



ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
ΙΔΡΥΜΑ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ
ΤΟΥ Zn(II) ΜΕ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΦΑΡΜΑΚΑ**

**ΜΠΑΚΡΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΝΙΚΟΛΑΪΔΟΥ ΣΥΡΜΩ**

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2013

**ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΟΥ Zn(II) ΜΕ
ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΦΑΡΜΑΚΑ**

ΜΠΑΚΡΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΝΙΚΟΛΑΙΔΟΥ ΣΥΡΜΩ

Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης (ΑΤΕΙ),
Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 Θεσσαλονίκη ΤΘ 141

Υποβολή διατριβής που αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για την
απονομή του Πτυχίου του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ
Θεσσαλονίκης

Ημερομηνία: 25/06/13

Εισηγητής: Α. Παπαδόπουλος

ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΤΟΥ Zn(II) ΜΕ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΦΑΡΜΑΚΑ

ΜΠΑΚΡΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΝΙΚΟΛΑΙΔΟΥ ΣΥΡΜΩ

Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης (ΑΤΕΙ),
Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 Θεσσαλονίκη ΤΘ 141

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία έγινε ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συμπλόκων ενώσεων που παρασκευάστηκαν και χαρακτηρίστηκαν. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος DPPH, μία μέθοδος με ευρεία εφαρμογή στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας τροφίμων, ενώ τελευταία μόνο χρησιμοποιείται στις σύμπλοκες ενώσεις.

Συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν μονοπυρηνικά σύμπλοκα του ψευδαργύρου με υποκαταστάτες τα tolfenamic acid, mefenamic acid, Na-diclofenac, flufenamic acid, narroxen, diflunisal, niflumic acid καθώς και με υποκατάστατες-δότες ενός (πυριδίνη και 4-βενζυλοπυριδίνη) ή δύο (φαινανθρολίνη, 2,2'-διπυριδυλαμίνη και 2,2'-διπυριδίνη) ατόμων N με απώτερο σκοπό τη μελέτη ενδεχόμενης συνεργιστικής δράσης.

Ο χαρακτηρισμός των συμπλόκων ενώσεων έγινε με στοιχειακή ανάλυση, φασματοσκοπία υπερύθρου και φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού. Επιπρόσθετα, επιλύθηκαν οι κρυσταλλικές δομές συμπλόκων με περίθλαση ακτίνων-Χ.

Περιεχόμενα	Σελίδα
1. Εισαγωγή.....	6
2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση.....	7
2.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ	7
2.1.1 Ο Ψευδάργυρος ως ιχνοστοιχείο.....	7
2.1.2 Κατανομή του ψευδαργύρου στο ανθρώπινο σώμα.....	11
2.1.3 Ψευδάργυρος και η νόσος Alzheimer.....	12
2.2 ΣΥΜΠΛΟΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝ	13
2.2.1 Σύμπλοκες ενώσεις του Zn με μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα.....	13
2.2.1.2 Σύμπλοκες ενώσεις του Zn με αντικαρκινικά, αντιμικροβιακά, αντικά και ανθελονοσιακά φάρμακα.....	16
2.2.1.3 Σύμπλοκες ενώσεις του Zn με αντιμικροβιακά φάρμακα κινολονες.....	20
2.2.1.4 Σύμπλοκες ενώσεις του Zn με αντισπασμωδικά φάρμακα.....	22
2.2.1.5 Σύμπλοκες ενώσεις του Zn με φάρμακα κατά της υπερουραιμίας.....	22
2.2.1.6 Σύμπλοκες ενώσεις του Zn με αντιδιαβητικά φάρμακα.....	23
3. ΜΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΦΑΡΜΑΚΑ	24
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	33
4.1. Αντιφλεγμονώδες φάρμακο- Mefenamic acid.....	33
4.1.1 Ετεροκυκλικές ενώσεις.....	34
4.2 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ, ΔΙΑΛΥΤΕΣ, ΟΡΓΑΝΑ	35
4.2.1 Αντιδραστήρια και διαλύτες.....	35
4.2.2 Όργανα Μέτρησης.....	36
4.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	37
4.3.1 Χαρακτηρισμός και διεκρίνιση της δομής των συμπλόκων ενώσεων.....	37
4.3.2 Μελέτη αλληλεπίδρασης των ενώσεων με DNA.....	37
4.3.3 Μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συμπλόκων.....	38
4.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ Zn	38
4.4.1 Παρασκευή συμπλόκου του τύπου $[Zn(mef)_2(bipy)]$, 1.....	38
4.4.2 Παρασκευή συμπλόκου του τύπου $[Zn(mef)_2(CH_3OH)_2]$, 2.....	39
4.4.3 Παρασκευή συμπλόκου του τύπου $[Zn(mef)_2(phen)(H_2O)]$, 3.....	39
4.4.4 Παρασκευή συμπλόκου του τύπου $[Zn(mef)_2(Hpko)_2]$, 4.....	39
4.4.5 Παρασκευή συμπλόκου του τύπου $[Zn(Me_f)_2(bipyam)]$, 5.....	40
4.4.6. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ	41

4.5 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΙΕΥΚΡΙΝΙΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	45
4.5.1 Περιγραφή της δομής του συμπλόκου [Zn(mef) ₂ (bipy)].....	45
4.5.2 Περιγραφή της δομής του συμπλόκου [Zn(mef) ₂ (phen)(H ₂ O)].....	47
4.5.3 Περιγραφή της δομής του συμπλόκου [Zn(Mef) ₂ (Hrko) ₂].....	48
5. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ-ΟΡΑΤΟΥ (UV-Vis)	50
5.1 ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	51
5.1.1 Τιτλοδότηση (Φασματοσκοπία UV–vis).....	51
5.1.2 Συμπεράσματα.....	56
5.1.3 Ιξωδομετρία.....	56
5.1.4 Μελέτη με φασματοσκοπία φθορισμού.....	58
5.1.5 Αλληλεπίδραση των ΜΣΑΦ και των συμπλόκων με αλβουμίνη ορού αίματος (SerumAlboumin).....	62
5.2. Αντιοξειδωτική δράση ενώσεων	69
6. Συμπεράσματα	71
7. Βιβλιογραφία	73

1.Εισαγωγή

Ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη και λειτουργία του νευρικού συστήματος συμπεριλαμβανομένου και του εγκεφάλου, πράγμα που αποδίδεται στο ρόλο που παίζει στο μεταβολισμό των νουκλεϊνικών οξέων και των πρωτεϊνών, στη διαίρεση των κυττάρων και την ανάπτυξή τους, αφού ο Zn αποτελεί το "δομικό στοιχείο" του παράγοντα ανάπτυξης των νευρών και συμβάλλει στη μεταβίβαση μηνυμάτων. Αύξηση όμως της συγκέντρωσης του ψευδαργύρου στα εγκεφαλικά κύτταρα προκαλεί νευροτοξικότητα. Στη μείωση αυτής της συγκέντρωσης του ψευδαργύρου προσανατολίζονται οι επιστήμονες για να βρουν λύση στην καταπολέμηση της ασθένειας του Alzheimer (AD) .

Είναι γνωστό ότι ο ψευδάργυρος βρίσκεται στην ινσουλίνη συναρμωσμένος με τρία άτομα αζώτου των ιστιδινών και τρία μόρια νερού με δομή παραμορφωμένου οκταέδρου που θεωρείται ως η λειτουργική δομή. Έχει ακόμη βρεθεί ότι το άτομο του Zn παίζει σημαντικό δομικό και φαρμακευτικό ρόλο στη μιμητική δράση της ινσουλίνης (Coulston-Dandona., 1980).

Είναι απαραίτητος στο γεννητικό σύστημα των αρρένων και ιδιαίτερα χρήσιμος για το δέρμα, τα νύχια και τις τρίχες. Σταθεροποιεί τα κύτταρα έναντι των ιών και είναι ιδιαίτερα χρήσιμος στην αντιμετώπιση της γρίπης και του κοινού κρυολογήματος.

Η κλιοκινόλη (5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline = CQ), μια 8- υδροξυκινόλη, είναι μια ουσία που χρησιμοποιείται για θεραπεία διαφόρων λοιμώξεων, δίνει πολύ καλά αποτελέσματα στην καταπολέμηση της AD σε προκλινικές και πρόσφατες κλινικές δοκιμές (Vaira., et al., 2002)

Υπάρχουν σύμπλοκες ενώσεις του Zn με μη- στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα όπως η ινδομεθασίνη (**indomethacin** = 1-4-chlorobenzoyl)-5methoxy-2-methyl-1Hindole-3-acetic acid = IndoH] που εμφανίζει αρκετά ευνοϊκές αντιφλεγμονώδεις, αναλγητικές και αντιυπερτικές ιδιότητες, όμως έχει και ορισμένα μειονεκτήματα. Στα μειονεκτήματα αυτά περιλαμβάνεται το έλκος στομάχου και η αιμορραγία που προκαλεί, που στην κατηγορία των φαρμάκων αυτών πολλά φάρμακα έχουν τέτοιου είδους παρενέργειες στον ανθρώπινο οργανισμό. Έτσι λοιπόν σε μια προσπάθεια να βελτιωθεί η δράση του φαρμάκου παρασκευάστηκαν και χαρακτηρίστηκαν τα σύμπλοκα του Zn με την ινδομεθασίνη ως ligand. Τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ) αποτελούν μια κατηγορία φαρμάκων με αναλγητική, αντιφλεγμονώδη και αντιυπερτική δράση, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη συμπτωματική αντιμετώπιση του πόνου και των άλλων συμπτωμάτων της φλεγμονής. Ο μηχανισμός δράσης των ΜΣΑΦ σχετίζεται με την αναστολή της παραγωγής των προσταγλανδινών (PGs) (Regtop - Biffin., 1995).

Επίσης υπάρχουν ενώσεις του Zn με αντιμικροβιακά φάρμακα κινολόνες εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της αντιβακτηριδιακής τους δράσης διότι χρησιμοποιούνται ευρέως στη θεραπεία πολλών μολύνσεων καθώς η αντιβακτηριδιακή τους δράση είναι ικανή να εμποδίσει την αντιγραφή του DNA. (Tarushi., 2011).

Η μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συμπλόκων ενώσεων πραγματοποιήθηκε με τη γνωστή μέθοδο DPPH με τη χρήση φασματοσκοπίας ορατού. Σκοπός της εργασίας ήταν να μελετηθεί η διαφοροποίηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, η οποία συνδέεται έμμεσα με τη φλεγμονή, του φαρμάκου, μετά την ένωση του με το μέταλλο.

2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

2.1 Βιολογικός ρόλος του ψευδάργυρου

2.1.1 Ο Ψευδάργυρος ως ιχνοστοιχείο

Ο ψευδάργυρος μαζί με το κάδμιο και τον υδράργυρο ανήκουν στην τελευταία ομάδα των μεταβατικών στοιχείων του περιοδικού πίνακα. Στην πραγματικότητα τα στοιχεία αυτά δεν είναι μεταβατικά γιατί έχουν συμπληρωμένα τα d εσωτερικά τους τροχιακά. Ανάμεσα στα υπόλοιπα στοιχεία, ο ψευδάργυρος καταλαμβάνει την 23^η θέση σε αφθονία στη φύση. Ωστόσο είναι μετά το σίδηρο το δεύτερο πιο άφθονο μεταβατικό μέταλλο στο ανθρώπινο σώμα.

Ο Zn βρίσκεται στη φύση υπό μορφή διαφόρων ορυκτών, όπως είναι ο σφαλερίτης (ZnS), ο σμισθωνίτης (ZnCO₃) κ.α. από τα οποία λαμβάνεται ο ψευδάργυρος. Λόγω της ηλεκτρονικής του διαμόρφωσης (d¹⁰) απαντάται σε διαλύματα μόνο σε μια βαθμίδα οξείδωσης, Zn(II). Στη βαθμίδα αυτή δρα ως οξύ κατά Lewis. Η ευκαμψία της σφαίρας συναρμογής του, σε συνάρτηση με τη γεωμετρία του και τον αριθμό συναρμοτών, ευθύνονται για τη μεγάλη παρουσία του ψευδαργύρου στις πρωτεΐνες του ανθρώπινου σώματος. Το ιόν του ψευδαργύρου, Zn²⁺, θεωρείται κατά Pearson ότι ανήκει μάλλον στα ενδιάμεσα οξέα και επομένως σχηματίζει κατά προτίμηση σταθερά σύμπλοκα με ligands ενδιάμεσες βάσεις που έχουν ως δότες ηλεκτρονίων άτομα οξυγόνου, αζώτου και θείου.

