. B., Lankin, D. C., Chen, S.-N., & Pauli, G. F. (2018). Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *Journal of Natural Products*, 81(3), 679–690. doi:10.1021/acs.jnatprod.7b00945
47. Jablonský, M., Škulcová, A., & Šima, J. (2019). Use of Deep Eutectic Solvents in Polymer Chemistry—A Review. *Molecules*, 24(21), 3978. doi:10.3390/molecules24213978
48. Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G.-J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61–68. doi:10.1016/j.aca.2012.12.019
49. Gai, S., Yang, G., Yang, P., He, F., Lin, J., Jin, D., & Xing, B. (2018). Recent advances in functional nanomaterials for light-triggered cancer therapy. *Nano Today*, 19, 146–187. doi:10.1016/j.nantod.2018.02.010
50. Lucky, S. S., Soo, K. C., & Zhang, Y. (2015). Nanoparticles in Photodynamic Therapy. *Chemical Reviews*, 115(4), 1990–2042. doi:10.1021/cr5004198
51. Li, X., Kwon, N., Guo, T., Liu, Z., & Yoon, J. (2018). Innovative Strategies for Hypoxic-Tumor Photodynamic Therapy. *Angewandte Chemie International Edition*. doi:10.1002/anie.201805138
52. Gritzapis, P. S., Varras, P. C., Andreou, N. P., Katsani, K. R., Dafnopoulos, K., Psomas, G., Peitsinis, Z. V., Koumbis, A. E., & Fylaktakidou, K. C. (2020). p-Pyridinyl oxime carbamates: synthesis, DNA binding, DNA photocleaving activity and theoretical photodegradation studies. *Beilstein journal of organic chemistry*, 16, 337–350. <https://doi.org/10.3762/bjoc.16.33>
53. Castano, Ana P et al. “Mechanisms in photodynamic therapy: part one- photosensitizers, photochemistry and cellular localization.” *Photodiagnosis and photodynamic therapy* vol. 1,4 (2004): 279-93. doi:10.1016/S1572-1000(05)00007-4

54. Tokura, Y., Ogai, M., Yagi, H., & Takigawa, M. (1994). AFLOQUALONE PHOTSENSITIVITY. IMMUNOGENICITY OF AFLOQUALONE-PHOTOMODIFIED EPIDERMAL CELLS. *Photochemistry and Photobiology*, 60(3), 262–267. doi:10.1111/j.1751-1097.1994.tb05102.x
55. Yu, Y., Xu, Q., He, S., Xiong, H., Zhang, Q., Xu, W., ... Zhou, D. (2019). Recent advances in delivery of photosensitive metal-based drugs. *Coordination Chemistry Reviews*, 387, 154–179. doi:10.1016/j.ccr.2019.01.020
56. Goftar, M.K., Kor, N.M., & Kor, Z.M. (2014). DNA INTERCALATORS AND USING THEM AS ANTICANCER DRUGS. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2, 811-822.
57. Kadagathur, M., Parimala Devi, G., Grewal, P., Kumar Sigalapalli, D., Makhil, P. N., Chand Banerjee, U., ... Tangellamudi, N. D. (2020). Novel Diindoloazepinone Derivatives as DNA Minor Groove Binding Agents with Selective Topoisomerase I Inhibition: Design, Synthesis, Biological Evaluation and Docking Studies. *Bioorganic Chemistry*, 103629. doi:10.1016/j.bioorg.2020.103629
58. Singla, P., Luxami, V., & Paul, K. (2017). Quinazolinone-benzimidazole conjugates: Synthesis, characterization, dihydrofolate reductase inhibition, DNA and protein binding properties. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 168, 156–164. doi:10.1016/j.jphotobiol.2017.02.009
59. Amini, Y., Amel Jamehdar, S., Sadri, K., Zare, S., Musavi, D., & Tafaghodi, M. (2017). Different methods to determine the encapsulation efficiency of protein in PLGA nanoparticles. *Bio-medical materials and engineering*, 28(6), 613–620. <https://doi.org/10.3233/BME-171705>
60. Mehta, R. C., Thanoo, B. C., & Deluca, P. P. (1996). Peptide containing microspheres from low molecular weight and hydrophilic poly(d,l-lactide-co-glycolide). *Journal of Controlled Release*, 41(3), 249–257. doi:10.1016/0168-3659(96)01332-6
61. Castro, K. C. de, Costa, J. M., & Campos, M. G. N. (2020). Drug-loaded polymeric nanoparticles: a review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 1–13. doi:10.1080/00914037.2020.1798436
62. Bodmeier, R., & McGinity, J. W. (1988). Solvent selection in the preparation of poly(dl-lactide) microspheres prepared by the solvent evaporation method. *International Journal of Pharmaceutics*, 43(1-2), 179–186. doi:10.1016/0378-5173(88)90073-7
63. Park, T. G., Yong Lee, H., & Sung Nam, Y. (1998). A new preparation method for protein loaded poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) microspheres and protein release mechanism study. *Journal of Controlled Release*, 55(2-3), 181–191. doi:10.1016/s0168-3659(98)00050-9
64. Fu, X., Ping, Q., & Gao, Y. (2005). Effects of formulation factors on encapsulation efficiency and release behaviour in vitro of huperzine A-PLGA microspheres. *Journal of microencapsulation*, 22(7), 705–714. <https://doi.org/10.1080/02652040500162196>
65. Li, M., Rouaud, O., & Poncelet, D. (2008). Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. *International*

