



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**  
**ΤΟΜΕΑΣ Ι: ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Θεραπευτικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες:  
σύνθεση, μελέτη δομής και αξιολόγηση της  
αλληλεπίδρασής τους με το ctDNA**

**Διπλωματική Εργασία**  
**Μαρία - Κωνσταντίνα Καλαντζή**

**Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:**  
Αναστασία Δέτση  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Αθήνα, 2021

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά την περίοδο 2020 – 2021 στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ, υπό την επίβλεψη της Αναπλ. Καθ. Αναστασίας Δέτση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Δέτση για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα ενδιαφέρον και καινοτόμο θέμα, από το οποίο αποκόμισα πρωτόγνωρες γνώσεις για τον τομέα της Φαρμακευτικής Χημείας. Επιπλέον, σπουδαίο ρόλο στην προσπάθεια αυτή διαδραμάτισαν οι υποψήφιοι διδάκτορες Μπαϊρακτάρη Μαρία και Πιττερού Ιωάννα, οι οποίες με υπομονή με καθοδήγησαν σε όλα τα στάδια της εργασίας, καθώς και η Δρ. Τζάνη Ανδρομάχη που μου προσέφερε την πολύτιμη βοήθειά της στο κομμάτι της σύνθεσης των πράσινων διαλυτών. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και ομαδικότητα, σε μια περίοδο αρκετά δύσκολη για όλους μας.

Τέλος, δε θα μπορούσα να παραλείψω τη μεγάλη συμβολή της οικογένειάς μου και των φίλων μου, οι οποίοι στήριξαν από την αρχή μέχρι το τέλος την προσπάθειά μου.

## Περιεχόμενα

|  |    |
|--|----|
| Ευχαριστίες .....  | 2  |
| Κατάλογος Εικόνων .....  | 6  |
| Κατάλογος Σχημάτων .....   | 8  |
| Κατάλογος Πινάκων .....  | 9  |
| Περίληψη.....  | 10 |
| Abstract.....  | 11 |
| Graphical Abstract.....  | 12 |
| Θεωρητικό Μέρος .....  | 13 |
| 1. Πράσινη Χημεία.....   | 14 |
| 1.1 Αρχές Πράσινης Χημείας .....   | 15 |
| 1.2 Πράσινοι Διαλύτες.....   | 20 |
| 1.2.1 Ιοντικά Υγρά (ILs) .....   | 20 |
| 1.2.2.1 Ιδιότητες .....  | 22 |
| 2. Φυσικοί και Θεραπευτικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες<br>(NaDES - TheDES) .....         | 27 |
| 2.1 Ιστορική Αναδρομή .....  | 27 |
| 2.2 Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (NaDES).....                                      | 29 |
| 2.3 Θεραπευτικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (TheDES).....                                | 31 |
| 2.4 Μέθοδοι Σύνθεσης .....   | 34 |
| 3. Αλληλεπίδραση Οργανικών Ενώσεων με το DNA .....                                       | 35 |
| 3.1 Δομή του DNA .....   | 36 |
| 3.2 Παρεμβολή στο DNA .....  | 37 |
| 3.2.1 Η διαδικασία της παρεμβολής .....  | 37 |
| 3.2.2 Βιολογική σημασία της παρεμβολής .....   | 38 |
| 3.2.3 Μόρια παρεμβολείς (intercalating agents) .....                                     | 39 |
| 3.3 Δέσμευση στην κύρια ή δευτερεύουσα αύλακα του DNA .....                              | 41 |
| 3.3.1 Χημική δομή της αύλακας του DNA.....   | 41 |
| 3.3.2 Η διαδικασία της δέσμευσης μορίων στο DNA .....                                    | 41 |
| 3.3.3 Βιολογική σημασία της δέσμευσης στην κύρια ή δευτερεύουσα<br>αύλακα του DNA .....  | 42 |
| 3.3.4 Μόρια δέσμευσης στη δευτερεύουσα αύλακα του DNA (DNA<br>minor groove binders)..... | 43 |
| 3.4 Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις .....  | 45 |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.5 Βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες και αλληλεπίδρασή τους με βιολογικά μακρομόρια .....       | 46        |
| 3.6 Η σταθερότητα του DNA κατά την αλληλεπίδρασή του με βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες ..... | 50        |
| 3.6.1 Πρόσδεση ενός DES στο μόριο του DNA .....   | 51        |
| <b>Πειραματικό Μέρος .....</b>  | <b>52</b> |
| <b>4 Πειραματική διαδικασία .....</b>   | <b>53</b> |
| 4.1 Σκοπός .....  | 53        |
| 4.2 Όργανα - Συσκευές .....   | 54        |
| 4.3 Μέθοδοι - Χαρακτηρισμοί .....   | 55        |
| 4.3.1 Φασματοσκοπία NMR .....   | 55        |
| 4.3.2 Φασματοσκοπία FT-IR .....   | 55        |
| 4.3.3 Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA) .....   | 55        |
| 4.4 Σύνθεση NaDES .....   | 57        |
| 4.4.1 Πειραματική διαδικασία .....  | 58        |
| 4.4.2 Χαρακτηρισμός των DES .....   | 61        |
| 4.5 Αλληλεπίδραση με το DNA .....   | 68        |
| 4.5.1 Υπολογιστική Μελέτη (Molecular Docking) .....                                       | 68        |
| 4.5.2 Τιτλοδότηση ορατού - υπεριώδους (UV - Vis) .....                                    | 68        |
| <b>5 Αποτελέσματα - Συζήτηση .....</b>  | <b>72</b> |
| 5.1 Σύνθεση NaDES .....   | 72        |
| 5.2 Χαρακτηρισμός ενώσεων .....   | 73        |
| 5.2.1 Φασματοσκοπία H-NMR .....   | 73        |
| 5.2.2 Φασματοσκοπία FT-IR .....   | 78        |
| 5.3 Μελέτη αλληλεπίδρασης με το DNA .....   | 80        |
| 5.3.1 Υπολογιστική μελέτη αλληλεπίδρασης (Molecular Docking) .....                        | 80        |
| 5.3.2 Τιτλοδότηση ορατού - υπεριώδους (UV-Vis) .....                                      | 83        |
| <b>6 Συμπεράσματα .....</b>   | <b>90</b> |
| 6.1 Σύνθεση NaDES .....   | 90        |
| 6.2 Βιολογική Δράση .....   | 91        |
| <b>7 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα .....</b>  | <b>92</b> |
| <b>8 Παραρτήματα .....</b>  | <b>94</b> |
| 8.1 Κατάλογος ενώσεων .....   | 94        |
| 8.2 Φάσματα H NMR .....   | 97        |

|                                   |            |
|-----------------------------------|------------|
| <b>8.3 Φάσματα FT-IR.....</b>     | <b>100</b> |
| <b>8.4 Φάσματα UV - Vis .....</b> | <b>103</b> |
| <b>Βιβλιογραφία.....</b>          | <b>112</b> |

## Κατάλογος Εικόνων

|  |    |
|--|----|
| Εικόνα 1: Οι 12 αρχές της Πράσινης Χημείας. <sup>2</sup> .....   | 15 |
| Εικόνα 2: Πράσινοι Διαλύτες. <sup>27</sup> .....   | 20 |
| Εικόνα 3: Η διαδικασία της ηλεκτροαπόθεσης. <sup>7</sup> .....   | 25 |
| Εικόνα 4: Διάγραμμα χρονικής εξέλιξης των DES.....   | 28 |
| Εικόνα 5: Προετοιμασία ενός TheDES. <sup>13</sup> .....  | 32 |
| Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των βασικότερων τρόπων αλληλεπίδρασης ενός μορίου με το DNA.....  | 35 |
| Εικόνα 7: Χημική δομή του DNA.....   | 36 |
| Εικόνα 8: Δέσμευση στη δευτερεύουσα αύλακα του DNA.....  | 42 |
| Εικόνα 9: Σύνδεση DNA - Χιτοζάνης μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. <sup>34</sup> .....  | 45 |
| Εικόνα 10: Παράδειγμα εκχύλισης μιας πρωτεΐνης σε ένα σύστημα ABS με βάση ένα DES. <sup>28</sup> .....   | 47 |
| Εικόνα 11: Αναδίπλωση του DNA μέσα στο DES χλωριούχου χολίνης – ουρίας. <sup>28</sup> .....  | 48 |
| Εικόνα 12: Ανάμιξη του DNA με ILs και DESs. <sup>29</sup> .....  | 50 |
| Εικόνα 13: Αλληλεπίδραση της χλωριούχου χολίνης με τη δευτερεύουσα αύλακα του DNA. <sup>31</sup> .....   | 51 |
| Εικόνα 14: Πρόσδεση ενός DES στη μικρή αύλακα του DNA. <sup>33</sup> .....   | 51 |
| Εικόνα 15: Απεικόνιση του συνδυασμού ενός δότη και ενός δέκτη πρωτονίου με σκοπό τη σύνθεση ενός ευτηκτικού μίγματος.....  | 58 |
| Εικόνα 16: Σύνθεση ενός NaDES με τη μέθοδο I.....  | 59 |
| Εικόνα 17: Σύνθεση ενός NaDES με τη μέθοδο II.....   | 60 |
| Εικόνα 18: Σύνθεση ενός NaDES με τη μέθοδο III.....  | 60 |
| Εικόνα 19: Φασματοφωτόμετρο UV-VIS.....  | 68 |
| Εικόνα 20: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.....   | 71 |
| Εικόνα 21: NaDES μετά από την ξήρανση.....   | 72 |
| Εικόνα 22: Φάσμα πρωτονίου <sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO) του NaDES 6.....   | 73 |
| Εικόνα 23: Φάσμα πρωτονίου <sup>1</sup> H NMR (600MHz, DMSO) του NaDES 9.....  | 75 |
| Εικόνα 24: Φάσμα πρωτονίου <sup>1</sup> H NMR (600MHz, DMSO) του NaDES 18.....   | 76 |
| Εικόνα 25: Φάσμα πρωτονίου <sup>1</sup> H NMR (600MHz, DMSO) του NaDES 18 στα υψηλά πεδία.....   | 77 |
| Εικόνα 26: Φάσμα FT-IR του NaDES 18.....   | 78 |
| Εικόνα 27: Υπολογιστική μελέτη αλληλεπίδρασης τρυγικού οξέος – DNA.....  | 81 |
| Εικόνα 28: Υπολογιστική μελέτη αλληλεπίδρασης γλυκερόλης - DNA.....  | 82 |
| Εικόνα 29: Φάσμα UV διαλύματος των ενώσεων a,b,g και k συγκέντρωσης 100 μM παρουσία ctDNA σε διάφορες συγκεντρώσεις (0-400 μM). Τα βέλη υποδηλώνουν τις μεταβολές που παρατηρούνται κατά την προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων DNA..... | 86 |
| Εικόνα 30: Φάσμα UV διαλύματος του NaDES 6 συγκέντρωσης 100μM παρουσία ctDNA σε διάφορες συγκεντρώσεις (0-400μM). Τα βέλη υποδηλώνουν την αύξηση της απορρόφησης με ταυτόχρονη μετατόπιση του λmax προς μεγαλύτερα μήκη κύματος..... | 88 |

|   |     |
|---|-----|
| Εικόνα 31: Φάσμα UV διαλύματος του φυσικού μίγματος 6mix συγκέντρωσης 100μM παρουσία ctDNA σε διάφορες συγκεντρώσεις (0-400μM). .....   | 88  |
| Εικόνα 32: Φάσμα UV διαλύματος των NaDES 1 και NaDES 13 συγκέντρωσης 100 μM παρουσία ctDNA σε διάφορες συγκεντρώσεις (0-400 μM). Τα βέλη υποδηλώνουν τις μεταβολές που παρατηρούνται κατά την προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων DNA..... | 89  |
| Εικόνα 33: Αλληλεπίδραση χλωριούχου χολίνης - DNA.....  | 91  |
| Εικόνα 34: Φάσμα πρωτονίου <sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO) του NaDES 1 .....   | 97  |
| Εικόνα 35: Φάσμα πρωτονίου <sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO) του NaDES 3 .....   | 97  |
| Εικόνα 36: Φάσμα πρωτονίου <sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO) του NaDES 7 .....   | 98  |
| Εικόνα 37: Φάσμα πρωτονίου <sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO) του NaDES 10.....   | 98  |
| Εικόνα 38: Φάσμα πρωτονίου <sup>1</sup> H NMR (600 MHz, DMSO) του NaDES 16.....   | 99  |
| Εικόνα 39: Φάσμα FT-IR του NaDES 6 .....  | 100 |
| Εικόνα 40: Φάσμα FT-IR του NaDES 9 .....  | 101 |
| Εικόνα 41: Φάσμα FT-IR του NaDES 17 .....   | 101 |
| Εικόνα 42: Φάσμα FT-IR του NaDES 18 .....   | 102 |
| Εικόνα 43: Φάσμα UV για το γαλακτικό οξύ.....   | 103 |
| Εικόνα 44: Φάσμα UV για το λεβουλινικό οξύ .....  | 103 |
| Εικόνα 45: Φάσμα UV για τη γλυκερόλη .....  | 103 |
| Εικόνα 46: Φάσμα UV για το κιτρικό οξύ.....   | 104 |
| Εικόνα 47: Φάσμα UV για το κιτρικό οξύ.....   | 104 |
| Εικόνα 48: Φάσμα UV για το φυσικό μίγμα 1mix.....   | 104 |
| Εικόνα 49: Φάσμα UV για το φυσικό μίγμα 2mix.....   | 105 |
| Εικόνα 50: Φάσμα UV για το φυσικό μίγμα 3mix.....   | 105 |
| Εικόνα 51: Φάσμα UV για το φυσικό μίγμα 4mix.....   | 105 |
| Εικόνα 52: Φάσμα UV για το φυσικό μίγμα 9mix.....   | 106 |
| Εικόνα 53: Φάσμα UV για το φυσικό μίγμα 10mix .....   | 106 |
| Εικόνα 54: Φάσμα UV για το φυσικό μίγμα 11mix .....   | 106 |
| Εικόνα 55: Φάσμα UV για το φυσικό μίγμα 17mix .....   | 107 |
| Εικόνα 56: Φάσμα UV για το φυσικό μίγμα 18mix .....   | 107 |
| Εικόνα 57: Φάσμα UV για το φυσικό μίγμα 20mix .....   | 107 |
| Εικόνα 58: Φάσμα UV για το NaDES 3.....   | 108 |
| Εικόνα 59: Φάσμα UV για το NaDES 4.....   | 108 |
| Εικόνα 60: Φάσμα UV για το NaDES 9.....   | 108 |
| Εικόνα 61: Φάσμα UV για το NaDES 10.....  | 109 |
| Εικόνα 62: Φάσμα UV για το NaDES 11.....  | 109 |
| Εικόνα 63: Φάσμα UV για το NaDES 16.....  | 109 |
| Εικόνα 64: Φάσμα UV για το NaDES 17.....  | 110 |
| Εικόνα 65: Φάσμα UV για το NaDES 18.....  | 110 |
| Εικόνα 66: Φάσμα UV για το NaDES 19.....  | 110 |
| Εικόνα 67: Φάσμα UV για το NaDES 20.....  | 111 |

## Κατάλογος Σχημάτων

|  |    |
|--|----|
| Σχήμα 1: Ενδεικτικές δομές Ιοντικών Υγρών. <sup>6</sup> .....                                    | 21 |
| Σχήμα 2: Δομή ενός DES με συστατικά τη χλωριούχο χολίνη και το μηλονικό οξύ.<br>.....            | 22 |
| Σχήμα 3: Αντίδραση σύνθεσης οργανικών ενώσεων με καταλύτη DES. <sup>8</sup> .....                | 24 |
| Σχήμα 4: Δομή ενός NaDES με συστατικά τη χλωριούχο χολίνη και το γαλακτικό οξύ.....              | 30 |
| Σχήμα 5: Χημική δομή DNA intercalators.....  | 37 |
| Σχήμα 6: Φυσική και πρωτονωμένη μορφή της ελλειπτικής. <sup>30</sup> .....                       | 39 |
| Σχήμα 7: Χημική δομή Ακτινομυκίνης D. <sup>30</sup> .....  | 39 |
| Σχήμα 8: R=NO <sub>2</sub> Μιτοναφίδιο, R=NH <sub>2</sub> Αμοναφίδιο. <sup>30</sup> .....        | 40 |
| Σχήμα 9: Χημική δομή DAPI.....   | 42 |
| Σχήμα 10: Παραδείγματα διαρυλαμιδίων. <sup>32</sup> .....  | 43 |
| Σχήμα 11: ET – 743. <sup>32</sup> .....  | 43 |
| Σχήμα 12: Δισταμυκίνη A. <sup>32</sup> .....   | 44 |
| Σχήμα 13: Σχηματική απεικόνιση του DES χλωριούχου χολίνης – ουρίας.....                          | 48 |
| Σχήμα 14: Δομή τρυγικού οξέος.....   | 81 |
| Σχήμα 15: Δομή γλυκερόλης.....   | 82 |
| Σχήμα 16: Χημική δομή των συστατικών a ,b, g, k.....   | 87 |
| Σχήμα 17: Ανάμιξη χλωριούχου χολίνης, καφεϊκού οξέος και νερού (5:1:5) για σύνθεση ενός DES..... | 92 |
| Σχήμα 18: Ανάμιξη χλωριούχου χολίνης, κουμαρικού και νερού (4:1:4) για σύνθεση ενός DES.....     | 92 |



## Κατάλογος Πινάκων

|   |    |
|---|----|
| Πίνακας 1: Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν .....   | 54 |
| Πίνακας 2: NaDES που παράχθηκαν με συστατικό τη χλωριούχο χολίνη .....  | 57 |
| Πίνακας 3: NaDES που παράχθηκαν με συστατικό τη βεταΐνη.....  | 57 |
| Πίνακας 4: NaDES που παράχθηκαν με συστατικό τα αμινοξέα (L-προλίνη και β-αλανίνη).....                             | 58 |
| Πίνακας 5: Αποτελέσματα της υπολογιστικής μελέτης αλληλεπίδρασης (molecular docking).....                           | 80 |
| Πίνακας 6: Δεδομένα ανάλυσης των υπό μελέτη φυσικών συστατικών από τη μέθοδο τιτλοδότησης ορατού - υπεριώδους ..... | 83 |
| Πίνακας 7: Δεδομένα ανάλυσης των υπό μελέτη NaDES από τη μέθοδο τιτλοδότησης ορατού - υπεριώδους .....              | 84 |
| Πίνακας 8: Δεδομένα ανάλυσης των υπό μελέτη φυσικών μιγμάτων από τη μέθοδο τιτλοδότησης υπεριώδους - ορατού .....   | 85 |
| Πίνακας 9: Τα NaDES που συντέθηκαν και οι αντίστοιχοι κωδικοί τους .....  | 94 |

## Περίληψη

Οι Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (DES), αποτελούν μίγματα δύο ή περισσότερων συστατικών και χαρακτηρίζονται ως πράσινοι διαλύτες κυρίως λόγω της χαμηλής τοξικότητάς τους. Η κυριότερη κατηγορία των συγκεκριμένων διαλυτών ονομάζονται Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (NaDES), οι οποίοι αποτελούνται αποκλειστικά από φυσικά προϊόντα. Οι Θεραπευτικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες είναι βιοδραστικά ευτηκτικά μίγματα που μπορεί να περιέχουν ένα τουλάχιστον δραστικό φαρμακευτικό συστατικό (API).

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός μιας σειράς NaDES. Πιο συγκεκριμένα, συντέθηκαν οχτώ NaDES με βάση τη χλωριούχο χολίνη, οχτώ με βάση τη βεταΐνη, και τέσσερα με βάση αμινοξέα (L-προλίνη και β-αλανίνη).

Σε δεύτερο στάδιο, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των παραπάνω ενώσεων, τόσο σε θεωρητικό επίπεδο μέσω υπολογιστικής μελέτης (molecular docking), όσο και σε πειραματικό με αξιολόγηση της ικανότητάς τους να αλληλεπιδρούν με το DNA θύμου αδένος βοδιού (calf thymus DNA, ctDNA), μέσω τιτλοδότησης ορατού – υπεριώδους (UV-Vis Titration). Η τιτλοδότηση υπεριώδους – ορατού πραγματοποιήθηκε εκτός από τα NaDES, τόσο για τα φυσικά μίγματά τους όσο και για κάθε ένα φυσικό συστατικό ξεχωριστά, προκειμένου να γίνει σύγκριση ως προς τη βιολογική τους δράση.

Από τα αποτελέσματα και των δύο μεθόδων, εξάγεται το συμπέρασμα ότι ως συστατικά, το τρυγικό οξύ και η γλυκερόλη εμφανίζουν τη μεγαλύτερη δράση με το DNA, ενώ το NaDES 6 που αποτελείται από τη χλωριούχο χολίνη και το γαλακτικό οξύ παρουσιάζει τη μεγαλύτερη σταθερά αλληλεπίδρασης  $K_b$ , κάτι το οποίο επιβεβαιώνει τη δράση του ως ένας θεραπευτικός διαλύτης (TheDES).

**Λέξεις κλειδιά:** Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες, Θεραπευτικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες, χλωριούχος χολίνη, συμβατική μέθοδος ανάδευσης-θέρμανσης, αλληλεπίδραση με το ctDNA, DNA παρεμβολή.

## Abstract

Deep Eutectic Solvents (DES) are mixtures of two or more components and are characterized as green solvents mainly due to their low toxicity. Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES) comprise exclusively from natural compounds and have emerged as even greener alternatives than DESs. Therapeutic Deep Eutectic Solvents (TheDES) are a new category of DESs in which one at least component is an active pharmaceutical ingredient (API) or which possess interesting bioactivity

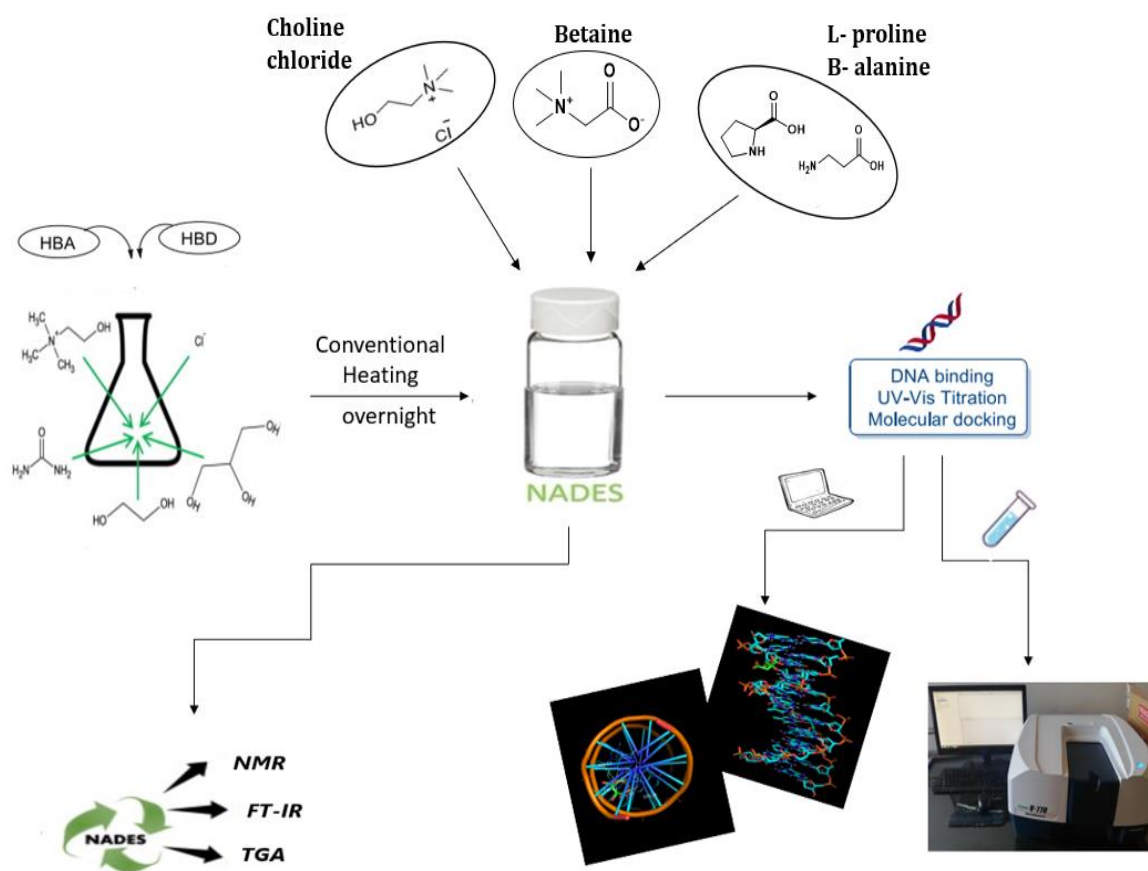
In the present diploma thesis, a series of NaDES were successfully synthesized and characterized, using different hydrogen bond acceptors namely choline chloride, betaine and the amino acids L-proline and b-alanine.

The evaluation of the biological activity of the above molecules was evaluated by studying their interaction with calf thymus DNA (ctDNA) using UV-Vis Titration methodology. In addition, molecular modeling studies were implemented in order to examine the mode of interaction between the NADESs and ctDNA.

The results showed that tartaric acid and glycerol show the strongest binding with DNA, while NaDES 6, which consists of choline chloride and lactic acid, is the one which binds more strongly to ctDNA thus has a potential as a therapeutic solvent (TheDES).

**Key words:** Natural Deep Eutectic Solvents, Therapeutic Deep Eutectic Solvents, choline chloride, conventional method of stirring-heating, ctDNA binding, DNA intercalation.

# Graphical Abstract



# Θεωρητικό Μέρος

## 1. Πράσινη Χημεία

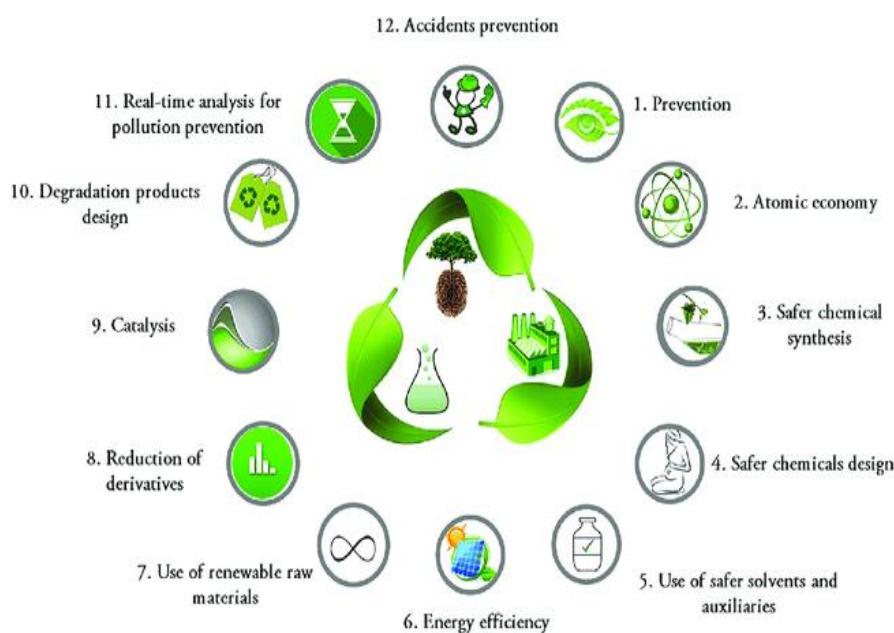
Ο κλάδος της Χημείας διαδραματίζει πρωταρχικό ρόλο στην κοινωνία, καθώς προσφέρει ένα μεγάλο εύρος αγαθών στην καθημερινή ζωή των ανθρώπων. Το πιο σημαντικό, αναμφισβήτητα, είναι η βελτίωση του βιοτικού επιπέδου που παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια του 20<sup>ου</sup> αιώνα, λόγω της εξέλιξης της χημικής τεχνολογίας. Ωστόσο, υπάρχουν και ορισμένα αρνητικά στοιχεία τα οποία προέρχονται από κάποιες χημικές αντιδράσεις και επηρεάζουν σημαντικά τόσο την υγεία των ανθρώπων όσο και το περιβάλλον.<sup>1</sup>

Για αυτόν τον λόγο τα τελευταία χρόνια πραγματοποιούνται προσπάθειες ενσωμάτωσης ενός νέου κλάδου στην καθημερινή ζωή, ο οποίος ονομάζεται “Πράσινη Χημεία” ή αλλιώς “Βιώσιμη Αειφορική Χημεία”. Η Πράσινη Χημεία, έχει ως πρωταρχικό στόχο τον περιορισμό ή ακόμα και την εξάλειψη όλων των επικίνδυνων ουσιών οι οποίες δημιουργούνται μέσω χημικών αντιδράσεων. Αυτό το χαρακτηριστικό τη διαφοροποιεί και από την Κλασική Χημεία, η οποία εστιάζει κυρίως στις συνθήκες σχηματισμού των τελικών προϊόντων και όχι στους πιθανούς εγγενείς κινδύνους των χημικών ουσιών που προκαλούν προβλήματα μεγάλης έκτασης. Η συγκεκριμένη προσέγγιση περιλαμβάνει εναλλακτικές πρώτες ύλες, εναλλακτικούς διαλύτες, καθώς και εναλλακτικούς καταλύτες, ο συνδυασμός των οποίων συμβάλλει καθοριστικά στην αναγκαιότητα της Πράσινης Χημείας για τους ανθρώπους, το περιβάλλον και τη βιομηχανία.

## 1.1 Αρχές Πράσινης Χημείας

Η Πράσινη Χημεία αποτελείται από Δώδεκα Θεμελιώδεις Αρχές, οι οποίες καθορίζουν τους τρόπους περιορισμού επιβλαβών ουσιών στις διεργασίες σχεδιασμού, παραγωγής και εφαρμογής νέων προϊόντων. Αποτελούν κριτήρια σχεδιασμού ή κατευθυντήριες γραμμές, οι οποίες παρέχουν το πλαίσιο για ενίσχυση του πράσινου χαρακτήρα χημικών διεργασιών.<sup>1,2</sup>

Οι δώδεκα αρχές της Πράσινης Χημείας παρουσιάζονται συνοπτικά στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 1):



Εικόνα 1: Οι 12 αρχές της Πράσινης Χημείας.<sup>2</sup>

### 1. Πρόληψη

Η πρόληψη των αποβλήτων αποτελεί την πρώτη αρχή της Πράσινης Χημείας, και βασίζεται στο ότι είναι προτιμότερο να προλαμβάνεται η δημιουργία αποβλήτων παρά να επιδιώκεται η μετέπειτα επεξεργασία τους. Συγκεκριμένα οποιοδήποτε υλικό με μηδαμινή ενεργειακή αξία χαρακτηρίζεται ως "απόβλητο" και συνήθως είναι ανεπιθύμητο. Ο παράγοντας E, αποτελεί ένδειξη της ποσότητας παραγωγής αποβλήτων και της μη αποτελεσματικότητάς τους σε μια περιβαλλοντική διαδικασία.

### 2. Οικονομία ατόμων

Βασίζεται στο ότι οι συνθετικές μέθοδοι θα πρέπει να σχεδιάζονται με τρόπο όπου θα μεγιστοποιείται η ενσωμάτωση στο τελικό προϊόν όλων των χρησιμοποιούμενων υλικών στη διεργασία.

Η **Οικονομία Ατόμων (Atom Economy - AE)** ως πράσινος δείκτης ποσοτικοποίησης ορίζεται ως εξής:

$$\% AE = \frac{\text{Μάζα ατόμων στο επιθυμητό προϊόν}}{\text{Μάζα ατόμων σε όλα τα αντιδρώντα}} \times 100$$

Παρακάτω παρατίθενται οι υπόλοιποι Πράσινοι Δείκτες Ποσοτικοποίησης, η χρήση των οποίων καθιστά εφικτή την εξαγωγή μιας ολοκληρωμένης και αντιπροσωπευτικής εικόνας σχετικά με την τεχνική και περιβαλλοντική συμπεριφορά κάθε χημικής διεργασίας.<sup>3</sup>

**Πειραματική Οικονομία Ατόμων (Experimental Atom Economy - EAE):**

$$\% EAE = \frac{\text{Μάζα αντιδρώντων που ενσωματώνονται στο κύριο προϊόν}}{\text{Συνολική πειραματική μάζα αντιδρώντων}} \times 100$$

**Απόδοση Αντίδρασης (Yield - α):**

$$\% a = \frac{\text{Πραγματική ποσότητα προϊόντος}}{\text{Θεωρητική ποσότητα προϊόντος}} \times 100$$

**Χρήση Ατόμου (Atom Utilization):**

$$\% \text{ Χρήση Ατόμου} = \frac{\text{Μάζα ατόμων στο επιθυμητό προϊόν}}{\text{Μάζα ατόμων σε όλα τα αντιδρώντα}} \times 100$$

**Εκλεκτικότητα Χημικής Αντίδρασης (Selectivity - s):**

$$\% s = \frac{\text{Μάζα επιθυμητού προϊόντος}}{\text{Μάζα υποστρώματος που τροποποιήθηκε}} \times 100$$

**Παράγοντας E (Factor E):**

$$E = \frac{\text{Μάζα αποβλήτων και ανεπιθύμητων παραπροϊόντων}}{\text{Μάζα επιθυμητών προϊόντων}}$$



### **Αποδοτικότητα Άνθρακα (Carbon Efficiency):**

$$\begin{aligned} \% \text{ Αποδοτικότητα Άνθρακα} \\ = \frac{\text{Μάζα άνθρακα στο προϊόν}}{\text{Συνολική μάζα άνθρακα στα αντιδρώντα}} \times 100 \end{aligned}$$

### **Αποδοτικότητα Μάζας Αντίδρασης (AMA):**

$$\% \text{ AMA} = \frac{\text{Πραγματική μάζα προϊόντος}}{\text{Συνολική πειραματική μάζα αντιδρώντων}} \times 100$$

### **3. Λιγότερο επικίνδυνες χημικές συνθέσεις**

Οι συνθετικές μεθοδολογίες, όπου είναι εφικτό, πρέπει να χρησιμοποιούν ή να παράγουν χημικές ουσίες με όσο το δυνατόν μικρότερη τοξικότητα τόσο για τον άνθρωπο όσο και για το περιβάλλον. Η ελαχιστοποίηση ή εξάλειψη του κινδύνου αποτελεί βασική προϋπόθεση κατά τον σχεδιασμό. Με την πάροδο του χρόνου και την εξέλιξη της τεχνολογίας, ένα μεγάλο ποσοστό των χημικών αντιδράσεων έχουν ενισχύσει τον πράσινο χαρακτήρα τους. Παραδείγματα πράσινων αντιδράσεων αποτελούν οι αντιδράσεις κυκλοπροσθήκης, αναδιάταξης ή πολλαπλών συστατικών.

### **4. Σχεδιασμός ασφαλέστερων χημικών υλικών**

Τα χημικά υλικά κρίνεται αναγκαίο να σχεδιάζονται με κατάλληλο τρόπο, ώστε να διατηρείται η λειτουργικότητά τους και να ελαττώνεται η τοξικότητά τους. Η πλήρης γνώση των ιδιοτήτων ενός μορίου διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στην προώθηση σχεδιασμού πιο ασφαλών μορίων για τον άνθρωπο και το περιβάλλον.

### **5. Ασφαλέστεροι διαλύτες και βοηθητικά μέσα**

Η χρήση βοηθητικών μέσων θα πρέπει να αποφεύγεται ή να πραγματοποιείται με ασφαλή τρόπο, έτσι ώστε να επιδρούν θετικά στην παρασκευή και επεξεργασία χημικών ουσιών.

Επιπρόσθετα, οι διαλύτες κατέχουν ιδιαίτερα ενεργό ρόλο στη βιομηχανία και η χρήση τους είναι πολύ διαδεδομένη. Πολλοί από τους κλασσικούς διαλύτες όμως εμφανίζουν αυξημένη επικινδυνότητα, καθώς η συντριπτική τους πλειοψηφία χαρακτηρίζονται ως τοξικοί, εύφλεκτοι, ακόμα και καρκινογόνοι για τον άνθρωπο. Με την εμφάνιση της Πράσινης Χημείας, οι προαναφερόμενοι διαλύτες συχνά υποκαθίστανται από άλλους περιβαλλοντικά ασφαλέστερους διαλύτες.

Οι κυριότεροι από αυτούς είναι οι διαλύτες από βιομάζα, ιονικοί διαλύτες και υπερκρίσιμοι διαλύτες.

## **6. Σχεδιασμός για ενεργειακή αποτελεσματικότητα**

Οι περιβαλλοντικές και οικονομικές επιπτώσεις των ενεργειακών αναγκών ώθησαν τόσο την ανάπτυξη πιο αποδοτικών διεργασιών, όσο και την ανακάλυψη ανανεώσιμων πηγών ενέργειας. Οι τελευταίες προέρχονται από φυσικές διαδικασίες, όπως είναι ο άνεμος, η γεωθερμία και η κυκλοφορία του νερού. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ο σχεδιασμός χημικών αντιδράσεων ή συστημάτων όπου δεν απαιτούνται μεγάλα ποσά ενέργειας, κάτι το οποίο επιδρά θετικά στον οικονομικό και περιβαλλοντικό τομέα.