Ο ψευδάργυρος σε αντίθεση με το σίδηρο, το χαλκό και το μαγγάνιο, λόγω της ηλεκτρονικής του διαμόρφωσης δεν παίρνει μέρος σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, που γίνονται στους ζωντανούς οργανισμούς. Ο Williams υποστήριξε ότι η απουσία οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων του ψευδαργύρου είναι ζωτικής σημασίας, γιατί τον καθιστά ικανό να λειτουργήσει καταλυτικά σε συστήματα ευαίσθητα σε οξειδώσεις από δραστικές οξυγονούχες ρίζες. Οι ρίζες αυτές παράγονται από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις *in vivo*. Αυτό μπορεί να εξηγήσει γιατί ο ψευδάργυρος έχει «επιλεγεί» από τη φύση να βρίσκεται σε ορισμένα ένζυμα του μεταβολισμού του RNA και DNA και δεν έχει επιλεγεί ο σίδηρος, το μαγγάνιο ή άλλα μεταβατικά στοιχεία.

Ενώ τα στοιχεία κάδμιο και υδράργυρος είναι πολύ τοξικά, ο Zn²⁺ είναι ένα από τα πιο σημαντικά κατιόντα για τη σωστή λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού, ο

ο οποίος χρειάζεται κατά μέσο όρο 20 mg ψευδαργύρου την ημέρα. Την απορρόφηση του Zn^{2+} την παρεμποδίζουν τα ιόντα Cd^{2+} και Cu^{2+} . Στο ανθρώπινο σώμα υπάρχουν περίπου 2g ψευδαργύρου σε διάφορες ενώσεις. Υπάρχουν χιλιάδες πρωτεΐνες και περισσότερα από 200 ένζυμα που περιέχουν ψευδάργυρο. Ανάλογα με το ρόλο που παίζει ο ψευδάργυρος σε κάθε περίπτωση, οι πρωτεΐνες ψευδαργύρου μπορούν να χωριστούν σε διάφορες ομάδες:

A) Στην καταλυτική ομάδα όπου ανήκουν π.χ. η καρβονική ανυδράση και η καρβοξυπεπτιδάση A, ο ψευδάργυρος συμμετέχει άμεσα στην καταλυτική λειτουργία του ενζύμου.

B) Στα ένζυμα όπου ο ψευδάργυρος βρίσκεται στο ενεργό τους κέντρο (όπως π.χ. η πρωτεΐνη κινάση C) και στα οποία ένα ή περισσότερα μεταλλικά ιόντα διασφαλίζουν την αναδίπλωση που απαιτείται για την ύπαρξη βιοδραστικότητας στο μόριο.

Γ) Στα ένζυμα όπου ο ψευδάργυρος έχει συνεργιστική καταλυτική δράση (π.χ. στη σουπεροξειδική δισμουτάση) και ένα ή περισσότερα ιόντα ψευδαργύρου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για καταλυτικές, ρυθμιστικές και δομικές λειτουργίες.

Επιπλέον, υπάρχουν και πρωτεΐνες ψευδαργύρου-δακτύλου όπου ο ψευδάργυρος που περιέχουν συμμετέχει σε λειτουργίες μεταγραφής. Τέλος, ο ψευδάργυρος σχετίζεται με τα λιπίδια των μεμβρανών, το DNA και RNA, αλλά η λειτουργία του δεν είναι σαφής.

Έχοντας υπόψη το μεγάλο αριθμό των μεταβολικών λειτουργιών που απαιτούν την ύπαρξη ψευδαργύρου, δεν πρέπει να απορούμε γιατί η έλλειψη ψευδαργύρου ή η μη συμμετρική κατανομή στο σώμα, στα όργανα ή στα κύτταρα, οδηγεί σε ποικιλία παθολογικών καταστάσεων. Η έλλειψη ψευδαργύρου μπορεί να προκαλέσει εμφάνιση κηλίδων στο δέρμα, ανωμαλίες στο σκελετό και ανωμαλίες στο σχηματισμό νουκλεϊνικών οξέων.

Η ανεπάρκεια του ψευδαργύρου στον άνθρωπο μελετήθηκε από τον Prasad και τους συνεργάτες του πριν από 50 χρόνια περίπου. Αυτοί περιέγραψαν το σύνδρομο του νανισμού και της σεξουαλικής ανωριμότητας σε έφηβα αγόρια. Είναι δύσκολο να υπολογίσουμε σήμερα κατά πόσο υπάρχει ακόμη στον κόσμο έλλειψη ψευδαργύρου. Ωστόσο ο Οργανισμός Παγκόσμιας Υγείας υπολογίζει ότι περισσότερο από το 40% των νέων παιδιών σε πολλά μέρη της Αφρικής

και της Ασίας πάσχουν από νανισμό και αυτό μπορεί να συσχετιστεί με μια διαίτα περιορισμένη σε ψευδάργυρο.

Οι λόγοι στους οποίους μπορεί να οφείλεται η έλλειψη ψευδαργύρου είναι ειδικές δίαιτες, κατάχρηση αλκοολούχων ποτών, ασθένειες του ήπατος, γαστρεντερικές ανωμαλίες, εκτεταμένα εγκαύματα, χρόνιες νεφρικές ανεπάρκειες, διατροφή πλούσια σε φυτικά οξέα. Η ανεπάρκεια ψευδαργύρου μπορεί να διαπιστωθεί με τον προσδιορισμό του στο πλάσμα του αίματος. Επίσης, τα ποσοστά του ψευδαργύρου στα ερυθρά αιμοσφαίρια, στα μαλλιά και στα νύχια δίνουν μια εικόνα μακρόχρονης ή μη ανεπάρκειας. Ακόμη ενδεικτικός είναι ο προσδιορισμός του στα ούρα του 24ώρου σε περιπτώσεις νεφρικής ανεπάρκειας ή κίρρωσης του ήπατος.

Ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη και λειτουργία του νευρικού συστήματος συμπεριλαμβανομένου και του εγκεφάλου, πράγμα που αποδίδεται στο ρόλο που παίζει στο μεταβολισμό των νουκλεϊνικών οξέων και των πρωτεϊνών, στη διαίρεση των κυττάρων και την ανάπτυξή τους, αφού ο Zn αποτελεί το "δομικό στοιχείο" του παράγοντα ανάπτυξης των νεύρων και συμβάλλει στη μεταβίβαση μηνυμάτων. Αύξηση όμως της συγκέντρωσης του ψευδαργύρου στα εγκεφαλικά κύτταρα προκαλεί νευροτοξικότητα. Στη μείωση αυτής της συγκέντρωσης του ψευδαργύρου προσανατολίζονται οι επιστήμονες για να βρουν λύση στην καταπολέμηση της ασθένειας του Alzheimer (AD) .

Η υπερβολική απορρόφηση ψευδαργύρου, ωστόσο, μπορεί να καταστείλει την απορρόφηση χαλκού και σιδήρου. Γενικά ο ψευδάργυρος επιδρά ανταγωνιστικά στο μεταβολισμό του χαλκού και αντίστροφα. Αύξηση της συγκέντρωσης του ενός στοιχείου συνεπάγεται ελάττωση της συγκέντρωσης του άλλου. Η ανταγωνιστική δράση του Cu ως προς τον Zn μπορεί να αποδοθεί κυρίως στο γεγονός ότι ο Cu σχηματίζει σύμπλοκα μεγαλύτερης σταθερότητας με ορισμένα αμινοξέα, πεπτίδια και πρωτεΐνες από ότι ο Zn.

Έντονη ανταγωνιστική δράση υπάρχει και μεταξύ ψευδαργύρου και καδμίου. Αυτό είναι κάτι το αναμενόμενο αφού το κάδμιο έχει παρόμοια χημική συμπεριφορά με τον ψευδάργυρο και βρίσκεται αμέσως κάτω από αυτόν στην IIB ομάδα του περιοδικού πίνακα.

Παραμαγνητικά και χρωμοφόρα μεταλλικά ιόντα όπως το Mn^{2+} και το Co^{2+}

έχουν αντικατασταθεί από Zn^{2+} στα ένζυμα για να μελετηθεί το περιβάλλον της ενεργής περιοχής. Όμως οι ενζυμικές δραστηριότητες και οι δομές των περιοχών δέσμησης του μετάλλου για τα ένζυμα με υποκατεστημένο μέταλλο είναι στις περισσότερες περιπτώσεις διαφορετικές από αυτές των φυσικών ενζύμων με δεσμευμένο Zn^{2+} . Γι' αυτό αναζητήθηκαν φασματοσκοπικές μέθοδοι για τη διερεύνηση αυτών των μορίων, όπως η φασματοσκοπία NMR.

Ο ψευδάργυρος λειτουργεί σαν «τροχονόμος» καθώς κατευθύνει και επιβλέπει την αποτελεσματική ροή των διαδικασιών του σώματος και την διατήρηση των ενζύμων και των κυττάρων. Είναι απαραίτητος στο γεννητικό σύστημα των αρρένων και ιδιαίτερα χρήσιμος για το δέρμα, τα νύχια και τις τρίχες. Σταθεροποιεί τα κύτταρα έναντι των ιών και είναι ιδιαίτερα χρήσιμος στην αντιμετώπιση της γρίπης και του κοινού κρυολογήματος.

Επειδή ο Zn^{2+} έχει συμπληρωμένα τα 3d τροχιακά δεν εμφανίζει d-d μεταπτώσεις και δεν είναι χρωμοφόρος. Το ιόν Zn^{2+} είναι πολύ σταθερό και μόνο κάτω από ακραίες καταστάσεις υφίσταται οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, αποκλείοντας την ύπαρξη ταινιών μεταφοράς φορτίου ligand-μέταλλου. Αυτό καθιστά τη φασματοσκοπία UV-Vis ακατάλληλη για τη ανίχνευση ελεύθερου ή δεσμευμένου Zn^{2+} . Επειδή ο ψευδάργυρος είναι διαμαγνητικός σε όλες τις ενώσεις του καθιστά αδύνατες τις μετρήσεις φασματοσκοπίας EPR και τις μαγνητικές μετρήσεις. Τέλος, η πλειοψηφία των φυσικών ισοτόπων έχουν μηδενικό πυρηνικό spin κι έτσι δεν εμφανίζουν σήμα στο NMR.

2.1.2 Κατανομή του ψευδαργύρου στο ανθρώπινο σώμα

Η διαιτητική αξιοποίηση, αλλά και η δράση του ψευδαργύρου, επηρεάζονται από την ποσότητα του Zn που λαμβάνεται με τα διάφορα τρόφιμα, την ταχύτητα με την οποία απορροφάται από το γαστρεντερικό σύστημα, την ταχύτητα και την ποσότητα απομάκρυνσης του Zn από τον οργανισμό, το είδος των τροφίμων που καταναλώνονται και την παρουσία ορισμένων ουσιών, που είτε βοηθούν στην απορρόφηση του ψευδαργύρου, όπως π.χ. η ιστιδίνη, είτε επιβραδύνουν την απορρόφηση, όπως η πρωτεΐνη της σόγιας, τα φωσφορικά, η καζεΐνη κ.ά. (Kirschgessner et al., 1983).

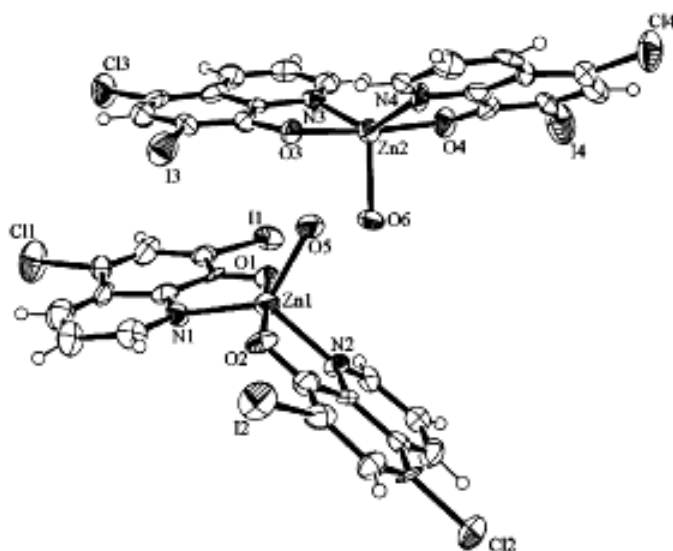
Ο ψευδάργυρος βρίσκεται σε όλα τα όργανα, τους ιστούς και τα υγρά του ανθρώπινου σώματος. Οι μέσες περιεκτικότητες του Zn στους κυριότερους ιστούς φαίνονται στον πίνακα 1 (Μασουσάκη, 1992).