- journal of pharmaceutics, 363(1-2), 26–39.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.018>
66. Kesente, M., Kavetsou, E., Roussaki, M., Blidi, S., Loupassaki, S., Chanioti, S., ... Detsi, A. (2017). Encapsulation of Olive Leaves Extracts in Biodegradable PLA Nanoparticles for Use in Cosmetic Formulation. *Bioengineering*, 4(4), 75. doi:10.3390/bioengineering4030075
  67. Jeyanthi, R., Thanoo, B. C., Metha, R. C., & Deluca, P. P. (1996). Effect of solvent removal technique on the matrix characteristics of polylactide/glycolide microspheres for peptide delivery. *Journal of Controlled Release*, 38(2-3), 235–244. doi:10.1016/0168-3659(95)00125-5
  68. Boury, F., Marchais, H., Proust, J. E., & Benoit, J. P. (1997). Bovine serum albumin release from poly( $\alpha$ -hydroxy acid) microspheres: effects of polymer molecular weight and surface properties. *Journal of Controlled Release*, 45(1), 75–86. doi:10.1016/s0168-3659(96)01547-7
  69. Witschi, C., & Doelker, E. (1998). Influence of the microencapsulation method and peptide loading on poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) degradation during in vitro testing. *Journal of Controlled Release*, 51(2-3), 327–341. doi:10.1016/s0168-3659(97)00188-0
  70. Εργαστηριακός Οδηγός: «Προχωρημένες Εργαστηριακές Ασκήσεις Υλικών» – ΔΠΜΣ: Επιστήμη και Τεχνολογία Υλικών – 2018-2019.
  71. Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, 8(4), 409–427. doi:10.1007/s12551-016-0218-6
  72. Κ. Παναγιώτου, Επιστήμη και Τεχνολογία Πολυμερών, 2η Έκδοση, Εκδόσεις Πήγασος, Θεσσαλονίκη 2006.
  73. Rwei, A. Y., Wang, W., & Kohane, D. S. (2015). Photoresponsive nanoparticles for drug delivery. *Nano Today*, 10(4), 451–467. doi:10.1016/j.nantod.2015.06.004
  74. Reimer, L. (1998). *Scanning Electron Microscopy*. Springer Series in Optical Sciences. doi:10.1007/978-3-540-38967-5
  75. Μαρία Όξενκιουν-Πετροπούλου, Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης, Οπτικές Μέθοδοι, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Εργαστήριο Ανοργάνου και Αναλυτικής Χημείας, Αθήνα 1997
  76. Κουή Μαρία, Αβδελίδης Νικόλαος, Θεοδωρακέας Παναγιώτης, Χειλάκου Ελένη, Μη καταστρεπτικές και φασματοσκοπικές μέθοδοι εξέτασης των υλικών, Εκδόσεις Κάλλιπος, 2015
  77. Gabbott, P. (n.d.). A Practical Introduction to Differential Scanning Calorimetry. *Principles and Applications of Thermal Analysis*, 1–50. doi:10.1002/9780470697702.ch1
  78. Mansfield, E. (2015). Recent advances in thermal analysis of nanoparticles. *Modeling, Characterization, and Production of Nanomaterials*, 167–178. doi:10.1016/b978-1-78242-228-0.00006-5
  79. Chartoff, R. P., & Sircar, A. K. (2004). Thermal Analysis of Polymers. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. doi:10.1002/0471440264.pst367
  80. Saadatkah, N., Garcia, A. C., Ackermann, S., Leclerc, P., Latifi, M., Samih, S., ... Chaouki, J. (2019). *Experimental Methods in Chemical Engineering*:

- Thermogravimetric Analysis—TGA. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. doi:10.1002/cjce.23673
81. Bikiaris, D. (2011). Can nanoparticles really enhance thermal stability of polymers? Part II: An overview on thermal decomposition of polycondensation polymers. *Thermochimica Acta*, 523(1-2), 25–45. doi:10.1016/j.tca.2011.06.012
  82. Nain, S., Singh, R., Ravichandran, S. (2019). Importance of Microwave Heating In Organic Synthesis. *Advanced Journal of Chemistry-Section A*, 2(Issue 2), 94-104. doi: 10.29088/SAMI/AJCA.2019.2.94104
  83. Microwave Theory. (2012). *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, 9–39. doi:10.1002/9783527647828.ch2
  84. Draye, M., Estager, J., & Kardos, N. (2019). *Organic Sonochemistry: Ultrasound in Green Organic Synthesis. Activation Methods*, 1–93. doi:10.1002/9781119687443.ch1
  85. Li, W., Zhou, M., Xu, N., Hu, Y., Wang, C., Li, D., ... Li, D. (2016). Comparative analysis of protective effects of curcumin, curcumin- $\beta$ -cyclodextrin nanoparticle and nanoliposomal curcumin on unsymmetrical dimethyl hydrazine poisoning in mice. *Bioengineered*, 7(5), 334–341. doi:10.1080/21655979.2016.1197029
  86. Rizzarelli, P., Rapisarda, M., & Valenti, G. (2019). Mass spectrometry in bioresorbable polymer development, degradation and drug release tracking. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. doi:10.1002/rcm.8697
  87. Anderski, J., Mahlert, L., Sun, J., Birnbaum, W., Mulac, D., Schreiber, S., ... Langer, K. (2018). Light-responsive nanoparticles based on new polycarbonate polymers as innovative drug delivery systems for photosensitizers in PDT. *International Journal of Pharmaceutics*. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.12.040