## **7. Χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών**

Σύμφωνα με έρευνες, το μεγαλύτερο ποσοστό των χημικών προϊόντων έχουν ως πρώτη ύλη το πετρέλαιο ή το φυσικό αέριο. Η ανεξέλεγκτη χρήση των συγκεκριμένων καυσίμων πρέπει να περιοριστεί, και να αντικατασταθεί από ανανεώσιμες πρώτες ύλες, όπου βέβαια αυτό είναι τεχνικά και οικονομικά εφικτό. Η βιομάζα αποτελεί την πιο ευρέως διαδεδομένη εναλλακτική πρώτη ύλη, η οποία προέρχεται από ζωντανούς οργανισμούς. Άλλες ανανεώσιμες πηγές είναι η κυτταρίνη, η λιγνίνη, το γαλακτικό οξύ, το άμυλο, η γλυκερόλη κ.α.

## **8. Μείωση ενδιάμεσων παραγώγων (προϊόντων)**

Ιδιαίτερα σημαντικό κομμάτι της Πράσινης Χημείας αποτελεί η αποφυγή της άσκοπης παραγωγοποίησης, έτσι ώστε να εξαλειφθεί η συχνή δημιουργία απορριμμάτων.

## **9. Κατάλυση**

Η κατάλυση αποτελεί μια από τις πιο υψηλής σημασίας διεργασίες για την ενίσχυση του πράσινου χαρακτήρα διεργασιών. Παρέχει αρκετά πλεονεκτήματα, όπως η αύξηση της αποδοτικότητας μιας αντίδρασης, περιορίζοντας τις ενεργειακές απαιτήσεις και αποφεύγοντας τη χρήση στοιχειομετρικών ποσοτήτων αντιδραστηρίων.

Η βιοκατάλυση συνδέεται άρρηκτα με την Πράσινη Χημεία και βασίζεται σε ένζυμα που παράγονται από ζωντανούς οργανισμούς. Η καταλυτική τους δράση οφείλεται κυρίως στη χημική τους δομή, παρόλα αυτά ένα αρνητικό στοιχείο είναι η μικρή χρονική διάρκεια ζωής τους.

## **10. Σχεδιασμός αποικοδομήσιμων προϊόντων**

Τα χημικά προϊόντα πρέπει να σχεδιάζονται με τρόπο ώστε στο τέλος της χρήσης τους να αποικοδομούνται προς αβλαβή προϊόντα. Ο σχεδιασμός βιοαποικοδομήσιμων χημικών ουσιών δεν αποτελεί μια

απλή διεργασία, όπως επιβεβαιώνεται από προβλήματα που δημιουργούνται από τη ρύπανση του περιβάλλοντος. Συνήθως αποφεύγονται συγκεκριμένες χημικές δομές όπως διακλαδισμένες αλυσίδες ή αλογονωμένα τμήματα, σε αντίθεση με λειτουργικές ομάδες εστέρων και αμιδίων, οι οποίες συμβάλλουν στον επιτυχή σχεδιασμό βιοαποικοδομήσιμων προϊόντων.

### **11. Ανάλυση σε πραγματικό χρόνο**

Οι αναλυτικές μεθοδολογίες χρειάζονται περαιτέρω ανάπτυξη προς την κατεύθυνση της παρακολούθησης μιας διεργασίας σε πραγματικό χρόνο και του έγκαιρου ελέγχου πριν από τον σχηματισμό επικίνδυνων ουσιών. Η αναλυτική χημεία προωθεί την επίτευξη διεργασιών που παράγουν μικρό αριθμό αποβλήτων, στοχεύοντας έτσι σε ένα ασφαλές περιβάλλον για την υγεία των ανθρώπων.

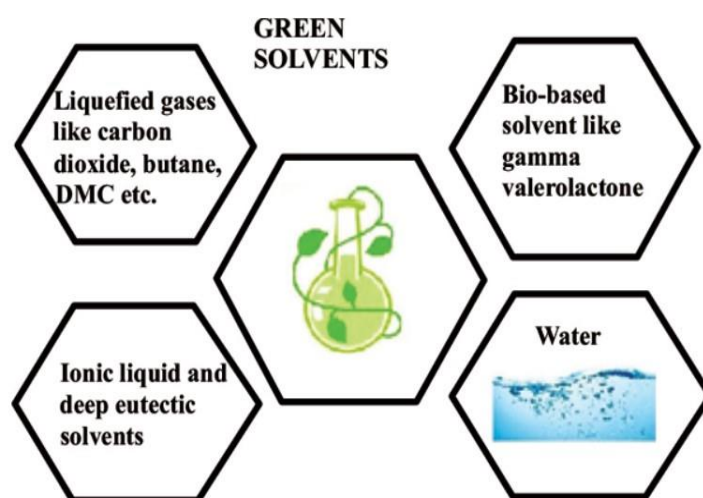
Συγκεκριμένα, περιλαμβάνει την προεπεξεργασία του δείγματος που αφορά σε εκχύλιση, διαχωρισμό ή χημική τροποποίηση. Το στάδιο της προεπεξεργασίας απαιτεί συνήθως μεγάλους όγκους διαλύτη, κάτι το οποίο έχει απασχολήσει αρκετά τους χημικούς.

### **12. Ασφαλέστερη χημεία για την πρόληψη ατυχημάτων**

Οι ουσίες που συμμετέχουν σε κάποια χημική διεργασία, πρέπει να επιλέγονται με τρόπο ώστε να περιορίζεται στο ελάχιστο η πιθανότητα χημικών ατυχημάτων. Αφετηρία για την πρόληψη των ατυχημάτων, αποτελεί ο εντοπισμός και η αξιολόγηση του κινδύνου. Ορισμένα σοβαρά ατυχήματα, προκλήθηκαν από συγκεκριμένες χημικές ουσίες, οι οποίες κρίνεται αναγκαίο να εξαλειφθούν και να αντικατασταθούν από ασφαλέστερες εναλλακτικές λύσεις.

## 1.2 Πράσινοι Διαλύτες

Οι συμβατικοί διαλύτες είναι υγρές ουσίες, οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη βιομηχανία με πρωταρχικό στόχο την επίτευξη ποικίλων χημικών διεργασιών. Στην πλειοψηφία τους είναι τοξικοί, εύφλεκτοι και καρκινογόνοι, δημιουργώντας έναν αέναο κίνδυνο για τις ανθρώπινες ζωές καθώς και για το περιβάλλον. Ένας από τους κυριότερους στόχους της Πράσινης Χημείας, είναι η αντικατάσταση των συμβατικών διαλυτών, με άλλους περισσότερο φιλικούς προς το περιβάλλον, ελαχιστοποιώντας με αυτόν τον τρόπο τις δυσμενείς συνέπειες για ολόκληρο το οικοσύστημα. Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκε ιδιαίτερα η χρήση πράσινων διαλυτών όπως είναι το νερό, τα ιοντικά υγρά, οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες, καθώς και ένα μεγάλο εύρος βιολογικών διαλυτών, οι οποίοι παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 2).<sup>1,4,5</sup>



Εικόνα 2: Πράσινοι Διαλύτες.<sup>27</sup>

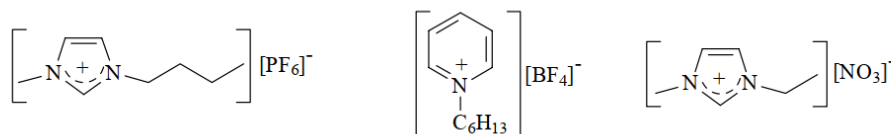
Οι πράσινοι διαλύτες που θα μελετηθούν στις παρακάτω υποενότητες είναι τα Ιοντικά Υγρά και οι Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες, οι οποίοι εμφανίζουν αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά και σχετίζονται άμεσα με το αντικείμενο της συγκεκριμένης εργασίας.

### 1.2.1 Ιοντικά Υγρά (ILs)

Η επιστήμη της Χημείας τα τελευταία χρόνια έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στην κατηγορία των ιοντικών υγρών (Ionic Liquids: ILs) μελετώντας τη φύση και τα χημικά χαρακτηριστικά τους. Οι συγκεκριμένοι διαλύτες εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα σημαντικών ιδιοτήτων, καθώς τόσο η θερμοδυναμική όσο και η κινητική των αντιδράσεών τους διαφέρουν αρκετά από αυτές των

συμβατικών διαλυτών. Τα ιοντικά υγρά είναι οργανικά άλατα, τα οποία βρίσκονται σε υγρή κατάσταση σε συνθήκες περιβάλλοντος και αποτελούνται συνήθως από ένα οργανικό κατιόν και ένα οργανικό ή ανόργανο ανιόν, με σημείο τήξης κάτω των 100°C.<sup>5,6,7</sup>

Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 1) παρουσιάζεται η δομή ιοντικών υγρών:



*Σχήμα 1: Ενδεικτικές δομές Ιοντικών Υγρών.<sup>6</sup>*

Επιπλέον έχουν την ικανότητα να διαλύουν μεγάλο αριθμό πολικών αλλά και μη πολικών ενώσεων, καθώς χαρακτηρίζονται ως εξαιρετικοί καταλύτες. Οι χημικές και φυσικές τους ιδιότητες, όπως είναι το σημείο τήξεως, το ιξώδες, η πυκνότητα, η διαλυτότητα και η ηλεκτρική αγωγιμότητα, ποικίλουν ανάλογα με τους διαφορετικούς συνδυασμούς των ιόντων που πραγματοποιούνται προκειμένου να επιτευχθεί η σύνθεση ενός ιοντικού υγρού. Ο απεριόριστος συνδυασμός κατιόντων και ανιόντων είναι ο κύριος λόγος που τα ιοντικά υγρά έχουν αρκετές χρήσεις τα τελευταία χρόνια. Για παράδειγμα, αποτελούν αντικαταστάτες των πτητικών οργανικών διαλυτών σε πολλές χημικές διεργασίες, όπως για παράδειγμα στον διαχωρισμό, τον καθαρισμό και σε αντιδράσεις βιοκατάλυσης.

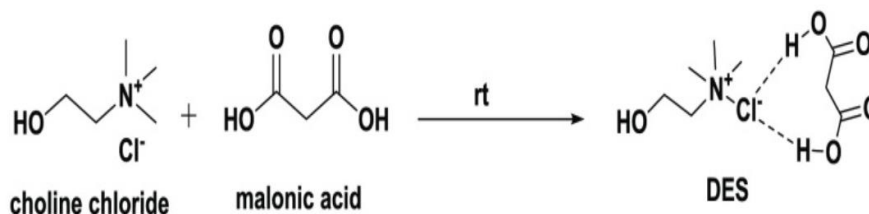
Ωστόσο, η χρήση τους ως διαλύτες σταδιακά περιορίζεται κυρίως λόγω της τοξικότητας και της χαμηλής βιοαποικοδομησιμότητας των περισσότερων ιοντικών υγρών, κάτι το οποίο επιφέρει δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων και στο περιβάλλον. Το συγκεκριμένο μειονέκτημα σε συνδυασμό με το αρκετά υψηλό κόστος που απαιτείται για την ανάπτυξη των ιοντικών υγρών, έχει οδηγήσει στην υιοθέτηση των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών.

## 1.2.2 Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (DES)

Όπως προαναφέρθηκε, προκειμένου να ενισχυθεί ο πράσινος χαρακτήρας των διαλυτών, οι επιστήμονες περιόρισαν σημαντικά τη χρήση ιοντικών υγρών, τα οποία σταδιακά αντικατέστησαν με τους βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες. Ως Βαθέως Ευτηκτικός Διαλύτης (Deep Eutectic Solvent: DES), ορίζεται ένα σύστημα που δημιουργείται από την ανάμειξη δύο ή περισσότερων ουσιών, προς τον σχηματισμό ενός ευτηκτικού μίγματος, το οποίο αποτελείται από έναν δέκτη δεσμού υδρογόνου (HBA), και έναν δότη δεσμού υδρογόνου (HBD). Ο πιο διαδεδομένος δέκτης πρωτονίου για τη σύνθεση ενός DES είναι η χλωριούχος χολίνη, η οποία αναμιγνύεται μέσω ποικίλων μεθόδων με δότες πρωτονίου, όπως καρβοξυλικά οξέα, αμίδια, αλκοόλες, αμινοξέα ή ουρία. Το συγκεκριμένο άλας αμμωνίου χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της χαμηλής τιμής, της βιοαποικοδομησιμότητας, της μη τοξικότητας και λόγω του ότι οι δεσμοί υδρογόνου που δημιουργούνται δίνουν μεγάλη ώθηση στην επιτυχή σύνθεση του ευτηκτικού μίγματος.<sup>8,9</sup>

Χάρη λοιπόν στο οικολογικό αποτύπωμα και στην ελκυστική τιμή τους, οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες αποτελούν πλέον τους κατεξοχήν πράσινους διαλύτες, τόσο σε βιομηχανικό επίπεδο όσο και ακαδημαϊκό.

Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 2) απεικονίζεται η σύνθεση ενός DES με συστατικά τη χλωριούχο χολίνη και το μηλονικό οξύ:



Σχήμα 2: Δομή ενός DES με συστατικά τη χλωριούχο χολίνη και το μηλονικό οξύ.

### 1.2.2.1 Ιδιότητες

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες έχουν ένα μεγάλο εύρος φυσικοχημικών ιδιοτήτων, οι οποίες είναι παρόμοιες με αυτές των ιοντικών υγρών και ποικίλουν ανάλογα με το είδος του δότη δεσμού υδρογόνου (HBD), τη γραμμομοριακή αναλογία των αρχικών συστατικών καθώς και τη θερμοκρασία. Παρακάτω παρατίθενται κάποιες από τις πιο σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες.<sup>8</sup>

## Σημείο Τήξης

Η σύνθεση των DES είναι εφικτή κατά την ανάμιξη δύο στερεών, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους μέσω δεσμών υδρογόνου, δημιουργώντας ένα νέο ευτηκτικό μίγμα. Το μίγμα αυτό, το οποίο πλέον βρίσκεται σε υγρή φάση, θα έχει ένα σημείο τήξης χαμηλότερο από αυτό των δυο επιμέρους συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν εξ αρχής. Γενικά τα σημεία τήξης πρέπει να είναι κάτω των 150°C, και ειδικότερα τα DES χαρακτηρίζονται με χαμηλά σημεία τήξης, κάτω από 50°C.

## Πυκνότητα

Μια επιπλέον ιδιότητα των DES είναι η πυκνότητα. Η θερμοκρασία και η γραμμομοριακή αναλογία παίζουν καθοριστικό ρόλο στην τελική πυκνότητα του μίγματος. Σύμφωνα με έρευνες βέβαια, είναι δύσκολη η πειραματική μέτρηση της πυκνότητας των DES ως συνάρτηση της θερμοκρασίας. Έτσι με την εξέλιξη της τεχνολογίας, έχει δοθεί έμφαση σε καινοτόμες μεθόδους, ικανές να παρέχουν τα απαραίτητα δεδομένα με απόλυτη ακρίβεια.

## Ιξώδες

Το ιξώδες αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες για όλους τους διαλύτες. Συγκεκριμένα τα DES παρουσιάζουν σχετικά υψηλό ιξώδες, μεγαλύτερο των 100cP σε θερμοκρασία δωματίου, με εξαίρεση το ευτηκτικό μίγμα της χλωριούχου χολίνης – αιθυλενογλυκόλης. Το υψηλό ιξώδες των DES οφείλεται στην παρουσία δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συστατικών του, οι οποίοι περιορίζουν αισθητά την κινητικότητα των ελεύθερων ειδών μέσα στον διαλύτη. Επιπλέον λόγοι που οδηγούν σε αυξημένο ιξώδες πιθανώς είναι το μεγάλο μέγεθος των ιόντων ή η ύπαρξη δυνάμεων, όπως είναι η ηλεκτροστατικές ή οι van der Waals αλληλεπιδράσεις. Το ιξώδες των περισσότερων ευτηκτικών μιγμάτων μεταβάλλεται σημαντικά συναρτήσει της θερμοκρασίας μέσω της εξίσωσης του Arrhenius. Συγκεκριμένα καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, το ιξώδες μειώνεται.

## Πολικότητα

Η πολικότητα των DES σχετίζεται με τη μοριακή δομή του δότη στον δεσμό υδρογόνου, και μπορεί να εκτιμηθεί από την κλίμακα  $E_T(30)$ . Μέσω της μεθόδου UV-Vis υπολογίζεται το  $E_T(30)$  μέσω της παρακάτω σχέσης:

$$E_T(30) \text{ (kcal mol}^{-1}\text{)} = h\nu_{\text{max}}N_A = (2.8591 \cdot 10^{-3}) U_{\text{max}}(\text{cm}^{-1}) = 28591/\lambda_{\text{max}}$$

## Αγωγιμότητα

Τα DES παρουσιάζουν κακές αγωγιμότητες, χαμηλότερες από 2 mS·cm<sup>-1</sup> σε θερμοκρασία δωματίου, λόγω του υψηλού ιξώδους τους. Η αγωγιμότητα μεταβάλλεται αναλογικά με τη θερμοκρασία, και έτσι μπορεί να εκτιμηθεί από την εξίσωση του Arrhenius. Επίσης η αγωγιμότητα επηρεάζεται σημαντικά και από την αναλογία των συστατικών για τη σύνθεση ενός DES.

## Επιφανειακή Τάση

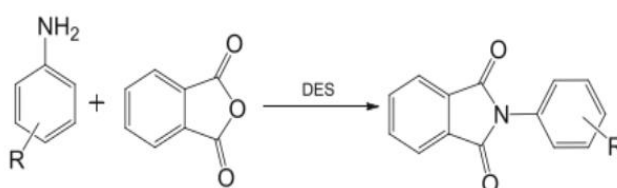
Η επιφανειακή τάση, όπως και το ιξώδες, εξαρτάται από τη μεταβολή της θερμοκρασίας. Συγκεκριμένα με αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρείται ελάττωση της επιφανειακής τάσης των DES.

### 1.2.2.2 Εφαρμογές

Λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων που εμφανίζουν οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες, έχει παρατηρηθεί μεγάλη ενσωμάτωσή τους σε ποικίλους τομείς της Χημείας. Οι βασικότερες εφαρμογές τους σχετίζονται με τη σύνθεση, την ηλεκτροχημεία, τα νανοϋλικά, τη βιοχημεία, τις τεχνικές διαχωρισμού και την αναλυτική χημεία.<sup>8,9</sup>

### Σύνθεση

Οι DES είναι φιλικοί προς το περιβάλλον διαλύτες, παρέχοντας πολλά πλεονεκτήματα στη σύνθεση οργανικών ενώσεων. Στις περισσότερες χημικές αντιδράσεις δεν έχουν μόνο την ιδιότητα του διαλύτη αλλά δρουν και ως καταλύτες, όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 3):



Σχήμα 3: Αντίδραση σύνθεσης οργανικών ενώσεων με καταλύτη DES.<sup>8</sup>

Επίσης οι DES μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση πολυμερών, τόσο ως διαλύτες μονομερών όσο και ως μέσα πολυμερισμού. Έπειτα από έρευνες παρατηρήθηκε μεγάλη απόδοση πολυμερισμού συγκριτικά με άλλους οργανικούς διαλύτες, όπως είναι τα ιοντικά υγρά.

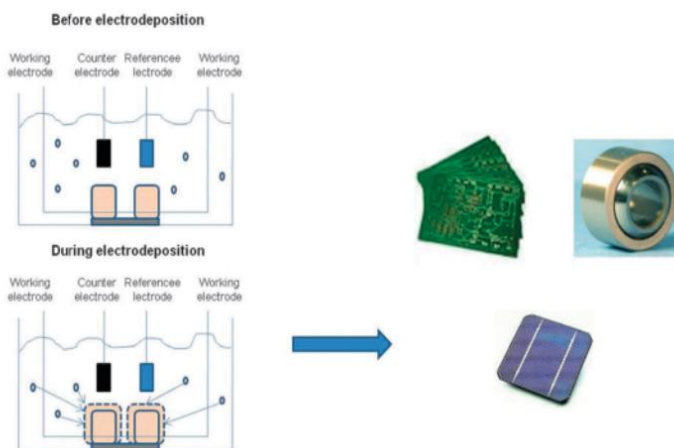
### Ηλεκτροχημεία

Ως ηλεκτροαπόθεση ορίζεται μια διαδικασία που οδηγεί στον σχηματισμό ενός στερεού υλικού μέσω ηλεκτροχημικών αντιδράσεων οι οποίες διεξάγονται στην υγρή κατάσταση. Η εγκατάσταση αποτελείται από ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο τριών ηλεκτροδίων, όπου το μέταλλο που περιέχεται στον ηλεκτρολύτη μετακινείται προς την κάθοδο.

Γενικότερα, οι οργανικοί διαλύτες είναι ιδιαίτερα ελκυστικοί για ηλεκτροαπόθεση. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, τα ιοντικά υγρά συναντώνται συχνά σε ηλεκτροχημικές διεργασίες, καθώς η ηλεκτροαπόθεση μετάλλων και κραμάτων επιτεύχθηκε με επιτυχία σε αντίθεση με προσπάθειες που πραγματοποιήθηκαν σε υδατικούς διαλύτες. Βέβαια λόγω της ευαισθησίας των ILs στο νερό σε συνδυασμό με τον κίνδυνο αποδόμησης τους, πλέον τα DES έχουν λάβει ιδιαίτερο ενδιαφέρον κατά τη χρήση τους ως ηλεκτρολύτες.



Συγκεκριμένα η ανοχή στο νερό, η χαμηλή τιμή και η βιοαποικοδομησιμότητα των DES αποτελούν τα τρία κύρια πλεονεκτήματα που υπερισχύουν έναντι των IIs. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 4), παρουσιάζεται η διαδικασία της ηλεκτροαπόθεσης:



Εικόνα 3: Η διαδικασία της ηλεκτροαπόθεσης. <sup>7</sup>

## Νανοϋλικά

Στον τομέα της νανοτεχνολογίας, τα νανοϋλικά αποτελούν ένα πολλά υποσχόμενο κομμάτι της, λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους όπως είναι οι υψηλές ειδικές επιφάνειες ή η δυνατότητα ετερογενούς κατάλυσης. Τα DES χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην προετοιμασία των συγκεκριμένων υλικών, παίζοντας συνήθως τον ρόλο του σταθεροποιητή.

## Βιοχημεία

Οι DES ως διαλύτες έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον και της βιοχημείας που σχετίζεται με τις δομές, τις λειτουργίες και τις αλληλεπιδράσεις των βιολογικών μορίων, τα οποία έχουν ιδιαίτερη σημασία για την ανθρώπινη ζωή. Εκτός από τα χαρακτηριστικά των συμβατικών διαλυτών, οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες εμφανίζουν και μεγάλη βιοσυμβατότητα. Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές έρευνες που αφορούν ιδιαίτερα το DNA, προκειμένου να διαπιστωθεί η επίδραση των DES σε ζωντανά κύτταρα.

## Τεχνικές Διαχωρισμού

Μια από τις σημαντικότερες εφαρμογές των DES σε τεχνικές διαχωρισμού είναι στη διεργασία καθαρισμού του βιοντίζελ από αλκοόλες, οι οποίες είναι τα κύρια υποπροϊόντα του. Ο βασικός λόγος είναι η ικανότητα των DES να απορροφήσουν αλκοόλες, οι οποίες δρουν ως ένας δότης δεσμού υδρογόνου.

Εκτός από τον καθαρισμό του βιοντίζελ, τα DES χρησιμοποιούνται και για τον διαχωρισμό αρωματικών υδρογονανθράκων από μια ποικιλία μιγμάτων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρήση ενός διαλύτη με βάση το φωσφόριο ( $\text{PH}_4^+$ ) για τον επιτυχή διαχωρισμό του βενζολίου από μίγματα βενζολίου/εξανίου.

## Αναλυτική Χημεία

Η εφαρμογή των DES στην Αναλυτική Χημεία, αν και βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο, παρουσιάζει μια αυξανόμενη τάση τόσο για υγρά όσο και για στερεά δείγματα. Χρησιμοποιούνται κυρίως για εξαγωγή αναλυτών, τροποποίηση νανοσωματιδίων ή προσροφητικών για τη βελτίωση της διαδικασίας της εκχύλισης και εφαρμογή χρωματογραφίας όπου λειτουργεί συνήθως ως πρόσθετο. Ιδιαίτερα στις διεργασίες εκχύλισης υγρού-υγρού (HLLE) με βάση το DES, παρατηρείται ο σχηματισμός ενός ομοιογενούς διαλύματος, καθώς ο διαλύτης έχει την ιδιότητα να αναμιγνύεται πλήρως με το νερό.<sup>10</sup>

Συνεπάγεται από όλα τα παραπάνω ότι οι DES αποτελούν πλέον αναπόσπαστο κομμάτι πολλών κλάδων της Χημείας, συμβάλλοντας στην επίτευξη διεργασιών με χαμηλό κόστος και μειωμένη τοξικότητα έναντι άλλων διαλυτών.

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία επικεντρώνεται στις δυο βασικές κατηγορίες των Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών, τους Φυσικούς Βαθέως Ευτηκτικούς Διαλύτες (NaDES) και τους Θεραπευτικούς Βαθέως Ευτηκτικούς Διαλύτες (TheDES), τα χαρακτηριστικά των οποίων αναλύονται εκτενώς στο επόμενο κεφάλαιο.

## 2. Φυσικοί και Θεραπευτικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (NaDES - TheDES)

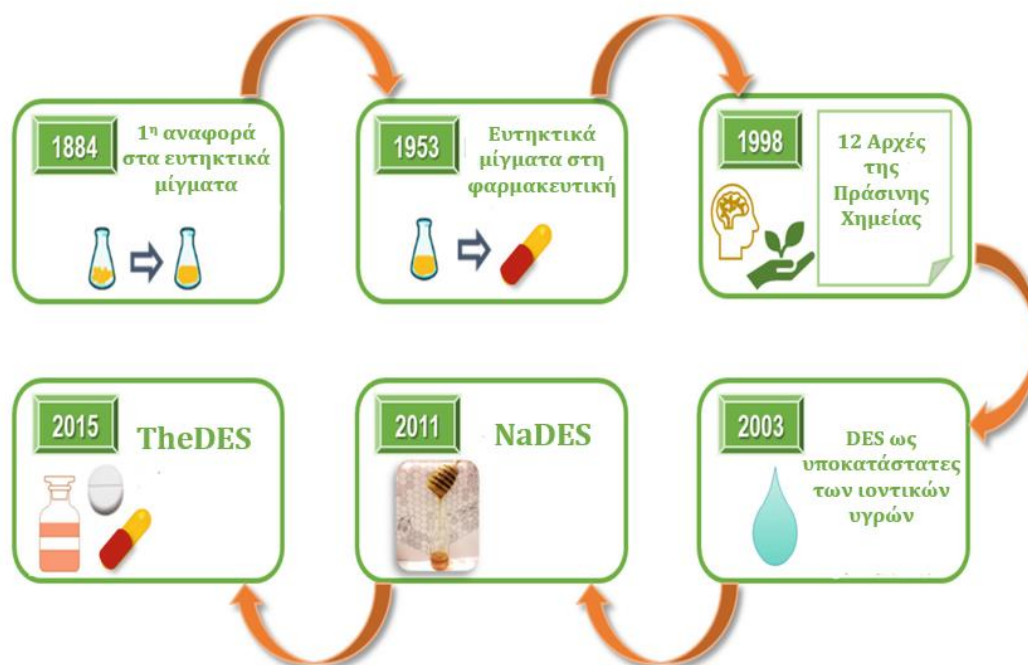
### 2.1 Ιστορική Αναδρομή

Στις αρχές της δεκαετίας του 1990 ανακαλύφθηκαν οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DES), οι οποίοι σταδιακά αντικατέστησαν άλλους διαλύτες, συμπεριλαμβανομένων των ιοντικών υγρών (ILs). Λόγω κυρίως της χαμηλής τοξικότητας και της οικονομικής τιμής τους, αποτελούν τους κατεξοχήν πράσινους διαλύτες και έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών.

Έπειτα από κάποια χρόνια, και συγκεκριμένα το 2011, πραγματοποιήθηκε η ανακάλυψη των φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (NaDES), οι οποίοι αποτελούνται από φυσικούς πρωτογενείς μεταβολίτες, όπως σάκχαρα ή οργανικά οξέα. Τα NaDES, είναι ιδιαίτερα φιλικό διαλύτες προς το περιβάλλον και βρίσκουν εφαρμογές σε πολλούς τομείς της καθημερινότητας.

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί μια ανοδική πορεία ως προς τη χρήση των DES σε φαρμακευτικές και βιολογικές εφαρμογές. Οι συγκεκριμένοι διαλύτες λοιπόν, που είναι ευρέως γνωστοί ως θεραπευτικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (TheDES), αποτελούνται από τουλάχιστον ένα δραστικό φαρμακευτικό συστατικό (Active Pharmaceutical Ingredient: API). Η μελέτη της δομής και των χαρακτηριστικών τους έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς συνδέονται άρρηκτα με την τεχνολογική εξέλιξη του κλάδου της Φαρμακευτικής Χημείας, η οποία αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι στη ζωή των ανθρώπων. Επιπλέον οι TheDES αποτελούν ένα καινοτόμο πεδίο έρευνας, το οποίο δεν έχει ερευνηθεί πλήρως και έτσι πραγματοποιούνται συστηματικά πλήθος ερευνών σχετικά με τις ιδιότητες και τις εφαρμογές τους.<sup>13,15</sup>

Παρακάτω απεικονίζεται η εξέλιξη των DES σε συνάρτηση με την πάροδο του χρόνου, καταλήγοντας στην πιο καινοτόμα κατηγορία τους, τους TheDES:



Εικόνα 4: Διάγραμμα χρονικής εξέλιξης των DES.

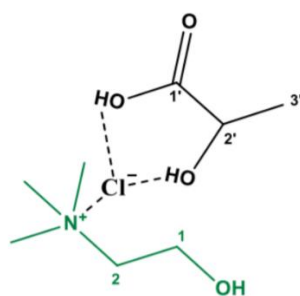
## 2.2 Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (NaDES)

Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NaDES) είναι μια υποκατηγορία των DES. Η βασική τους διαφορά είναι ότι τα συστατικά των NaDES αποτελούν αποκλειστικά φυσικές ενώσεις, οι οποίες είναι οικονομικές και φιλικές προς το περιβάλλον. Πιο συγκεκριμένα, η ανακάλυψη των NaDES πραγματοποιήθηκε μέσω μιας προσπάθειας ερμηνείας της παραγωγής ορισμένων μεταβολιτών, όπως είναι η γλυκόζη ή τα αμινοξέα, σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις από φυτά σε συνθήκες ξηρασίας ή ακραίων θερμοκρασιών. Έτσι λοιπόν θεωρήθηκε ότι τα κυτταρικά συστατικά που παράγονται σε περίσσεια σε αυτές τις συνθήκες σχηματίζουν NaDES εντός του κυττάρου, δημιουργώντας ένα εναλλακτικό μέσο ως προς το νερό για τη διατήρηση της λειτουργίας των ενδοκυτταρικών βιοχημικών αντιδράσεων, τη διαλυτοποίηση, αποθήκευση και μετακίνηση μη- υδατοδιαλυτών δευτερογενών μεταβολιτών. Ο πρωταρχικός ρόλος τους στα φυτικά κύτταρα είναι επομένως η διαλυτοποίηση δυσδιάλυτων συστατικών στα κύτταρα. Επιπλέον εκτός από τη μεγάλη διαλυτότητά τους, λειτουργούν και ως μέσα σταθεροποίησης ενώσεων λόγω της δημιουργίας δεσμών υδρογόνου. Σε αντίθεση με τους οργανικούς διαλύτες, η βασική δομή των NaDES εξαρτάται από τις διαμοριακές δυνάμεις μεταξύ των συστατικών τους. Για αυτόν τον λόγο έχει παρατηρηθεί ότι η θερμοκρασία, η αναλογία συστατικών καθώς και η περιεκτικότητά τους σε νερό τους επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό. Οι κυριότερες φυσικοχημικές ιδιότητες των NaDES (πυκνότητα, ιξώδες, πολικότητα) συμπίπτουν με αυτές των DES που έχουν προαναφερθεί, και είναι ο λόγος που αποτελούν ελκυστικό είδος διαλυτών για ποικίλες καινοτόμες διεργασίες.<sup>3,11</sup>

Με βάση τα συστατικά τους, τα NaDES μπορούν να χωριστούν σε πέντε βασικές κατηγορίες:

- NaDES που αποτελούνται από ένα οξύ ή μια βάση,
- NaDES που αποτελούνται μόνο από σάκχαρα ή σάκχαρα και πολυαλκοόλες (ουδέτερα DES),
- NaDES που αποτελούνται από σάκχαρα/ πολυαλκοόλες και οργανικά οξέα (ουδέτερα DES με οξέα),
- NaDES που αποτελούνται από σάκχαρα/πολυαλκοόλες και οργανικές βάσεις (ουδέτερα DES με βάσεις)
- NaDES που αποτελούνται από αμινοξέα και οργανικά οξέα ή σάκχαρα.

Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 4) απεικονίζεται η δομή ενός NaDES:



Σχήμα 4: Δομή ενός NaDES με συστατικά τη χλωριούχο χολίνη και το γαλακτικό οξύ.

Στο παραπάνω παράδειγμα NaDES με συστατικά τη χλωριούχο χολίνη και το γαλακτικό οξύ, φαίνεται η αλληλεπίδραση μεταξύ ενός δότη και ενός δέκτη δεσμού υδρογόνου. Συγκεκριμένα, το χλώριο στο μόριο της χολίνης σχηματίζει δεσμό με τα υδροξύλια του γαλακτικού οξέος με αποτέλεσμα να σχηματίζεται ένα ευτηκτικό μίγμα.

### 2.2.1 Εφαρμογές

Τα NaDES χαρακτηρίζονται από πολλά πλεονεκτήματα έναντι των άλλων διαλυτών. Το πιο σημαντικό είναι η μειωμένη τοξικότητά τους, το οποίο διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ευρεία χρήση των συγκεκριμένων διαλυτών σε ποικίλες εφαρμογές της καθημερινής ζωής. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια ανοδική τάση για χρήση των NaDES σε διεργασίες εκχύλισης, χρωματογραφίες καθώς και βιοϊατρικές εφαρμογές.<sup>11,12</sup>

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρήση NaDES σε βιολογικά συστήματα για διαλυτοποίηση βιολογικών μακρομορίων, όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα και τα λιπίδια, υπό την επίδραση του νερού, κάτι το οποίο θα αναλυθεί εκτενώς στο επόμενο κεφάλαιο που σχετίζεται με τις βιολογικές δράσεις.

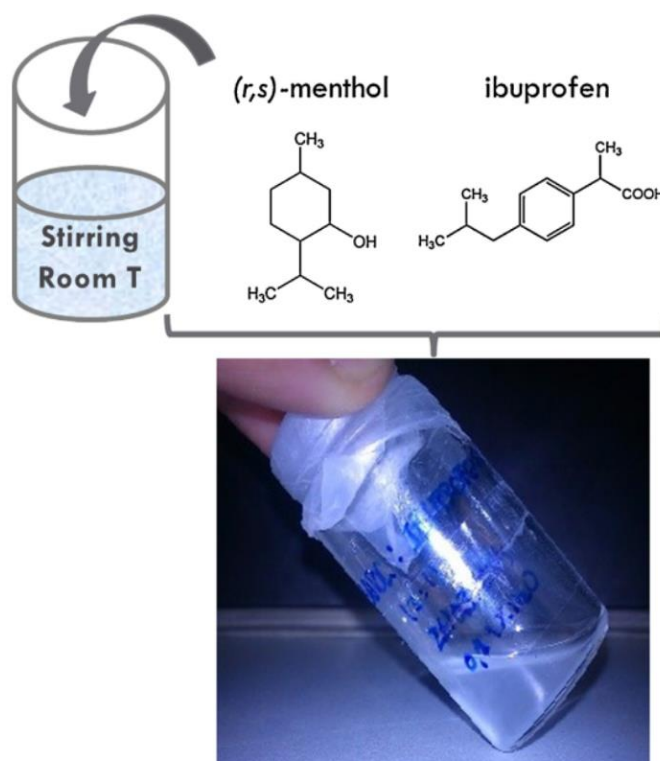
## 2.3 Θεραπευτικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (TheDES)

Οι θεραπευτικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (TheDES) αποτελούν ένα βιοδραστικό ευτηκτικό μίγμα που περιέχει τουλάχιστον ένα δραστικό φαρμακευτικό συστατικό (API). Μελέτες έδειξαν ότι όταν ένα API χορηγείται σε ένα βιολογικό σύστημα υπό μορφή ευτηκτικού μίγματος, το σύστημα παρουσιάζει καλύτερη αποτελεσματικότητα συγκριτικά με το αν δρούσε ως μεμονωμένο θεραπευτικό συστατικό. Οι πιο συνηθισμένοι δέκτες πρωτονίων που χρησιμοποιούνται κατά τη σύνθεση ενός TheDES είναι η χλωριούχος χολίνη και η μενθόλη, καθώς έχουν τη δυνατότητα να συνδυαστούν με μεγάλη ποικιλία API, όπως είναι η ιβουπροφαίνη και το ακετυλοσαλικυλικό οξύ, ή αλλιώς ασπιρίνη. Τα συγκεκριμένα ευτηκτικά μίγματα χρησιμοποιούνται κυρίως για τη σύνθεση νέων φαρμάκων και η θερμοκρασία τους συνήθως είναι κοντά στη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Η φυσική προέλευση σε συνδυασμό με τις φυσικοχημικές ιδιότητες τους, έχει καταστήσει τους TheDES ως μια έξυπνη εναλλακτική λύση για ανάπτυξη ναρκωτικών φαρμάκων. Επιπλέον είναι δυνατό να συνδυαστούν και με άλλα συστατικά όπως είναι το διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο είναι ιδιαίτερα ελκυστικό λόγω της μη τοξικότητας και της οικονομικής του τιμής, ή κάποιο πολυμερές.<sup>13,14,15</sup>

Η πρώτη κατηγορία θεραπευτικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών έχουν ως βάση τη χλωριούχο χολίνη. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της χλωριούχου χολίνης με τον δότη δεσμού υδρογόνου, όπως σε κάθε είδος DES, παίζουν κυρίαρχο ρόλο για την τελική σύνθεση του ευτηκτικού μίγματος. Πιο συγκεκριμένα, οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις καθορίζουν κυρίως τη σταθερότητα, τη μοριακή δόνηση, την πυκνότητα καθώς και το ιξώδες του τελικού προϊόντος. Έχει παρατηρηθεί η δημιουργία ισχυρών δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ιόντων του χλωρίου ( $\text{Cl}^-$ ) της χολίνης και του υδροξυλίου ( $\text{OH}^-$ ) που προέρχεται από τον δότη πρωτονίου.