Πίνακας 1. Ποσότητα ψευδαργύρου σε διάφορους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού

Ιστός	Μέση συγκέντρωση Zn (μg/g)	Ολική ποσότητα Zn (g)	Αναλογία στη συνολική ποσότητα Zn (%)
Σκελετικός μυς	51	1,53	57
Οστά	100	0,77	29
Δέρμα	32	0,16	6
Συκώτι	58	0,13	5
Εγκέφαλος	11	0,04	1,5
Νεφρά	55	0,02	0,7
Καρδιά	23	0,01	0,4
Μαλλιά	150	< 0,01	0,1
Πλάσμα αίματος	1	< 0,01	0,1

2.1.3 Ψευδάργυρος και η νόσος Alzheimer

Η νόσος του Alzheimer (AD) τα τελευταία χρόνια συσχετίζεται με την αυξημένη συγκέντρωση του ψευδαργύρου στο εσωτερικό των εγκεφαλικών κυττάρων. Η κλιοκινόλη (5-chloro-7-iodo-8-hydroxyquinoline = CQ), μια 8- υδροξυκινολίνη, είναι μια ουσία που χρησιμοποιείται για θεραπεία διαφόρων λοιμώξεων, δίνει πολύ καλά αποτελέσματα στην καταπολέμηση της AD σε προκλινικές και πρόσφατες κλινικές δοκιμές. Συγκεκριμένα, θεωρείται ότι το φάρμακο αυτό ενεργοποιεί τη μεταφορά του Zn από το εσωτερικό των κυττάρων στην Αβ πρωτεΐνη. Η μεταφορά αυτή οδηγεί στην ελάττωση νευροτοξικότητας του εγκεφάλου. Παρασκευάστηκε το σύμπλοκο της CQ με Zn με τύπο $[Zn(CQ)_2(H_2O)]$ και η κρυσταλλική του δομή επιλύθηκε με περίθλαση ακτίνων-Χ (σχήμα 1), όπου φαίνεται ότι Zn έχει αριθμό συναρμογής πέντε. (Vaira M et al., 2002)



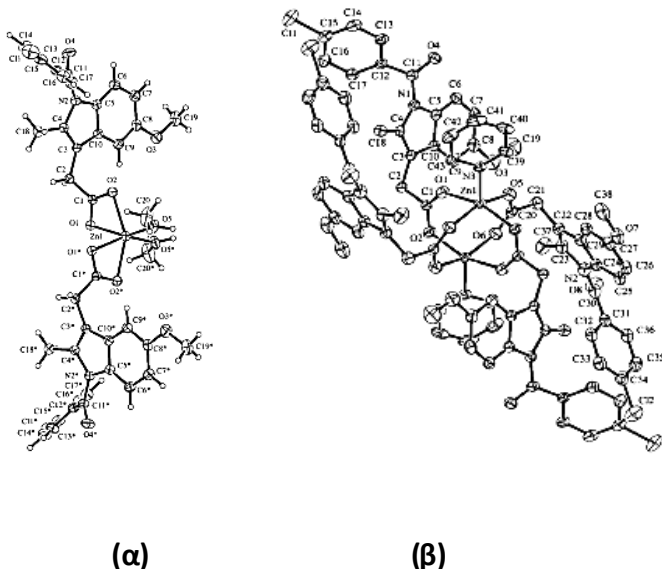
Σχήμα 1 : Δύο ανεξάρτητες μονάδες συμμετρίας του ίδιου μορίου $[Zn-(CQ)_2 (H_2O)]$

2.2 ΣΥΜΠΛΟΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝ

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και η μελέτη αρκετων συμπλόκων ενώσεων του ψευδαργύρου τόσο με υποκαταστάτες ορισμένες δραστικές ουσίες φαρμάκων όσο και ενώσεων που παρουσιάζουν κάποια βιολογική δράση. Παρακατω θα αναφερθούν και θα περιγραφούν ορισμένες από αυτές τις ενώσεις.

2.2.1 Σύμπλοκες ενώσεις του Zn με μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα

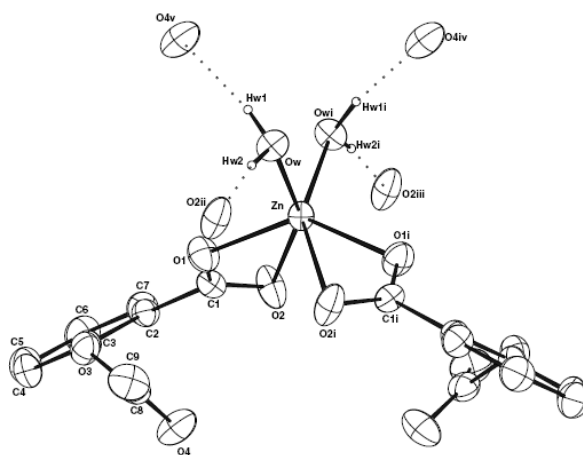
Ένα χαρακτηριστικό μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο (ΜΣΑΦ) είναι η ινδομεθασίνη (**indomethacin** = 1-4-chlorobenzoyl)-5methoxy-2-methyl-1Hindole-3-acetic acid = IndoH] που εμφανίζει αρκετά ευνοϊκές αντιφλεγμονώδεις, αναλγητικές και αντιπυρετικές ιδιότητες, όμως έχει και ορισμένα μειονεκτήματα. Στα μειονεκτήματα αυτά περιλαμβάνεται το έλκος στομάχου και η αιμορραγία που προκαλεί, που στην κατηγορία των φαρμάκων αυτών πολλά φάρμακα έχουν τέτοιου είδους παρενέργειες στον ανθρώπινο οργανισμό. Έτσι λοιπόν σε μια προσπάθεια να βελτιωθεί η δράση του φαρμάκου παρασκευάστηκαν και χαρακτηρίστηκαν τα σύμπλοκα του Zn με την ινδομεθασίνη ως ligand όπως φαίνεται και στο σχήμα 2 όπου απεικονίζονται δύο δομές του ψευδαργύρου με την ινδομεθασίνη. Στο σύμπλοκο $[Zn(Indo)_2(MeOH)_2]$, ο Zn έχει αριθμό συναρμογής έξι και παραμορφωμένη οκταεδρική γεωμετρία ενώ στο διπυρηνικό σύμπλοκο $[Zn_2(Indo)_4(py)_2]$ έχει αριθμό συναρμογής πέντε, με τετραγωνική πυραμιδική γεωμετρία. Το σύμπλοκο Zn-Indo εμφανίζει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Regtop et al., 1995).



Σχήμα 2 : Κρυσταλλική δομή των συμπλόκων (α) $[Zn(Indo)_2(MeOH)_2]$ και (β) $[Zn_2(Indo)_4(py)_2]$

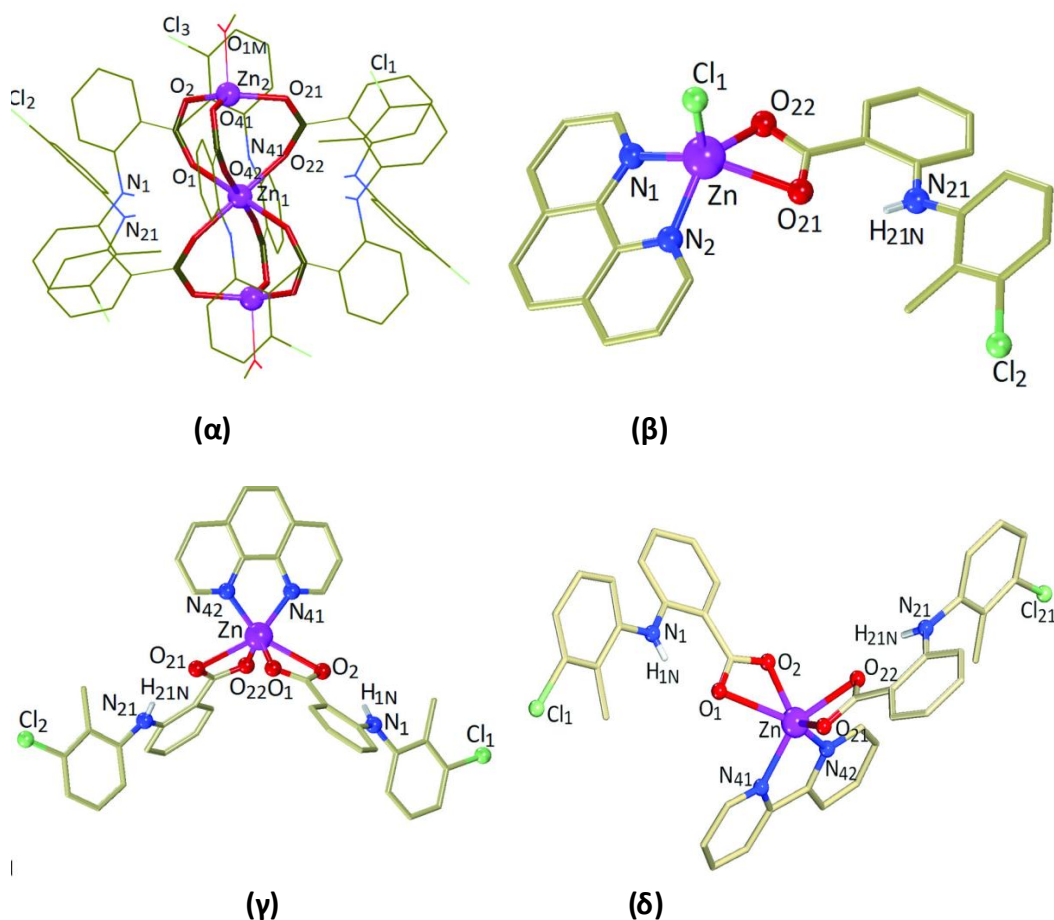
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, ύστερα από αλληπάλληλες δοκιμές των συμπλόκων αυτών σε πειραματόζωα, ήταν αρκετά ενθαρρυντικά καθώς έδειξαν χαμηλή τοξικότητα στο λεπτό έντερο, παρ'όλα αυτά παραμένουν ακόμη τοξικά για το στομάχι. Αντίστοιχα σύμπλοκα του Cu και του Co παρουσιάζουν χαμηλότερη τοξικότητα κάτι που ενθαρρύνει την περαιτέρω έρευνα για να αντιμετωπιστούν και οι εναπομείναντες παρενέργειες.

Μια ακόμη σειρά μελετών έγινε και με υποκαταστάτη την ασπιρίνη (acetylsalicylate) όπου παρασκευάστηκε και μελετήθηκε η δομή του συμπλόκου $[Zn(aspirinate)_2(H_2O)_2]$ (σχήμα 3) (Lemoine et al., 2004). Στην βιβλιογραφία έχει αναφερθεί πως το συγκεκριμένο σύμπλοκο έχει λιγότερες παρενέργειες από το απλό φάρμακο και οι θεραπευτικές του ιδιότητες είναι καλύτερες (Singla et al., 1990; Singa et al., 1994).



Σχήμα 3 : Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου $[Zn(aspirinate)_2(H_2O)_2]$

Τελος, με υποκαταστατη το μη-στεροειδες αντιφλεγμονωδες φαρμακο tolfenamic acid παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν οι δομες των συμπλόκων $[Zn_3(tolf)_6(CH_3OH)_2]$, $[Zn(tolf)(phen)Cl]$, $[Zn(tolf)_2(phen)] \cdot Et_2O, 4 \cdot EtO_2$ και $[Zn(tolf)_2(bipy)]$ (σχημα 4)



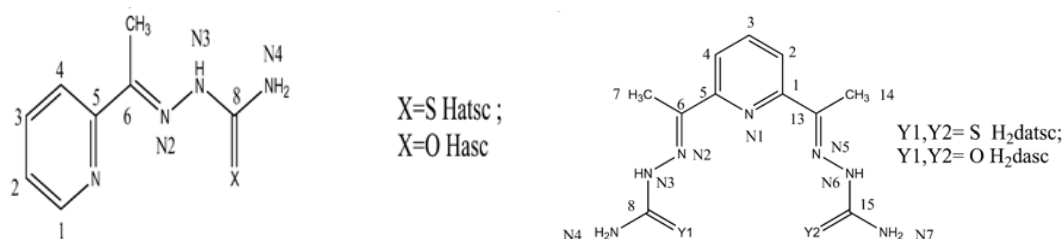
Σχήμα 4 : Κρυσταλλική δομή των συμπλόκων (α) $[Zn_3(tolf)_6(CH_3OH)_2]$, (β) $[Zn(tolf)(phen)Cl]$, (γ) $[Zn(tolf)_2(phen)] \cdot Et_2O, 4 \cdot EtO_2$ και (δ) $[Zn(tolf)_2(bipy)]$

2.2.1.2 Σύμπλοκες ενώσεις του Zn με αντικαρκινικά, αντιμικροβιακά, αντιακτικά και ανθελονοσιακά φάρμακα

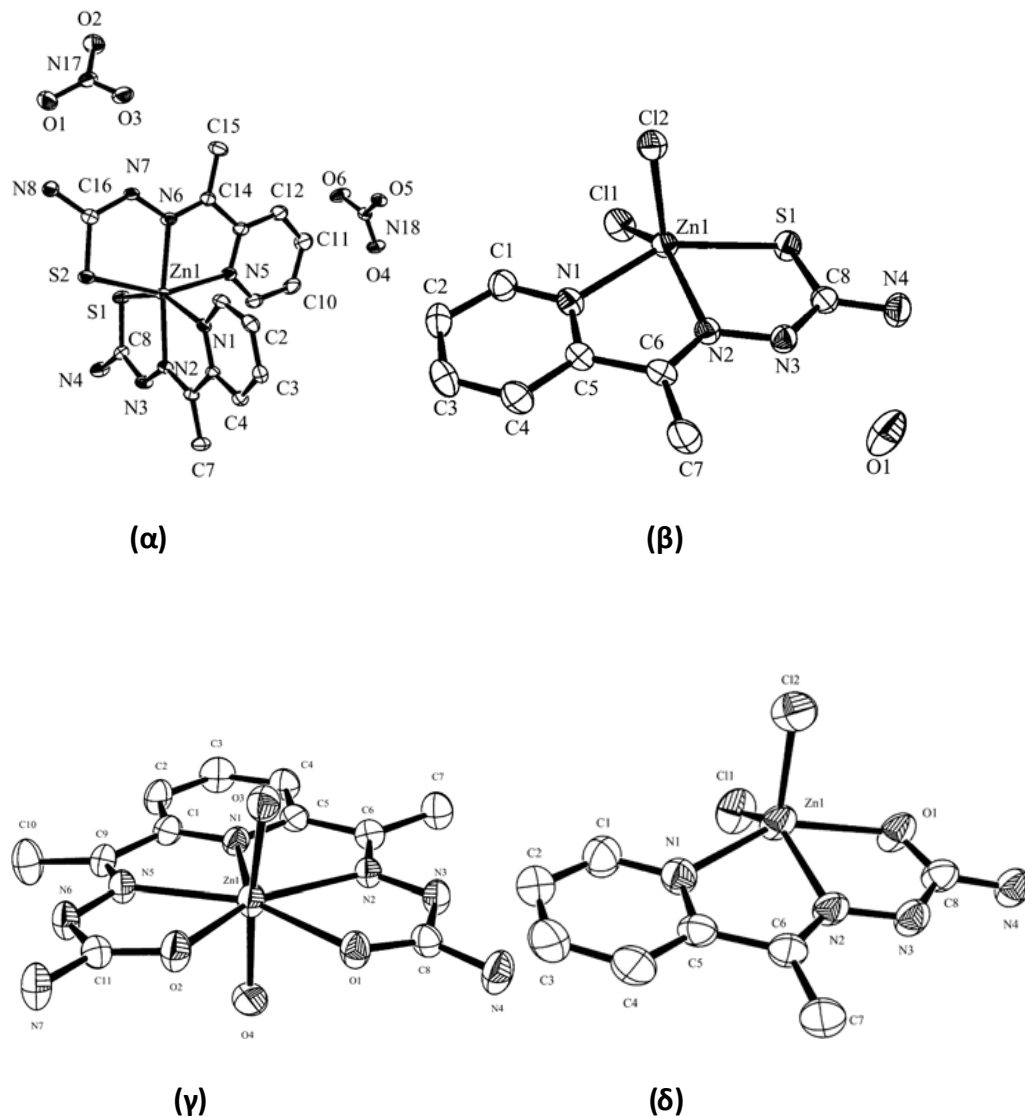
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι σύμπλοκες ενώσεις του Zn με θειοσεμικαρβαζόνες λόγω της χημείας των σεμικαρβαζόνων και της εξαιρετικής βιολογικής δράσης τους. Οι βιολογικές τους ιδιότητες δεν περιορίζονται σε έναν τομέα αλλά περιλαμβάνουν σημαντικές και συγχρόνως πολλές δράσεις, μεταξύ των οποίων είναι η αντικαρκινική, αντιμικροβιακή, αντιακτική δράση και η δράση κατά της ελονοσίας, οπότε δεν θα μπορούσαν να περάσουν απαρατήρητες από την επιστημονική κοινότητα. Στη συνέχεια παρουσιάζονται μερικά από τα σύμπλοκα που παρασκευάστηκαν, χαρακτηρίστηκαν και μελετήθηκαν ως προς την βιολογική τους δράση (Chikaraishi Kasuga et al., 2003).

Για τα σύμπλοκα $[Zn(Hatsc)](NO_3)_2 \cdot 0.3H_2O$, $[ZnCl_2(Hatsc)][ZnCl_2(Hasc)]$, $[Zn(H_2datsc)(H_2O)_2](OAc)_2 \cdot 5.3H_2O$, όπου Hatsc=2-acetylpyridine(thiosemicarbazone), Hasc=2-acetylpyridine(semicarbazone) και Hdatsc=2,6-diacetylpyridinebis μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δραστηριότητα (σχήμα 4) η οποία μπορεί να αποδοθεί στον δεσμό υδρογόνου που σχηματίζεται με ένα αντισταθμιστικό ιόν ή μόριο νερού ως διαλύτη (Chikaraishi Kasuga et al., 2003).

Στο σχήμα 5 παρατίθενται και οι δομές των προαναφερθέντων συμπλόκων.



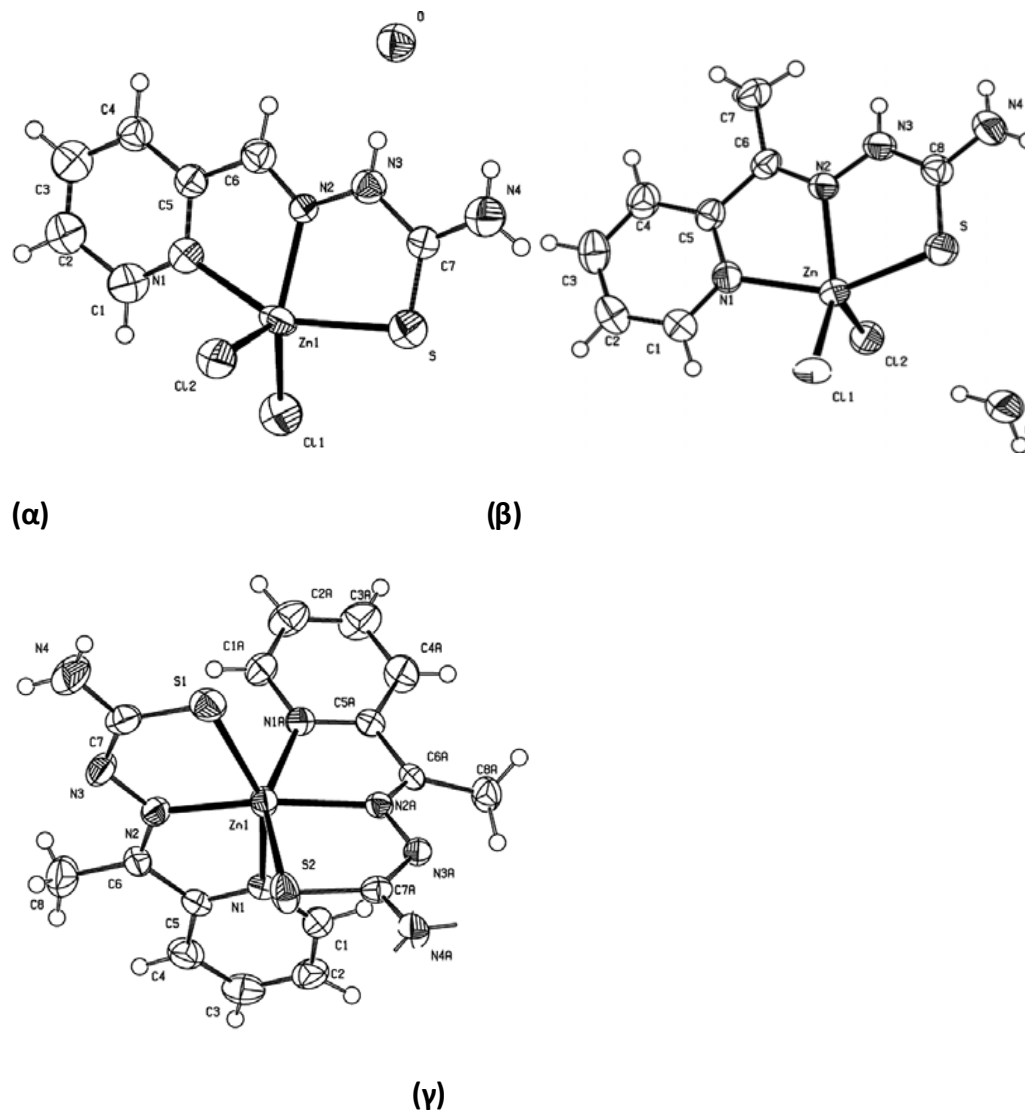
Σχήμα 4 :Συντακτικοί τύποι των υποκαταστατών Hatsc = 2-acetylpyridine (thiosemicarbazone), Hasc = 2-acetylpyridine (semicarbazone), Hdatsc = 2,6-diacetylpyridine bis(thiosemicarbazone).



Σχήμα 5 : Κρυσταλλική δομή των συμπλόκων (α) $[Zn(Hatsc)](NO_3)_2 \cdot 0.3H_2O$, (β) $[ZnCl_2(Hatsc)][ZnCl_2(Hasc)]$, (γ) $[ZnCl_2(Hasc)]$ και (δ) $[Zn(H_2datsc)(H_2O)_2](OAc)_2 \cdot 5.3H_2O$

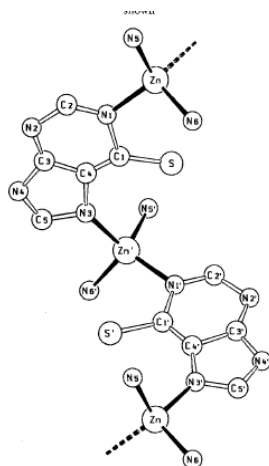
Παρασκευάστηκαν και χαρακτηρίστηκαν οι σύμπλοκες ενώσεις του Zn με διάφορους υποκαταστάτες φαρμάκων όπως, pyridine-2-carbaldehyde-thiosemicarbazone, (=HFoTsc) και (1E)-1-pyridin-2-ylethan-1-one thiosemicarbazone, (=HAcTsc). Οι κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων $[ZnCl_2(HFoTsc)(H_2O)]$, $[Zn(AcTsc)_2]$ και $[ZnCl_2(HAcTsc)(H_2O)]$ επιλύθηκαν με περίθλαση ακτίνων-Χ (σχήμα 6). Τα σύμπλοκα αυτά καθώς και τα ligands HFoTsc και HAcTsc εξετάστηκαν για την αντικαρκινική δράση τους *in vitro* απέναντι σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα MCF-7 (καρκίνου του μαστού), T24 (καρκίνου του αίματος) και στην καρκινική ινοπλασματική κυτταρική σειρά L-929 των ποντικών. Η

μελέτη της κυτταροτοξικότητας έδειξε ότι τα σύμπλοκα του Zn εμφανίζουν καλύτερες τιμές IC από το *cis-platin*, το πλέον χρησιμοποιούμενο αντικαρκινικό φάρμακο που χορηγείται στους ασθενείς σήμερα. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να θεωρηθούν ως μέσα με δυνητική αντικαρκινική δράση και χρήζουν περαιτέρω *in vitro* και *in vivo* μελετών (Kovala-Demertzi et al., 2006).