Μια άλλη εξίσου σημαντική κατηγορία είναι οι TheDES που χρησιμοποιούν ως δέκτη πρωτονίου τη μενθόλη, που χρησιμοποιείται βέβαια πιο σπάνια για τη σύνθεσή τους. Η μενθόλη αλληλοεπιδρά με άλλα συστατικά μέσω του υδροξυλίου της, όπως για παράδειγμα με την ιβουπροφαίνη που συνεισφέρει ένα οξυγόνο και ένα υδρογόνο από το καρβοξυλικό της οξύ.

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 5), απεικονίζεται η προετοιμασία ενός TheDES με συστατικά την μενθόλη και την ιβουπροφαίνη σε αναλογία 3:1 αντίστοιχα:



Εικόνα 5: Προετοιμασία ενός TheDES. <sup>13</sup>

### 2.3.1 Εφαρμογές

Οι TheDES βρίσκουν εφαρμογές κυρίως στον κλάδο της Φαρμακευτικής Χημείας, όπου είναι απαραίτητη η μελέτη της αντιμικροβιακής δραστηριότητάς τους καθώς και της βελτίωσης της βιοδιαθεσιμότητας των φαρμάκων που συμμετέχουν σε διάφορες θεραπείες. Πιο συγκεκριμένα οι εφαρμογές τους μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με τις αλληλεπιδράσεις των TheDES με ένα βιολογικό σύστημα, τις φυσικοχημικές αλλαγές όπως είναι η βελτίωση της διαλυτότητας, την ελεγχόμενη απελευθέρωση φαρμάκου ή τη βελτίωση της αντικαρκινικής δράσης των φαρμάκων λόγω της σύνθεσης ενός θεραπευτικού διαλύτη.

#### Βελτίωση της διαλυτότητας και της διάλυσης

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μετρήσεις της διαλυτότητας τόσο για τα θεραπευτικά συστατικά API όσο και για τον σχηματισμό των TheDES, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό ανάδευση για περίπου 24 ώρες. Έγινε λοιπόν αντιληπτό ότι η διαλυτότητα των API αυξάνεται όταν αυτά είναι υπό μορφή ευτηκτικού μίγματος. Επομένως τα TheDES προσφέρουν ενίσχυση της διαπερατότητας, της διάλυσης και της διαλυτότητας των συστατικών. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η σύγκριση του ρυθμού διάλυσης της



σουλφαθειαζόλης και του ευτηκτικού μίγματος με βάση την ουρία. Παρατηρήθηκε ότι η σουλφαθειαζόλη υπό μορφή TheDES διαλύεται περίπου 700 φορές γρηγορότερα συγκριτικά με την καθαρή μορφή της.

### **Έλεγχος απελευθέρωσης φαρμάκων**

Αφετηρία της μελέτης απελευθέρωσης των φαρμάκων αποτελεί η μετατροπή της υδροχλωρικής λιδοκαΐνης σε TheDES ενσωματώνοντας σε αυτήν πολυμερικά οξέα. Τα συγκεκριμένα σύμπλοκα πολυμερούς – φαρμάκου σχηματίστηκαν μέσω μια αντίδρασης πολυμερισμού όπου δημιουργήθηκαν δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του άλατος της λιδοκαΐνης και των πολυμερών. Παρατηρήθηκε λοιπόν πως το φάρμακο μπορεί να απελευθερωθεί με ελεγχόμενο τρόπο, που εξαρτάται από το pH, την ιοντική ισχύ και τη διαλυτότητα του φαρμάκου.

Μια επιπρόσθετη προσέγγιση που πραγματοποιήθηκε αφορά τη δημιουργία ενός TheDES με συστατικά τη μενθόλη και την ιβουπροφαίνη σε αναλογία 3:1 αντίστοιχα, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον σχεδιασμό ενός προηγμένου συστήματος απελευθέρωσης φαρμάκων. Διαπιστώθηκε λοιπόν έπειτα από *in vitro* πειράματα, ότι η καθαρή ιβουπροφαίνη έχει παρόμοια απόδοση με την ιβουπροφαίνη σε μορφή TheDES.

### **Βελτίωση της αντικαρκινικής δράσης των φαρμάκων**

Το λιμονένιο αποτελεί ένα τερπένιο με χημικοθεραπευτικές ιδιότητες έναντι του καρκίνου. Βέβαια είναι αρκετά τοξικό ακόμα και για τα υγιή κύτταρα, επομένως όσον αφορά τη βιωσιμότητα των κυττάρων, η χρήση του για τη θεραπεία των καρκινικών κυττάρων δεν είναι αποτελεσματική. Έτσι οι επιστήμονες επιχείρησαν τη μελέτη ορισμένων TheDES με συστατικό το λιμονένιο για να ελέγξουν αν το συγκεκριμένο μίγμα έχει καλύτερες θεραπευτικές ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα, έπειτα από δοκιμή 14 TheDES, το ευτηκτικό μίγμα ιβουπροφαίνη – λιμονένιο σε αναλογία 1:4 έδειξε την πιο επιτυχημένη αναστολή της συγκεκριμένης ασθένειας.

## 2.4 Μέθοδοι Σύνθεσης

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι σύνθεσης των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών, οι οποίες είναι κοινές για τους NaDES και TheDES που διαφοροποιούνται μόνο ως προς τις εφαρμογές τους. Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι αναλύονται παρακάτω:

### Σύνθεση με ανάδευση και θέρμανση

Είναι η πιο απλή και ασφαλής μέθοδος σύνθεσης των DES, τα οποία παρασκευάζονται μέσω ανάμιξης των συστατικών από τα οποία αποτελείται το τελικό ευτηκτικό μίγμα. Σύμφωνα με συγκεκριμένη μοριακή αναλογία που μπορεί να βρεθεί βιβλιογραφικά, τα συστατικά αναδεύονται και θερμαίνονται σε συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασία που κυμαίνεται στους 50-100°C. Η μέθοδος αυτή προτιμάται έναντι άλλων, κυρίως λόγω της ευκολίας δημιουργίας DES καθώς και του χαμηλού κόστους που απαιτείται.<sup>17</sup>

### Σύνθεση υποβοηθούμενη με υπερήχους

Τα συστατικά του μίγματος ομογενοποιούνται με τη χρήση vortex και τοποθετούνται σε λουτρό υπερήχων. Ο χρόνος παραμονής τους στο λουτρό μέχρι τον σχηματισμό ενός διαυγούς μίγματος είναι περίπου 30 λεπτά. Στη συνέχεια το μίγμα τοποθετείται σε ξηραντήρα όπου διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.<sup>16</sup>

### Σύνθεση υποβοηθούμενη με μικροκύματα

Τα συστατικά του μίγματος ομογενοποιούνται με τη χρήση vortex και επεξεργάζονται εντός ενός αντιδραστήρα μικροκυμάτων υπό ελεγχόμενη θερμοκρασία και πίεση. Η συγκεκριμένη μέθοδος επιτυγχάνεται με τη βοήθεια ακτινοβολίας. Όταν σχηματιστεί το DES τοποθετείται σε ξηραντήρα όπου διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.<sup>16</sup>

### Σύνθεση με εξάτμιση

Τα συστατικά του DES διαλύονται σε συγκεκριμένη ποσότητα νερού, το οποίο εξατμίζεται έπειτα από κάποιο χρονικό διάστημα. Στη συνέχεια το δείγμα τοποθετείται σε ξηραντήρα προκειμένου να διατηρηθεί υπό συνθήκες χαμηλής υγρασίας.<sup>17</sup>

### Σύνθεση με λυοφιλοποίηση

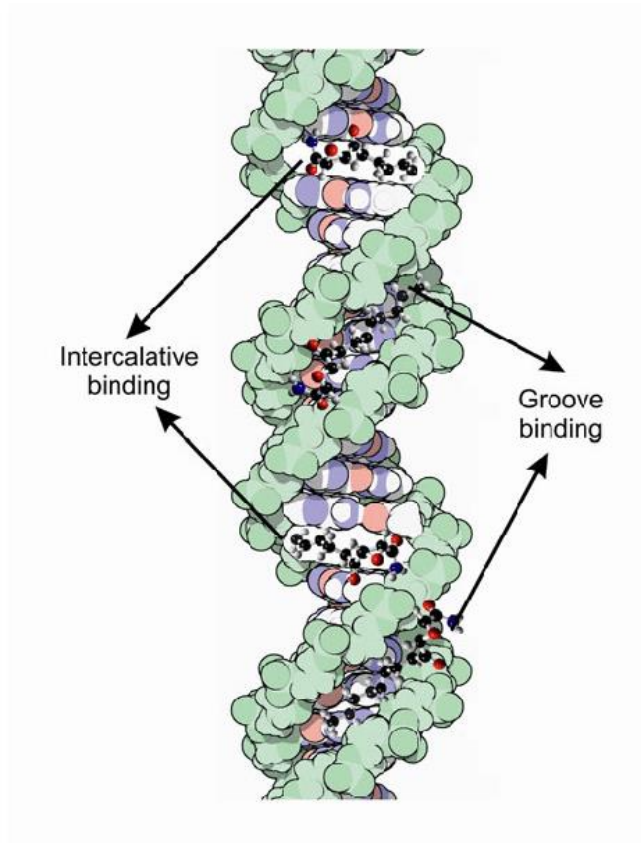
Στη μέθοδο λυοφιλοποίησης, που είναι γνωστή και ως freeze drying, τα συστατικά ζυγίζονται σύμφωνα με τη γραμμομοριακή αναλογία και διαλύονται με τη βοήθεια προσθήκης μικρής ποσότητας νερού. Έπειτα ακολουθεί ξήρανση υπό κατάψυξη μέσω της εξάχνωσης του πάγου, μέχρι να παραχθεί ένα διαυγές ιξώδες υγρό.

### 3. Αλληλεπίδραση Οργανικών Ενώσεων με το DNA

Το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της ζωής όλων των οργανισμών. Η δέσμευση μικρών μορίων στο μόριο του DNA αποτελεί βασικό θέμα έρευνας τα τελευταία χρόνια, καθώς μέσω της συγκεκριμένης διαδικασίας προωθείται ο μηχανισμός δράσης των αντικαρκινικών φαρμάκων. Οι κυριότεροι τύποι μη ομοιοπολικής αγκιστείας είναι οι παρακάτω (Εικόνα 6):

- Παρεμβολή στο DNA
- Δέσμευση στην κύρια ή δευτερεύουσα αύλακα του DNA
- Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις

Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίον η πολυπλοκότητα επηρεάζει τις δομικές και μηχανικές ιδιότητες του DNA αποτελεί ένα σημαντικό βήμα για τη διευκρίνιση κάθε μηχανισμού σύνδεσης σε αυτό, καθώς και για την ανάπτυξη ενός πιο ορθολογικού σχεδιασμού φαρμάκων.<sup>18</sup>



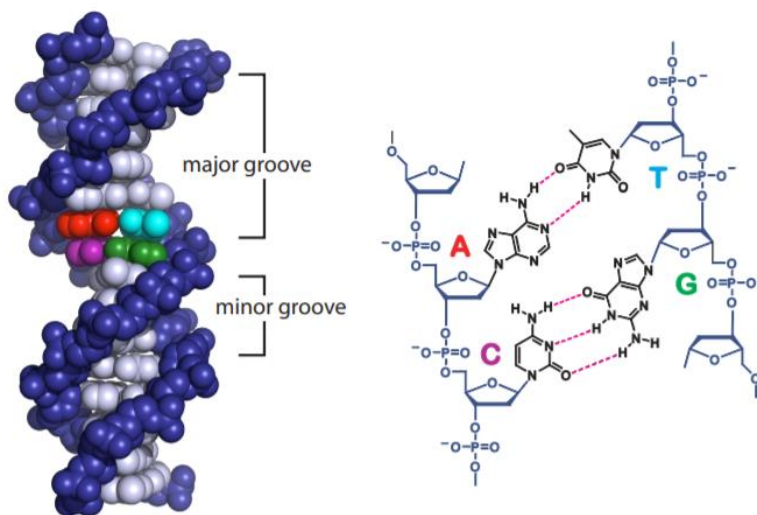
Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των βασικότερων τρόπων αλληλεπίδρασης ενός μορίου με το DNA.

### 3.1 Δομή του DNA

Το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) είναι ένα βιολογικό μακρομόριο, το οποίο αποτελείται από δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες σε μορφή κλώνων που σχηματίζουν μια δεξιόστροφη διπλή έλικα. Οι δύο κλώνοι συγκρατούνται μεταξύ τους μέσω δεσμών υδρογόνου. Η διαμόρφωση των μεγάλων μορίων του DNA στον χώρο έχει τη μορφή μιας διπλής έλικας, και αποτελούνται από τέσσερις αζωτούχες βάσεις : Κυτοσίνη, Γουανίνη, Θυμίνη και Αδενίνη, οι οποίες ανάλογα με τη σειρά αλληλουχίας τους σε τριάδες, κωδικοποιούν το μήνυμα για τη σύνθεση των αμινοξέων του κυττάρου στα ριβοσώματα. Εκεί τα αμινοξέα συνδυάζονται κατάλληλα με σκοπό τη σύνθεση πρωτεϊνών. Επιπλέον τα μόρια του DNA συγκροτούνται από φωσφορικές ρίζες και ένα σάκχαρο, τη δεσοξυριβόζη.

Το DNA περιέχει τις γενετικές πληροφορίες που κωδικοποιούν ολόκληρη τη δομή και τις λειτουργίες των ζωντανών οργανισμών. Τα βιολογικά χαρακτηριστικά καθορίζονται από μεμονωμένα γονίδια που αποτελούνται από συγκεκριμένες ακολουθίες DNA. Μέσω της διαδικασίας της αντιγραφής του DNA διατηρείται και μεταβιβάζεται η γενετική πληροφορία από κύτταρο σε κύτταρο και από έναν οργανισμό στους απογόνους του. Επιπλέον το DNA επιτυγχάνει την έκφραση των γενετικών πληροφοριών ελέγχοντας τη σύνθεση των πρωτεϊνών.

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 7) απεικονίζεται η χημική δομή του DNA:



Εικόνα 7: Χημική δομή του DNA.

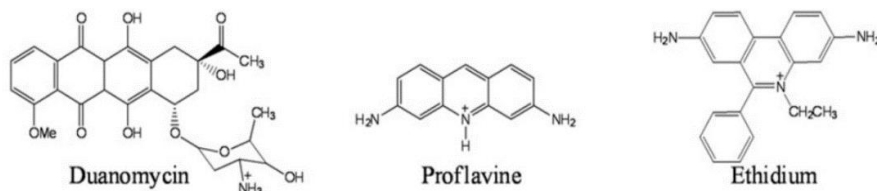
### 3.2 Παρεμβολή στο DNA

Η παρεμβολή μορίων στο DNA επιτυγχάνεται μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων, όπου ένας αρωματικός δεσμός εισάγεται μεταξύ των γειτονικών ζευγών βάσεων του DNA. Γενικότερα η παρεμβολή προκαλεί σταθεροποίηση, τοπική χαλάρωση, επιμήκυνση, και άλλες δομικές αλλαγές στο DNA. Ο συγκεκριμένος τρόπος αλληλεπίδρασης έχει προσελκύσει αρκετό ενδιαφέρον, καθώς έχει τεράστιες θεραπευτικές δράσεις. Οι παρεμβολείς του DNA χρησιμοποιούνται συχνά ως φάρμακα για τη θεραπεία σοβαρών ασθενειών, όπως είναι ο καρκίνος και η μικροβιακή ή παρασιτική λοίμωξη. Επιπλέον η χρήση τους επεκτείνεται και στη μελέτη της δομής και λειτουργίας των νουκλεϊκών οξέων.

Οι παρεμβολείς χωρίζονται σε δυο κύριες κατηγορίες, τους μόνο-παρεμβολείς και τους δι-παρεμβολείς. Η πρώτη κατηγορία αποτελείται από μικρά οργανικά μόρια με ένα τμήμα δακτυλίου, που παρεμβάλλονται μεταξύ των ζυγών βάσεων του DNA. Η δεύτερη κατηγορία παρεμβολέων αποτελείται από δυο μόνο-παρεμβολείς, οι οποίοι ενώνονται μεταξύ τους μέσω ενός ομοιοπολικού δεσμού και η σύνδεσή τους πρέπει να είναι βέλτιστη σε μήκος ώστε να επιτευχθεί η ομαλή αλληλεπίδρασή τους με τα ζεύγη των αζωτούχων βάσεων.

19,20

Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 5), απεικονίζεται η δομή ορισμένων DNA παρεμβολέων:



Σχήμα 5: Χημική δομή DNA intercalators.

#### 3.2.1 Η διαδικασία της παρεμβολής

Η διαδικασία της παρεμβολής έχει ως αφετηρία την αλλαγή της διαμόρφωσης του DNA. Έτσι προωθείται η αύξηση της κατακόρυφης απόστασης μεταξύ των ζευγών των αζωτούχων βάσεων προκειμένου να σχηματιστεί μια κοιλότητα μέσω της οποίας πραγματοποιείται η μεταφορά του επίπεδου αρωματικού συστήματος. Η διπλή έλικα ξετυλίγεται σταδιακά, κάτι το οποίο προκαλεί αλλαγές τόσο στη γωνία στροφής μεταξύ διαδοχικών βάσεων όσο και στον σκελετό που σχηματίζεται μεταξύ μιας φωσφορικής ομάδας και ενός σακχάρου. Με τον εγκλωβισμό του φαρμάκου μεταξύ των ζευγών βάσεων,

πραγματοποιούνται διάφορα είδη μη ομοιοπολικών δυνάμεων. Τα θετικά φορτισμένα μόρια είναι πιο αποτελεσματικά ως προς την παρεμβολή τους στο DNA. Η πλειοψηφία λοιπόν των παραγόντων παρεμβολής φορτίζονται θετικά ή περιέχουν βασικές ομάδες οι οποίες πρωτονιώνονται.

### 3.2.2 Βιολογική σημασία της παρεμβολής

Όπως προαναφέρθηκε, οι παρεμβολείς χρησιμοποιούνται ως αντικαρκινικά, αντιμικροβιακά και αντιπαρασιτικά μέσα, καθώς αναστέλλουν την διαδικασία της αντιγραφής και μεταγραφής του DNA, αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο την κυτταρική διαίρεση. Δεδομένου ότι τα καρκινικά κύτταρα είναι αρκετά επιρρεπή στην ανάπτυξη, η παρεμβολή δρα ως ανασταλτικός παράγοντας για τη συγκεκριμένη ενέργεια. Ο μηχανισμός της βιολογικής δράσης της παρεμβολής αναλύεται παρακάτω.<sup>30</sup>

#### **Αντικαρκινικές ενώσεις**

Η ακτινομυκίνη D χρησιμοποιείται πολύ συχνά ως ένα αντικαρκινικό αντιβιοτικό για τη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκινικής πάθησης, και ιδιαίτερα για τη θεραπεία της λευχαιμίας. Ακόμα μια αντικαρκινική ένωση είναι η προφλαβίνη, η οποία παρά την αντικαρκινική της δράση δε χρησιμοποιείται κλινικά λόγω της αυξημένης τοξικότητάς της. Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές προσπάθειες τροποποίησης της προφλαβίνης προκειμένου να γίνει περισσότερο επιλεκτική ως προς τα βιολογικά κύτταρα και λιγότερο τοξική ένωση.

#### **Αντιμικροβιακές ενώσεις**

Η προφλαβίνη χρησιμοποιείται ακόμα ως απολυμαντικό και αντιβακτηριακό μέσο. Η συγκεκριμένη ένωση έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς επιδρά θετικά στη θεραπεία του ιού HPV. Επιπλέον η τραπαφλαβίνη, η αιθακριδίνη και η ακριφλαβίνης χρησιμοποιήθηκαν πρόσφατα ως αντιβακτηριακά μέσα.

#### **Αντιπαρασιτικές ενώσεις**

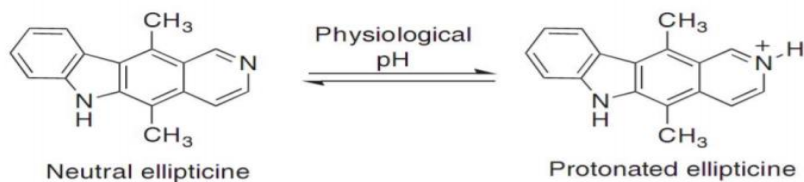
Η μεπακρίνη αποτελεί ένα παράγωγο ακριδίνης, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στη θεραπεία της ελονοσίας. Επίσης άλλα παράγωγα ακριδίνης όπως είναι η προφλαβίνη ή το βρωμιούχο αιθίδιο χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της τρυπανοσωμίας.

### 3.2.3 Μόρια παρεμβολείς (intercalating agents)

Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένα παραδείγματα παρεμβολέων DNA:

#### ➤ Ελλειπτίνη (Ellipticine)

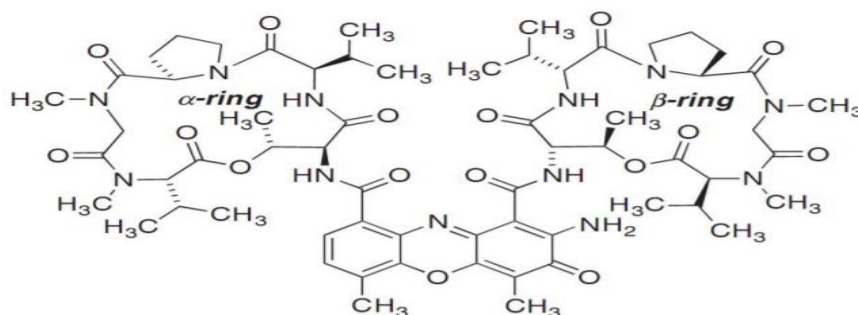
Η ελλειπτίνη αποτελεί ένα αλκαλοειδές που εξάγεται από δέντρα του είδους *Ochrosia elliptica*, το οποίο αναστέλλει το ένζυμο τοποϊσομεράση II μέσω παρεμβατικής σύνδεσης στο DNA, συμβάλλοντας έτσι στην αναστολή του καρκίνου.<sup>30</sup>



Σχήμα 6: Φυσική και πρωτονιωμένη μορφή της ελλειπτίνης.<sup>30</sup>

#### ➤ Ακτινομυκίνη D (Actinomycin D)

Οι κύριες βιολογικές δράσεις της ακτινομυκίνης D είναι η θεραπεία σαρκωμάτων, στερεών όγκων παιδικής ηλικίας καθώς και καρκίνου γεννητικών κυττάρων.



Σχήμα 7: Χημική δομή Ακτινομυκίνης D.<sup>30</sup>

#### ➤ Ναφθαλιμίδια και παρόμοιες ενώσεις (Naphthalimides and related compounds)

Παράγωγα ναφθαλιμιδίου, όπως είναι το μιτοναφίδιο ή το αμοναφίδιο, που έχουν αμινοαλκυλική πλευρική ομάδα, παρουσιάζουν ενδιαφέρουσα κυτταροτοξική δραστηριότητα, η οποία οφείλεται κυρίως στην αναστολή της τοποϊσομεράσης II.



Σχήμα 8:  $R=NO_2$  Μιτοναφίδιο,  $R=NH_2$  Αμωναφίδιο. <sup>30</sup>



### 3.3 Δέσμευση στην κύρια ή δευτερεύουσα αύλακα του DNA

Η μελέτη της δέσμευσης μικρών μορίων στη δευτερεύουσα κυρίως αύλακα του DNA κρίνεται αναγκαία και χρήσιμη για αρκετούς τομείς. Πολλές από αυτές τις ενώσεις έχουν έντονο φθορισμό κατά τη σύνδεσή τους με το DNA, ενώ η απόδοση φθορισμού εξαρτάται από την ακολουθία της αύλακας που δεσμεύουν. Οι επιπτώσεις τους στη διαδικασία μεταγραφής οδήγησαν στην περαιτέρω ανάπτυξη τέτοιου είδους μορίων, τα οποία έχουν θεραπευτικές ιδιότητες και χρησιμοποιούνται ως αποτελεσματικά αντιμικροβιακά φάρμακα σε ανθρώπους και ζώα. Η δέσμευση στην αύλακα του DNA έχει καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα συγκριτικά με την παρεμβολή, κυρίως λόγω της χαμηλότερης τοξικότητας των συνδεδετικών αυλάκων καθώς και των μειωμένων πιθανοτήτων για δημιουργία μεταλλάξεων.<sup>21,22</sup>

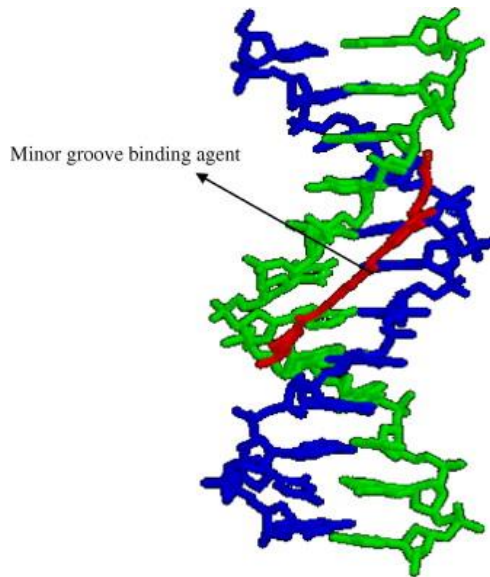
#### 3.3.1 Χημική δομή της αύλακας του DNA

Τα μόρια που αναζητούν μια θέση πρόσδεσης στο DNA, συναντούν διαφορετικά και εξαρτώμενα από την αλληλουχία, πλάτη αυλακώσεων στις δευτερεύουσες και κύριες αύλακες. Γενικά η διπλή έλικα του DNA έχει μεγάλο μήκος και αρκετά μικρή διάμετρο. Η μικρή αύλακα χαρακτηρίζεται ως στενή με πλάτος μόνο 10 Å, ενώ η κύρια είναι βαθύτερη και φαρδύτερη με πλάτος περίπου 24Å. Οι αύλακες σχηματίζονται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ δεσμών υδρογόνου με τις συμπληρωματικές αζωτούχες βάσεις του DNA, δηλαδή τα ζεύγη Αδενίνης – Θυμίνης και Γουανίνης – Κυτοσίνης.

#### 3.3.2 Η διαδικασία της δέσμευσης μορίων στο DNA

Η δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων του DNA, προωθεί τη συναρμογή μιας ένωσης στην κύρια ή δευτερεύουσα αύλακα. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η πρόσδεση ορισμένων πρωτεϊνών στην κύρια αύλακα του DNA μέσω αλληλεπιδράσεων που πραγματοποιούνται μεταξύ τους. Στη φύση οι πρωτεΐνες μπορούν να δεσμευτούν στην κύρια αύλακα κυρίως λόγω του μεγάλου πλήθους δοτών δεσμού υδρογόνου, κάποια μικρότερα μόρια στην δευτερεύουσα και άλλα και στις δυο. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν μικρού μεγέθους μόρια (μικρότερα από 1000 Da), για αυτόν τον λόγο μας ενδιαφέρει κυρίως η μελέτη δέσμευσης στη δευτερεύουσα αύλακα του DNA και η επίδραση που επιφέρει η ένωση σε αυτό.

Στην Εικόνα 8 απεικονίζεται η δέσμευση μιας χημικής ένωσης στη δευτερεύουσα αύλακα του DNA:

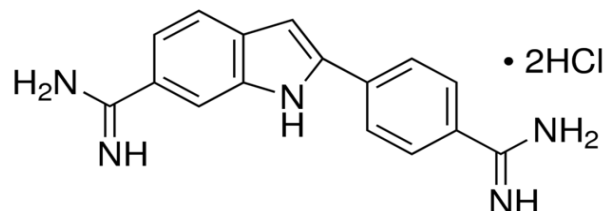


Εικόνα 8: Δέσμευση στη δευτερεύουσα αύλακα του DNA.

### 3.3.3 Βιολογική σημασία της δέσμευσης στην κύρια ή δευτερεύουσα αύλακα του DNA

Σύμφωνα με έρευνες που έχουν διεξαχθεί, τα περισσότερα μόρια που συνδέονται στη δευτερεύουσα αύλακα του DNA αποτελούν ισχυρά φάρμακα που χρησιμοποιούνται για θεραπείες σοβαρών ασθενειών, όπως ο καρκίνος. Συγκεκριμένα διαθέτουν πολλές βιολογικές δράσεις, όπως αντιβακτηριακές, αντικαρκινικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιων ενώσεων αποτελεί το DAPI, το οποίο ανακαλύφθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1970 και αποδείχθηκε ότι συνδέεται σε περιοχές του δίκλωνου μορίου DNA που είναι πλούσιες στις αζωτούχες βάσεις αδενίνη – θυμίνη.



Σχήμα 9: Χημική δομή DAPI.

Τα μόρια που δεσμεύονται σε περιοχές πλούσιες σε αδενίνη – θυμίνη έχουν χαρακτηριστεί ως καλύτεροι αντικαρκινικοί παράγοντες, από αυτά που συνδέονται σε περιοχές γουανίνης – κυτοσίνης. Παρά την ανησυχία των ειδικών για το αν είναι τοξικά ορισμένα φάρμακα που συνδέονται στη μικρή

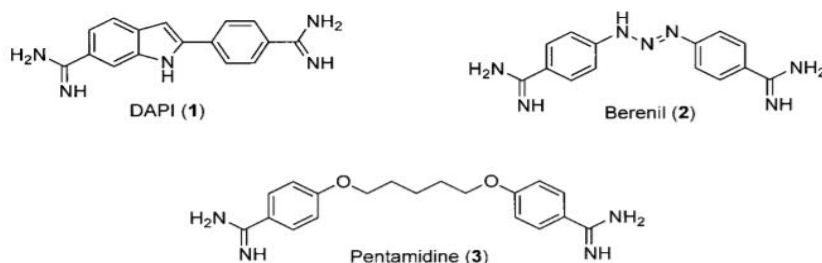
αύλακα του DNA, αναπτύσσονται συνεχώς νέες υποσχόμενες ενώσεις με όλο και καλύτερες δράσεις. Επιπροσθέτως, σημαντικό ρόλο στη θεραπεία του καρκίνου παίζει το σύστημα MMR, το οποίο συμβάλλει στη διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας και η απουσία του οδηγεί σε κλινική αντίσταση της χημειοθεραπείας.<sup>21</sup>

### 3.3.4 Μόρια δέσμησης στη δευτερεύουσα αύλακα του DNA (DNA minor groove binders)

Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένα παραδείγματα μορίων που δεσμεύονται στη δευτερεύουσα αύλακα:<sup>21,32</sup>

#### ➤ Διαρυλαμιδίνες (Diarylmidines)

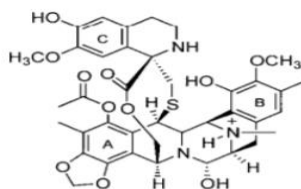
Οι διαρυλαμιδίνες συμβάλλουν στην θεραπεία πρωτοζωικών παθήσεων, όπως είναι η τρυπανοσωμίαση.



Σχήμα 10: Παραδείγματα διαρυλαμιδίνων.<sup>32</sup>

#### ➤ Εκτενασκιδίνη (Ecteinascidin)

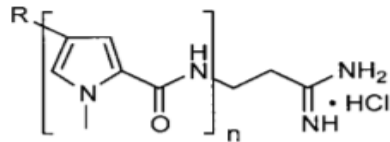
Η αλκαλοειδής τετραυδροϊσοκινολίνη εκτενασκιδίνη-743 (ET-743), αποτελεί έναν ισχυρό αντικαρκινικό παράγοντα.



Σχήμα 11: ET - 743.<sup>32</sup>

➤ **Δισταμυκίνη (Distamycin)**

Η πεπτιδική τριπυρρόλη, δισταμυκίνη A, είναι ένας φυσικός αντιβιοτικός παράγοντας, που απομονώθηκε το 1962 από τις καλλιέργειες του *Streptomyces distallicus*, με ενδιαφέρουσες αντιβακτηριακές δράσεις, χωρίς αντικαρκινικές ιδιότητες. Επιπλέον η δισταμυκίνη διαπιστώθηκε ότι έχει αντιπρωτοζωική δράση, ιδιαίτερα έναντι ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών του *Plasmodium falciparum*.

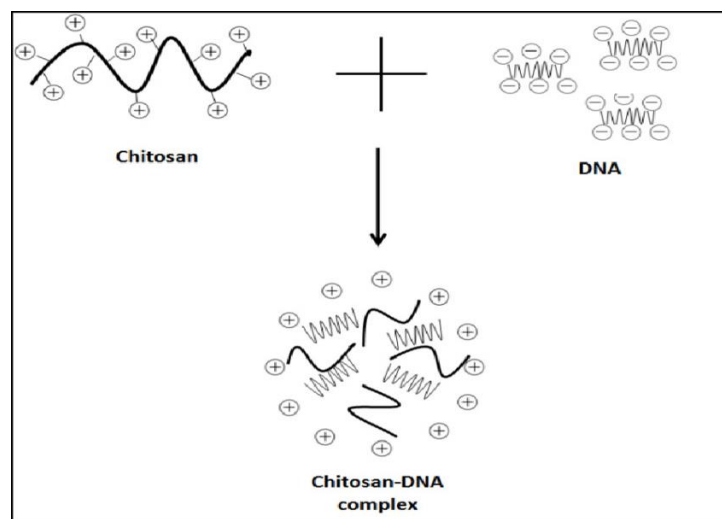


Σχήμα 12: Δισταμυκίνη A. <sup>32</sup>

### 3.4 Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις

Πολλά μικρά μόρια συνδέονται με το DNA μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο την αντικαρκινική δράση. Πιο συγκεκριμένα, δημιουργούνται δεσμοί υδρογόνου ή δυνάμεις van der Waals μεταξύ μιας φωσφορικής ομάδας του DNA η οποία βρίσκεται σε ανηγμένη μορφή και ενός θετικά φορτισμένου ιόντος.

Στην Εικόνα 9, παρουσιάζεται ένα παράδειγμα αλληλεπίδρασης του DNA με ένα μόριο χιτοζάνης, μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Η κύρια μέθοδος σχηματισμού συμπλοκών χιτοζάνης με το DNA είναι η άμεση ανάμιξη ενός θετικού μορίου χιτοζάνης με ένα αρνητικά φορτισμένο νουκλεϊκό οξύ, το οποίο στη συνέχεια δεσμεύεται από ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση.



Εικόνα 9: Σύνδεση DNA - Χιτοζάνης μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. <sup>34</sup>

### 3.5 Βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες και αλληλεπίδρασή τους με βιολογικά μακρομόρια

Τα βιολογικά συστήματα αποτελούνται κυρίως από νερό και βιολογικά μακρομόρια, και συγκεκριμένα από πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και λιπίδια. Η δομή, η δραστηριότητα και η σταθερότητα αυτών των μορίων εξετάζονται κατά βάση σε μη υδατικούς διαλύτες, όπως είναι οι βαθέως ευτηκτικοί. Οι DES και οι NaDES διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στην οργανική σύνθεση, διαλυτοποίηση και εκχύλιση των βιολογικών μορίων, λόγω των πολυάριθμων ιδιοτήτων τους. Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιούνται ποικίλες μελέτες που διερευνούν τόσο την επίδραση του νερού στις δομές των DESs, όσο και περαιτέρω εφαρμογές τους ως διαλύτες για τα βιολογικά μακρομόρια, παρουσία ή μη του νερού. Το νερό σε ένα DES είναι πιθανό να έχει προστεθεί σκόπιμα για τη σωστή διαμόρφωση της φυσικοχημικής ιδιότητας του διαλύτη.