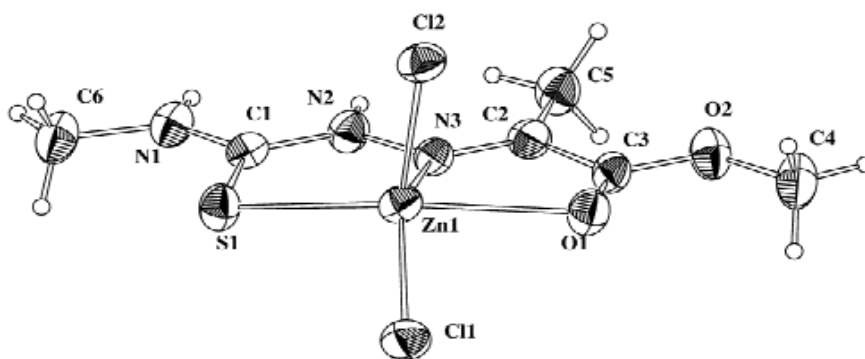
Σχήμα 6 : Κρυσταλλική δομή των συμπλόκων (α) $[ZnCl_2(HFoTsc)(H_2O)]$, (β) $[ZnCl_2(HAcTsc)(H_2O)]$, και (γ) $[Zn(AcTsc)_2]$

Επίσης έχουν παρασκευαστεί και σύμπλοκες ενώσεις Zn με υποκαταστάτη το φάρμακο μερκαπτοπουρίνη (=H₂Mer) που μιμείται τη φυσική βάση της πουρίνης της υποξανθίνης και χρησιμοποιείται κλινικά στη θεραπεία της λευχαιμίας. Ανάλογες σύμπλοκες ενώσεις του λευκοχρύσου και του παλλαδίου με τη μερκαπτοπουρίνη παρουσιάζουν αντικαρκινική δράση. Η ένωση [Zn(Mer)(NH₃)₂] \cdot H₂O πολυμερίζεται δίνοντας ένα μη αναμενόμενο μόριο (σχήμα 7), του οποίου οι βιολογικές ιδιότητες χρήζουν έρευνας (Korpenhofer et al., 1995).



Σχήμα 7 : Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου [Zn(Mer)(NH₃)₂] \cdot H₂O

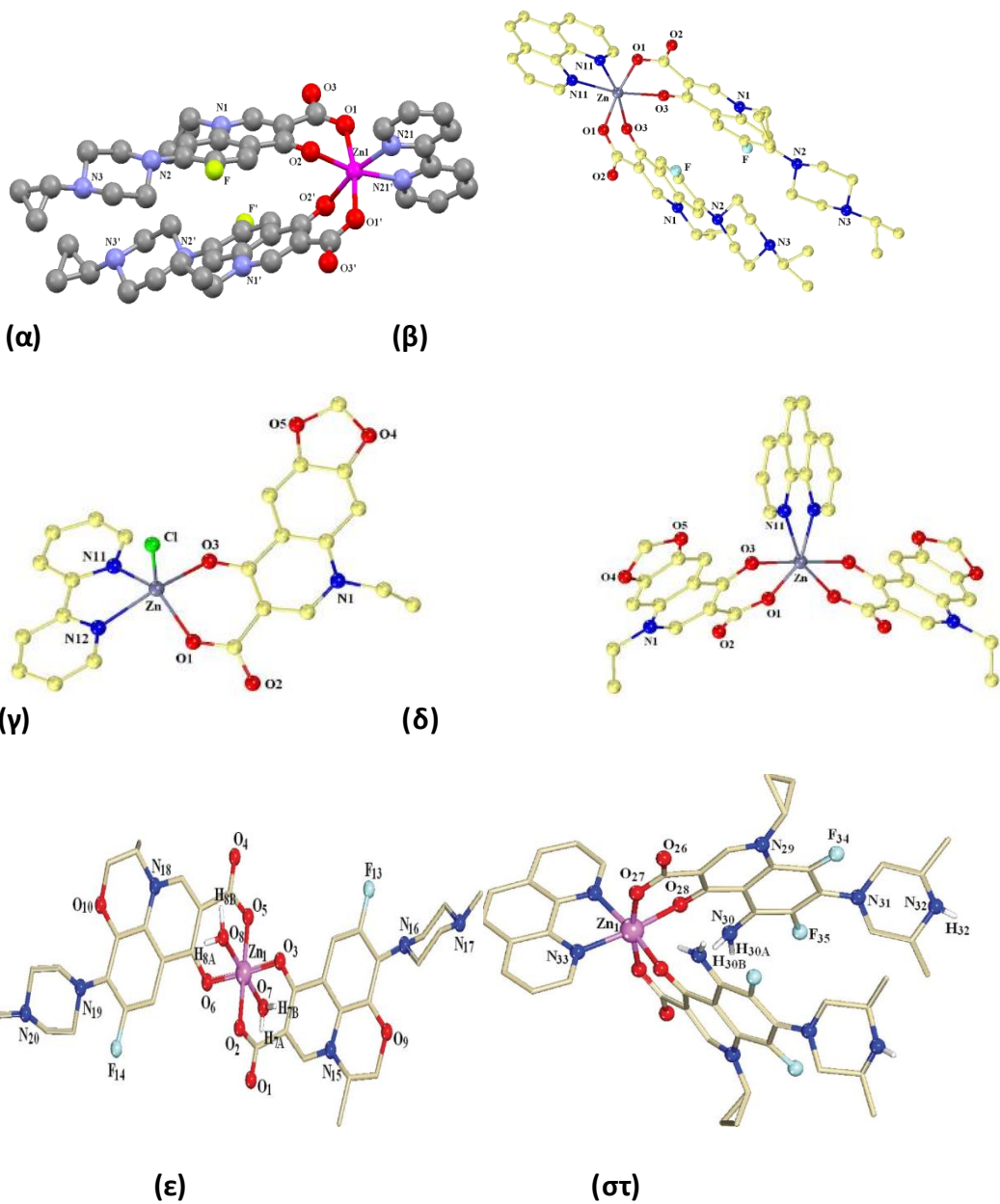
Τελος, μελέτες επίδρασης του [Zn(Me-Hmppt)Cl] (σχήμα 8) (Hmppt = methylglyuvate thiosemicarbazone) σε ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα έδειξαν ότι το σύμπλοκο παρουσιάζει μεγαλύτερη δραστικότητα από τον ελεύθερο υποκαταστάτη.



Σχήμα 8 : Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου [Zn(Me-Hmppt)Cl]

2.2.1.3 Σύμπλοκες ενώσεις του Zn με αντιμικροβιακά φάρμακα κινολόνες

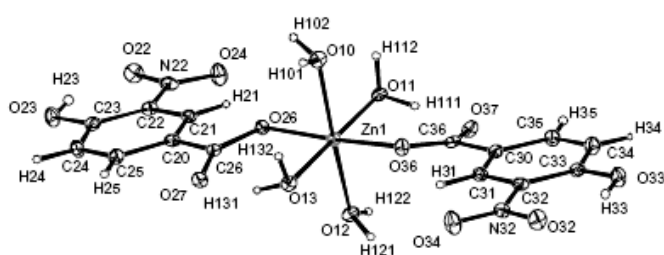
Οι κινολόνες εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της αντιβακτηριδιακής τους δράσης διότι χρησιμοποιούνται ευρέως στη θεραπεία πολλών μολύνσεων καθώς η αντιβακτηριδιακή τους δράση είναι ικανή να εμποδίσει την αντιγραφή του DNA. Έχουν παρασκευαστεί, χαρακτηριστεί και μελετηθεί ως προς την βιολογική τους δράση ορισμένα σύμπλοκα του Zn, χρησιμοποιώντας υποκαταστάτες κινολόνες όπως το enrofloxacin (Herx = 1-cyclopropyl-7-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihydro-quinoline-3-carboxylic acid), το οξολινικό οξύ (Hoxo = 5,8-dihydro-5-ethyl-8-oxo-1,3-dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid.), levofloxacin (Hlevo=(S)-9-fluoro-3-methyl-10-(4-methylpiperazin-1-yl)-7-oxo-3,7-dihydro-2H[1,4]oxazino [2,3,4-ij]quinoline-6-carboxylic acid) και sparfloxacin (Hsf=5-amino-1-cyclopropyl-7-((3R,5S)-3,5-dimethylpiperazin-1-yl)-6,8-difluoro-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid) □ παρουσία ή απουσία δοτών ατόμων N και επιλύθηκαν κρυσταλλογραφικά οι δομές των σύμπλοκων ενώσεων, [Zn(erx)₂(phen)]·3MeOH, [Zn(oxo)(bipy)Cl], [Zn(oxo)₂(phen)], [Zn(erx)₂(bipy)·5H₂O·MeOH], [Zn(sf)₂(phen)]·2MeOH και [Zn(levo)₂(H₂O)₂]·2H₂O (Tarushi, 2011; Tarushi, 2012).



Σχήμα 9 : Κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων (α) $[Zn(ery)_2(bipy)]$ (β) $[Zn(ery)_2(phen)] \cdot 3MeOH$ (γ) $[Zn(oxo)(bipy)Cl]$ (δ) $[Zn(oxo)(phen)] \cdot 2MeOH$ (ε) $[Zn(sf)_2(phen)] \cdot 2MeOH$ και (στ) $[Zn(lev)_2(H_2O)_2] \cdot 2H_2O$

2.2.1.4 Σύμπλοκες ενώσεις του Zn με αντισπασμωδικά φάρμακα

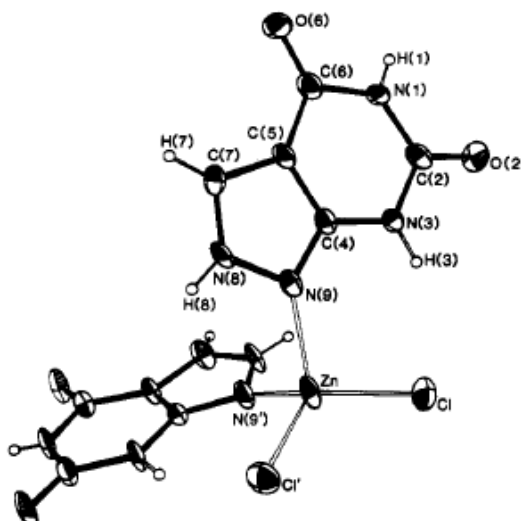
Το σύμπλοκο $[Zn(C_7H_4NO_5)_2(H_2O)_4]$, με υποκαταστάτη το αποπρωτονιωμένο 3-νιτρο-4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (3-nitro-4-hydroxybenzoate), έχει παρασκευαστεί και χαρακτηριστεί δομικά και οι αντισπασμωδικές του ιδιότητες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Η δομή του συμπλόκου επιλύθηκε με περίθλαση ακτίνων-X όπου ο Zn έχει αριθμό συναρμογής έξι και παραμορφωμένη οκταεδρική γεωμετρία (σχήμα 10).



Σχήμα 10 : Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου $[Zn(C_7H_4NO_5)_2(H_2O)_4]$

2.2.1.5 Σύμπλοκες ενώσεις του Zn με φάρμακα κατά της υπερουραιμίας

Η αλλοπουρινόλη (allopurinol = pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-6-one) είναι ουσία που χρησιμοποιείται ως φάρμακο κατά της υπερουραιμίας και αρθριτικών νόσων (Hanggi et al., 1988). Διάφορες επιδράσεις στο μεταβολισμό της πουρίνης έχουν ως αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή ουρικού οξέος. Η αλλοξανθίνη (alloxanthine = pyrazolo[3,4-d]pyrimidine-2,6-dione) είναι μια ένωση παρόμοια και χρησιμοποιήθηκε ως υποκαταστάτης για την παρασκευή του συμπλόκου $[Zn(alloxanthine)_2Cl_2]$, του οποίου η δομή του φαίνεται στο σχήμα 11.

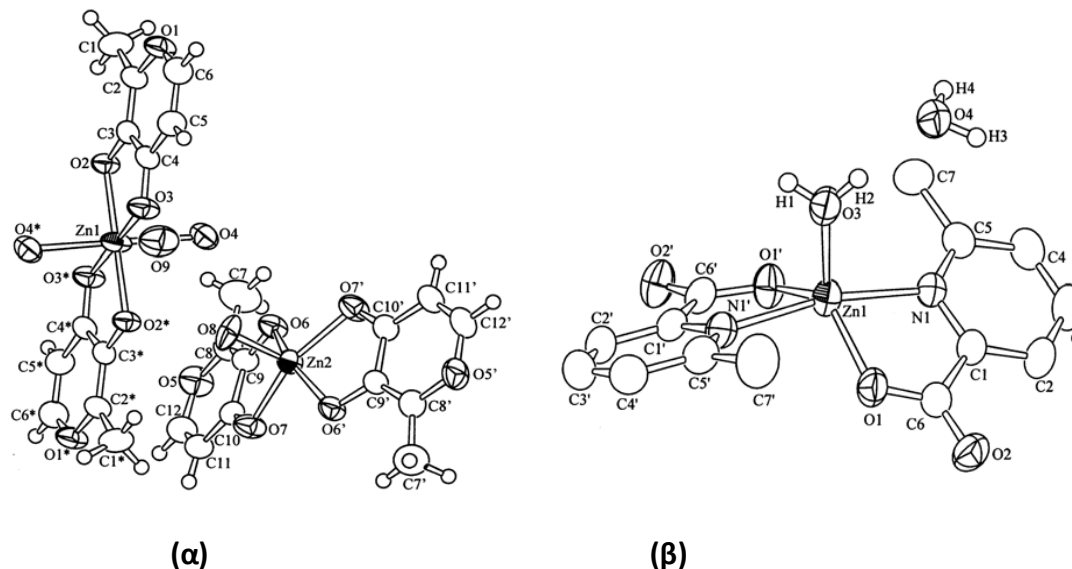


Σχήμα 11 : Κρυσταλλική δομή του συμπλόκου $[Zn(alloxanthine)_2Cl_2]$

2.2.1.6 Σύμπλοκες ενώσεις του Zn με αντιδιαβητικά φάρμακα

Είναι γνωστό ότι ο ψευδάργυρος βρίσκεται στην ινσουλίνη συναρμωσμένος με τρία άτομα αζώτου των ιστιδινών και τρία μόρια νερού με δομή παραμορφωμένου οκταέδρου που θεωρείται ως η λειτουργική δομή. Έχει ακόμη βρεθεί ότι το άτομο του Zn παίζει σημαντικό δομικό και φαρμακευτικό ρόλο στη μμητική δράση της ινσουλίνης (Coulston & Dandona, 1980).

Με τη σύνθεση και το χαρακτηρισμό συμπλόκων Zn έγινε προσπάθεια εξέλιξης της μμητικής δράσης της ινσουλίνης με διάφορους τρόπους συναρμογής, ελέγχοντας τη σταθεροποίηση της γλυκόζης στο αίμα σε επιτρεπτά επίπεδα. Ύστερα από αρκετές πειραματικές διαδικασίες παρασκευάστηκαν οι σύμπλοκες ενώσεις, *trans*- $[Zn(ma)_2(H_2O)_2][Zn(ma)_2(H_2O)]_2(H_2O)$ (*ma*=maltolate) και το $[Zn(6mpa)_2(H_2O)]$ (σχήμα 12) όπου 6mpa=6-methylpicolinate που φαίνεται ότι έχουν την επιθυμητή ινσουλινο-μμητική δράση.



Σχήμα 12 : Κρυσταλλική δομή των συμπλόκων (α) *trans*- $[Zn(ma)_2(H_2O)_2][Zn(ma)_2(H_2O)]_2(H_2O)$ και (β) $[Zn(6mpa)_2(H_2O)]$

3. Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα

Τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ) αποτελούν μια κατηγορία φαρμάκων με αναλγητική, αντιφλεγμονώδη και αντιπυρετική δράση, τα οποία χρησιμοποιούνται για τη συμπτωματική αντιμετώπιση του πόνου και των άλλων συμπτωμάτων της φλεγμονής. Ο μηχανισμός δράσης των ΜΣΑΦ σχετίζεται με την αναστολή της παραγωγής των προσταγλανδινών (PGs). Το μόριο του φαρμάκου, αφού πλησιάσει το κύτταρο-στόχο, διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και εισέρχεται στον καταλυτικό διάυλο του ενζύμου COX. Στην συνέχεια συνδέεται με κάποια αμινοξέα του τοιχώματος του διαύλου με τέτοιο τρόπο, ώστε το μόριο του φαρμάκου να προκαλεί πλήρη απόφραξη του διαύλου. Όταν διεγερθεί το συγκεκριμένο κύτταρο από φυσιολογικό ή παθολογικό ερέθισμα, θα παραχθεί αραχιδονικό οξύ, το οποίο θα προσπαθήσει να εισέλθει στην COX για να παραχθούν οι αναγκαίες προσταγλανδίνες και να αντιμετωπιστεί η διέγερση που προκάλεσε το ερέθισμα. Στην πορεία του όμως προς τον διάυλο της COX θα βρει την είσοδο

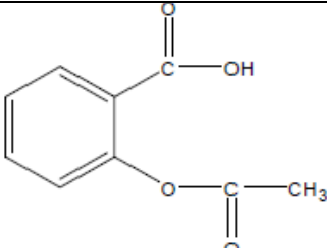
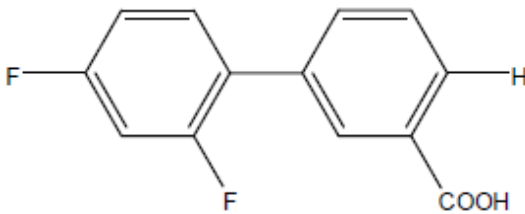
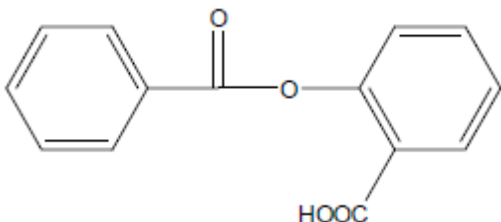
κλειστή από το μόριο του φαρμάκου και έτσι δεν θα παραχθούν προσταγλανδίνες.

Η αναστολή της παραγωγής των προσταγλανδινών (ιδιαίτερα της PGE2) από την δράση των ΜΣΑΦ μπορεί να ανακουφίσει από τον πόνο, ακόμη και όταν δεν υπάρχει αμιγώς φλεγμονώδης νόσος. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η PGE2 παράγεται μετά από τη δράση οποιουδήποτε ερεθίσματος στην περιφέρεια και ευαισθητοποιεί τους περιφερειακούς υποδοχείς πόνου (περιφερειακή ευαισθητοποίηση), αλλά ταυτόχρονα παράγεται μέσω της δράσης ιντερλευκινών στον εγκέφαλο, τον οποίον επίσης ευαισθητοποιεί για την αντίληψη του πόνου (κεντρική ευαισθητοποίηση). Γι'αυτό τα ΜΣΑΦ χρησιμοποιούνται και ως παυσίπονα πέραν της αντιφλεγμονώδους δράσης τους.

Με βάση τη χημική τους δομή, τα ΜΣΑΦ κατατάσσονται σε:

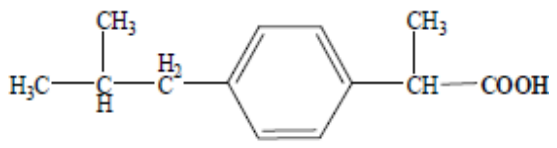
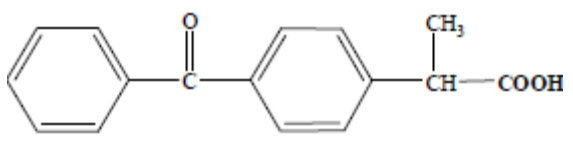
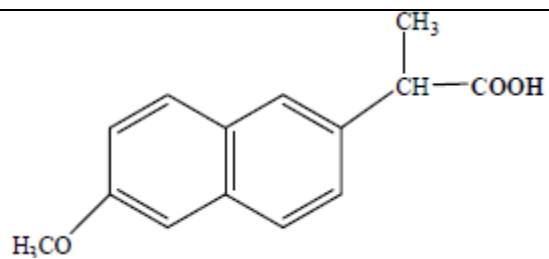
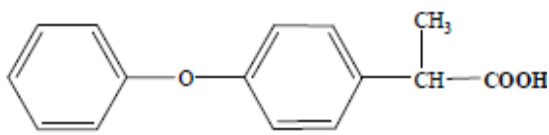
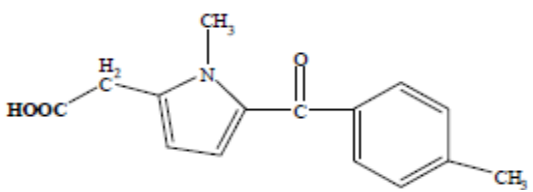
α) παράγωγα του σαλικυλικού οξέος με κυριότερα μέλη την ασπιρίνη, το diflunisal κ.α.

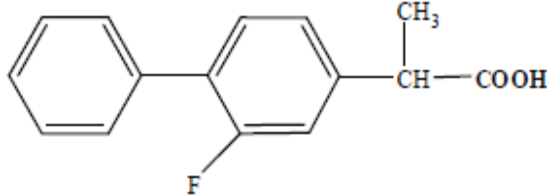
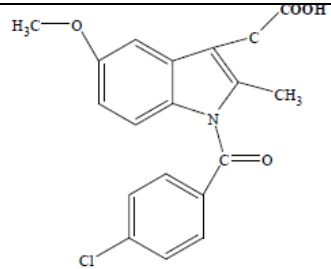
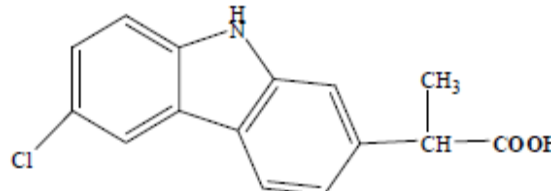
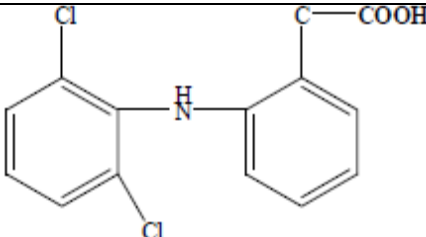
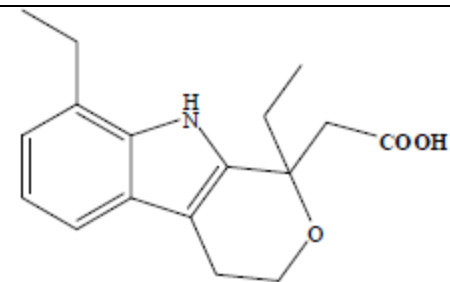
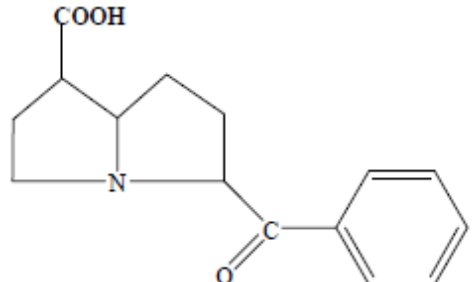
Πίνακας 2. Παράγωγα του σαλικυλικού οξέος

ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΧΗΜΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΔΟΜΗ
Aspirin	2-(acetyloxy) benzoic acid	
Diflunisal (Hdifl)	2',4'-difluoro-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-carboxylic acid	
Salsalate (SAS)	2-carboxyphenyl ester of salicylate	

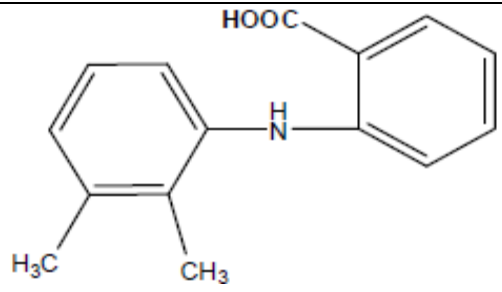
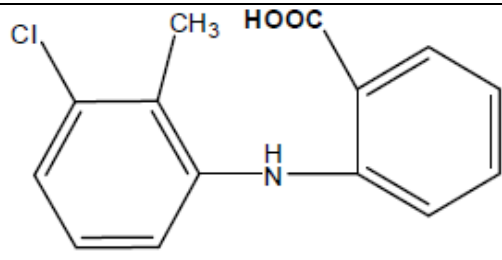
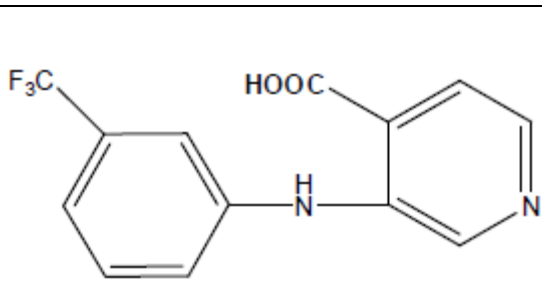
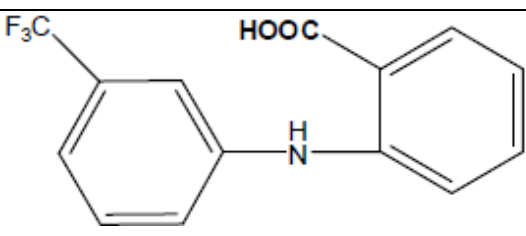
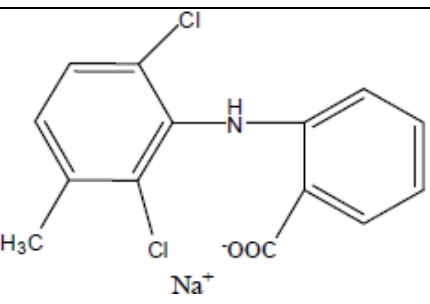
β) Φαινυλαλκανοϊκά οξέα με κυριότερα τα ibuprofen, diclofenac, tolmetin, naproxen και indomethacin