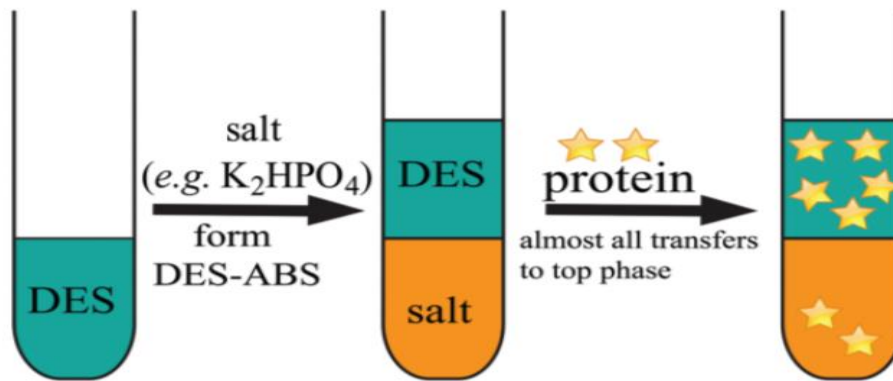
Παρακάτω αναλύονται τα κυριότερα βιολογικά μακρομόρια και η συνύπαρξή τους με έναν βαθέως ευτηκτικό διαλύτη, με την παρουσία νερού.<sup>12,28</sup>

#### DES – Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες είναι μεγάλα μόρια που αποτελούνται από αμινοξέα, η ακολουθία των οποίων καθορίζει την κύρια δομή και λειτουργία ενός πρωτεϊνικού μορίου. Η καταλυτική δραστηριότητα, η οποία επιτυγχάνεται μέσω των ενζύμων, αποτελεί την κυριότερη λειτουργία μιας πρωτεΐνης. Γενικότερα, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες σχετικά με τη βιοκατάλυση των πρωτεϊνών σε μη υδατικά μέσα, καθώς προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα, όπως είναι η μεγαλύτερη διαλυτότητα του υποστρώματος ή βελτιωμένη σταθερότητα ενός ενζύμου. Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες, λόγω του πράσινου χαρακτήρα και της οικονομικής τιμής τους, θεωρούνται οι κατεξοχήν κατάλληλοι διαλύτες για επίτευξη βιοκαταλυτικών αντιδράσεων.

Δυο από τις πιο σημαντικές εφαρμογές των πρωτεϊνών είναι η διαλυτοποίηση και εκχύλιση τους. Οι επιστήμονες εστιάζουν τα τελευταία χρόνια στην απομόνωση καθαρών πρωτεϊνικών μορίων, προσπαθώντας να διατηρήσουν τη δομή και τις λειτουργίες τους μετά το πέρας της διαδικασίας της εκχύλισης. Οι περισσότερες μέθοδοι εκχύλισης και καθαρισμού πρωτεϊνών περιλαμβάνουν καθίζηση του θειικού αμμωνίου και ανταλλαγή ιόντων. Ενώ μέχρι πρόσφατα γινόταν χρήση υδατικών διφασικών συστημάτων (ABS) με ιοντικά υγρά ως μέθοδος εξαγωγής βιολογικών μορίων, τελευταία το ενδιαφέρον έχει στραφεί στην εφαρμογή των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών στα συγκεκριμένα συστήματα, καθώς υπερσχύουν σε πλεονεκτήματα μετατρέποντας τα συστήματα σε πιο αποτελεσματικά μέσα.

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζεται ένα γενικό σχήμα της διαδικασίας εκχύλισης πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας ένα υδατικό διφασικό σύστημα που έχει ως βάση ένα DES:

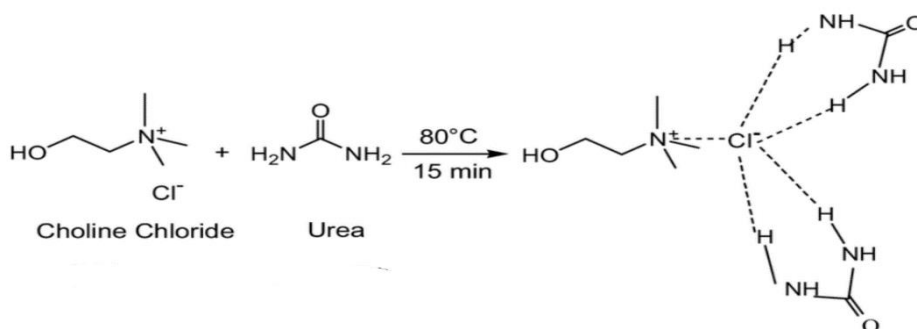


Εικόνα 10: Παράδειγμα εκχύλισης μιας πρωτεΐνης σε ένα σύστημα ABS με βάση ένα DES. <sup>28</sup>

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η επίδραση ενός DES στη σταθερότητα και δομή ενός ενζύμου, της υπεροξειδάσης του χρένου (HRP). Παρασκευάστηκε λοιπόν μια σειρά από DES, χρησιμοποιώντας ως άλας τη χλωριούχο χολίνη και ως δότη πρωτονίου την ουρία, τη γλυκερόλη, και την αιθυλενογλυκόλη σε τρεις διαφορετικές αναλογίες (1:2, 1:1, 2:1). Έπειτα το ευτηκτικό μίγμα διαλύθηκε σε ένα διάλυμα φωσφορικών σε διάφορες συγκεντρώσεις (έως 2M), και το pH του ρυθμίστηκε κοντά στο 7. Η παρουσία του DES είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της δράσης του ενζύμου HRP με ταυτόχρονη αύξηση της σταθερότητας της πρωτεΐνης. <sup>12,28</sup>

### DES – Νουκλεϊκά οξέα

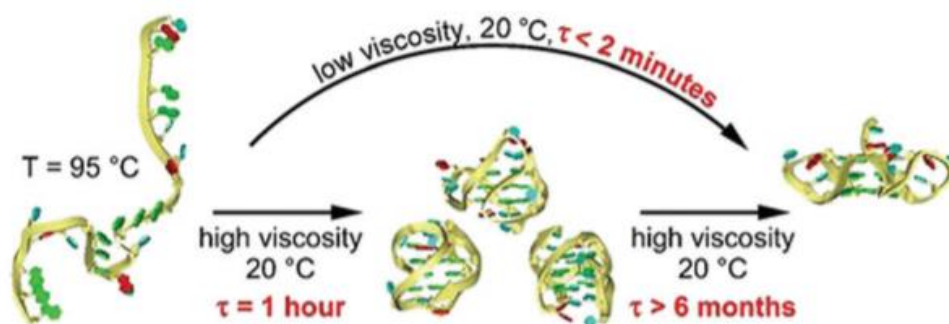
Το μόριο του DNA αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες, τα νουκλεϊκά οξέα, τα οποία χαρακτηρίζονται από χαμηλή σταθερότητα σε υδατικά διαλύματα. Για αυτόν τον λόγο, πραγματοποιήθηκαν προσπάθειες ανακάλυψης νέων εναλλακτικών διαλυτών, οι οποίοι θα αποτελούν ένα σταθερό μέσο για το DNA. Έπειτα από έρευνες διαπιστώθηκε ότι ορισμένα DES, όπως το ευτηκτικό μίγμα χλωριούχου χολίνης – ουρία, έχουν την ικανότητα να διατηρούν σταθερή τη δομή του DNA μέσω ειδικού διαχωρισμού.



Σχήμα 13: Σχηματική απεικόνιση του DES χλωριούχου χολίνης - ουρίας.

Έπειτα εξετάστηκε η διαλυτότητα του DNA σε διάφορα NaDES, η οποία είναι μεγαλύτερη στο μίγμα χλωριούχου χολίνης-μηλικού οξέος (1:1) συγκριτικά με το νερό. Επιπλέον ανάμεσα σε μεγάλο πλήθος DESs που ερευνήθηκε, το μόριο του DNA διαλύεται εύκολα στο μίγμα χλωριούχου χολίνης-γλυκερόλης και χλωριούχου χολίνης-αιθυλενογλυκόλης, με περιεκτικότητες 2,5%w/w και 5,5%w/w αντίστοιχα, έπειτα από συνεχή ανάδευση περίπου έξι και δύο ωρών αντίστοιχα. Κρίνεται σημαντικό ότι δεν παρατηρήθηκε αποικοδόμηση του απομονωμένου DNA κατά τη διάλυσή του και στα δύο DES, ακόμα και μετά από έξι μήνες παραμονής τους σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαλυτότητα και η σταθερότητα του DNA που παρατηρείται μέσα στο DES οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κατιόντων της χλωριούχου χολίνης και των φωσφορικών ομάδων του μορίου του DNA.<sup>12,28</sup>

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 11) απεικονίζεται η αναδίπλωση του DNA μέσα σε ένα παχύρευστο DES με συστατικά την χλωριούχο χολίνη και την ουρία σε αναλογία 1:2.



Εικόνα 11: Αναδίπλωση του DNA μέσα στο DES χλωριούχου χολίνης - ουρίας.<sup>28</sup>



## **DES - Φωσφολιπίδια**

Τα φωσφολιπίδια είναι η πιο διαδεδομένη κατηγορία λιπιδίων, τα οποία αποτελούνται από ένα μόριο γλυκερόλης, δυο μόρια λιπαρών οξέων, ένα μόριο φωσφορικού οξέος και ένα ακόμη πολικό μόριο. Χαρακτηρίζονται ως αμφίφυλα μόρια καθώς περιέχουν μια υδρόφοβη “ουρά” και μια υδρόφιλη κεφαλή, σχηματίζοντας έτσι αυθόρμητα μια λιπιδική διπλή στιβάδα σε ένα υδατικό μέσο. Αρκετές έρευνες εστιάζουν στην οργάνωση των φωσφολιπιδίων σε ένα DES. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε η ικανότητα των φωσφολιπιδίων να σχηματίζουν κυστίδια μέσα σε ένα DES αποτελούμενο από χολίνη και ουρία, μέσω μιας τεχνικής διεϊσδυσης διαλύτη. Επιπρόσθετα, πραγματοποιούνται μελέτες σχετικά με την αλληλεπίδραση των DES με την λιπιδική μεμβράνη στο μοριακό επίπεδο, και μέχρι στιγμής δεν έχει διαπιστωθεί κάποια αλλοίωση της δομής της κατά την εισαγωγή ενός δότη δεσμού υδρογόνου σε αυτήν.<sup>12</sup>

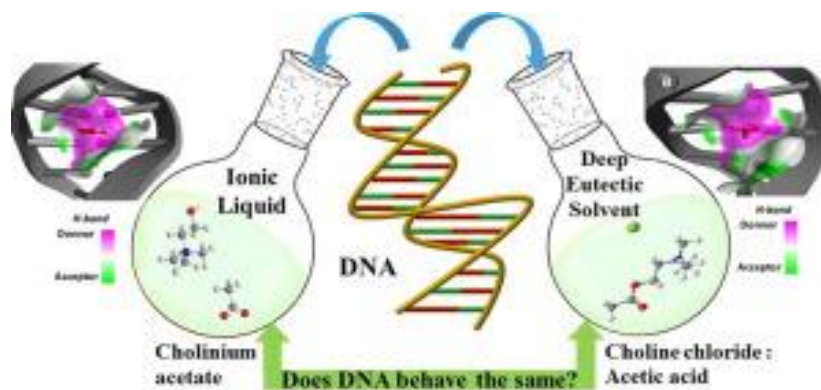
## **DES - Πολυσακχαρίτες**

Οι πολυσακχαρίτες αντιπροσωπεύουν μια κατηγορία βιολογικών πολυμερών. Στους ζωντανούς οργανισμούς εντοπίζονται δύο κατηγορίες πολυσακχαριτών: οι πολυσακχαρίτες αποθήκευσης όπως είναι το άμυλο ή το γλυκογόνο, και οι δομές πολυσακχαριτών όπως είναι η κυτταρίνη. Εκτός από τις φυσικές τους ιδιότητες, τα συγκεκριμένα μακρομόρια έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων λόγω των φαρμακευτικών τους ιδιοτήτων.<sup>12</sup>

Σύμφωνα με μελέτες τα DES χρησιμοποιούνται ως πράσινοι διαλύτες, για διαλυτοποίηση, εκχύλιση και πλαστικοποίηση πολλών πολυσακχαριτών. Για παράδειγμα εξετάστηκαν τρία διαφορετικά DES με βάση τη χλωριούχο χολίνη και ως δότη δεσμού υδρογόνου την ουρία, το κιτρικό και το ηλεκτρικό οξύ, ως πλαστικοποιητές για το άμυλο της πατάτας. Γενικά, οι πλαστικοποιητές χαρακτηρίζονται ως χαμηλού μοριακού βάρους μόρια, ικανά να διαταράξουν τους διαμοριακούς δεσμούς ενός πολυσακχαρίτη εξαιτίας του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου με τις ομάδες υδροξυλίου του πολυσακχαρίτη.

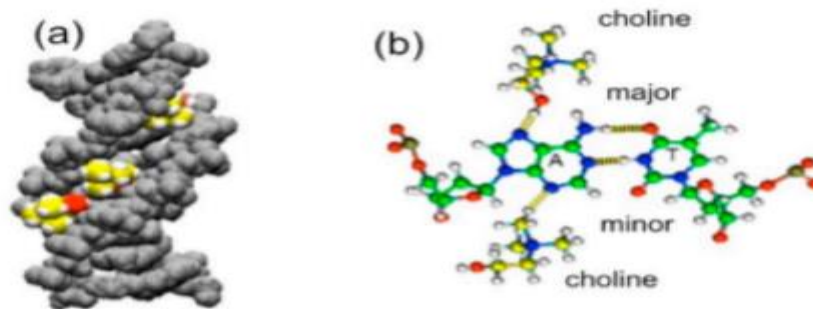
### 3.6 Η σταθερότητα του DNA κατά την αλληλεπίδρασή του με βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες

Το DNA, όπως προαναφέρθηκε, περιέχει όλες τις γενετικές πληροφορίες ενός οργανισμού κάτι το οποίο το καθιστά ύψιστης σημασίας μόριο για την ανθρώπινη ζωή. Έτσι πραγματοποιούνται συνεχώς προσπάθειες εύρεσης εναλλακτικών διαλυτών για το συγκεκριμένο μόριο με σκοπό να διατηρηθεί η σταθερότητά του. Τα ιοντικά υγρά (ILs) και οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DESS) έχει διαπιστωθεί ότι είναι δυο από τους πιο φιλικούς διαλύτες για το DNA, με το οποίο αλληλεπιδρούν στην κύρια ή δευτερεύουσα αύλακα.<sup>24,25,28,29</sup>



Εικόνα 12: Ανάμιξη του DNA με ILs και DESS. <sup>29</sup>

Η δομή της έλικας του DNA πολλές φορές επηρεάζεται από τη θερμοκρασία και το pH και είναι πιθανό να οδηγήσει σε μειωμένη σταθερότητα, κάτι το οποίο αποτελεί σημαντικό μειονέκτημα στις βιοτεχνολογικές διεργασίες που βασίζονται σε νουκλεϊκά οξέα. Για αυτόν τον λόγο, έχουν διεξαχθεί αρκετά πειράματα με φασματοσκοπικές μεθόδους για έλεγχο της δομής του DNA και RNA σε ένα DES προκειμένου να διαπιστωθεί αν επιτυγχάνεται η σταθερότητα του DNA κατά την αλληλεπίδρασή τους. Για παράδειγμα τα DES που έχουν ως βάση τη χλωριούχο χολίνη επιτυγχάνουν μεγάλη σταθερότητα, καθώς τα ιόντα της χολίνης αλληλοεπιδρούν με άτομα που εντοπίζονται σε όλες τις περιοχές του DNA και λόγω της δημιουργίας πολλαπλών δεσμών υδρογόνου είναι ικανά να σταθεροποιήσουν την έλικα του DNA με αποτελεσματικότερο τρόπο συγκριτικά με τα υδατικά διαλύματα. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι τα κατιόντα συμμετέχουν στη σταθεροποίηση περισσότερο από ότι τα ανιόντα, τα οποία δημιουργούν αλληλεπιδράσεις μόνο με τις αζωτούχες βάσεις μέσω δεσμών υδρογόνου. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 13, τα ιόντα της χολίνης έχουν υψηλή “συγγένεια” με τις αζωτούχες βάσεις αδενίνη – θυμίνη που βρίσκονται στη δευτερεύουσα αύλακα του DNA, η οποία εξασφαλίζει ένα καλύτερο και φιλικότερο περιβάλλον συγκριτικά με την κύρια αύλακα.<sup>31</sup>



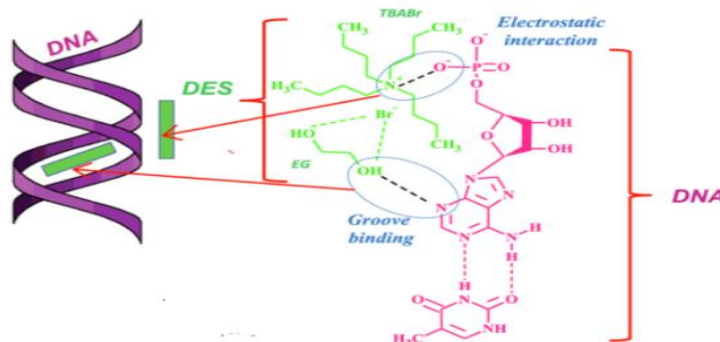
Εικόνα 13: Αλληλεπίδραση της χλωριούχου χολίνης με τη δευτερεύουσα αύλακα του DNA. <sup>31</sup>

### 3.6.1 Πρόσδεση ενός DES στο μόριο του DNA

Τα τελευταία χρόνια οι επιστήμονες έχουν ενσωματώσει τους βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες στον τομέα της βιοτεχνολογίας, εστιάζοντας κυρίως στην επίδραση που έχουν στο DNA. Οι DES συνδέονται με το DNA μέσω διάφορων ειδών αλληλεπιδράσεων, όπως είναι η παρεμβολή, η δέσμευση ενός μορίου σε αύλακα του DNA, ή μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Κάθε DES έχει διαφορετική ικανότητα πρόσδεσης στο DNA, κάτι το οποίο εξαρτάται από φυσικοχημικούς παράγοντες όπως είναι η σταθερά αλληλεπίδρασης  $K_b$  και η ελεύθερη ενέργεια του Gibbs  $\Delta G$  και αναλύεται μέσω φασματοσκοπικών τεχνικών. Έχει βρεθεί ότι η σύνδεση ευνοείται όσο πιο μεγάλη είναι η σταθερά  $K_b$  και όσο μικρότερη η  $\Delta G$ .

Συμπερασματικά, ο συνδυασμός ηλεκτροστατικών, πολικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του θύμου αδένου του DNA και ενός ευτηκτικού μίγματος συμβάλλουν καθοριστικά στη σταθερότητα του DNA.

Στην Εικόνα 14, παρουσιάζεται ένα παράδειγμα πρόσδεσης του ευτηκτικού μίγματος με συστατικά το βρωμιούχο τετραβουτυλαμμώνιο και αιθυλενογλυκόλη (TBABr:EG) στη μικρή αύλακα του DNA ενισχύοντας τη σταθερότητά του. <sup>33</sup>



Εικόνα 14: Πρόσδεση ενός DES στη μικρή αύλακα του DNA. <sup>33</sup>

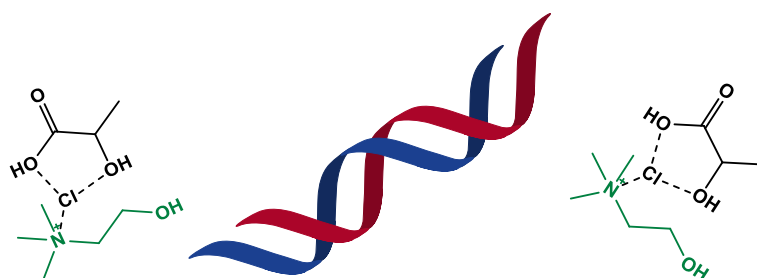
# Πειραματικό Μέρος

## 4 Πειραματική διαδικασία

### 4.1 Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση θεραπευτικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών, οι οποίοι αποτελούνται από φυσικά συστατικά, και η μετέπειτα μελέτη της αλληλεπίδρασής τους με το DNA. Με αυτόν τον τρόπο αξιολογείται η ικανότητα ορισμένων πράσινων διαλυτών, όπως οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες φυσικής προέλευσης (NaDES), να λειτουργούν ως μέσα για τη θεραπεία σοβαρών ασθενειών.

Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιείται ο σχεδιασμός και η παρασκευή τριών διαφορετικών σειρών NaDES. Η πρώτη έχει ως δέκτη πρωτονίου (HBA) τη χλωριούχο χολίνη, η δεύτερη τη βεταΐνη και η τρίτη αμινοξέα (την L-προλίνη και την β-αλανίνη) και οργανικά οξέα ως δότες δεσμών υδρογόνου (HBD). Παράλληλα πραγματοποιείται χαρακτηρισμός των τελικών ευτηκτικών μιγμάτων μέσω διαφόρων φασματοσκοπικών μεθόδων, όπως είναι η φασματοσκοπία NMR, FT-IR, και TGA, λαμβάνοντας σημαντικές πληροφορίες από τα φάσματα για τον κάθε διαλύτη.



Η οργανική σύνθεση των συγκεκριμένων διαλυτών αποσκοπεί στη μετέπειτα πραγματοποίηση υπολογιστικής μελέτης και φασματοσκοπικής ανάλυσης για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης του ctDNA με τα συστατικά, τα φυσικά μίγματα και κυρίως με τα NaDES. Κριτήριο αλληλεπίδρασης της κάθε ένωσης με το μόριο του DNA αποτελεί η σταθερά σύνδεσης Kb. Επιπλέον, οι αλλαγές που πραγματοποιούνται στην απορρόφηση ή οι πιθανές μετατοπίσεις του μήκους κύματος μας δίνουν πληροφορίες σχετικά με την ύπαρξη υποχρωμίας ή υπερχρωμίας.

## 4.2 Όργανα – Συσκευές

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) παρουσιάζονται τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους.

Πίνακας 1: Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν

| Όργανα και Συσκευές              | Μοντέλο                             | Κατασκευαστής       |
|----------------------------------|-------------------------------------|---------------------|
| Ζυγός ακριβείας (μέχρι 110g)     | Explorer                            | OHAUS               |
| Ζυγός ακριβείας (μέχρι 2g)       | M2P                                 | Sartorius           |
| Αναδευτήρας τύπου Vortex         | ZX4                                 | Velp                |
| Πεχάμετρο                        | 744                                 | Metrohm             |
| Λυοφιλοποιητής                   | Lablyo Mini                         | Frozen in Time Ltd. |
| Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού | Rotavapor R-114/<br>Waterbath B-480 | Buchi               |
| Φασματοφωτόμετρο UV-Vis          | V-770 UV-Vis / NIR                  | Jasco               |
| Φασματόμετρο NMR                 | 600 MHz                             | Varian              |
| Φασματόμετρο FT-IR               | 4000                                | Jasco               |

## 4.3 Μέθοδοι - Χαρακτηρισμοί

### 4.3.1 Φασματοσκοπία NMR

Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) είναι ένα φυσικό φαινόμενο στο οποίο οι πυρήνες σε ένα μαγνητικό πεδίο απορροφούν και επανεκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Αυτή η ενέργεια έχει μια συγκεκριμένη συχνότητα συντονισμού που εξαρτάται από την ισχύ του μαγνητικού πεδίου και τις μαγνητικές ιδιότητες του ισότοπου των ατόμων. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την παρατήρηση ειδικών κβαντικών μαγνητικών ιδιοτήτων του ατομικού πυρήνα. Τελικά, ένα φάσμα είναι ένα διάγραμμα των κορυφών απορρόφησης σε συνάρτηση με τη συχνότητα.

Στην παρούσα εργασία, το NMR χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των μοριακών δομών των δειγμάτων που παρασκευάζονται. Για τη λήψη των φασμάτων, μικρή ποσότητα ενός DES διαλύεται σε περίπου 800μL διαλύτη (DMSO-d<sub>6</sub>).

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πραγματοποιήθηκε με χρήση του οργάνου Varian Gemini 600 MHz. Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων δίνονται σε ppm και των σταθερών συζεύξεως J σε Hz. Η πολλαπλότητα των σημάτων στα φάσματα περιγράφεται ως εξής:

- s (singlet - απλό)
- d (doublet - διπλό)
- t (triplet - τριπλό)
- q (quartet - τετραπλό)
- m (multiplet - πολλαπλό)
- br (broad - ευρύ)

### 4.3.2 Φασματοσκοπία FT-IR

Η υπέρυθη φασματοσκοπία αποτελεί μια οπτική μέθοδο ανάλυσης, η οποία βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μιας ένωσης που διεγείρονται σε υψηλότερες στάθμες δόνησης όταν αυτές είναι κβαντισμένες. Τοποθετείται μικρή ποσότητα διαλύτη στην υποδοχή ATR και πραγματοποιείται μελέτη αλληλεπίδρασής τους με την ακτινοβολία να κυμαίνεται μεταξύ 4000 - 400 cm<sup>-1</sup>.

### 4.3.3 Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA)

Η θερμοσταθμική ανάλυση ανήκει σε μια κατηγορία θερμικών μεθόδων ανάλυσης. Συγκεκριμένα στα δείγματα προς ανάλυση, αφού θερμανθούν υπό ελεγχόμενες συνθήκες (20-600°C), παρατηρούνται φαινόμενα αυξομείωσης τους βάρους τους. Τελικά λαμβάνεται μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου ανάλυσης μια καμπύλη βάρους που καταγράφει την απώλεια βάρους συναρτήσει της θερμοκρασίας του δείγματος. Η πρώτη παράγωγος της καμπύλης ονομάζεται

καμπύλη διαφορικής ανάλυσης και αντιπροσωπεύει τον ρυθμό μείωσης ή αύξησης του δείγματος.



#### 4.4 Σύνθεση NaDES

Για τη σύνθεση των NaDES, χρησιμοποιήθηκαν ως κύρια συστατικά: η χλωριούχος χολίνη, η βεταΐνη, και αμινοξέα (L-προλίνη και β- αλανίνη), τα οποία σε κατάλληλες αναλογίες με επιλεγμένα οργανικά οξέα οδήγησαν στον σχηματισμό ευτηκτικών συστημάτων.

Έτσι παρασκευάστηκαν τρεις διαφορετικές σειρές ευτηκτικών μιγμάτων, οι οποίες παρουσιάζονται στους τρεις παρακάτω πίνακες (Πίνακας 2-4) μαζί με τη μοριακή αναλογία και τη μέθοδο σύνθεσής τους:

Πίνακας 2: NaDES που παράχθηκαν με συστατικό τη χλωριούχο χολίνη

| Κωδικός | Συστατικό 1       | Συστατικό 2         | Συστατικό 3 | Μοριακή Αναλογία | Μέθοδος Σύνθεσης |
|---------|-------------------|---------------------|-------------|------------------|------------------|
| 1       | Χλωριούχος Χολίνη | Τρυγικό οξύ         | -           | 2:1              | I                |
| 2       | Χλωριούχος Χολίνη | Λεβουλικό οξύ       | -           | 2:1              | I                |
| 3       | Χλωριούχος Χολίνη | Γλυκερόλη           | -           | 1:2              | I                |
| 4       | Χλωριούχος Χολίνη | Κιτρικό οξύ         | -           | 1:1              | III              |
| 5       | Χλωριούχος Χολίνη | Κιτρικό οξύ         | -           | 1:2              | I                |
| 6       | Χλωριούχος Χολίνη | D, L- Γαλακτικό οξύ | -           | 1:1.5            | I                |
| 7       | Χλωριούχος Χολίνη | Οξαλικό οξύ         | -           | 1:1              | I                |
| 8       | Χλωριούχος Χολίνη | Ασκορβικό οξύ       | -           | 2:1              | I                |

Πίνακας 3: NaDES που παράχθηκαν με συστατικό τη βεταΐνη

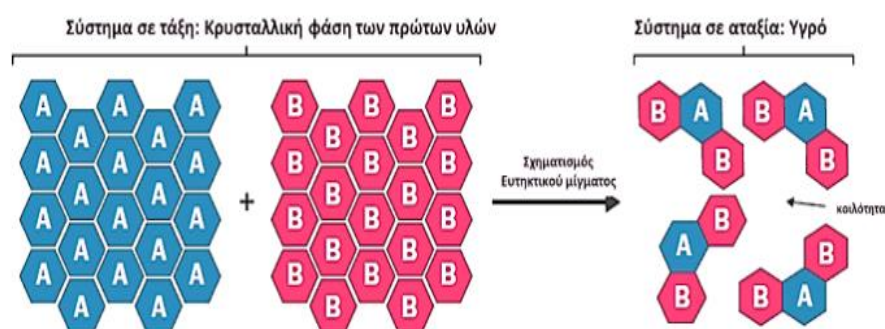
| Κωδικός | Συστατικό 1 | Συστατικό 2         | Συστατικό 3 | Μοριακή Αναλογία | Μέθοδος Σύνθεσης |
|---------|-------------|---------------------|-------------|------------------|------------------|
| 9       | Βεταΐνη     | D, L- Γαλακτικό οξύ | -           | 1:2              | I                |
| 10      | Βεταΐνη     | Λεβουλικό οξύ       | -           | 1:2              | I                |
| 11      | Βεταΐνη     | Οξαλικό οξύ         | -           | 1:1              | I                |
| 12      | Βεταΐνη     | Οξαλικό οξύ         | -           | 1:2              | III              |
| 13      | Βεταΐνη     | Τρυγικό οξύ         | -           | 2:1              | I                |
| 14      | Βεταΐνη     | Τρυγικό οξύ         | -           | 2:1              | III              |
| 15      | Βεταΐνη     | Κιτρικό οξύ         | -           | 1:1              | I                |
| 16      | Βεταΐνη     | Γλυκερόλη           | -           | 1:3              | I                |

Πίνακας 4: NaDES που παράχθηκαν με συστατικό τα αμινοξέα (L-προλίνη και β-αλανίνη)

| Κωδικός | Συστατικό 1 | Συστατικό 2        | Συστατικό 3 | Μοριακή Αναλογία | Μέθοδος Σύνθεσης |
|---------|-------------|--------------------|-------------|------------------|------------------|
| 17      | L-Προλίνη   | D, L-Γαλακτικό οξύ | -           | 1:2              | I                |
| 18      | L-Προλίνη   | Οξαλικό οξύ        | -           | 1:1              | I                |
| 19      | L-Προλίνη   | Κιτρικό οξύ        | -           | 2:1              | II               |
| 20      | B - Αλανίνη | D, L-Γαλακτικό οξύ | -           | 1:2              | I                |

#### 4.4.1 Πειραματική διαδικασία

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 15), απεικονίζεται η βασική μέθοδος σύνθεσης των NaDES και στη συνέχεια αναλύεται η κάθε μέθοδος που εφαρμόστηκε για τη σύνθεση όλων των ευτηκτικών μιγμάτων.



Εικόνα 15: Απεικόνιση του συνδυασμού ενός δότη και ενός δέκτη πρωτονίου με σκοπό τη σύνθεση ενός ευτηκτικού μίγματος.

#### Μέθοδος I

Για τη σύνθεση των τριών διαφορετικών σειρών NaDES, χρησιμοποιήθηκε κυρίως η συμβατική μέθοδος ανάδευσης του συστήματος υπό θέρμανση. Συγκεκριμένα, υπολογίζονται στοιχειομετρικά οι ποσότητες των συστατικών που απαρτίζουν το κάθε DES και ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας. Στη συνέχεια αναμιγνύονται τα συστατικά κάτω από συνθήκες ήπιας ανάδευσης και θέρμανσης (η θερμοκρασία συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 50-80°C), με χρήση μαγνητικού αναδευτήρα, έως ότου μετατραπούν σε διαυγή ρευστά (Εικόνα 16). Ο χρόνος ανάδευσης ποικίλλει ανάλογα με τον κάθε συνδυασμό συστατικών που χρησιμοποιείται. Έπειτα τα δείγματα τοποθετούνται σε ξηραντήρα, προκειμένου να απομακρυνθεί πιθανό υπόλειμμα υγρασίας.

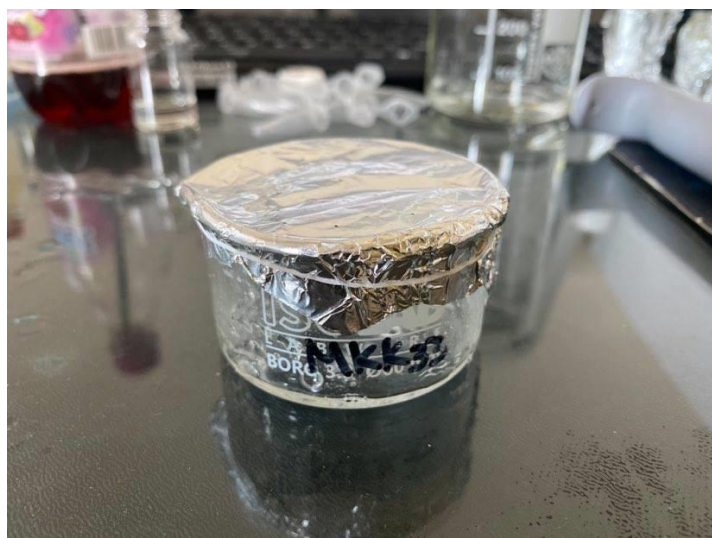
Να σημειωθεί ότι πριν ξεκινήσει η παραπάνω διαδικασία, η χλωριούχος χολίνη που είναι το μοναδικό υγροσκοπικό συστατικό που χρησιμοποιήθηκε, τοποθετήθηκε σε αντλία υπό κενό μέχρι σταθερού βάρους.



*Εικόνα 16: Σύνθεση ενός NaDES με τη μέθοδο I.*

## **Μέθοδος II**

Υπολογίζονται στοιχειομετρικά οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που θα απαρτίσουν το DES, και μετά την προσθήκη μικρής ποσότητας νερού (προστέθηκαν 3mL απιονισμένου νερού), το μίγμα τοποθετείται σε κρυσταλλωτήριο και καταψύχεται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Έπειτα το δείγμα ξηραίνεται υπό κατάψυξη για χρονικό διάστημα 48 ωρών. Τέλος λαμβάνεται ένα διαυγές ιξώδες υγρό.



*Εικόνα 17: Σύνθεση ενός NaDES με τη μέθοδο II.*

### **Μέθοδος III**

Υπολογίζονται στοιχειομετρικά οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που θα απαρτίζουν το DES, και στη συνέχεια το μίγμα διαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού. Ακολουθεί εξάτμιση με χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα κενού (Εικόνα 18), και η μέθοδος τερματίζεται όταν επιτευχθεί σταθερό βάρος του δείγματος. Το DES που παραλαμβάνεται τοποθετείται σε ξηραντήρα, προκειμένου να απομακρυνθεί πιθανό υπόλειμμα υγρασίας.



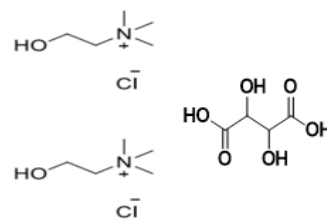
*Εικόνα 18: Σύνθεση ενός NaDES με τη μέθοδο III.*

## 4.4.2 Χαρακτηρισμός των DES

### ➤ 1<sup>η</sup> σειρά NaDES

#### Χλωριούχος χολίνη - Τρυγικό οξύ 2:1 (1)

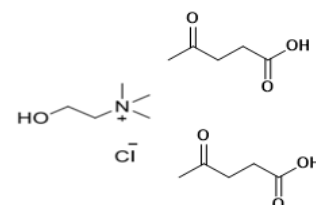
Η χλωριούχος χολίνη αρχικά τοποθετείται σε αντλία υψηλού κενού για περίπου 2 ώρες λόγω του υγροσκοπικού της χαρακτήρα. Έπειτα αναμιγνύονται σε μια προ ζυγισμένη σφαιρική φιάλη η χλωριούχος χολίνη και το τρυγικό οξύ σε αναλογία 2:1 και ακολουθεί ήπια ανάδευση και θέρμανση στους 70°C για περίπου 24 ώρες. Η θερμοκρασία είναι υψηλή καθώς το συγκεκριμένο μίγμα αποτελείται από δυο στερεά. Επιπλέον κατά την ανάδευση εφαρμόζονται αδρανή συνθήκες με την προσθήκη αέριου αζώτου.



**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm): 4.31 (2H, s, -CH tartaric acid), 3.8 (4H, br, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-N-CH<sub>2</sub>), 3.44 (4H, t, J = 5 Hz, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH), 3.15 (18 H, s, 6 x CH<sub>3</sub>).

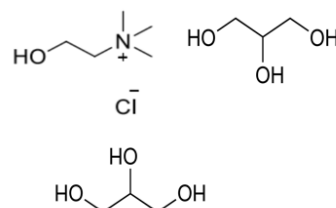
#### Χλωριούχος χολίνη - Λεβουλινικό οξύ 1:2 (2)

Η χλωριούχος χολίνη αρχικά τοποθετείται σε αντλία υψηλού κενού για περίπου 2 ώρες λόγω του υγροσκοπικού της χαρακτήρα. Έπειτα αναμιγνύονται σε μια προ ζυγισμένη σφαιρική φιάλη η χλωριούχος χολίνη και το λεβουλινικό οξύ αναλογία 1:2 και ακολουθεί ήπια ανάδευση και θέρμανση στους 50°C για περίπου 3 ώρες. Επιπλέον κατά την ανάδευση εφαρμόζονται αδρανή συνθήκες με την προσθήκη αέριου αζώτου.



### Χλωριούχος χολίνη – Γλυκερόλη 1:3 (3)

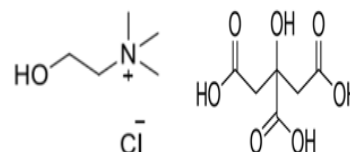
Η χλωριούχος χολίνη αρχικά τοποθετείται σε αντλία υψηλού κενού για περίπου 2 ώρες λόγω του υγροσκοπικού της χαρακτήρα. Έπειτα αναμιγνύονται σε μια προ ζυγισμένη σφαιρική φιάλη η χλωριούχος χολίνη και η γλυκερόλη σε αναλογία 1:2 και ακολουθεί ήπια ανάδευση και θέρμανση στους 50°C. Επιπλέον κατά την ανάδευση εφαρμόζονται αδρανή συνθήκες με την προσθήκη αέριου αζώτου. Επιπλέον κατά την ανάδευση εφαρμόζονται αδρανή συνθήκες με την προσθήκη αέριου αζώτου.



**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)** 5.51(t, J = 5.1 Hz, -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, 1H), 4.54 (d, J = 4.8 Hz, 2(-CHOH), 2H), 4.47 (t, J = 5.8 Hz, 2(2(-CH<sub>2</sub>OH)), 4H), 3.85 -3.78 (m, 2H), 3.47-3.38 (m, 4H), 3.35 (dt, J = 11.2, 5.7 Hz, 4H), 3.28 (dt, J = 11.0, 5.6 Hz, 4H), 3.13 (s, 9H, 3(-CH<sub>3</sub>))

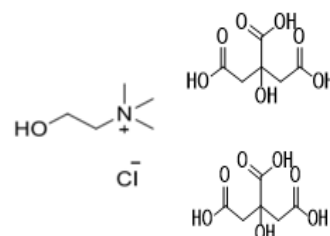
### Χλωριούχος χολίνη – Κιτρικό οξύ 1:1 (4)

Η χλωριούχος χολίνη αρχικά τοποθετείται σε αντλία υψηλού κενού για περίπου 2 ώρες λόγω του υγροσκοπικού της χαρακτήρα. Έπειτα αναμιγνύονται σε μια προ ζυγισμένη σφαιρική φιάλη η χλωριούχος χολίνη και το κιτρικό οξύ σε αναλογία 1:1 και ακολουθεί διάλυση του μίγματος σε μικρή ποσότητα νερού (περίπου 1mL) και εξάτμιση με χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα κενού για περίπου μισή ώρα (Μέθοδος III).



### Χλωριούχος χολίνη – Κιτρικό οξύ 1:2 (5)

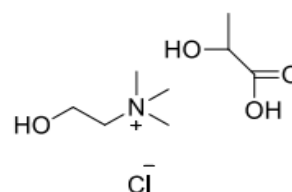
Η χλωριούχος χολίνη αρχικά τοποθετείται σε αντλία υψηλού κενού για περίπου 2 ώρες λόγω του υγροσκοπικού της χαρακτήρα. Έπειτα αναμιγνύονται σε μια προ ζυγισμένη σφαιρική φιάλη η χλωριούχος χολίνη και το κιτρικό οξύ σε αναλογία 1:2 και ακολουθεί ήπια ανάδευση και θέρμανση στους 80°C. Επιπλέον κατά την ανάδευση εφαρμόζονται αδρανή συνθήκες με την προσθήκη αέριου αζώτου.





### Χλωριούχος χολίνη – D,L-Γαλακτικό οξύ 1:1.5 (6)

Η χλωριούχος χολίνη αρχικά τοποθετείται σε αντλία για περίπου 2-3 ώρες λόγω του υγροσκοπικού της χαρακτήρα. Έπειτα αναμιγνύονται σε μια προ ζυγισμένη σφαιρική φιάλη η χλωριούχος χολίνη και το γαλακτικό οξύ σε αναλογία 1:1.5 και ακολουθεί ήπια ανάδευση και θέρμανση στους 50°C. Επιπλέον κατά την ανάδευση εφαρμόζονται αδρανή συνθήκες με την προσθήκη αέριου αζώτου.



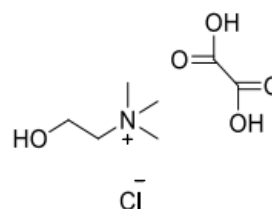
**TGA:** T<sub>onset</sub> = 259.2°C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) 4.03(q, -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

### Χλωριούχος Χολίνη – Οξαλικό οξύ 1:1 (7)

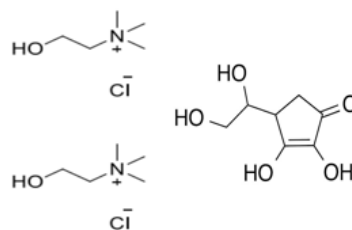
Η χλωριούχος χολίνη αρχικά τοποθετείται σε αντλία υψηλού κενού για περίπου 1 ώρα λόγω του υγροσκοπικού της χαρακτήρα. Έπειτα αναμιγνύονται σε μια προ ζυγισμένη σφαιρική φιάλη η χλωριούχος χολίνη και το οξαλικό οξύ σε αναλογία 1:1 και ακολουθεί ήπια ανάδευση και θέρμανση στους 50°C. Επιπλέον κατά την ανάδευση εφαρμόζονται αδρανή συνθήκες με την προσθήκη αέριου αζώτου.



**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) 3.83-3.82(m, -CH<sub>2</sub> [CC], 2H), 3.41(t, J=5.1Hz, -CH<sub>2</sub> [CC], 2H), 3.12(s, -CH<sub>3</sub> [CC], 9H).

### Χλωριούχος Χολίνη – Ασκορβικό οξύ 2:1 (8)

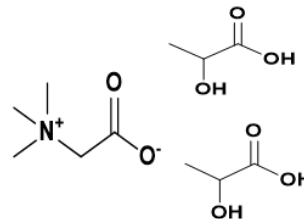
Η χλωριούχος χολίνη αρχικά τοποθετείται σε αντλία υψηλού κενού για περίπου 2 ώρες λόγω του υγροσκοπικού της χαρακτήρα. Έπειτα αναμιγνύονται σε μια προ ζυγισμένη σφαιρική φιάλη η χλωριούχος χολίνη και το ασκορβικό οξύ σε αναλογία 2:1 και ακολουθεί ήπια ανάδευση και θέρμανση. Επιπλέον κατά την ανάδευση εφαρμόζονται αδρανή συνθήκες με την προσθήκη αέριου αζώτου.



### ➤ 2<sup>η</sup> σειρά NaDES

#### Βεταΐνη – D,L-Γαλακτικό οξύ 1:2 (9)

Σε μια προ ζυγισμένη σφαιρική φιάλη αναμιγνύονται κατάλληλες ποσότητες βεταΐνης και γαλακτικού οξέος σε αναλογία 1:2. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και θέρμανση στους 50°C, υπό αδρανή συνθήκες.



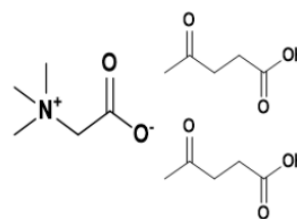
**TGA:** T<sub>onset</sub> = 243.7°C

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) 4.03(q, J=6.6Hz, -CH [LA], 2H), 3.70(s, -CH<sub>2</sub> [Be], 2H), 3.15(s, -CH<sub>3</sub> [Be], 9H), 1.22(d, J=6.6Hz, -CH<sub>3</sub> [LA], 6H).

**FT-IR-ATR:** ν/cm<sup>-1</sup>: 3405.7(N-R, O-H), 2985.3, 1726.9(C=O), 1629.6, 1400.1, 1130.1 cm<sup>-1</sup>

#### Βεταΐνη – Λεβουλικό οξύ 1:2 (10)

Σε μια προ ζυγισμένη σφαιρική φιάλη αναμιγνύονται κατάλληλες ποσότητες βεταΐνης και λεβουλικού οξέος σε αναλογία 1:2. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και θέρμανση στους 50°C, υπό αδρανή συνθήκες.

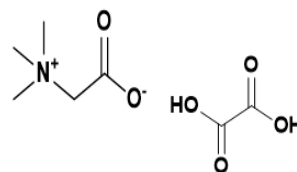




**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm)** 3.90(s, -CH<sub>2</sub>, [Be], 2H), 3.25(s, -CH<sub>3</sub>, [Be], 9H), 2.65 (t, J=6Hz, -CH<sub>2</sub>, [LA], 4H), 2.50(t, J=6Hz, -CH<sub>2</sub>, [LA], 4H), 2.12(s, -CH<sub>3</sub>, [LA], 6H)

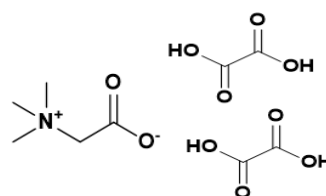
### Βεταΐνη – Οξαλικό οξύ 1:1 (11)

Σε μια προ ζυγισμένη σφαιρική φιάλη αναμιγνύονται κατάλληλες ποσότητες βεταΐνης και οξαλικού οξέος σε αναλογία 1:1. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και θέρμανση στους 50°C, υπό αδρανή συνθήκες.



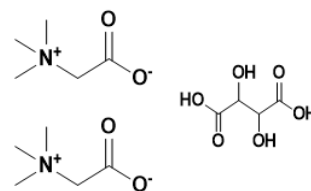
### Βεταΐνη – Οξαλικό οξύ 1:2 (12)

Σε μια προ ζυγισμένη σφαιρική φιάλη αναμιγνύονται κατάλληλες ποσότητες βεταΐνης και οξαλικού οξέος σε αναλογία 1:2. Ακολουθεί διάλυση του μίγματος σε μικρή ποσότητα νερού (περίπου 1mL) και εξάτμιση με χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα για περίπου μισή ώρα (Μέθοδος III).



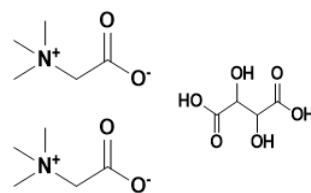
### Βεταΐνη – Τρυγικό οξύ 2:1 (13)

Σε μια προ ζυγισμένη σφαιρική φιάλη αναμιγνύονται κατάλληλες ποσότητες βεταΐνης και τρυγικού οξέος σε αναλογία 2:1. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και θέρμανση στους 60°C, υπό αδρανή συνθήκες.



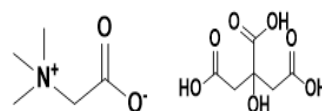
### Βεταΐνη – Τρυγικό οξύ 2:1 (14)

Σε μια προ ζυγισμένη σφαιρική φιάλη αναμιγνύονται κατάλληλες ποσότητες βεταΐνης και οξαλικού οξέος σε αναλογία 2:1. Ακολουθεί διάλυση του μίγματος σε μικρή ποσότητα νερού (περίπου 1mL) και εξάτμιση με χρήση περιστροφικού εξατμιστήρα για περίπου μισή ώρα.



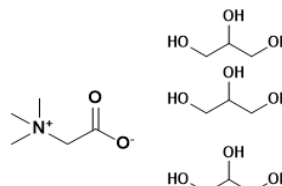
### Βεταΐνη – Κιτρικό οξύ 1:1 (15)

Σε μια προ ζυγισμένη σφαιρική φιάλη αναμιγνύονται κατάλληλες ποσότητες βεταΐνης και κιτρικού οξέος σε αναλογία 1:1. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και θέρμανση στους 90°C, υπό αδρανή συνθήκες.



### Βεταΐνη – Γλυκερόλη 1:3 (16)

Σε μια προ ζυγισμένη σφαιρική φιάλη αναμιγνύονται κατάλληλες ποσότητες βεταΐνης και γλυκερόλης σε αναλογία 1:3. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και θέρμανση στους 50°C για περίπου 24h, υπό αδρανή συνθήκες

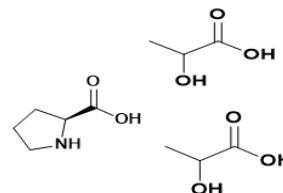


**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) 3.55(s, -CH<sub>2</sub> [Be], 2H), 3.13(s, -CH<sub>3</sub> [Be], 9H), 3.44-3.40(m, -CH<sub>2</sub>, [Gly], 6H), 3.38-3.32(m, -CH<sub>2</sub>, [Gly], 6H), 3.30-3.26(m, -CH<sub>2</sub>, [Gly], 6H).

### ➤ 3<sup>η</sup> σειρά NaDES

### L-Προλίνη – D,L-Γαλακτικό οξύ 1:2 (17)

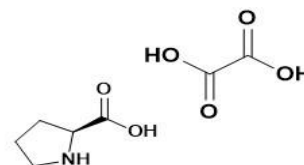
Σε μια προ ζυγισμένη σφαιρική φιάλη αναμιγνύονται κατάλληλες ποσότητες προλίνης και γαλακτικού οξέος σε αναλογία 1:2. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και θέρμανση στους 80°C, υπό αδρανή συνθήκες.



**FT-IR-ATR:** ν (cm<sup>-1</sup>) 2969.1(O-H), 2539.8, 1731.8(C=O), 1230.4, 1126.2, 1043.3, 821.5

### L-Προλίνη – Οξαλικό οξύ 1:1 (18)

Σε μια προ ζυγισμένη σφαιρική φιάλη αναμιγνύονται κατάλληλες ποσότητες προλίνης και οξαλικού οξέος σε αναλογία 1:1. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και θέρμανση στους 80°C, υπό αδρανή συνθήκες.

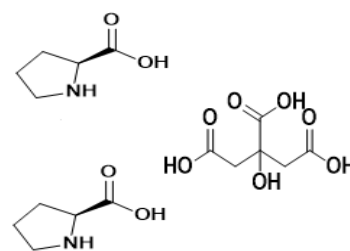


**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ(ppm) 7.69(s, -OH, -NH, [Pro], [OA], 4H), 4.08(t, J=7.8 Hz, -CH, [Pro], 1H), 1.83(m, -CH<sub>2</sub>, [Pro], 2H).

**FT-IR-ATR:** ν (cm<sup>-1</sup>) 3534.6(N-H), 2950.2(O-H), 1727.9(C=O), 1228.4

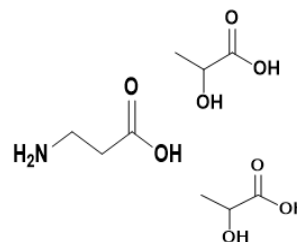
### L-Προλίνη – Κιτρικό οξύ 2:1 (19)

Σε μια προ ζυγισμένη σφαιρική φιάλη αναμιγνύονται κατάλληλες ποσότητες προλίνης και γαλακτικού οξέος σε αναλογία 2:1. Ακολουθεί προσθήκη μικρής ποσότητας νερού (περίπου 3ml), και το τελικό μίγμα τοποθετείται σε ένα κρυσταλλωτήριο, το οποίο καταψύχεται σε χαμηλές θερμοκρασίες για περίπου δύο 24ωρα (Μέθοδος II).



### B- αλανίνη – D,L-Γαλακτικό οξύ 1:2 (20)

Σε μια προ ζυγισμένη σφαιρική φιάλη αναμιγνύονται κατάλληλες ποσότητες β - αλανίνης και γαλακτικού οξέος σε αναλογία 1:2. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και θέρμανση στους 70-80°C, υπό αδρανή συνθήκες.



## 4.5 Αλληλεπίδραση με το ctDNA

### 4.5.1 Υπολογιστική Μελέτη (Molecular Docking)

Για τον σχεδιασμό των ενώσεων που θα εξεταστούν ως προς την αλληλεπίδρασή τους με το DNA χρησιμοποιείται το πρόγραμμα HyperChem 7.0 software (version 7.0, Hypercube, Inc, Gainesville, FL, USA, [www.hyper.com](http://www.hyper.com)). Επίσης για την απεικόνιση όλων των ενώσεων γίνεται χρήση του λογισμικού PyMol. Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων σύνδεσης επιτυγχάνεται μέσω του AutoDock Vina software (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA), εφαρμόζοντας εμπειρική λειτουργία ελεύθερης ενέργειας.

### 4.5.2 Τιτλοδότηση ορατού - υπεριώδους (UV - Vis)

#### 4.5.2.1 Γενική Μελέτη

Η φασματοσκοπία ορατού - υπεριώδους φωτός αποτελεί μια μέθοδο, η οποία βασίζεται στην απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από μια διαλυμένη ουσία. Πραγματοποιείται μέσω ενός φασματοφωτόμετρου (Εικόνα 19), το οποίο αποτελείται από την πηγή παραγωγής ακτινοβολίας και ένα τμήμα που διαχωρίζει το επιθυμητό μήκος κύματος από τα υπόλοιπα που παράγει η πηγή. Με αυτόν τον τρόπο παρέχεται στο δείγμα μονοχρωματική ακτινοβολία.



Εικόνα 19: Φασματοφωτόμετρο UV-VIS.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, η συγκεκριμένη φασματοσκοπική μέθοδος χρησιμοποιείται προκειμένου να ανιχνευθεί η ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ των παραγόμενων NaDES και του ctDNA (Calf thymus). Ο βαθμός επίδρασης ενός NaDES με το μόριο του DNA μπορεί να εκτιμηθεί μέσω της σταθεράς σύνδεσης με το DNA,  $K_b$ . Η σταθερά αυτή μπορεί να υπολογιστεί με βάση την εξίσωση Benesi-Hilderbrand:

$$\frac{1}{A_f - A_{obs}} = \frac{1}{A_f - A_{fc}} + \frac{1}{K_b \cdot (A_f - A_{fc}) \cdot [DNA]}$$

,όπου  $A_f$  : η απορρόφηση της ελεύθερης ένωσης,  $A_{obs}$  : η παρατηρούμενη απορρόφηση και  $A_{fc}$  : η απορρόφηση κορεσμού.<sup>26</sup>

Ο υπολογισμός της  $K_b$  για κάθε δείγμα πραγματοποιείται σε ένα αρχείο Excel σύμφωνα με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων.

Η μελετώμενη ένωση λοιπόν αλληλοεπιδρά με το μόριο του DNA και εμφανίζονται αλλαγές στην απορρόφηση ή/και μετατοπίσεις στο μήκος κύματος. Πιο συγκεκριμένα, κατά την παρεμβολή της ένωσης στο DNA παρατηρείται μείωση της απορρόφησης (υποχρωμία) με ταυτόχρονη μετατόπιση της απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (βαθυχρωμία, red-shift). Αντίθετα, σε περίπτωση συναρμογής της ένωσης στην εξωτερική επιφάνεια του DNA (external binding ή groove binding), παρατηρείται υπερχρωμία της ταινίας. Η υπερχρωμία σε κάποιες περιπτώσεις αποτελεί ένδειξη καταστροφής δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αζωτούχων βάσεων, συνεπώς και της δευτεροταγούς δομής του DNA. Επίσης η μετατόπιση της θέσης του  $\lambda_{max}$  υποδηλώνει σταθεροποίηση ή μη της έλικας του DNA μετά την αλληλεπίδραση με την εκάστοτε ένωση. Η βαθυχρωμία ή ερυθρή μετατόπιση δείχνει σταθεροποίηση της ελικοειδούς δομής του DNA λόγω αλληλεπίδρασης με την ένωση, σε αντίθεση με την μετατόπιση προς μικρότερα μήκη κύματος, υψιχρωμία ή κυανή μετατόπιση (blue-shift), που δείχνει αποσταθεροποίηση της έλικας του DNA.<sup>35</sup>

#### 4.5.2.2 Πειραματική διαδικασία

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας παρασκευάστηκαν τα εξής:

- **Ένα ρυθμιστικό διάλυμα Tris - HCl (10mM)**  
Ζυγίζονται περίπου 605.7mg Tris και αναμιγνύονται σε 500mL υπερκάθαρου νερού. Στη συνέχεια ρυθμίζεται το pH του διαλύματος κοντά στο 7.4 με τη χρήση σταγόνων HCl, περιεκτικότητας 10% v/v. Πρέπει να διατηρείται στο ψυγείο πριν χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή του διαλύματος DNA.
- **Διάλυμα ctDNA (10mM)**  
Παρασκευάζεται διάλυμα DNA με διάλυση ινών φυσικού DNA από θύμο αδένα (ctDNA) 1mg/mL, σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris - HCl. Πειραματικά ζυγίστηκαν 1.432 mg και διαλύθηκαν σε 1432 mL ρυθμιστικού

διαλύματος. Το διάλυμα αναδεύεται για 24 ώρες υπό ψύξη και παραμένει στο ψυγείο προκειμένου να διατηρηθεί σε χαμηλή θερμοκρασία πριν τη χρήση του.

- **Συγκεντρώσεις ctDNA από 0-400mM**

Παρασκευάζονται διαφορετικές συγκεντρώσεις ( $C=0,5,10,20,30,40,50,75,100,200,300$  και  $400\mu\text{M}$ ) ctDNA. Ο όγκος του CT-DNA που πρέπει να προστεθεί σε κάθε δείγμα υπολογίζεται από τον νόμο της αραιώσης, για γνωστές συγκεντρώσεις και τελικό όγκο.

- **Συγκεντρώσεις για τα συστατικά, τα NaDES και τα φυσικά μίγματα**

- 1. Συστατικά**

Διαλύεται κατάλληλη ποσότητα κάθε συστατικού σε  $1000\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl. Ακολουθεί ανάδευση του δείγματος στη συσκευή vortex. Η αρχική συγκέντρωση όλων των φυσικών συστατικών είναι  $C_{\text{αρχ}} = 10\text{mM}$ .

Για παράδειγμα, για το τρυγικό οξύ σε  $1000\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύθηκαν  $1,50\text{mg}$  ( $m=n \times Mr = 10^{-2}\text{mmol} \times 150,087 \text{ mg/mmol} \rightarrow m=1,50\text{mg}$ )

- 2. NaDES**

Από κάθε DES, ζυγίζονται  $10\text{mg}$  ένωσης τα οποία αναμιγνύονται σε  $1000\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl. Ακολουθεί ανάδευση σε συσκευή vortex.

Για παράδειγμα, από το DES βεταΐνης - τρυγικού οξέος ζυγίστηκαν  $14,2\text{mg}$  ένωσης, επομένως προστέθηκαν  $V=1420\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος.

- 3. Φυσικά μίγματα**

Κάθε φυσικό μίγμα παρασκευάζεται με βάση τη μοριακή αναλογία των συστατικών που θα αποτελέσουν το ευτηκτικό μίγμα.

Για παράδειγμα το φυσικό μίγμα χλωριούχου χολίνης - τρυγικού οξέος με αναλογία 2:1, παρασκευάζεται με την ανάμειξη  $200\mu\text{L}$  χολίνης και  $100\mu\text{L}$  τρυγικού οξέος, δηλαδή αναλογία όγκων. Ακολουθεί ανάδευση του δείγματος στη συσκευή vortex.

Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται τα αντιδραστήρια που είναι απαραίτητα για τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας.



*Εικόνα 20: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.*

Στο τελικό στάδιο, κατασκευάζονται 12 δείγματα τα οποία αποτελούνται από ανάμειξη κάθε συγκέντρωσης ctDNA και δείγματος (συστατικό, φυσικό μίγμα ή NaDES), καθώς ο τελικός όγκος του μίγματος έχει υπολογιστεί 1000μL και είναι σταθερός. Τα δείγματα τοποθετούνται σε αναδευτή με θέρμανση (Shaker), όπου παραμένουν για έναν απαιτούμενο χρόνο επώασης (περίπου 5 λεπτά), σε θερμοκρασία 37°C και σε ανάδευση 100 στροφών. Έπειτα γίνεται προετοιμασία του φασματοφωτόμετρου UV – VIS, και μετά από ρύθμιση των κατάλληλων παραμέτρων, γίνεται μελέτη κάθε δείγματος ξεχωριστά ως προς την αλληλεπίδρασή του με το DNA.



## 5 Αποτελέσματα - Συζήτηση

### 5.1 Σύνθεση NaDES

Κατά την πειραματική διαδικασία συντέθηκαν οχτώ NaDES με βασικό συστατικό τη χλωριούχο χολίνη, οχτώ NaDES με βασικό συστατικό τη βεταΐνη και τέσσερα NaDES με βασικό συστατικό αμινοξέα (L- προλίνη και β- αλανίνη). Για την σύνθεση των ευτηκτικών μιγμάτων επιλέχθηκαν συγκεκριμένα οργανικά οξέα, τα οποία χρησιμοποιούνται ήδη στις βιομηχανίες φαρμάκων, καλλυντικών και τροφίμων. Για παράδειγμα το κιτρικό οξύ βρίσκει πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, καθώς χρησιμοποιείται ως συντηρητικό ή αρωματικό συστατικό σε ορισμένα φρούτα. Έτσι οδηγούμαστε σε έναν στοχευμένο και ασφαλή σχεδιασμό των NaDES.

Η κύρια μέθοδος σύνθεσης που εφαρμόστηκε για όλες τις ενώσεις είναι η συμβατική (Μέθοδος I), υπό συνθήκες ήπιας ανάδευσης και θέρμανσης. Όλα τα NaDES αποθηκεύτηκαν σε ξηραντήρα για κατάλληλο χρονικό διάστημα μέχρι να επιτευχθεί σταθερό βάρος.

Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 21) απεικονίζονται ορισμένα δείγματα NaDES έπειτα από ξήρανση:



Εικόνα 21: NaDES μετά από την ξήρανση.

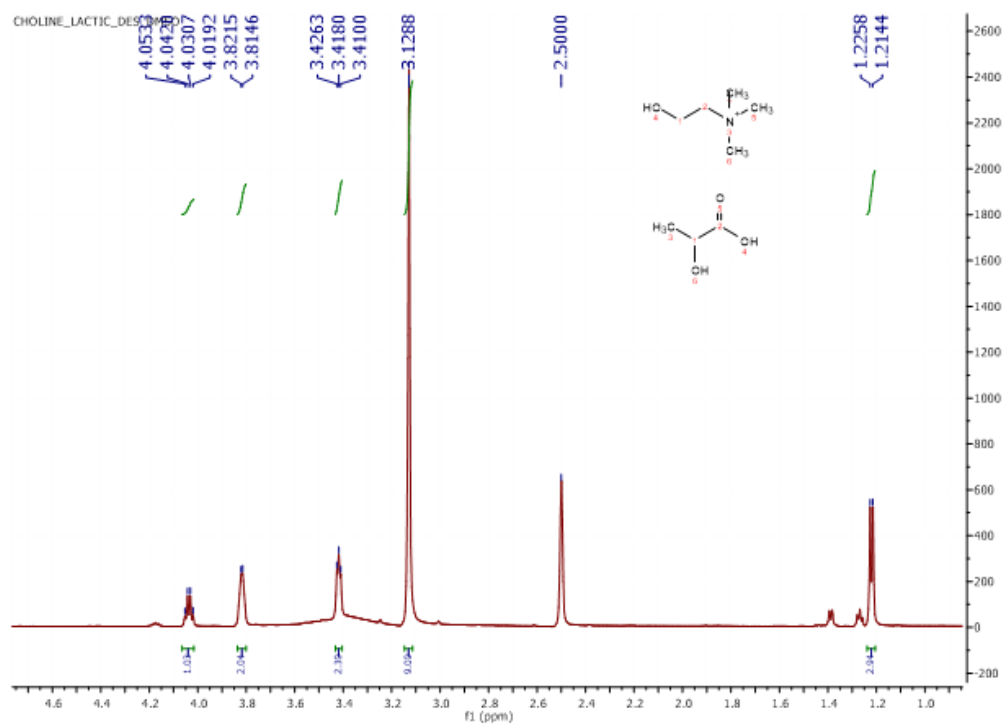
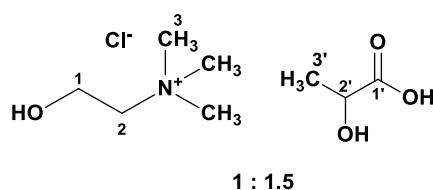


## 5.2 Χαρακτηρισμός ενώσεων

### 5.2.1 Φασματοσκοπία H-NMR

Η ταυτοποίηση των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR, σε φασματογράφο NMR 600 MHz. Παρακάτω παρουσιάζεται αναλυτικότερα η ταυτοποίηση δυο ενδεικτικά επιλεγμένων NaDES που προέρχονται από το γαλακτικό οξύ και τη χλωριούχο χολίνη (NaDES 6) και το γαλακτικό οξύ με τη βεταΐνη (NaDES 9), καθώς και το φάσμα της προλίνης με το οξαλικό οξύ. (NaDES 18).

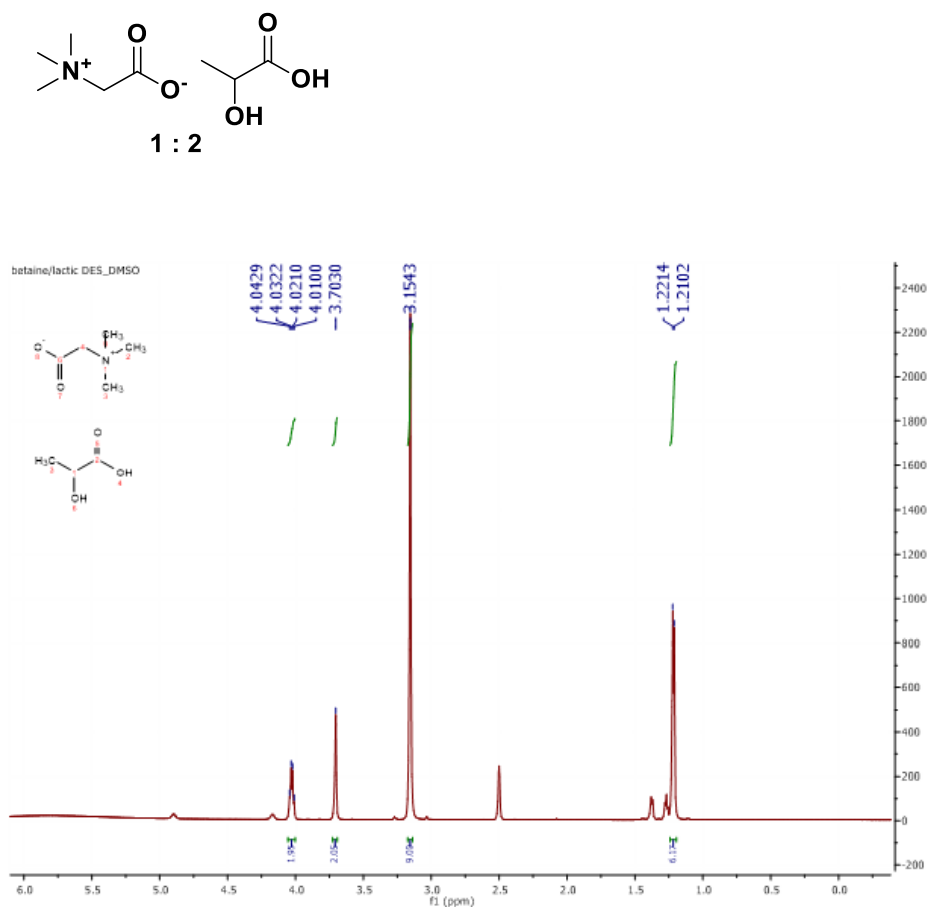
- Χλωριούχος Χολίνη – Γαλακτικό οξύ (6)



Εικόνα 22: Φάσμα πρωτονίου  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO) του NaDES 6.

Στο φάσμα που απεικονίζεται στην Εικόνα 22, εντοπίζονται τα πρωτόνια των συστατικών που αποτελούν το NaDES 6. Ξεκινώντας από τα χαμηλότερα μαγνητικά πεδία, στα 4.03 ppm εμφανίζεται μια τετραπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης  $J=6.8$  Hz η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 2' του γαλακτικού οξέος. Στα 3.82 ppm ακολουθεί μια ευρεία κορυφή, ενώ στα 3.42 ppm εμφανίζεται μια τριπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης  $J=7.4$  Hz, κάθε μια από τις οποίες ολοκληρώνεται για δυο πρωτόνια τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτόνια των θέσεων 1 και 2 της χλωριούχου χολίνης αντίστοιχα. Στη συνέχεια εντοπίζεται μια απλή ευρεία κορυφή στα 3.13 ppm που ολοκληρώνεται για εννέα πρωτόνια και αντιστοιχεί στα εννέα ισοδύναμα πρωτόνια των τριών μεθυλίων του αζώτου της χλωριούχου χολίνης. Τέλος, υπάρχει μια διπλή κορυφή στα 1.22 ppm με σταθερά σύζευξης  $J=6.8$  Hz, που ολοκληρώνεται για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πιο προστατευμένα πρωτόνια του στο μεθυλίου του γαλακτικού οξέος. Επισημαίνεται επιπλέον πως τα πρωτόνια των υδροξυλίων ως αρκετά ευκίνητα πρωτόνια, είναι πιθανό να ανταλλάσσονται με τα άτομα δευτερίου με αποτέλεσμα να μην εμφανίζουν κορυφή στο φάσμα. Τέλος, η απουσία κορυφής που αντιστοιχεί στο πιο προστατευμένο πρωτόνιο του καρβοξυλικού οξέος στα χαμηλά πεδία όπως αναμένεται, είναι ενδεικτικό ότι το πρωτόνιο αυτό συμμετέχει σε δεσμούς που αναπτύσσονται μεταξύ των συστατικών του NaDES.

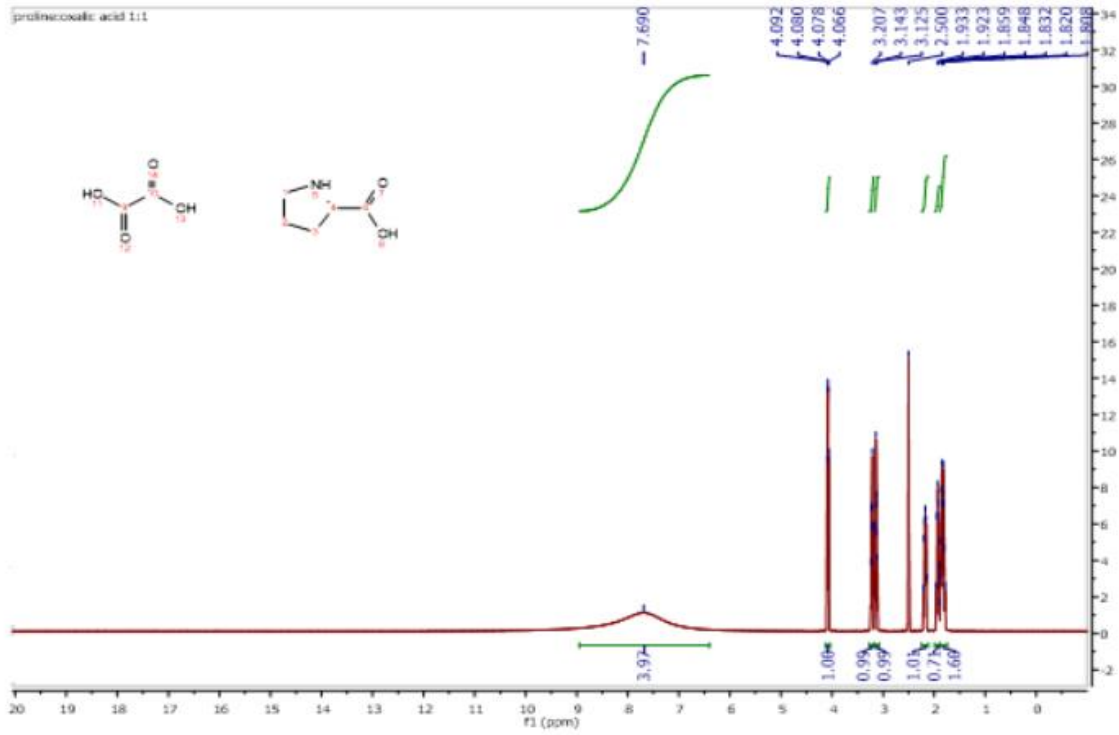
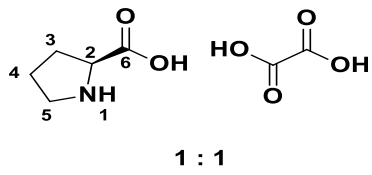
➤ Βεταΐνη – Γαλακτικό οξύ (9)



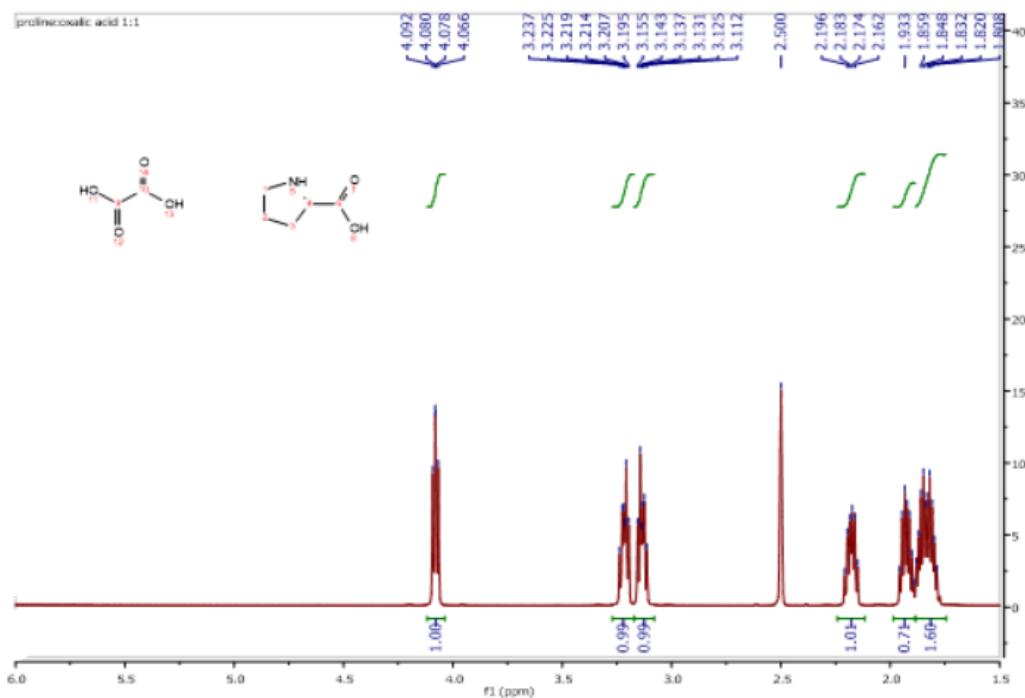
Εικόνα 23: Φάσμα πρωτονίου <sup>1</sup>H NMR (600MHz, DMSO) του NaDES 9.