Πίνακας 3. Φαινυλαλκανοϊκά οξέα

ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΧΗΜΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΔΟΜΗ
Ibuprofen (Hibu)	(±) 2-methyl-4-(2-methylpropyl)-benzeneacetic acid	
Ketoprofen	(±) 3-benzoyl-2-methyl benzeneacetic acid	
Naproxen (Hnap)	(±) 6-methoxy-2-methyl-2-naphthaleneacetic acid	
Fenoprofen	(±) 2-methyl-3-phenoxybenzenecetic acid	
Tolmetin (Htolm)	1-methyl-5-(4-methylbenzoyl)-1H-pyrrole-2-acetic acid	

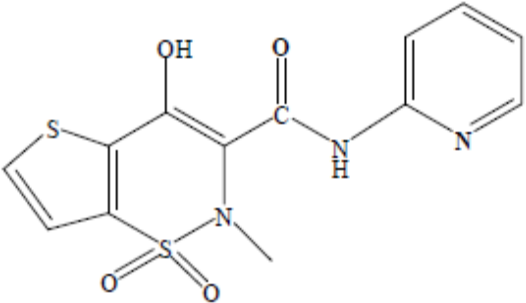
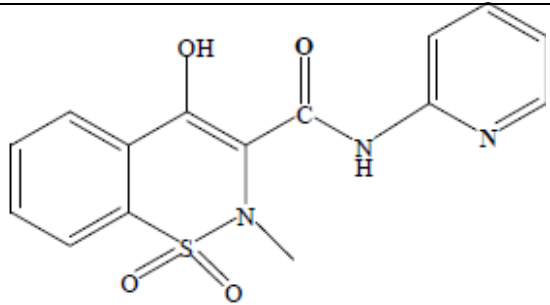
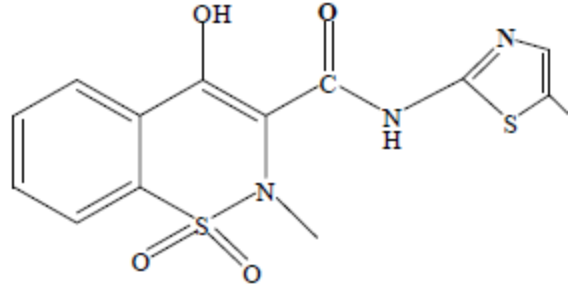
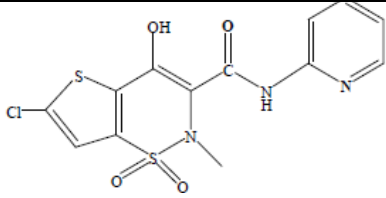
Flurbiprofen	(±) 2-fluoro-2-methyl-[1,1'-biphenyl]-4-acetic acid	
Indomethacin (HIndo)	1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indole-3-acetic acid	
Caprofen	(±)-6-chloro-2-methyl-9H-carbazole-2-acetic acid	
Diclofenac	2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]-benzeneacetic acid	
Etodolac	(±)-1,8-diethyl-1,3,4,9-tetrahydropyrano[3,4-b]indole-1-acetic acid	
Ketorolac	(±)-5-benzoyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolizine-1-carboxylic acid	

γ) Ανθρανιλικά οξέα με κυριότερα τα mefenamic acid, tolfenamic acid, niflumic acid
Πίνακας 4. Ανθρανιλικά οξέα

ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΧΗΜΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΔΟΜΗ
Mefenamic acid (HMef)	2-[(2,3-dimethylphenyl)amino]benzoic acid	
Tolfenamic acid (HTolf)	N-(3-chloro-2-methylphenyl)anthranilic acid	
Niflumic acid (HNifl)	2-[3-trifluoromethyl]phenyl]amino-nicotinic acid	
Flufenamic acid (HFluf)	2-[3-(Trifluoromethyl)(phenyl)(amino)] benzoic acid	
Meclofenamate sodium (Namecl)	2-[(2,6-dichloro-3-methylphenyl)amino]benzoic acid, monosodium salt	

δ) Οξικάμες με κυριότερη μέλη τα tenoxicam, piroxicam, meloxicam

Πίνακας 5. Οξικάμες

ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΧΗΜΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΔΟΜΗ
Tenoxicam (HTenx)	2H-thieno[2,3-e]-1,2-thiazine-3-carboxamide	
Piroxicam (HPir)	2H-1,2-benzothiazine-3-carboxamide	
Meloxicam (Hmelx)	2H-1,2-benzothiazine-3-carboxamide	
Lornoxicam (HLorn)	6-chloro-4-hydroxy-2-methyl-2-pyridyl-2H-thieno[2,3-e]-1,2-thiazine-3-amide-1,1-dioxide)	

ε) Κοξίμπες που περιλαμβάνουν σουλφοναμίδια με κυριότερο μέλος το celecoxib, φουρανόνες με κυριότερο μέλος το rofecoxib και προπαναμίδια με κυριότερο μέλος το parecoxib.

Πίνακας 6. Κοξίμπες

ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΧΗΜΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΔΟΜΗ
<p>Σουλφοναμίδια</p> <p>Sulfonamides</p> <p>Celecoxib</p>	<p>4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]-benzenesulfonamide</p>	
<p>Φουρανόνες</p> <p>Furanones</p> <p>Rofecoxib</p>	<p>4-[4-(methylsulfonyl)phenyl]-3-phenyl-2(5H)-furanone</p>	
<p>Προπαναμίδια</p> <p>Propanamides</p> <p>Parecoxib</p>	<p>N-[[4-(5-methyl-3-phenyl-4-isoxazolyl)phenyl]sulfonyl]-propanamide</p>	

Τα ΜΣΑΦ μπορούν να χορηγηθούν ως κύρια ή συμπληρωματική συμπτωματική θεραπεία σε ένα τεράστιο φάσμα παθήσεων ή νοσηρών καταστάσεων που συνοδεύονται από πόνο ή/και φλεγμονώδη σημεία ή συμπτώματα όπως:

- Σε σύνδρομο οξέος πόνου που εμφανίζονται μετεγχειρητικά, μετά απο οδοντιατρικές επεμβάσεις, σε οξείες κακώσεις μαλακών μυοσκελετικών μορίων, σε

οξείες αρθρίτιδες, στη δυσμηνόρροια, στις ημικρανίες, στις διάφορες λοιμώξεις και στην οξεία οσφυαλγία.

- Σε σύνδρομο χρόνιου πόνου που εμφανίζονται στις φλεγμονώδεις αρθρίτιδες και στις εκφυλιστικές αρθροπάθειες.
- Στον καρκίνο, σε συνεχή χορήγηση για την αντιμετώπιση του καρκινικού πόνου και για την πρόληψη ορισμένων μορφών καρκίνου, όπως η οικογενής αδενωμάτωσης πολυποδιάση ή για την πρόληψη της επανεμφάνισης των αδενωματωδών πολύποδων του παχέος εντέρου σε ασθενείς που έχει γίνει χειρουργική εκτομή σποραδικά εμφανιζόμενων πολύποδων. Υπάρχουν όμως και δεδομένα για την πρόληψη και άλλων μορφών καρκίνου (στον πνεύμονα, στον οισοφάγο, στο ήπαρ, στο πάγκρεας, στον μαστό, στον προστάτη, στον τράχηλο της μήτρας, στο δέρμα), αλλά ακόμη δεν έχει τεκμηριωθεί η αξία της χημειοπροφύλαξης με την χρήση των ΜΣΑΦ.
- Στον καρκίνο, σε συνεχή χορήγηση για την αντιμετώπιση του καρκινικού πόνου με την συνεχή χορήγηση ΜΣΑΦ, αλλά ακόμη δεν έχει τεκμηριωθεί η αποτελεσματικότητα σε συνδυασμό με την ασφάλεια αυτής της πρακτικής.
- Τέλος, σε άλλες καταστάσεις όπως αυτής της χρόνιας κόπωσης, της επούλωσης τραυμάτων και λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος.

Οι κυριότερες ανεπιθύμητες ενέργειες των ΜΣΑΦ σχετίζονται κυρίως με την κατάργηση των ομοιοστατικών προσταγλανδινών, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών στο γαστρεντερικό σωλήνα, το ήπαρ, τους νεφρούς, τα αιμοπετάλια, την καρδιά και το δέρμα.

Στο γαστρεντερικό σύστημα: Τα ΜΣΑΦ προκαλούν συχνά ανεπιθύμητες ενέργειες που διακρίνονται σε: (α) ελαφριές, δηλαδή ενοχλητικά συμπτώματα, όπως η δυσπεψία, καυσalgία, η επιγαστραλγία ή τα διάχυτα κοιλιακά άλγη, η ναυτία και οι διαταραχές των κενώσεων. Τα συμπτώματα αυτά οφείλονται σε τοπικό ερεθισμό και δεν έχουν σχέση με την αναστολή της COX. (β) Σοβαρές, δηλαδή βλάβες του βλεννογόνου του στομάχου ή του εντέρου, όπως οι διαβρώσεις και τα έλκη που μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρές επιπλοκές (με ή χωρίς την παρουσία έλκους),

όπως η μαζική αιμορραγία (γαστρορραγία ή εντερορραγία), η διάρρηξη, η απόφραξη του πυλωρικού στομίου ή/και ο θάνατος. Οι ενέργειες αυτές οφείλονται στην κατάργηση των γαστροπροστατευτικών προσταγλανδινών λόγω αναστολής της COX από τα ΜΣΑΦ και είναι αρκετά συχνές (10%-30%).

Στο ήπαρ: Όλα τα ΜΣΑΦ μπορούν να προκαλέσουν παροδική τρανσαμιναιμία, η οποία παρέρχεται με διακοπή του φαρμάκου. Σπανιότερα μπορεί να εμφανιστεί ηπατική βλάβη λόγω υπερευαισθησίας κυρίως από το nimesulid και το diclofenac.

Στους νεφρούς: Τα ΜΣΑΦ καταργώντας τις προσταγλανδίνες μπορούν να προκαλέσουν οιδήματα ή υπέρταση (1-5%) και σπάνια νεφρική ή καρδιακή ανεπάρκεια ή ηλεκτρολυτικές διαταραχές.

Στα αιμοπετάλια: Τα ΜΣΑΦ καταργώντας την παραγωγή της προσταγλανδίνης θρομβοξάνης, λόγω αναστολής της COX, ελαττώνουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και μπορεί να οδηγήσουν σε αιμορραγίες.

Απλές δερματικές και αλλεργικές αντιδράσεις, οι οποίες παρέρχονται με τη διακοπή, είναι συχνές κατά τη χρήση όλων των ΜΣΑΦ.