Στο φάσμα που απεικονίζεται στην Εικόνα 23, εντοπίζονται τα πρωτόνια των συστατικών που αποτελούν το NaDES 9. Πιο συγκεκριμένα, στα 4.03 ppm εμφανίζεται μια τετραπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για δυο πρωτόνια, ένα για κάθε ομάδα μεθινίου σε κάθε ένα από τα μόρια του γαλακτικού οξέος. Η σταθερά σύζευξης στη συγκεκριμένη κορυφή είναι  $J=6.4$  Hz. Ακολουθεί μια απλή κορυφή στα 3.70 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για δυο πρωτόνια και αντιστοιχεί στην ομάδα μεθυλενίου στο μόριο της βεταΐνης. Ακόμα μια απλή κορυφή εμφανίζεται στα 3.15 ppm που ολοκληρώνεται για εννέα πρωτόνια και αντιστοιχεί στα εννέα ισοδύναμα πρωτόνια των μεθυλίων του αζώτου στο μόριο της βεταΐνης. Τέλος, εμφανίζεται μια διπλή κορυφή στα 1.22 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για έξι πρωτόνια και αντιστοιχεί στο μεθύλιο που περιέχεται στο κάθε μόριο γαλακτικού οξέος. Η σταθερά σύζευξης είναι 6.6 Hz.

➤ Προλίνη - Οξαλικό οξύ (**18**)



Εικόνα 24: Φάσμα πρωτονίου  $^1\text{H}$  NMR (600MHz, DMSO) του NaDES 18.

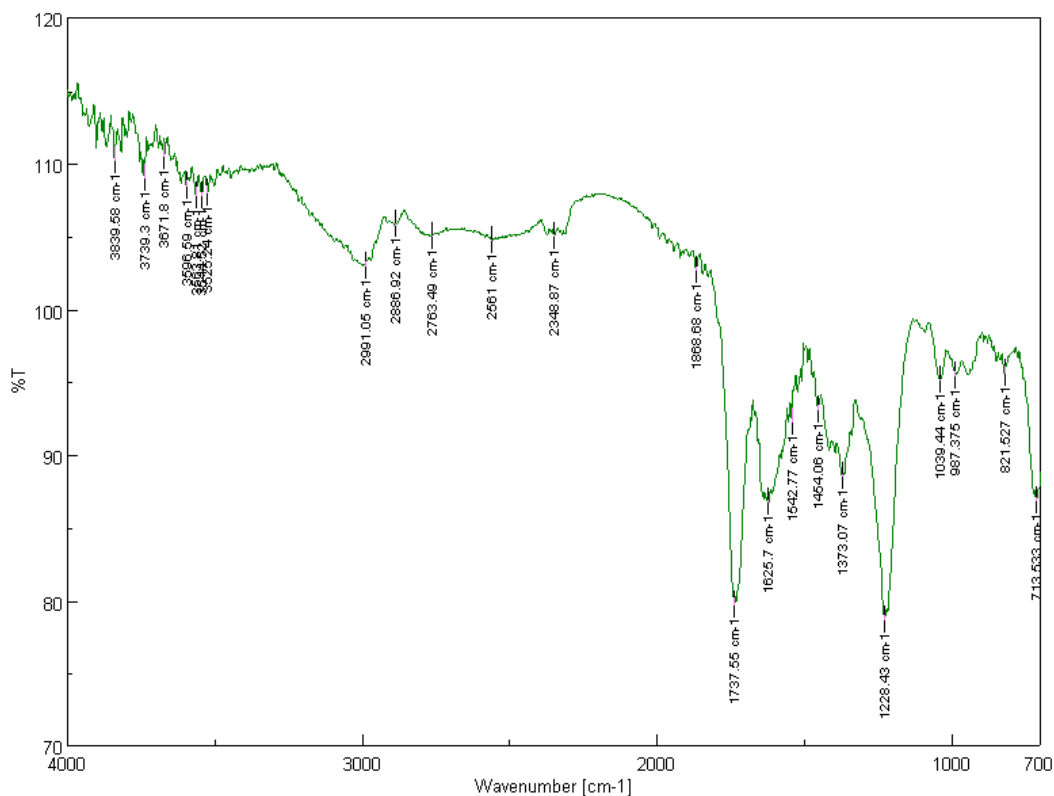
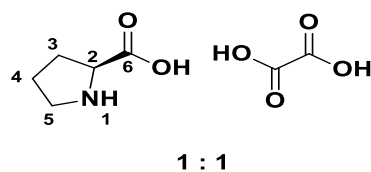


Εικόνα 25: Φάσμα πρωτονίου  $^1\text{H}$  NMR (600MHz, DMSO) του NaDES 18 στα υψηλά πεδία.

Στο φάσμα που απεικονίζεται στις Εικόνες 24 και 25, εντοπίζονται τα πρωτόνια των συστατικών που αποτελούν το NaDES 18. Πιο συγκεκριμένα, ξεκινώντας από τα χαμηλότερα μαγνητικά πεδία, στα 7.69 ppm εντοπίζεται μια απλή ευρεία κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για τέσσερα πρωτόνια που αναφέρονται στα πρωτόνια των τριών υδροξυλίων του NaDES και στο πρωτόνιο που είναι ενωμένο με το άζωτο του δακτυλίου της προλίνης. Στη συνέχεια στα 4.08 ppm εμφανίζεται μια τριπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο οξυγονωμένο πρωτόνιο του δακτυλίου της προλίνης (θέση 2), με σταθερά σύζευξης  $J=7.8$  Hz. Όσο κινούμαστε προς τα υψηλότερα μαγνητικά πεδία, και συγκεκριμένα στα 3.22 ppm και 3.13 ppm εμφανίζουν σήμα τα πρωτόνια συνδεδεμένα στον άνθρακα στη θέση 5, όμως τα δυο αυτά πρωτόνια δεν είναι χημικά ισοδύναμα καθώς το χημικό περιβάλλον του καθενός διαφέρει από του άλλου, με αποτέλεσμα να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και να μην εμφανίζονται με μια κοινή κορυφή στο φάσμα, αλλά με δυο πολλαπλές. Το ίδιο παρατηρείται και με τα πρωτόνια του άνθρακα στη θέση 3, τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και εμφανίζονται με δυο διαφορετικές πολλαπλές κορυφές στα 2.18 ppm και 1.93 ppm. Τέλος, εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή στο εύρος 1.77-1.89 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για δυο πρωτόνια που αντιστοιχούν στα πρωτόνια του άνθρακα της θέσης 4 του δακτυλίου.

## 5.2.2 Φασματοσκοπία FT-IR

Στην Εικόνα 26, απεικονίζεται το φάσμα FT-IR του NaDES 18 με συστατικά την L-προλίνη και το οξαλικό οξύ:



Εικόνα 26: Φάσμα FT-IR του NaDES 18.

Συγκεκριμένα, οι πιο χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος εμφανίζονται στα:

- $3620 \text{ cm}^{-1}$ 
  - Η κορυφή αποδίδεται στη δόνηση τάσης χαρακτηριστικής ομάδας -OH.
  - Η κορυφή αποδίδεται στη δόνηση τάσης χαρακτηριστικού δεσμού N-H.
  
- $< 3000 \text{ cm}^{-1}$ 
  - Οι κορυφές αποδίδονται στις δονήσεις τάσεις των αλειφατικών δεσμών C-H.

- 1737  $\text{cm}^{-1}$ 
  - Η κορυφή αποδίδεται στη δόνηση τάσης χαρακτηριστικού δεσμού C=O.
- 1228  $\text{cm}^{-1}$ 
  - Η κορυφή αποδίδεται στη δόνηση τάσης χαρακτηριστικού δεσμού C-O.
  
- 1373  $\text{cm}^{-1}$ 
  - Η κορυφή αποδίδεται στη δόνηση τάσης χαρακτηριστικού δεσμού C-N.

## 5.3 Μελέτη αλληλεπίδρασης με το DNA

### 5.3.1 Υπολογιστική μελέτη αλληλεπίδρασης (Molecular Docking)

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5) αναγράφονται τα αποτελέσματα της μοριακής μοντελοποίησης (molecular docking), για κάθε φυσικό συστατικό:

Πίνακας 5: Αποτελέσματα της υπολογιστικής μελέτης αλληλεπίδρασης (molecular docking)

| Κωδικός | Ένωση             | Ενέργεια Αλληλεπίδρασης (kcal/mol) | Δεσμοί Υδρογόνου | Νουκλεοτίδια               |
|---------|-------------------|------------------------------------|------------------|----------------------------|
| a       | Χλωριούχος Χολίνη | -4.1                               | 4                | DC-11, DG-10, DG-16        |
| b       | Βεταΐνη           | -4.5                               | 4                | DG-10, DG-16, DA-17        |
| c       | Οξαλικό οξύ       | -4.5                               | 4                | DG-10, DG-16               |
| d       | D,L-Γαλακτικό οξύ | -4.2                               | 8                | DC-11, DG-10, DG-16, DA-17 |
| e       | Λεβουλινικό οξύ   | -4.8                               | 5                | DG-10, DG-16, DA-17        |
| f       | Τρυγικό οξύ       | -5.8                               | 8                | DC-11, DG-10, DG-16, DA-17 |
| g       | Κιτρικό οξύ       | -5.4                               | 7                | DG-10, DG-14, DC-15, DG-16 |
| h       | Γλυκερόλη         | -4.2                               | 9                | DG-10, DG-16, DA-17        |
| i       | Ασκορβικό οξύ     | -4.5                               | 8                | DC-11, DG-10, DG-16        |
| g       | L-Προλίνη         | -4.5                               | 3                | DG-10, DG-16               |
| k       | β-Αλανίνη         | -3.8                               | 4                | DG-10, DG-16, DA-17        |

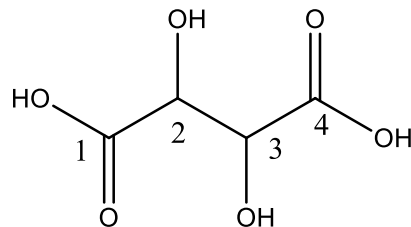
Συγκρίνοντας όλα τα παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι το τρυγικό οξύ και η γλυκερόλη παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη δράση, καθώς εμφανίζουν αρκετά υψηλή ενέργεια αλληλεπίδρασης, καθώς και τον μέγιστο αριθμό δεσμών υδρογόνου. Με αυτόν τον τρόπο σταθεροποιείται ισχυρά η διπλή έλικα του DNA. Τα μόρια μικρού μεγέθους, μεταξύ αυτών οι αντικαρκινικές και φαρμακευτικές ου, δεσμεύονται στη μικρή αύλακα κάτι το οποίο ενισχύει τη σημασία της μικρής αύλακας ως κυρίαρχη θέση δέσμευσης μορίων. Η σταθεροποίηση επιτυγχάνεται μέσω του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου, πολικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.

Η υπολογιστική μελέτη των δυο συγκεκριμένων ενώσεων αναλύεται παρακάτω:

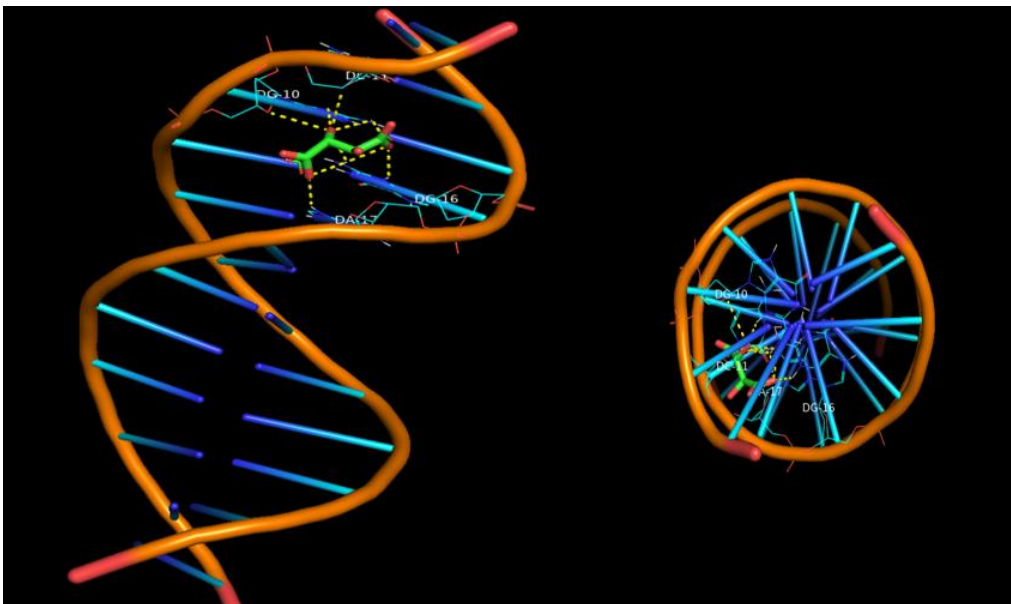


## ➤ Τρυγικό οξύ

Στην Εικόνα 22 παρουσιάζεται η δέσμευση του τρυγικού οξέος (Σχήμα 14) στην κρυσταλλική δομή του DNA, απεικονίζοντας τη σταθεροποίησή του στη μικρή αύλακα (minor groove) του DNA. Πιο συγκεκριμένα, δυο δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται μεταξύ του καρβονυλίου (Θέση 4) του τρυγικού οξέος και της πουρίνης του νουκλεοτιδίου DG-16. Για το υδροξύλιο (Θέση 2), σχηματίζεται ένας δεσμός με την πεντόζη του νουκλεοτιδίου DC-11, ενώ σχηματίζονται δυο δεσμοί υδρογόνου με την πουρίνη και ένας δεσμός υδρογόνου με την πεντόζη του νουκλεοτιδίου DG-10. Επίσης σχηματίζεται ένας δεσμός υδρογόνου μεταξύ του υδροξυλίου και της πουρίνης του νουκλεοτιδίου DG-16. Τέλος, μεταξύ του καρβονυλίου (Θέση 1) και της πουρίνης του νουκλεοτιδίου DA-17 σχηματίζεται ακόμη ένας δεσμός υδρογόνου.



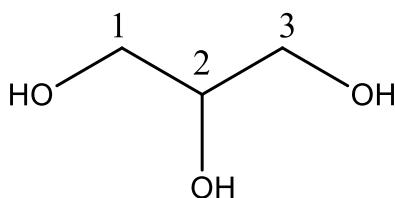
Σχήμα 14: Δομή τρυγικού οξέος.



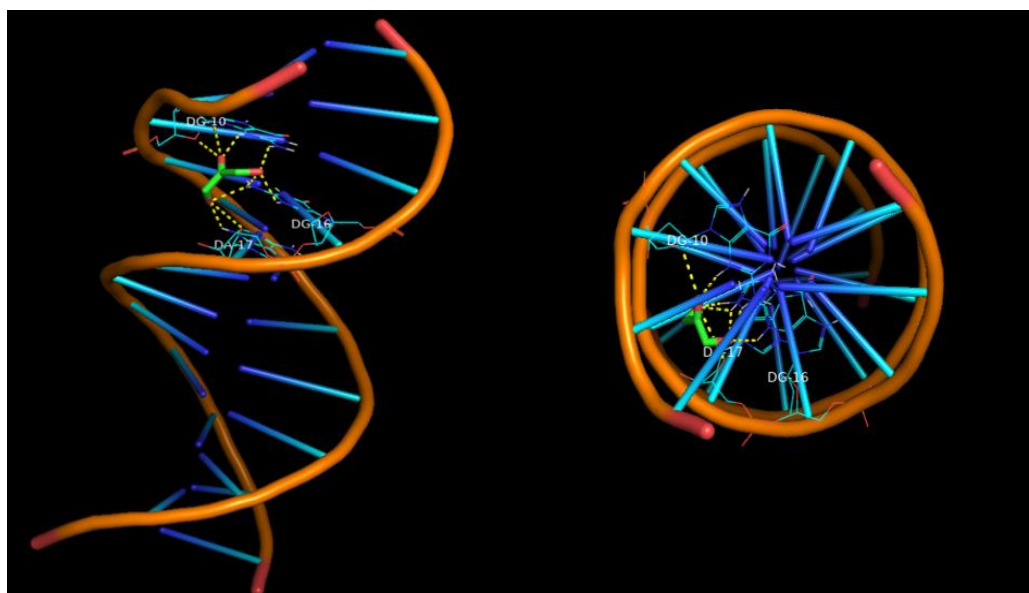
Εικόνα 27: Υπολογιστική μελέτη αλληλεπίδρασης τρυγικού οξέος - DNA.

## ➤ Γλυκερόλη

Στην Εικόνα 23 παρουσιάζεται η δέσμευση της γλυκερόλης (Σχήμα 15) στην κρυσταλλική δομή του DNA, απεικονίζοντας τη σταθεροποίησή της στη μικρή αύλακα (minor groove) του DNA. Όπως παρατηρείται, συνολικά συμμετέχουν εννέα δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των νουκλεοτιδίων DG-16, DG-10 και DA-17 και του μορίου της γλυκερόλης. Πιο αναλυτικά, δυο δεσμοί σχηματίζονται μεταξύ του υδροξυλίου (Θέση 1) και του νουκλεοτιδίου DA-17, ο ένας με την πουρίνη και ο άλλος με την πεντόζη. Επίσης ένας δεσμός σχηματίζεται μεταξύ του υδροξυλίου (Θέση 1) και της πουρίνης του νουκλεοτιδίου DG-16. Στη συνέχεια εντοπίζονται τρεις δεσμοί μεταξύ του υδροξυλίου (Θέση 2) και του νουκλεοτιδίου DG-10 (δύο με την πεντόζη και ένας με την πουρίνη) και τέλος τρεις δεσμοί μεταξύ του υδροξυλίου (Θέση 3), δύο με την πουρίνη του νουκλεοτιδίου DG-16 και ένας με την πουρίνη του νουκλεοτιδίου DG-10.



Σχήμα 15: Δομή γλυκερόλης.



Εικόνα 28: Υπολογιστική μελέτη αλληλεπίδρασης γλυκερόλης - DNA.

### 5.3.2 Τιτλοδότηση ορατού – υπεριώδους (UV-Vis)

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης του ctDNA με την κάθε ένωση ξεχωριστά, μέσω φασματοσκοπίας απορρόφησης υπεριώδους – ορατού. Η υποχρωμία και η υπερχρωμία διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο για τη μελέτη των αλλαγών που παρατηρούνται στη διπλή ελικοειδή μορφή του DNA. Λόγω των ισχυρών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων και των ζευγών αζωτούχων βάσεων του DNA, παρατηρείται μεταβολή της απορρόφησης.

Στους παρακάτω πίνακες αναγράφονται τα αποτελέσματα ανάλυσης για τα φυσικά συστατικά, για τα NaDES και για τα φυσικά τους μίγματα, τα οποία αλληλεπιδρούν με το ctDNA:

#### 5.3.2.1 Φυσικά Συστατικά

Πίνακας 6: Δεδομένα ανάλυσης των υπό μελέτη φυσικών συστατικών από τη μέθοδο τιτλοδότησης ορατού - υπεριώδους

| Κωδικός         | Ένωση             | $\lambda_{\max}$ absent (nm) | $\lambda_{\max}$ present (nm) | $\Delta\lambda$ (nm) | Υποχρωμία (%) | Υπερχρωμία (%) | $K_b \cdot 10^4$ (M <sup>-1</sup> ) |
|-----------------|-------------------|------------------------------|-------------------------------|----------------------|---------------|----------------|-------------------------------------|
| Πρότυπη ένωση 1 | Ροδαμίνη          | 554.2                        | 552                           | 2.2                  | 44.3          | -              | 9.19                                |
| Πρότυπη ένωση 2 | Methyl Green      | 255.8                        | 258,8                         | 3                    | -             | 86.5           | 7.33                                |
| <b>a</b>        | Χλωριούχος Χολίνη | 341.8                        | 259                           | 82                   | -             | 99.9           | 2.16                                |
| <b>b</b>        | Βεταΐνη           | 268.4                        | 258.8                         | 9.6                  | -             | 98.8           | 1.46                                |
| <b>c</b>        | Οξαλικό οξύ       | 341.8                        | 259                           | 82.8                 | -             | -              | -                                   |
| <b>d</b>        | D,L-Γαλακτικό οξύ | 256.2                        | 258.8                         | 2.6                  | -             | 98.9           | 0.61                                |
| <b>e</b>        | Λεβουλινικό οξύ   | 298.8                        | 259                           | 39.8                 | -             | -              | -                                   |
| <b>f</b>        | Τρυγικό οξύ       | 230                          | 259.2                         | 29.2                 | -             | 97.9           | 1.32                                |
| <b>g</b>        | Κιτρικό οξύ       | 263.8                        | 259                           | 4.8                  | -             | -              | -                                   |
| <b>h</b>        | Γλυκερόλη         | 263.6                        | 258.8                         | 4.8                  | -             | 96.8           | 0.75                                |
| <b>g</b>        | L-Προλίνη         | 250                          | 259.4                         | 9.4                  | -             | 93.6           | 2.59                                |
| <b>k</b>        | B- Αλανίνη        | 250                          | 259.4                         | 9.4                  | -             | 98.3           | 0.54                                |

$\lambda_{\max}$  absent: μήκος κύματος που απορροφά η ένωση στη μέγιστη συγκέντρωση DNA

$\lambda_{\max}$  present: μήκος κύματος που απορροφά η ένωση στη μηδενική συγκέντρωση DNA

$K_b$ : σταθερά αλληλεπίδρασης της ένωσης με το DNA

### 5.3.2.2 NaDES

Πίνακας 7: Δεδομένα ανάλυσης των υπό μελέτη NaDES από τη μέθοδο τιτλοδότησης ορατού - υπεριώδους

| Κωδικός            | Ένωση                                       | $\lambda_{\max}$<br>absent<br>(nm) | $\lambda_{\max}$<br>present<br>(nm) | $\Delta\lambda$<br>(nm) | Υποχρωμία | Υπερχρωμία | $K_b \cdot 10^4$<br>(M <sup>-1</sup> ) |
|--------------------|---|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-----------|------------|--|
| Πρότυπη<br>ένωση 1 | Ροδαμίνη                                    | 554.2                              | 552                                 | 2.2                     | 44.3      | -          | 9.19                                   |
| Πρότυπη<br>ένωση 2 | Methyl Green                                | 255.8                              | 258.8                               | 3                       | -         | 86.5       | 7.33                                   |
| 1                  | Χλωριούχος<br>Χολίνη-<br>Τρυγικό οξύ        | 265.4                              | 259.2                               | 6.2                     | -         | 97         | 5.29                                   |
| 2                  | Χλωριούχος<br>Χολίνη-<br>Λεβουλινικό<br>οξύ | 266.6                              | 263.2                               | 3.4                     |           | 82         | 8.44                                   |
| 6                  | Χλωριούχος<br>χολίνη –<br>Γαλακτικό οξύ     | 266                                | 264.6                               | 1.4                     | -         | 70.9       | 13.18                                  |
|                    |   |                                    |                                     |                         |           |            |  |
| 13                 | Βεταΐνη-<br>Τρυγικό οξύ                     | 308.2                              | 259.4                               | 48.8                    | -         | 97.4       | 0.25                                   |
|                    |   |                                    |                                     |                         |           |            |  |
| 18                 | L-Προλίνη-<br>Οξαλικό οξύ                   | 250                                | 259.2                               | 9.2                     | -         | 98.2       | 0.25                                   |
|                    |   |                                    |                                     |                         |           |            |  |
| 20                 | B- Αλανίνη-<br>Γαλακτικό οξύ                | 250                                | 259.2                               | 9.2                     | -         | 97.4       | 0.21                                   |

$\lambda_{\max}$  absent: μήκος κύματος που απορροφά η ένωση στη μέγιστη συγκέντρωση DNA

$\lambda_{\max}$  present: μήκος κύματος που απορροφά η ένωση στη μηδενική συγκέντρωση DNA

$K_b$ : σταθερά αλληλεπίδρασης της ένωσης με το DNA

### 5.3.2.3 Φυσικά Μίγματα

Πίνακας 8: Δεδομένα ανάλυσης των υπό μελέτη φυσικών μιγμάτων από τη μέθοδο τιτλοδότησης υπεριώδους - ορατού

| Κωδικός         | Ένωση                            | $\lambda_{\max}$ absent (nm) | $\lambda_{\max}$ present (nm) | $\Delta\lambda$ (nm) | Υποχρωμία | Υπερχρωμία | $K_b \cdot 10^4$ (M <sup>-1</sup> ) |
|-----------------|----------------------------------|------------------------------|-------------------------------|----------------------|-----------|------------|-------------------------------------|
| Πρότυπη ένωση 1 | Ροδαμίνη                         | 554.2                        | 552                           | 2.2                  | 44.3      | -          | 9.19                                |
| Πρότυπη ένωση 2 | Methyl Green                     | 255.8                        | 258.8                         | 3                    | -         | 86.5       | 7.33                                |
| 5mix            | Χλωριούχος χολίνη-Κιτρικό οξύ    | 252                          | 259                           | 7                    |           | 99.3       | 0.36                                |
| 6mix            | Χλωριούχος χολίνη-Γαλακτικό οξύ  | 230                          | 258.8                         | 28.8                 | -         | 99.9       | 1.05                                |
| 2mix            | Χλωριούχος χολίνη-Λεβουλνικό οξύ | 303.8                        | 259.8                         | 44                   | -         | 93.5       | 3.98                                |
|                 |                                  |                              |                               |                      |           |            |                                     |
| 16mix           | Βεταΐνη-Γλυκερόλη                | 254                          | 258.8                         | 4.8                  | -         | 95.1       | 0.60                                |
| 9mix            | Βεταΐνη-Γαλακτικό οξύ            | 280.6                        | 258.8                         | 21.8                 | -         | 82.4       | 0.79                                |
| 10mix           | Βεταΐνη-Λεβουλνικό οξύ           | 252.6                        | 258.8                         | 6.2                  | -         | 92.3       | 1.05                                |
| 13mix           | Βεταΐνη-Τρυγικό οξύ              | 250                          | 258.8                         | 8.8                  | -         | 89.2       | 0.57                                |
|                 |                                  |                              |                               |                      |           |            |                                     |
| 18mix           | L-Προλίνη-Οξαλικό οξύ            | 250                          | 259.6                         | 9.6                  | -         | 91.5       | 0.06                                |
| 20mix           | B- Αλανίνη-Γαλακτικό οξύ         | 250                          | 259.2                         | 9.2                  | -         | 97.4       | 0.21                                |

$\lambda_{\max}$  absent: μήκος κύματος που απορροφά η ένωση στη μέγιστη συγκέντρωση DNA

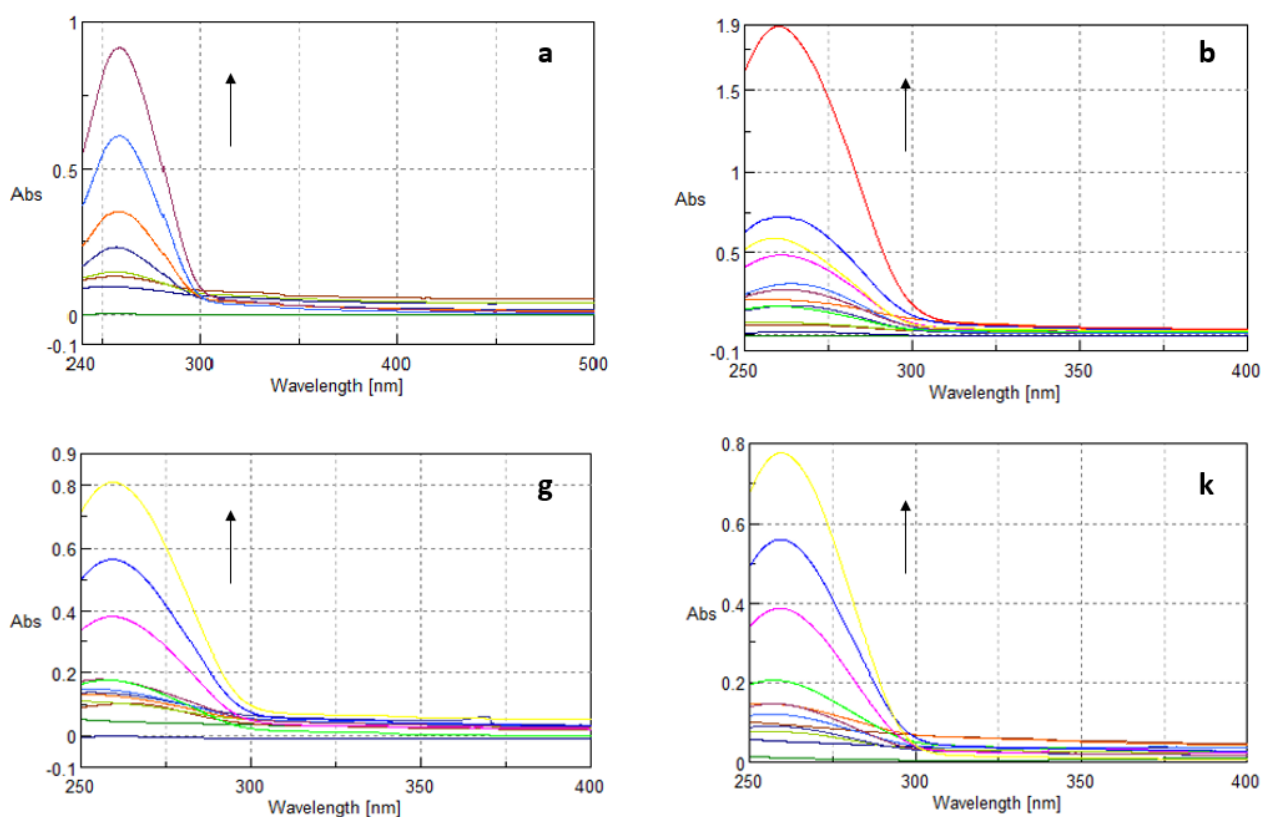
$\lambda_{\max}$  present: μήκος κύματος που απορροφά η ένωση στη μηδενική συγκέντρωση DNA

$K_b$ : σταθερά αλληλεπίδρασης της ένωσης με το DNA

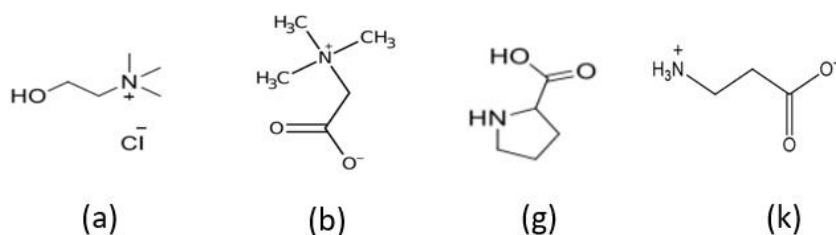
### 5.3.2.4 Σχολιασμός - Συζήτηση

Η τιτλοδότηση ορατού - υπεριώδους (UV-Vis) εφαρμόστηκε για όλα τα NaDES που συντέθηκαν. Παρόλα αυτά μόνο εκείνα που αναγράφονται στον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 7) φαίνεται να έχουν αλληλεπίδραση με το ctDNA, καθώς τα υπόλοιπα (3,4,5,7,8,9,10,11,12,14,15,16,17 και 19) εμφάνισαν αρνητική σταθερά αλληλεπίδρασης Kb. Σημειώνεται ότι σε όλες τις ενώσεις παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης (υπερχρωμία).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 29, τα φυσικά συστατικά **a**, **b**, **g** και **k** που χρησιμοποιήθηκαν ως δέκτες πρωτονίου (χλωριούχος χολίνη, βεταΐνη, προλίνη και αλανίνη), παρουσιάζουν υπερχρωμία, δηλαδή αύξηση της απορρόφησης με ταυτόχρονη μετατόπιση του  $\lambda_{\max}$  προς μικρότερα μήκη κύματος (κυανή μετατόπιση). Αυτό υποδηλώνει πως οι συγκεκριμένες ενώσεις δεσμεύονται με εξωτερική συναρμογή στη δευτερεύουσα αύλακα του ctDNA, συμβαδίζοντας με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την υπολογιστική μελέτη.



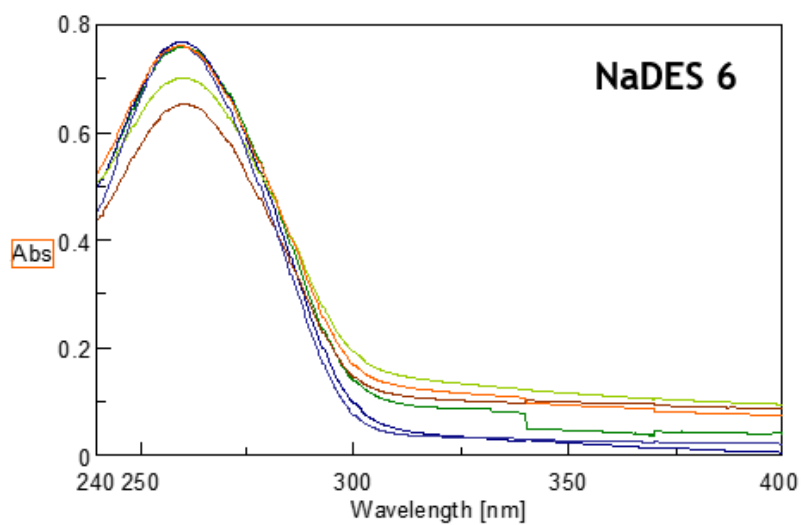
Εικόνα 29: Φάσμα UV διαλύματος των ενώσεων a,b,g και k συγκέντρωσης 100  $\mu\text{M}$  παρουσία ctDNA σε διάφορες συγκεντρώσεις (0-400  $\mu\text{M}$ ). Τα βέλη υποδηλώνουν τις μεταβολές που παρατηρούνται κατά την προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων DNA.



Σχήμα 16: Χημική δομή των συστατικών *a, b, g, k*.

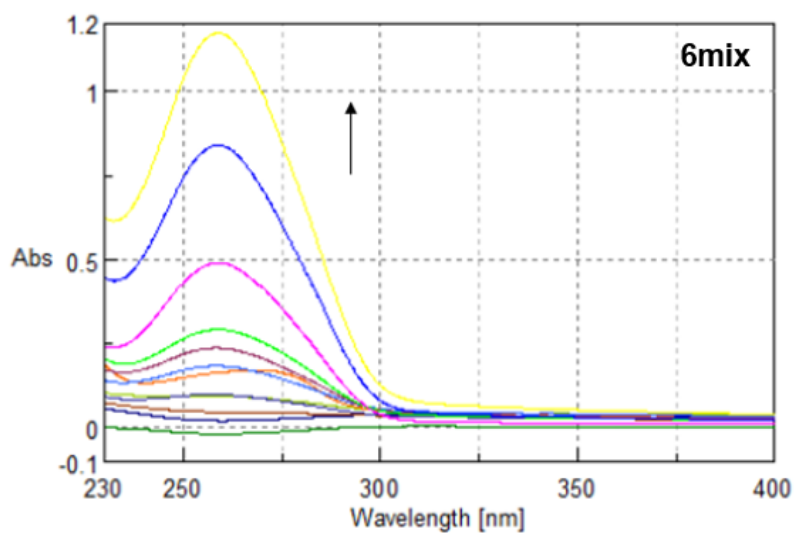
Επιπλέον παρατηρείται διαφορετική συμπεριφορά των NaDES και των φυσικών τους μιγμάτων ως προς την αλληλεπίδρασή τους με το ctDNA. Για παράδειγμα, το **NaDES 1** με συστατικά τη χλωριούχο χολίνη και το τρυγικό οξύ εμφανίζει αλληλεπίδραση συγκριτικά με το αντίστοιχο φυσικό μίγμα **1mix**. Αυτό είναι και το επιθυμητό αποτέλεσμα, καθώς μας ενδιαφέρει κυρίως το DES να επιδρά με το μόριο του DNA, ως μια θεραπευτική ουσία (TheDES).

Από τον Πίνακα 7 συμπεραίνεται ότι το **NaDES 6** με συστατικά τη χλωριούχο χολίνη και το γαλακτικό οξύ εμφανίζει την ισχυρότερη αλληλεπίδραση με το DNA. Συγκεκριμένα, η ένωση αυτή εμφανίζει αρκετά υψηλή τιμή σταθεράς αλληλεπίδρασης ( $K_b = 13.18 \cdot 10^4 M^{-1}$ ), πλησιάζοντας αρκετά την τιμή της ένωσης που λαμβάνεται ως πρότυπη, δηλαδή της Ροδαμίνης ( $K_b = 9.19 \cdot 10^4 M^{-1}$ ). Επιπλέον, παρατηρείται αύξηση του μήκους κύματος κατά  $\Delta\lambda = 1.4 \text{ nm}$ , δηλαδή ύπαρξη ερυθρής μετατόπισης (βαθυχρωμία), που συνεπάγεται εξωτερική συναρμογή στη μεγάλη αύλακα του DNA προκαλώντας σταθεροποίησή της. Στην Εικόνα 30 απεικονίζεται το φάσμα UV-Vis του NaDES 6, όπου με αύξηση της συγκέντρωσης του DNA παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης και μετατόπισης προς μεγαλύτερα μήκη κύματος.



Εικόνα 30: Φάσμα UV διαλύματος του NaDES 6 συγκέντρωσης 100μM παρουσία ctDNA σε διάφορες συγκεντρώσεις (0-400μM). Τα βέλη υποδηλώνουν την αύξηση της απορρόφησης με ταυτόχρονη μετατόπιση του λmax προς μεγαλύτερα μήκη κύματος.

Στην Εικόνα 31 απεικονίζεται το φάσμα UV-Vis του φυσικού μίγματος 6mix, το οποίο εμφανίζει μικρότερη βιολογική δράση συγκριτικά με το αντίστοιχο NaDES:

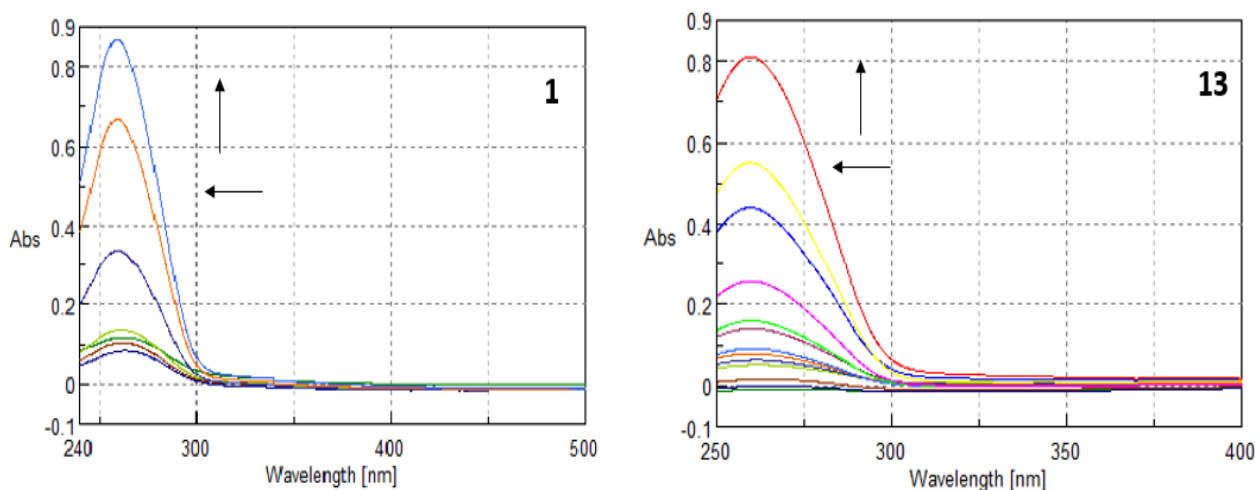


Εικόνα 31: Φάσμα UV διαλύματος του φυσικού μίγματος 6mix συγκέντρωσης 100μM παρουσία ctDNA σε διάφορες συγκεντρώσεις (0-400μM).



Και οι δυο παραπάνω ενώσεις (NaDES 6, Φυσικό μίγμα 6mix) εμφανίζουν αύξηση της απορρόφησης με δέσμευση της κάθε μιας στην εξωτερική επιφάνεια του DNA. Επίσης αναφορικά με τη μετατόπιση της θέσης του  $\lambda_{\max}$ , παρατηρείται και στις δυο περιπτώσεις ερυθρή μετατόπιση, κάτι το οποίο μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπάρχει σταθεροποίηση του DNA. Τέλος, είναι αξιοσημείωτο ότι τόσο το γαλακτικό οξύ όσο και η χλωριούχος χολίνη δεν εμφανίζουν μεγάλη σταθερά αλληλεπίδρασης ως μεμονωμένα συστατικά, ενώ η συμπλοκοποίησή τους δημιουργεί ένα ευτηκτικό μίγμα που αλληλοεπιδρά σε μεγάλο βαθμό με το DNA.

Τέλος, παρατηρείται καλύτερη επίδραση των NaDES με βάση τη χλωριούχο χολίνη συγκριτικά με αυτά που έχουν ως βάση τη βεταΐνη. Συγκρίνοντας το **NaDES 1** και το **NaDES 13**, που έχουν και τα δυο ως δότη πρωτονίου το τρυγικό οξύ, εμφανίζεται αρκετά ισχυρότερη η δράση του 1 σε σχέση με το 13, κάτι το οποίο οφείλεται πιθανότατα στο ανιόν του χλωρίου στο μόριο της χολίνης το οποίο αλληλοεπιδρά μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων με το DNA και ιδιαίτερα σε μορφή ευτηκτικού μίγματος συνδέεται ισχυρά με αυτό. Και στα δυο NaDES παρατηρείται υπερχρωμία με μετατόπιση του  $\lambda_{\max}$  προς μικρότερα μήκη κύματος (κυανή μετατόπιση). Επομένως τα NaDES 1 και NaDES 13 δεσμεύονται με εξωτερική συναρμογή στο ctDNA. Το φάσμα τιτλοδότησης ορατού – υπεριώδους αυτών των ενώσεων παρουσιάζεται στην Εικόνα 32:



Εικόνα 32: Φάσμα UV διαλύματος των NaDES 1 και NaDES 13 συγκέντρωσης 100  $\mu\text{M}$  παρουσία ctDNA σε διάφορες συγκεντρώσεις (0-400  $\mu\text{M}$ ). Τα βέλη υποδηλώνουν τις μεταβολές που παρατηρούνται κατά την προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων DNA.

## 6 Συμπεράσματα

Τα συμπεράσματα που εξάγονται σχετικά με τη σύνθεση των πράσινων διαλυτών και της βιολογικής τους δράσης συνοψίζονται ως εξής:

### 6.1 Σύνθεση NaDES

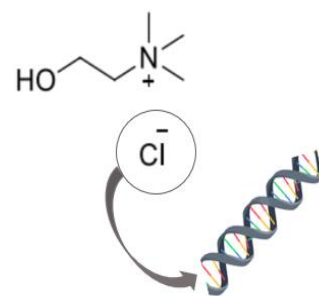
Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός και η σύνθεση είκοσι NaDES, με ανάμιξη ενός δέκτη και ενός δότη πρωτονίου σε κατάλληλες γραμμομοριακές αναλογίες. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν οχτώ NaDES με συστατικό τη χλωριούχο χολίνη, οχτώ με τη βεταΐνη, τρία με την L-προλίνη και ένα την β-αλανίνη. Η σύνθεση των συγκεκριμένων πράσινων διαλυτών αποσκοπεί στην ενίσχυση του πράσινου χαρακτήρα των διαλυτών, καθώς τα συστατικά των NaDES που παράχθηκαν βρίσκονται σε αφθονία στη φύση και το σύστημα που δημιουργούν έχει χαμηλή τοξικότητα συγκριτικά με τους συμβατικούς διαλύτες. Έτσι λοιπόν, εξάγεται το συμπέρασμα ότι αρκετά από αυτά τα NaDES είναι πιθανό να εμφανίσουν θεραπευτικές ιδιότητες και να χαρακτηριστούν ως TheDES για την αντιμετώπιση σοβαρών ασθενειών. Πιο συγκεκριμένα, τα **NaDES (1,2,6,13,18, και 20)** που εμφάνισαν αλληλεπίδραση με το DNA, έχουν την ικανότητα να δρουν ως φαρμακευτικές ουσίες για τον ανθρώπινο οργανισμό.

Η πλειοψηφία των NaDES συντέθηκαν με ήπια ανάδευση και θέρμανση (Μέθοδος I), καθώς μέσω αυτής το DES είχε σε σχετικά σύντομο χρόνο την επιθυμητή μορφή ρευστού.

## 6.2 Βιολογική Δράση

Η αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των NaDES που συντέθηκαν στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε τόσο μέσω υπολογιστικής μελέτης (Molecular Docking) όσο και μέσω τιτλοδότησης ορατού – υπεριώδους (UV-Vis Titration). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν και από τις δυο αναλύσεις ήταν σε συμφωνία για την πλειοψηφία των φυσικών συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν και έδειξαν ότι ως μικρού μοριακού βάρους μόρια προσδένονται με εξωτερική συναρμογή στη δευτερεύουσα αύλακα του DNA. Έτσι τα συγκεκριμένα μόρια με την πρόσδεσή τους στην μικρή αύλακα παρουσιάζουν αντικαρκινικές ή αντιιικές ιδιότητες. Σημειώνεται ότι η *in vitro* μελέτη (UV-Vis Titration) απαιτεί βελτιστοποίηση, καθώς διαπιστώθηκαν ορισμένα σφάλματα κυρίως όσον αφορά τη σταθερά αλληλεπίδρασης  $K_b$ .

Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι τα NaDES με συστατικό τη χλωριούχο χολίνη εμφανίζουν ισχυρότερη αλληλεπίδραση με το DNA και είναι περισσότερα συγκριτικά με τα εκείνα που συντέθηκαν με βάση τη βεταΐνη και τα αμινοξέα. Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται στην ύπαρξη του ιόντος χλωρίου ( $-Cl^-$ ) στο μόριο της χολίνης, το οποίο αλληλοεπιδρά ισχυρά με το μόριο του DNA μέσω δεσμών υδρογόνου καθώς και μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Επιπλέον, τα NaDES που δεν εμφάνισαν κάποιου είδους αλληλεπίδραση με το DNA μπορούν να φυλαχθούν υπό ψύξη και να λειτουργήσουν ως μέσα σταθεροποίησής του. Η μακροχρόνια αποθήκευση και σταθερότητα του DNA είναι ύψιστης σημασίας σε πολλές βιοϊατρικές εφαρμογές.

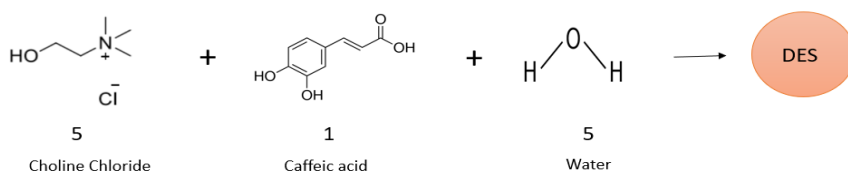


Εικόνα 33: Αλληλεπίδραση χλωριούχου χολίνης - DNA.

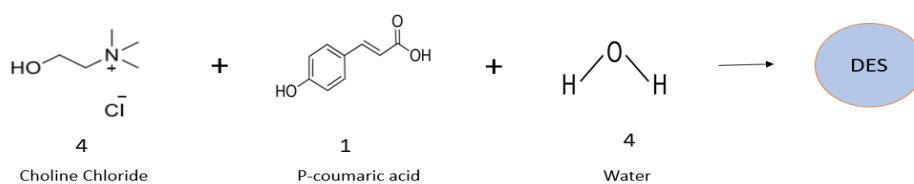
Σημειώνεται ότι μόνο για τα φυσικά συστατικά πραγματοποιείται *in silico* μελέτη, καθώς τα μίγματα είναι αδύνατον να αναπαρασταθούν και η βιολογική τους δράση αξιολογείται μόνο πειραματικά. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τόσο για τα NaDES όσο και για τα φυσικά μίγματα δεν μπορεί να εξαχθεί με βεβαιότητα ένα ασφαλές συμπέρασμα σχετικά με τη θέση πρόσδεσής τους στο μόριο του DNA (κύρια ή δευτερεύουσα αύλακα), καθώς δεν είναι εφικτή η οπτική αναπαράστασή τους στο υπολογιστικό πρόγραμμα (Molecular Docking).

## 7 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Σε πρώιμο ερευνητικό στάδιο βρίσκεται η σύνθεση NaDES που δρουν ως θεραπευτικές ουσίες, χρησιμοποιώντας φαινολικά οξέα ως δότες πρωτονίου. Τα φαινολικά οξέα αποτελούν μια ομάδα οργανικών οξέων και εμπεριέχουν όλες τις οργανικές ενώσεις που έχουν το λιγότερο μια καρβοξυλομάδα και ένα φαινολικό υδροξύλιο. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν αρκετά πειράματα για την παρασκευή NaDES χρησιμοποιώντας ως δέκτη πρωτονίου τη χλωριούχο χολίνη και ως δότες πρωτονίου το καφεϊκό οξύ (caffeic acid) και το κουμαρικό οξύ (p-coumaric acid) σε διαφορετικές αναλογίες, κάνοντας χρήση τόσο της συμβατικής μεθόδου ανάδευσης-θέρμανσης όσο και της λυοφιλοποίησης (freeze drying). Λόγω του ότι δεν παρατηρήθηκε η επιθυμητή μορφή των τελικών δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε επανάληψη με υποβοήθηση με νερό με τη συμβατική μέθοδο θέρμανσης, λαμβάνοντας ως τελικό δείγμα ένα τριφασικό ρευστό μίγμα. Οι δομές και οι αναλογίες των ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στα παρακάτω σχήματα:



Σχήμα 17: Ανάμιξη χλωριούχου χολίνης, καφεϊκού οξέος και νερού (5:1:5) για σύνθεση ενός DES.



Σχήμα 18: Ανάμιξη χλωριούχου χολίνης, κουμαρικού και νερού (4:1:4) για σύνθεση ενός DES.

Σε μεταγενέστερο στάδιο θα πραγματοποιηθεί προσπάθεια μελέτης της βιολογικής δράσης των φαινολικών οξέων, τόσο *in silico* μέσω υπολογιστικής μελέτης (Molecular Docking), όσο και μέσω τιτλοδότησης ορατού – υπεριώδους (UV-Vis Titration), έτσι ώστε να διαπιστωθεί αν συμβαδίζουν τα αποτελέσματα της κάθε μεθόδου και να συγκριθούν ως προς τα απλά καρβοξυλικά οξέα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

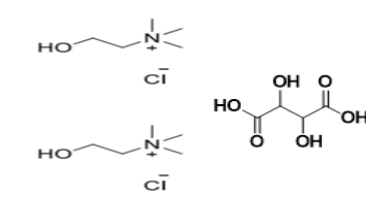
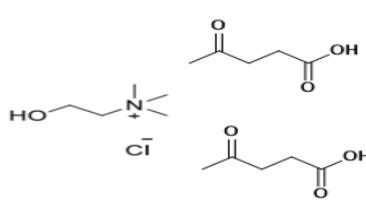
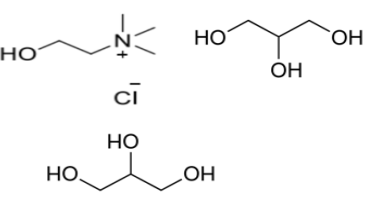
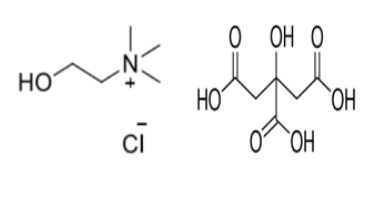
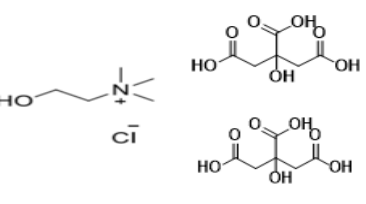
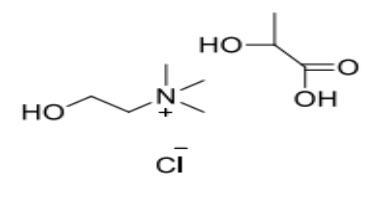
Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα έχει η έρευνα ευτηκτικών μιγμάτων που αποτελούνται από περισσότερα από δυο συστατικά, εφαρμόζοντας διαφορετικές μεθόδους σύνθεσης, όπως τεχνικές υψηλής ενέργειας (υπέρηχοι ή μικροκύματα).

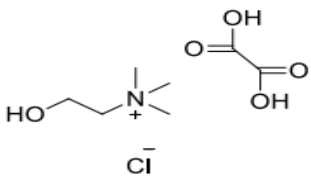
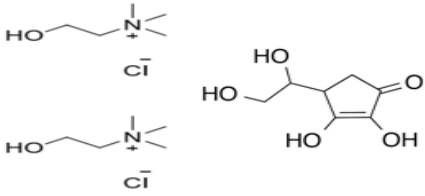
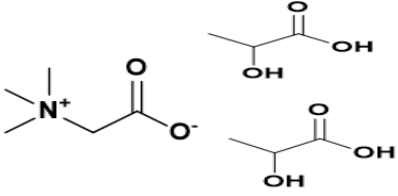
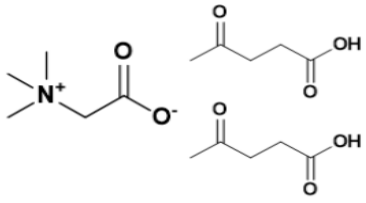
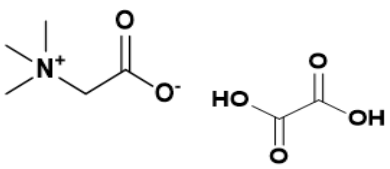
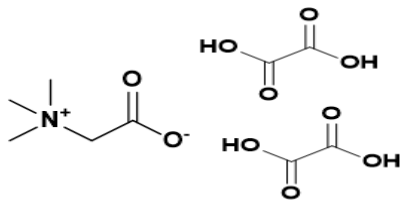
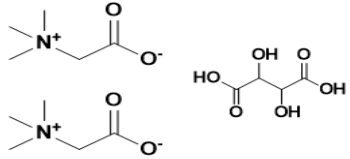
Τέλος, είναι σημαντικό η μελλοντική έρευνα να εστιάσει στην ενίσχυση του πράσινου χαρακτήρα των NaDES, μελετώντας τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και τη στερεοχημική δομή τους, έτσι ώστε να διερευνηθεί ποιοι παράγοντες επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της κάθε ένωσης.

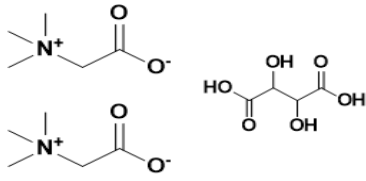
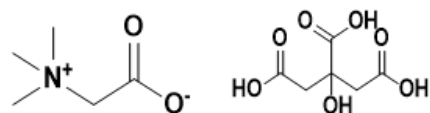
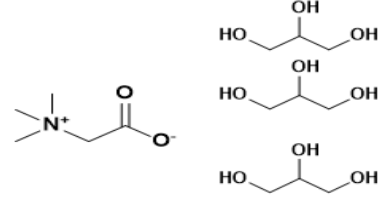
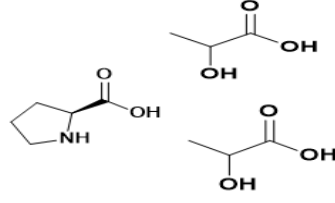
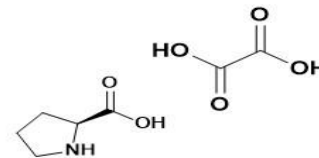
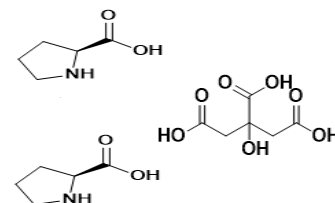
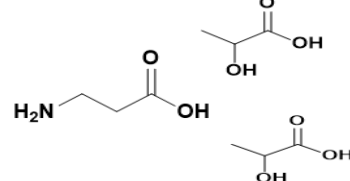
## 8 Παραρτήματα

### 8.1 Κατάλογος ενώσεων

Πίνακας 9: Τα NaDES που συντέθηκαν και οι αντίστοιχοι κωδικοί τους

| Κωδικός | Δομή   |
|---------|--|
| 1       |    |
| 2       |    |
| 3       |   |
| 4       |  |
| 5       |  |
| 6       |  |

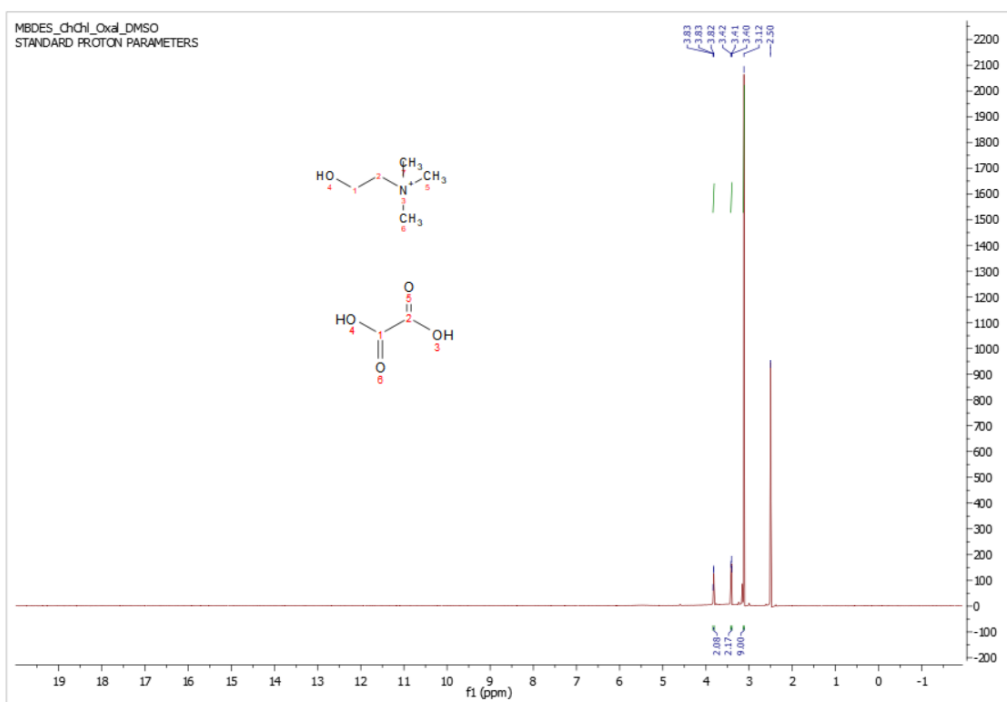
|    |  |
|----|--|
| 7  |    |
| 8  |    |
| 9  |    |
| 10 |  |
| 11 |  |
| 12 |  |
| 13 |  |

|    |  |
|----|--|
| 14 |    |
| 15 |    |
| 16 |    |
| 17 |  |
| 18 |  |
| 19 |  |
| 20 |  |

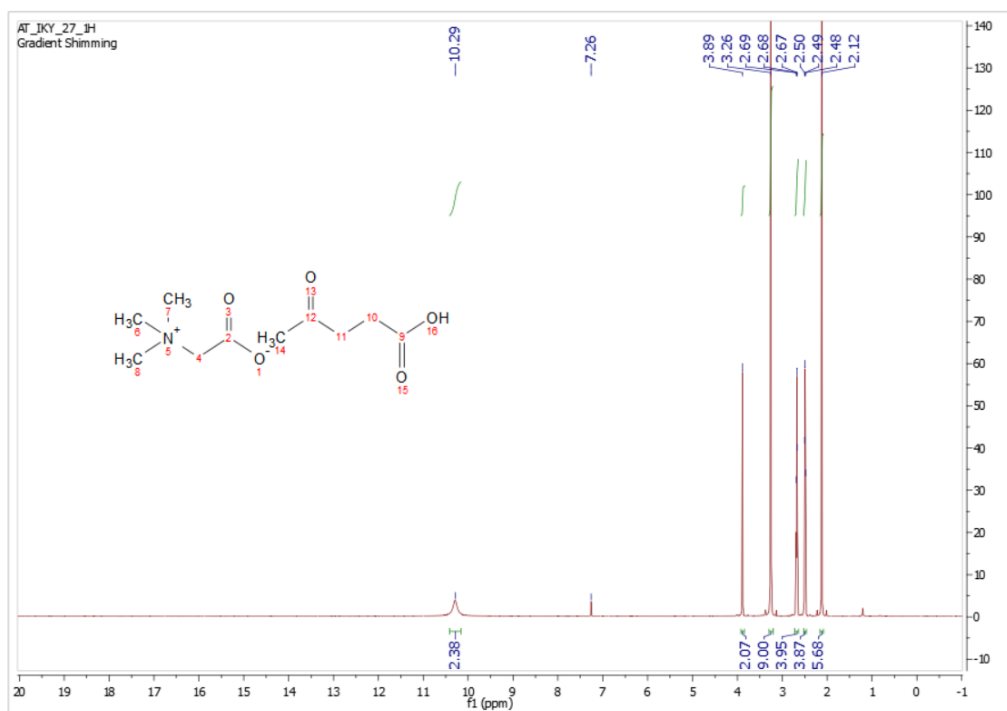




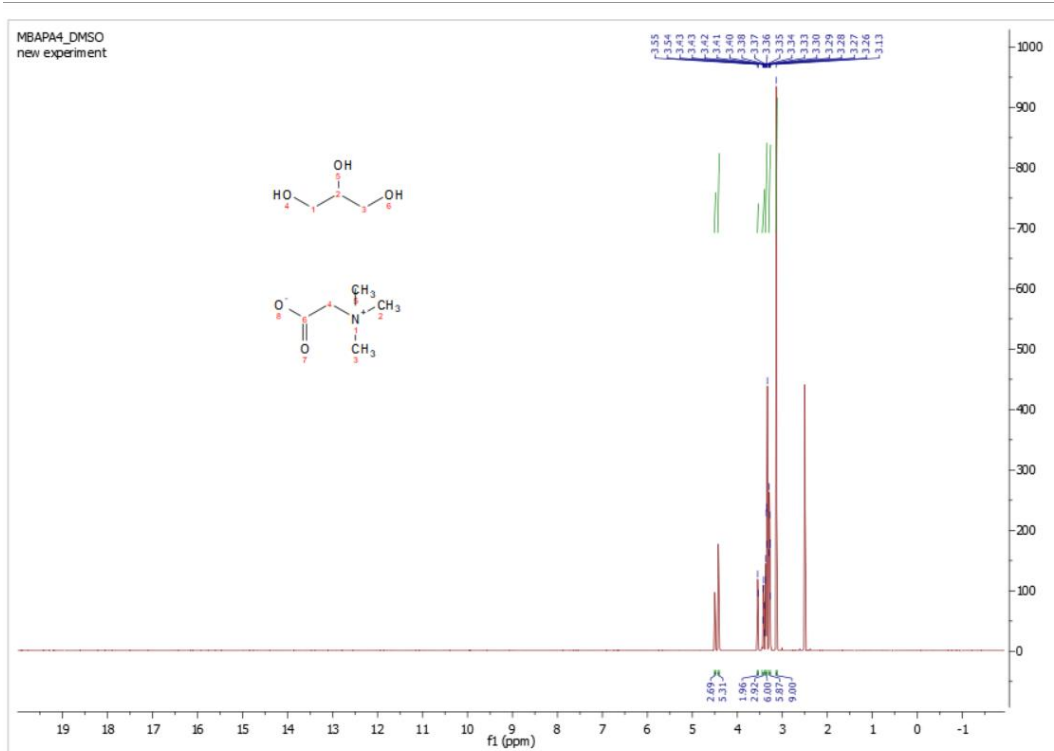
(3)



Εικόνα 36: Φάσμα πρωτονίου  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO) του NaDES 7

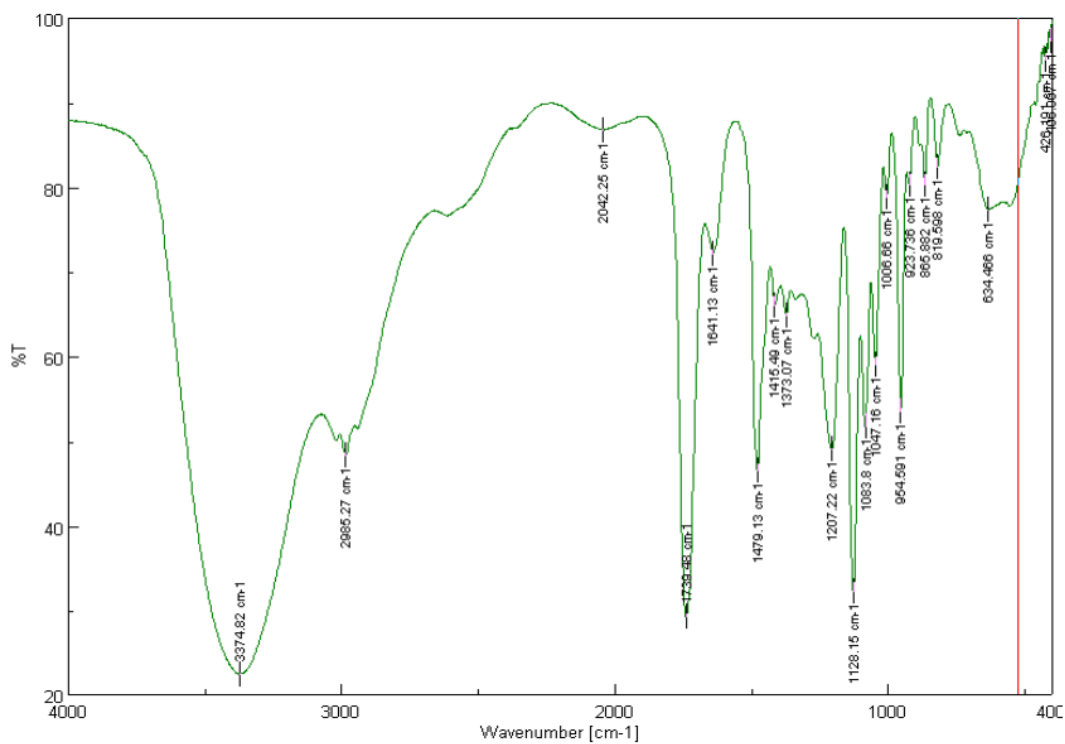


Εικόνα 37: Φάσμα πρωτονίου  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO) του NaDES 10

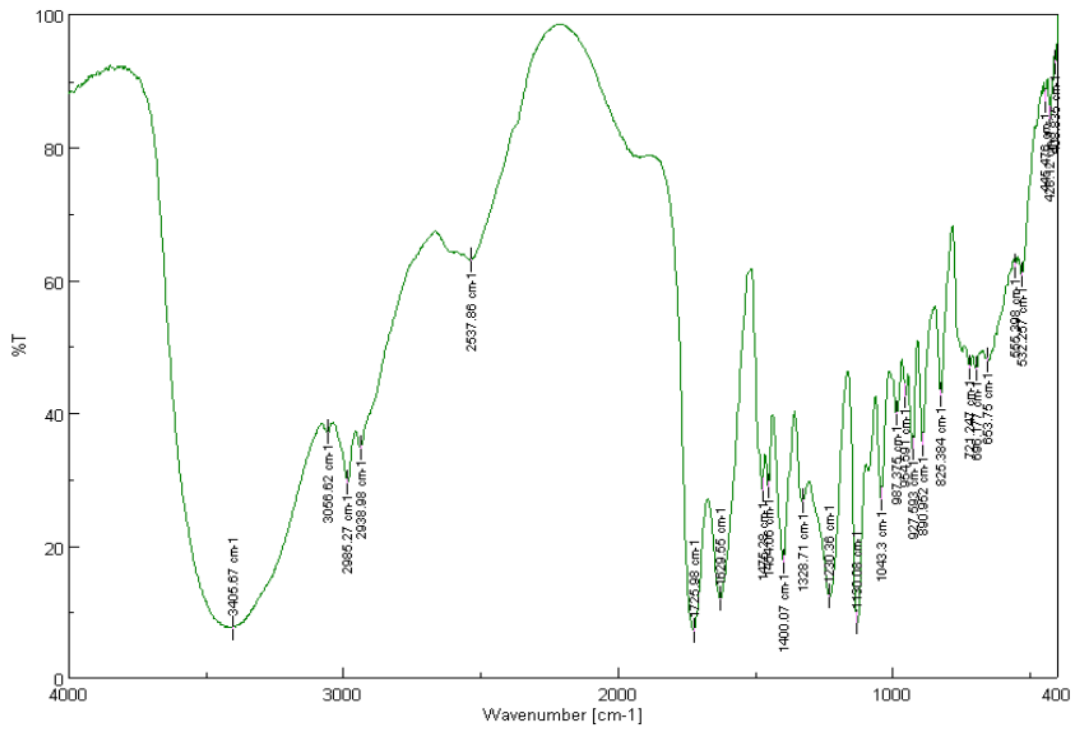


Εικόνα 38: Φάσμα πρωτονίου  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO) του NaDES 16

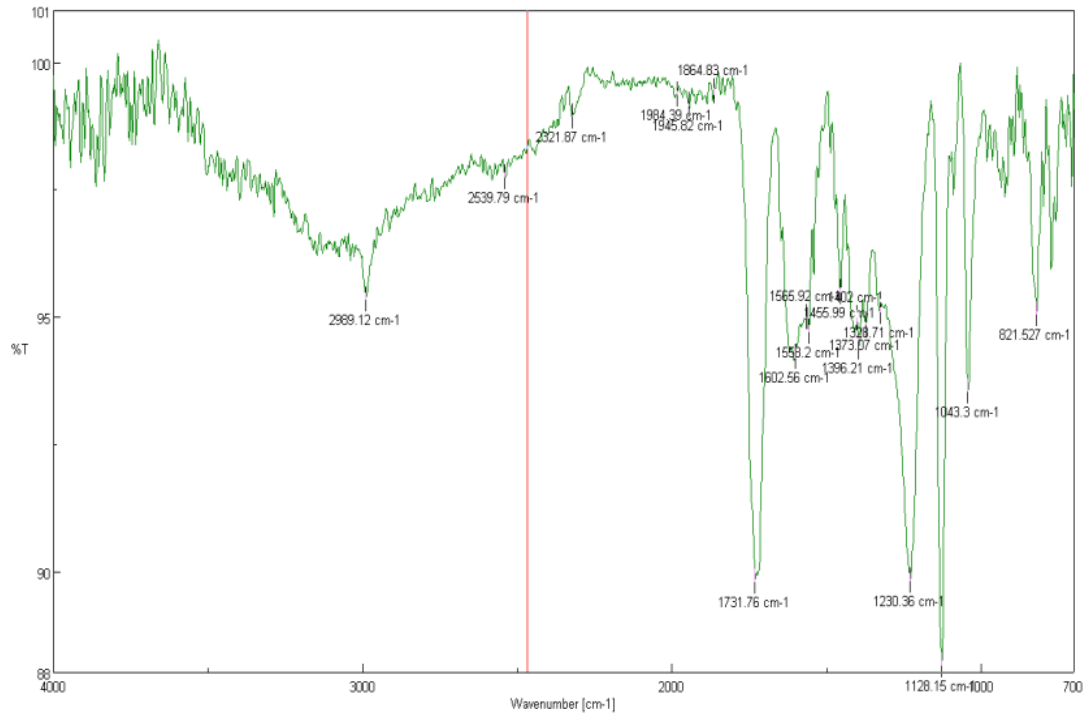
### 8.3 Φάσματα FT-IR



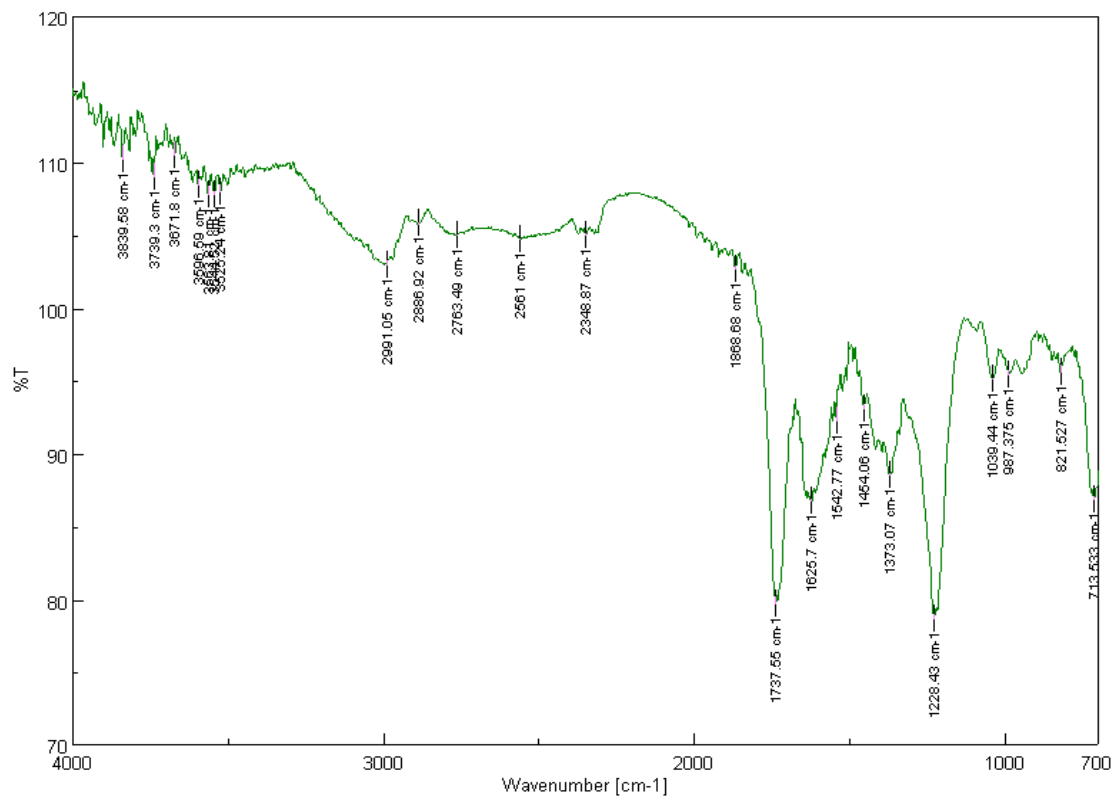
Εικόνα 39: Φάσμα FT-IR του NaDES 6



Εικόνα 40: Φάσμα FT-IR του NaDES 9

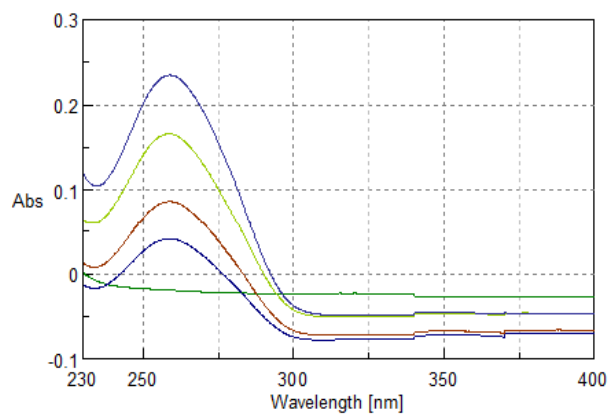


Εικόνα 41: Φάσμα FT-IR του NaDES 17

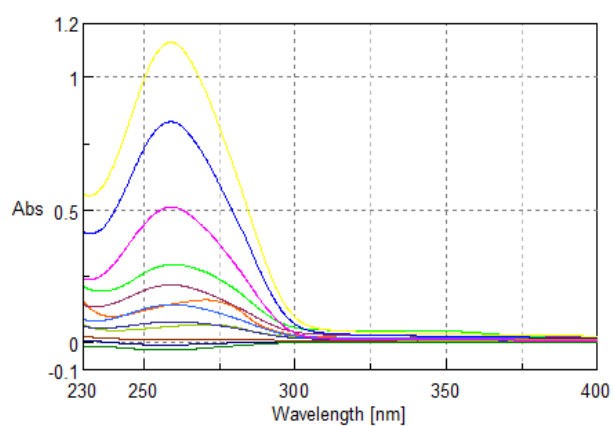


**Εικόνα 42: Φάσμα FT-IR του NaDES 18**

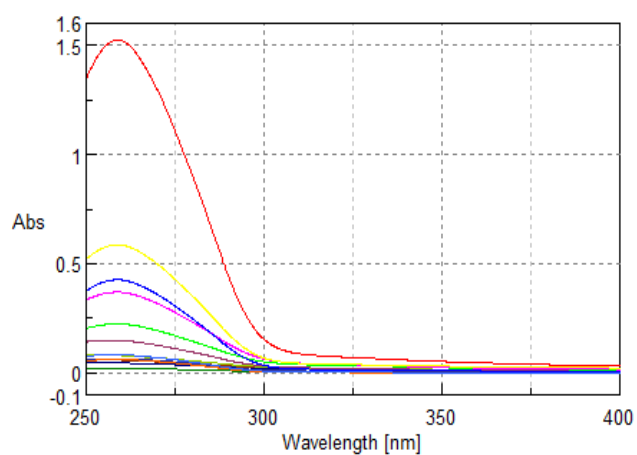
## 8.4 Φάσματα UV - Vis



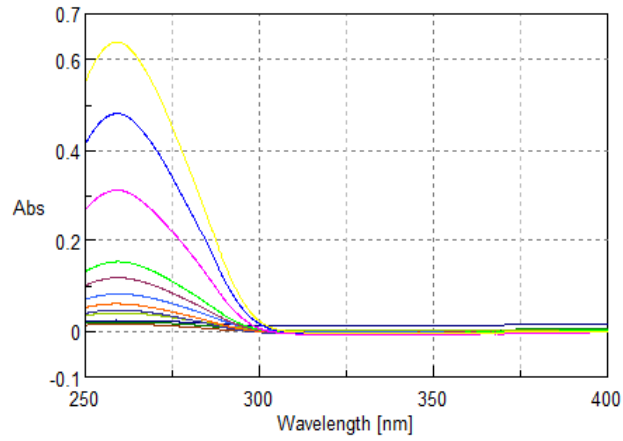
Εικόνα 43: Φάσμα UV για το γαλακτικό οξύ



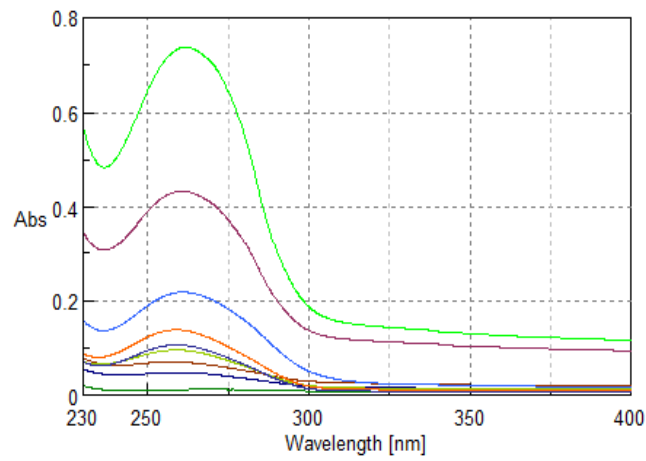
Εικόνα 44: Φάσμα UV για το λεβουλινικό οξύ



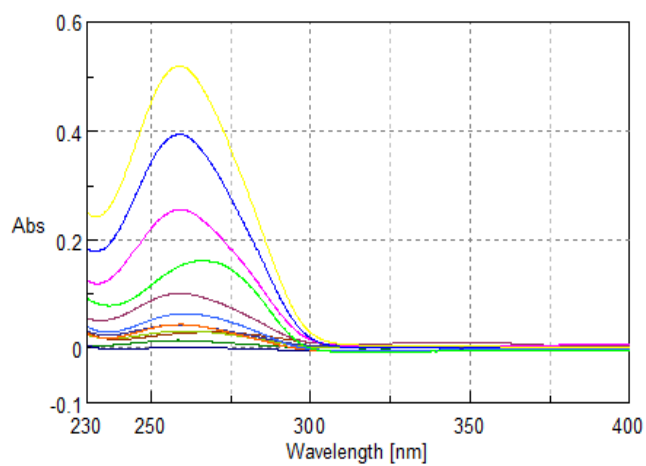
Εικόνα 45: Φάσμα UV για τη γλυκερόλη



*Εικόνα 46: Φάσμα UV για το κίτρικό οξύ*

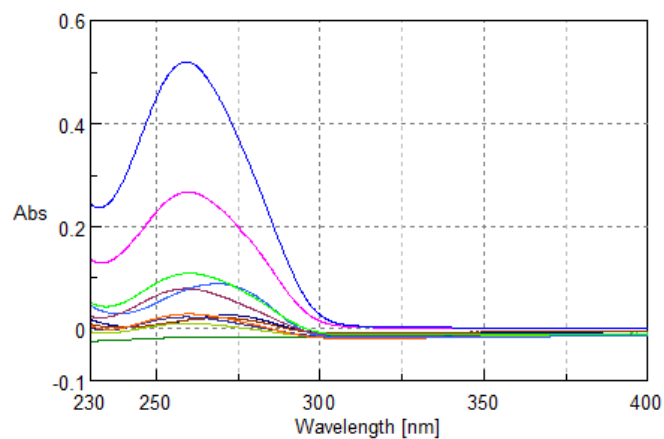


*Εικόνα 47: Φάσμα UV για το κίτρικό οξύ*

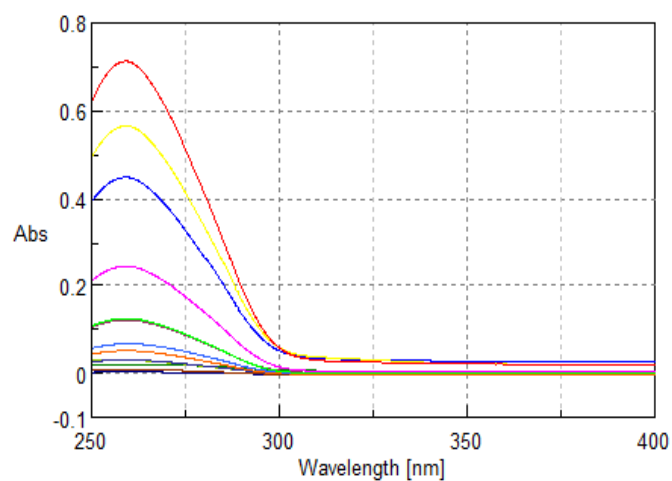


*Εικόνα 48: Φάσμα UV για το φυσικό μίγμα 1mg/ml*

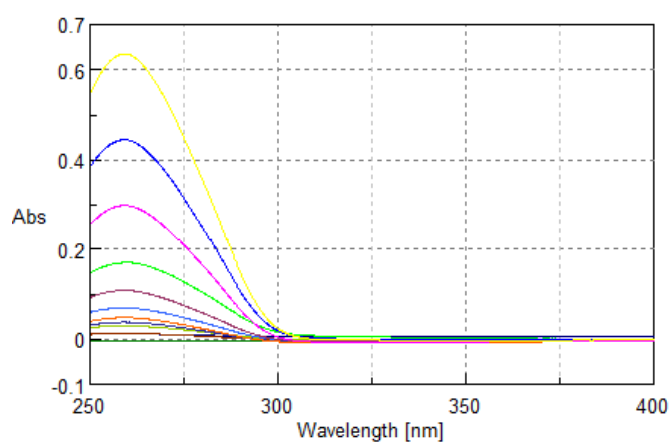




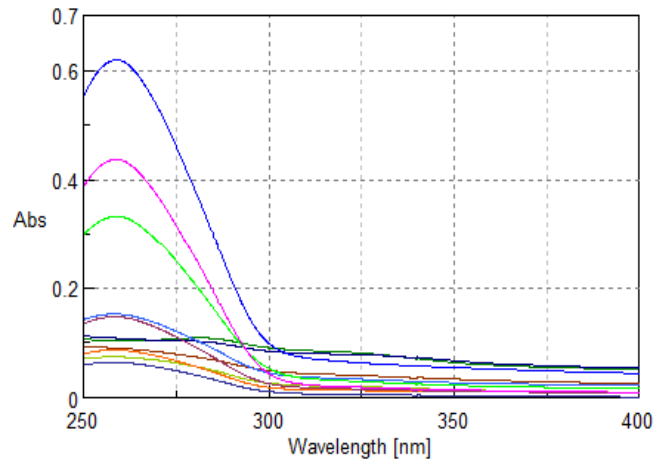
*Εικόνα 49: Φάσμα UV για το φυσικό μίγμα 2<sup>τη</sup>*



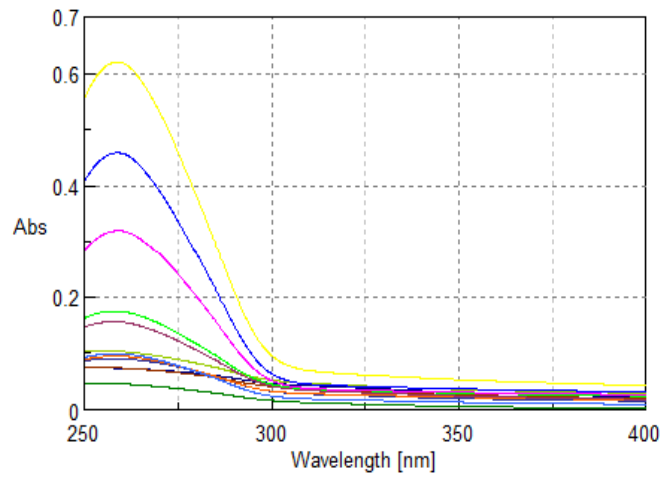
*Εικόνα 50: Φάσμα UV για το φυσικό μίγμα 3<sup>τη</sup>*



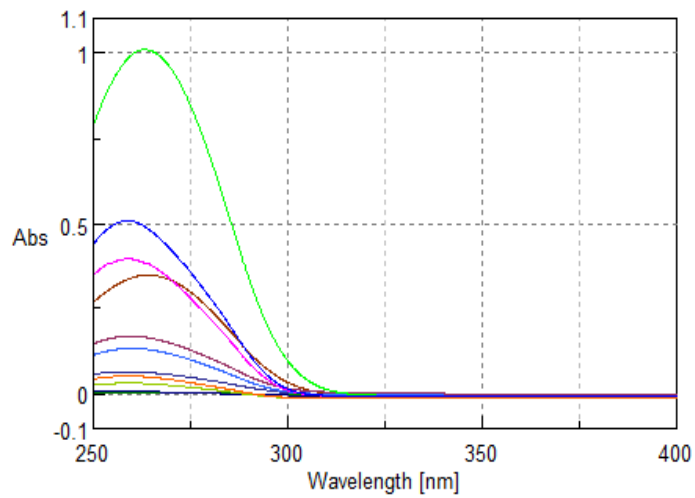
*Εικόνα 51: Φάσμα UV για το φυσικό μίγμα 4<sup>τη</sup>*



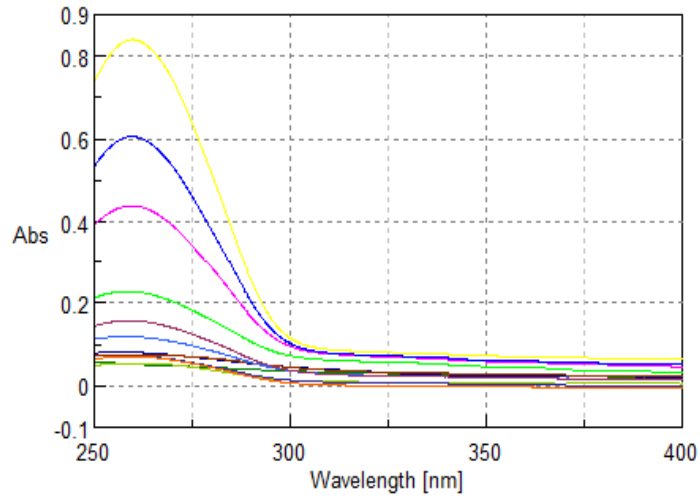
Εικόνα 52: Φάσμα UV για το φυσικό μίγμα 9τιχ



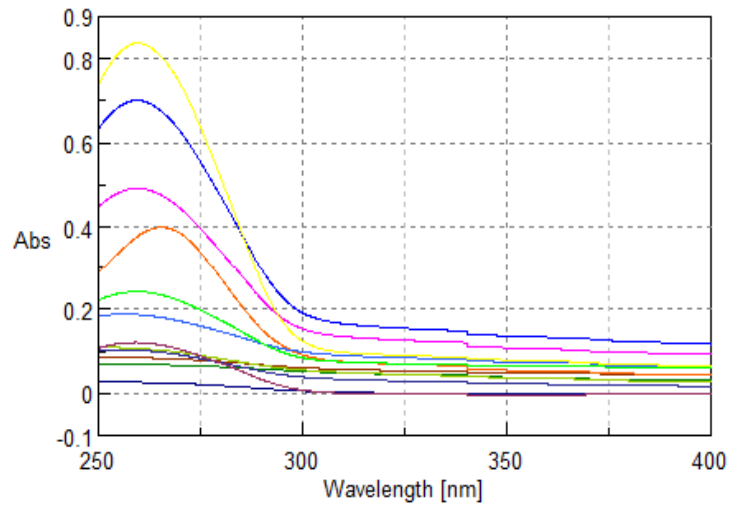
Εικόνα 53: Φάσμα UV για το φυσικό μίγμα 10τιχ



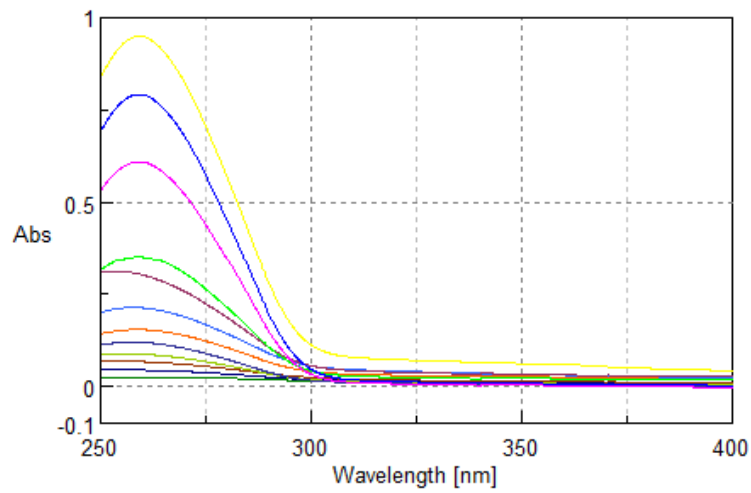
Εικόνα 54: Φάσμα UV για το φυσικό μίγμα 11τιχ



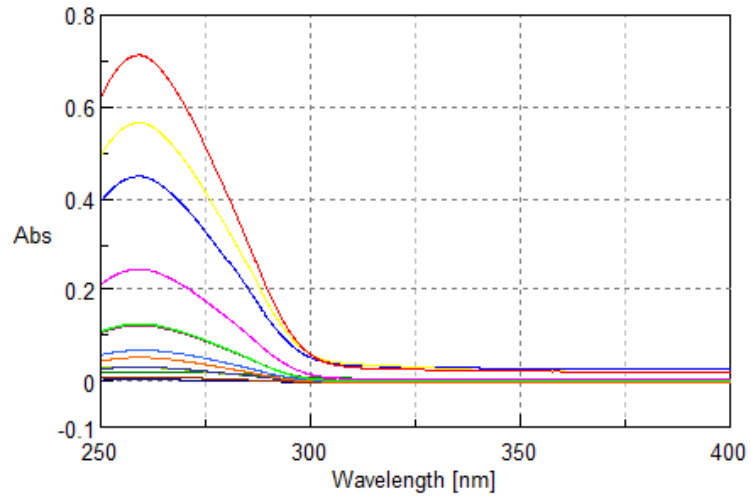
*Εικόνα 55: Φάσμα UV για το φυσικό μίγμα 17mix*



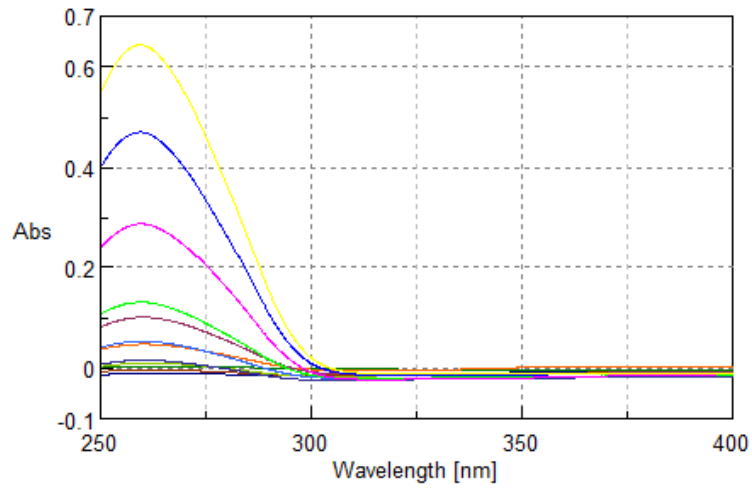
*Εικόνα 56: Φάσμα UV για το φυσικό μίγμα 18mix*



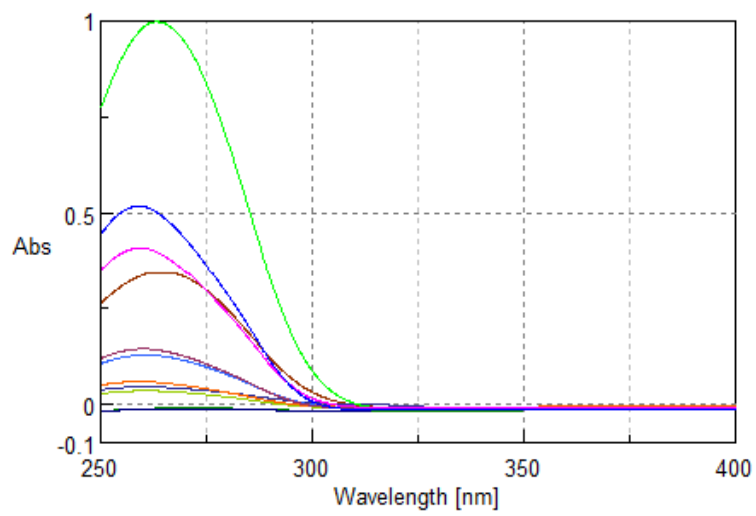
*Εικόνα 57: Φάσμα UV για το φυσικό μίγμα 20mix*



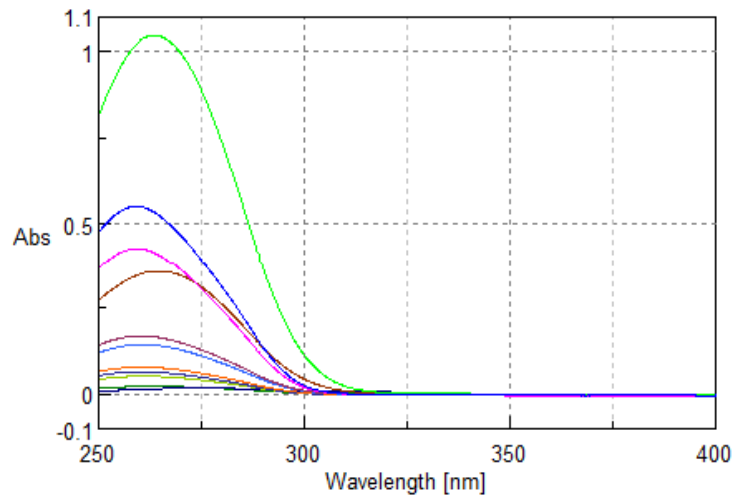
*Εικόνα 58: Φάσμα UV για το NaDES 3*



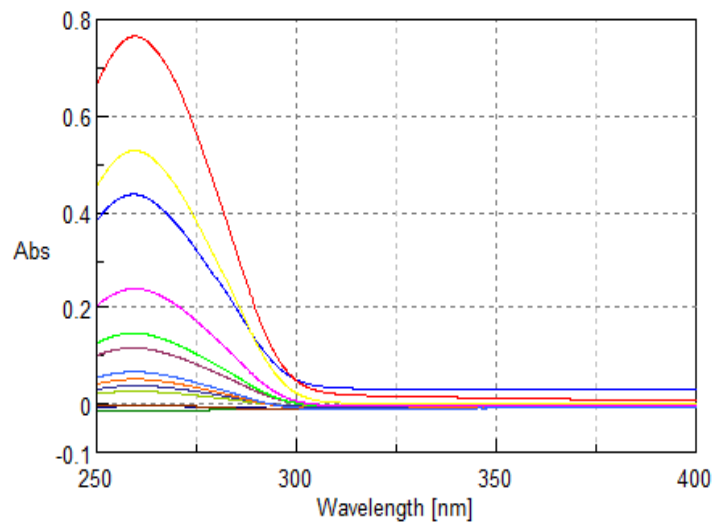
*Εικόνα 59: Φάσμα UV για το NaDES 4*



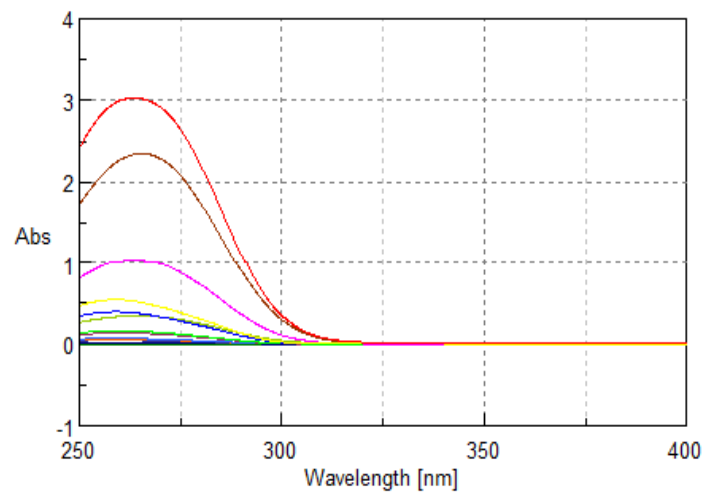
*Εικόνα 60: Φάσμα UV για το NaDES 9*



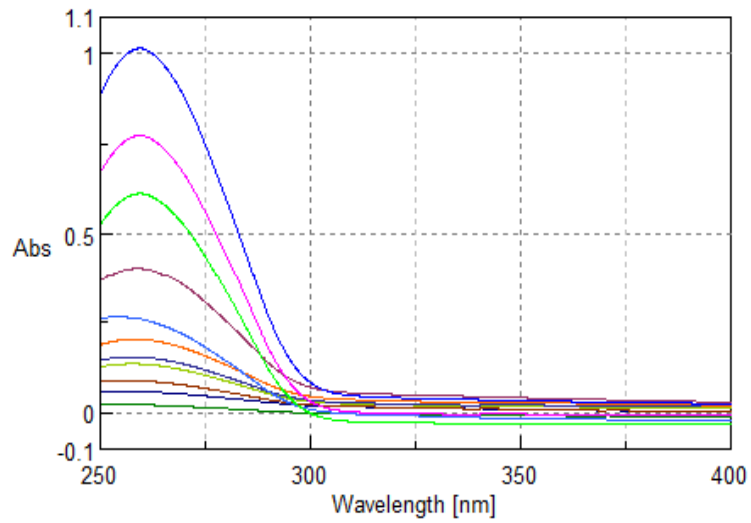
*Εικόνα 61: Φάσμα UV για το NaDES 10*



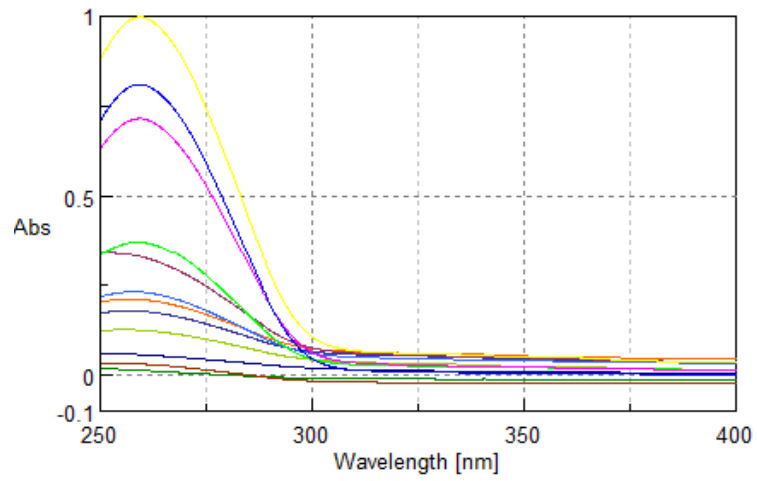
*Εικόνα 62: Φάσμα UV για το NaDES 11*



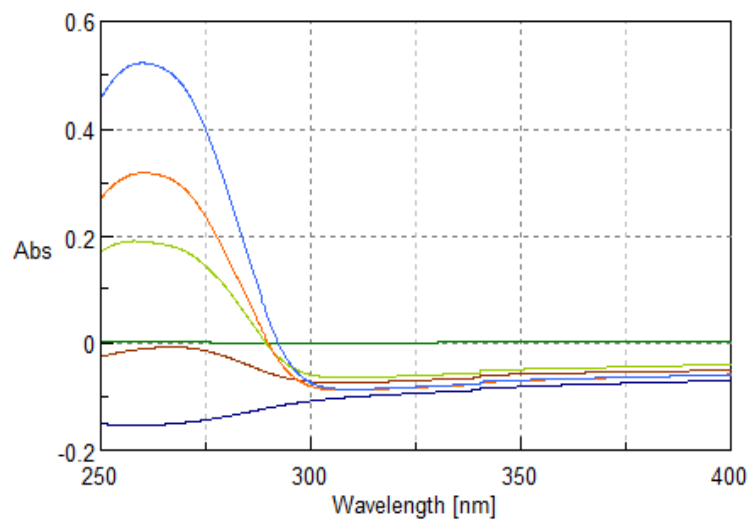
*Εικόνα 63: Φάσμα UV για το NaDES 16*



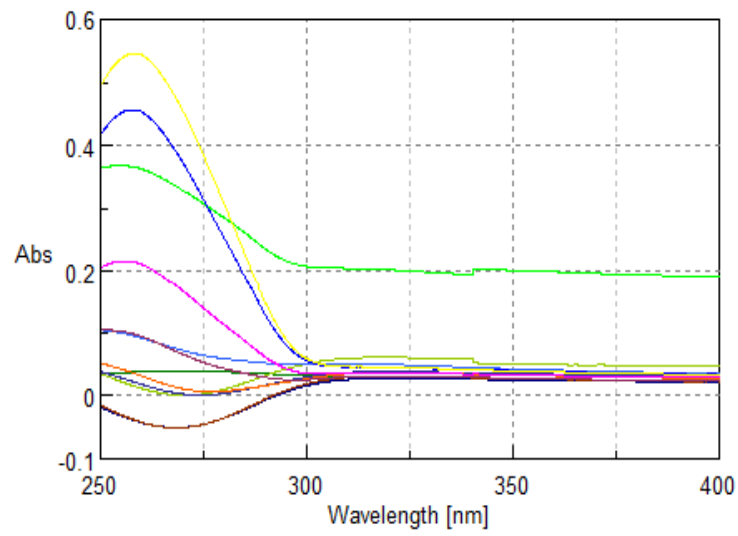
*Εικόνα 64: Φάσμα UV για το NaDES 17*



*Εικόνα 65: Φάσμα UV για το NaDES 18*



*Εικόνα 66: Φάσμα UV για το NaDES 19*



*Εικόνα 67: Φάσμα UV για το NaDES 20*

## Βιβλιογραφία

- (1) A.I. Ζουμπούλης, E.N. Πελέκα, Κ.Σ. Τριανταφυλλίδης, *Πράσινη Χημεία και Τεχνολογία στη Βιώσιμη Ανάπτυξη, Αθήνα, 2015.*
- (2) P. Anastas, N. Eghbali (2009), *Green Chemistry: Principles and Practice.* <https://pdfs.semanticscholar.org/6843/6535879442fd6bf5b0a5525b131d701d33af.pdf>.
- (3) Α. Δέτση, Α. Παπαδόπουλος, *Πράσινη Χημεία και Μηχανική, Αθήνα, 2020.*
- (4) W. Nelson, *Green Solvents for Chemistry: Perspectives and Practice, Oxford, 2003.*
- (5) M. Vian, C. Breil, L. Vernes, E. Chaabani, F. Chemat, *Green solvents for sample preparation in analytical chemistry, France, 2017.*
- (6) M. Earle, K. Seddon, *Ionic liquids. Green solvents for the future\**, Northern Ireland, **2000**, 37-50.
- (7) A. De Los Rios, A. Irabien, F. Hollmann, F. Fernandez, *Ionic Liquids: Green solvents for chemical processing, Spain, Journal of Chemistry, 2013.*
- (8) Q. Zhang, K. Vigier, S. Royer, F. Jerome, *Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications, Chemical Society Reviews, 2012, 7108-7146, 41(21).*
- (9) B. Tang, K. Row, *Recent developments in deep eutectic solvents in chemical sciences, Monatshefte fur Chemie, 2013.*
- (10) A. Shishov, A. Bulatov, M. Locatelli, S. Carradori, V. Andrich, *Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. A review, Mirochemical Journal, 2017, 33-38, 135.*
- (11) Y. Liu, J. B. Friesen, J. B. McAlpine, D. C. Lankin, S. Chen, G. F. Pauli, *Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives, 2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5913660/>*
- (12) T. El Achkar, S. Fourmentin, H. Greige-Gerges, *Deep eutectic solvents: An overview on their interactions with water and biochemical compounds, Journal of Molecular Liquids, 2019, 288*
- (13) I. Aroso, R. Craveiro, A. Rocha, M. Dionisio, S. Barreiros, R. Reis, A. Paiva, A. Duarte, *Design of controlled release systems for THEDES –*



*Therapeutic deep eutectic solvents, using supercritical fluid technology, International Journal of Pharmaceutics, 2015, 73-79, 492(1-2)*

- (14) A. Duarte, A. Ferreira, S. Barreiros, E. Cabrita, R. Reis, A. Paiva, *A comparison between pure active pharmaceutical ingredients and therapeutic deep eutectic solvents: Solubility and permeability studies, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2017, 296-304, 114*
- (15) M. Rahman, R. Roy, B. Jadhav, M. Hossain, M. Halim, D. Raynie, *Formulation, structure, and applications of therapeutic and amino acid-based deep eutectic solvents: An overview, Journal of Molecular Liquids, 2021, 321*
- (16) A. Santana, J. Mora-Vergas, T. Guimaraes, C. Amaral, A. Oliveira, M. Gonzalez, *Sustainable synthesis of natural deep eutectic solvents (NADES) by different methods, Journal of Molecular Liquids, 2019, 293*
- (17) Y. Dai, J. van Spronsen, G. Witkamp, R. Verpoorte, Y. Choi, *Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology, Analytica Chimica Acta, 2013, 61-68, 766*
- (18) S. Rauf, J. Gooding, K. Akhtar, M. A. Ghauri, M. Rahman, M. A. Anwar, A. M. Khalid, *Electrochemical approach of anticancer drugs-DNA intercalation, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 37, 2005, 205-217*
- (19) A. Mukherjee, W. Sasikala, *Drug – DNA intercalation: From discovery to the molecular mechanism, Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, 2013, 1-62,92*
- (20) R. Martinez, L. Chacon, *The search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs: What it worked and what did not work, 2005, 127-151*
- (21) X. Cai, P. Gray, D. Von Haff, *DNA minor groove binders: Back in the groove, Cancer Treatments Reviews, 2009, 437-450, 35(5)*
- (22) R. Nanjunda, W. Wilson, *Binding to the DNA minor groove by heterocyclic dications: From AT-specific monomers to GC recognition with dimers, Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, 2012*
- (23) A. Cherstvy, *Electrostatic interactions in biological DNA-related systems, Physical Chemistry Chemical Physics, 2011, 9942-9968, 13(21)*

- (24) H. Zhao, DNA stability in ionic liquids and deep eutectic solvents, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **2015**, 19-25,90(1)
- (25) D. Mondal, M. Sharma, C. Mukesh, V. Gupta, K. Prasad, Improved solubility of DNA in recyclable and reusable bio-based deep eutectic solvents with long-term structural and chemical stability, *Chemical Communications*, **2013**, 9606-9608, 49(83)
- (26) D. A. Lutterman, A. Chouai, Y. Liu, Y. Sun, C. D. Stewart, K. R. Dunbar, C. Turro, Intercalation Is Not Required for DNA Light-Switch Behavior, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130(4), 1163-1170.
- (27) T. Sahoo, J. Panda, J. Sahu, D. Sarangi, S. K. Sahoo, B. Nanda, R. Sahu, Green Solvent: Green Shadow on Chemical Synthesis, *Current Organic Synthesis*, **2020**, 17(6).
- (28) J. Kist, H. Zhao, K. K. Mitchell, G. Baker, The study and application of biomolecules in deep eutectic solvents, *Journal of Materials Chemistry B*, **2021**, 536-566, 9(3).
- (29) G. Sharma, R. Sequeira, M. Pereira, T. Maity, N. Chudasama, K. Prasad, Are ionic liquids and deep eutectic solvents the same? : Fundamental investigation from DNA dissolution point of view, *Journal of Molecular Liquids*, **2021**, 328.
- (30) M. Karimi Goftar, N. Kor, Z. Kor, DNA intercalators and using them as anticancer drugs, **2014**, 811-822.
- (31) R. Svirgelj, N. Dossi, C. Grazioli, R. Toniolo, Deep eutectic solvents (Dess) and their application in biosensor development, *Sensors*, **2021**, 21(13).
- (32) P. Baraldi, A. Bovero, F. Fruttarolo, et al. DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents, *Medicinal Research Reviews*, **2004**, 475-528, 24(4).
- (33) R. Yusof, K. Jumbri, H. Ahmad, E. Abdulmalek, M. Abdul Rahman, Binding of tetrabutylammonium bromide based deep eutectic solvent to DNA by spectroscopic analysis, *Spectrochimica Acta – Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **2021**, 253.
- (34) R. Raftery, F. O'Brien, S. Cryan, Chitosan for gene delivery and orthopedic tissue engineering applications, *Molecules*, **2013**, 5611-5647, 18(5).

(35) D. Sahoo, S. Jena, J. Dutta, S. Chakrabarty, H. Biswal, *Critical Assessment of the Interaction between DNA and Choline Amino Acid Ionic Liquids: Evidences, of Multimodal Binding and Stability Enhancement*, *ACS Central Science*, **2018**, 1642-1651, 4(12).