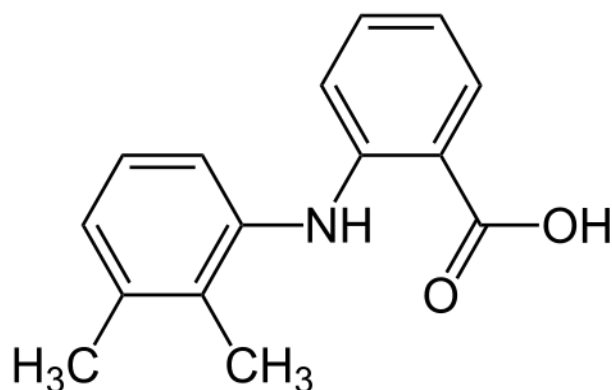
Για να μειωθεί λοιπόν ο κίνδυνος εμφάνισης ανεπιθύμητων ενεργειών κατά την χρήση ΜΣΑΦ, δεν θα πρέπει να χορηγούνται ταυτόχρονα διαφορετικά σκευάσματα, καθώς έτσι δεν αυξάνεται η αποτελεσματικότητά τους, και να μην γίνεται υπέρβαση της μέγιστης θεραπευτικής δόσης κάθε σκευάσματος. Ακόμη πρέπει να χορηγούνται περιοδικά, για μερικές εβδομάδες και μετά από μικρή διακοπή να επαναλαμβάνονται. Τέλος πρέπει να επιλέγεται το κατάλληλο σκεύασμα για τον κατάλληλο ασθενή ανάλογα με την καταλληλότητα του σκευάσματος και το προφίλ του ασθενούς.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στην παρούσα εργασία για την σύνθεση συμπλόκων ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν ως υποκαταστάτες μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα π.χ. mefenamic acid, οι ετεροκυκλικές ενώσεις 2,2'-διπυριδίνη (bipty), 2,2'-διπυριλαμίνη (biptyam) και 1,10-φαινανθρολίνη (phen) ως δότες ατόμων αζώτου καθώς και η οξίμη δι-2-πυριδυλκετονοξίμη (Hrko).

4.1 Αντιφλεγμονώδες φάρμακο- Mefenamic acid

Το mefenamic acid είναι ένα μη-στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση του πόνου καθώς και την αντιμετώπιση φλεγμονών. Χρησιμοποιείται ευρέως στο εμπόριο με την ονομασία Ponstan τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιά για εμπύρετες καταστάσεις. Παρακάτω δίνεται ο συντακτικός τύπος του μεφαιναμικού οξέος (σχήμα 13).

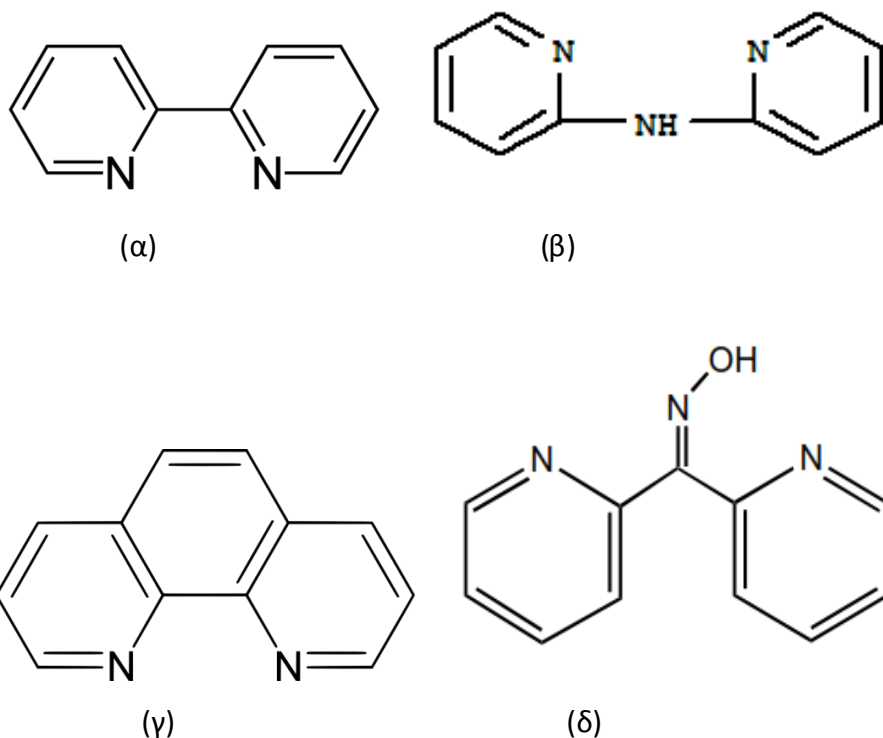


Σχήμα 13 : Συντακτικός τύπος του Mefenamicacid (HMef)

4.1.1 Ετεροκυκλικές ενώσεις

Από την κατηγορία αυτή επιλέχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως υποκαταστάτες οι ετεροκυκλικές ενώσεις 2,2'-διπυριδίνη (biry), 2,2'-διπυριδυλαμίνη (biryam), 1,10-φαινανθρολίνη (rhen) και η δι-2-πυριδυλκτονοξίμη (Hrko).

Στο σχήμα 14 δίνονται οι συντακτικοί τύποι των προαναφερθέντων ενώσεων.



Σχήμα 14 : Συντακτικοί τύποι (α) 2,2'-διπυριδίνη (biry), (β) διπυριδυλαμίνη (biryam), (γ) 1,10-φαινανθρολίνη (rhen) και (δ) η δι-2-πυριδυλκετονοξίμη (Hrko)

4.2 ANTIΔΡΑΣΤΗΡΙΑ, ΔΙΑΛΥΤΕΣ, ΟΡΓΑΝΑ

4.2.1 Αντιδραστήρια και διαλύτες

Η πυριδίνη, το διμεθυλοσουλφοξείδιο (dmsο), το διμεθυλοφορμαμίδιο (dmf) και η αιθανόλη χρησιμοποιήθηκαν όπως παραλήφθηκαν από την εταιρεία Merck σε βαθμό καθαρότητας "χημικώς καθαρά" χωρίς επιπλέον καθαρισμό.

Τα αντιδραστήρια mefenamic acid, CT DNA, EB, BSA, HSA, bipy, phen, bipyam, Hρko χρησιμοποιήθηκαν όπως παραλήφθηκαν από την εταιρεία Sigma–Aldrich, ενώ τα αντιδραστήρια ZnCl₂, NaCl, NaOH και KOH χρησιμοποιήθηκαν όπως παραλήφθηκαν από την εταιρεία Merck. Το κιτρικό νάτριο παραλήφθηκε από την εταιρεία Riedel–de Haen. Όλα τα αντιδραστήρια έχουν βαθμό καθαρότητας "χημικώς καθαρά".

Το διάλυμα DNA παρασκευάστηκε διαλύοντας το calf–thymus DNA (CT DNA) σε ρυθμιστικό διάλυμα (που περιείχε 150 mM NaCl και 15 mM κιτρικού νατρίου του οποίου το pH = 7.0 ρυθμίστηκε με διάλυμα HCl συγκέντρωσης 0,1 M) υπό συνεχή ανάδευση για τρεις ημέρες, και διατηρείται στους 4°C όχι περισσότερο από μια εβδομάδα. Ο λόγος των εντάσεων απορρόφησης στα 260 nm και 280 nm (A_{260}/A_{280}) για το διάλυμα του DNA είναι ίσο με 1.89–1.90, ένδειξη ότι το DNA είναι αρκετά καθαρό από πρωτεϊνικές προσμίξεις (Marmur, 1961). Η συγκέντρωση καθορίστηκε από την απορρόφηση στα 260 nm μετά από 1:20 αραίωση κατ' όγκο του αρχικού διαλύματος χρησιμοποιώντας την τιμή $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Reichmann et al., 1954).

Το αντιδραστήριο DPPH χρησιμοποιήθηκε όπως παραλήφθηκε από την εταιρεία Sigma-Aldrich.

4.2.2 Όργανα Μέτρησης

Οι στοιχειακές αναλύσεις C, H και N εκτελέσθηκαν σε στοιχειακό αναλυτή Perkin–Elmer 240B. Οι μετρήσεις μοριακής αγωγιμότητας εκτελέσθηκαν με συσκευή αγωγιμότητας Crison Basic 30 και κυψελίδα τύπου C, η οποία έχει σταθερά κυψελίδας 0.996. Αυτό αντιπροσωπεύει μία μέση τιμή που ρυθμίζεται στους 25°C με χλωριούχο κάλιο KCl.

Τα φάσματα υπερύθρου λήφθηκαν στην περιοχή 4000–400 cm^{-1} σε φασματοόμετρο Nicolet FT–IR 6700. Όλα τα φάσματα υπερύθρου λήφθηκαν ως δισκία KBr. Τα ηλεκτρονικά φάσματα UV–visible (UV–vis) διαλυμάτων των συμπλόκων σε dmsο, dmf και $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ λήφθηκαν σε συγκεντρώσεις 10^{-6} – 10^{-3} M σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης Hitachi U–2001 με κυψελίδες πάχους 1 cm. Τα φάσματα φθορισμού λήφθηκαν σε διάλυμα σε φθορισμόμετρο Hitachi F–7000.

Η επίλυση των κρυσταλλικών δομών πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Χημείας και Χημικής Τεχνολογίας στο Πανεπιστήμιο της Λιουμπλιάνας στην Σλοβενία. Χρησιμοποιήθηκε κρυσταλλικό περιθλασίμετρο ακτίνων-Χ NoniusKappaCCD εφοδιασμένο με γραφίτη μονοχρωματικής ακτινοβολίας Mo K α . Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με DENZO. Οι δομές επιλύθηκαν με άμεσες μεθόδους χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SIR-97 και καθορίστηκαν με τεχνικές πλήρους-μήτρας ελαχίστων τετραγώνων στο F στο πρόγραμμα SHELXL-97 χρησιμοποιώντας τον αντίστοιχο αριθμό ανακλάσεων και προσδιορίζοντας τον απαραίτητο αριθμό παραμέτρων για κάθε σύμπλοκο (Sheldrick, 1997; Sheldrick, 1996).

4.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

4.3.1 Χαρακτηρισμός και διευκρίνιση της δομής των συμπλόκων ενώσεων

Ο χαρακτηρισμός και η διευκρίνιση της δομής των συμπλόκων ενώσεων που παρασκευάστηκαν περιλαμβάνει τη μελέτη των φασμάτων υπερύθρου (IR), των στοιχειακών αναλύσεων, των μετρήσεων αγωγιμότητας και τον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής με περίθλαση ακτίνων-Χ.

Οι στοιχειακές αναλύσεις των συμπλόκων για τα στοιχεία C, H και N βοηθούν στον προσδιορισμό του πιθανού μοριακού τύπου του συμπλόκου. Οι μετρήσεις της μοριακής αγωγιμότητας των συμπλόκων παρέχουν πληροφορίες για τη σταθερότητα του συμπλόκου καθώς και για πιθανή διάστασή του σε διάλυμα. Επιπρόσθετα μελετήθηκε η διαλυτότητα των συμπλόκων ενώσεων που παρασκευάστηκαν σε H₂O, CH₃OH, CH₃COCH₃, CH₃CN, DMF και DMSO.

4.3.2 Μελέτη αλληλεπίδρασης των ενώσεων με DNA

Η αλληλεπίδραση των συμπλόκων ενώσεων με CT DNA μελετήθηκε με φασματοσκοπία UV για να εξεταστεί η πιθανότητα, καθώς και ο τρόπος αλληλεπίδρασής τους με το DNA. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε η σταθερά σύνδεσης τους με το CT DNA (K_b).

Για να εξεταστεί η δυνατότητα αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το CT DNA, λήφθηκαν τα φάσματα UV του CT DNA παρουσία κάθε ένωσης σε διάφορες αναλογίες [ένωση]/[CT DNA] (= r). Οι σταθερές αλληλεπίδρασης, K_b , των ενώσεων με το CT DNA προσδιορίστηκαν από τα φάσματα UV των ενώσεων που λήφθηκαν με την προσθήκη CT-DNA σε διάφορες αναλογίες r .

Η μελέτη της ανταγωνιστικής δράσης κάθε ένωσης με το βρωμιούχο αιθίδιο (EB=3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium bromide) πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία φθορισμού ώστε να εξεταστεί η δυνατότητα αντικατάστασης του EB από το φαρμακό ή τα σύμπλοκά του, στο σύμπλοκο του EB με το DNA (DNA-

EB). Το σύμπλοκο DNA–EB παρασκευάστηκε με ανάμιξη διαλυμάτων EB και CT DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα (που περιείχε 150 mM NaCl και 15 mM κιτρικό νάτριο με τιμή pH =7.0). Η δυνατότητα παρεμβολής του φαρμάκου και των συμπλόκων του μελετήθηκε από τις μεταβολές των φασμάτων φθορισμού διαλύματος του συμπλόκου DNA–EB κατά την προσθήκη των ενώσεων σε διάφορες αναλογίες.

4.3.3 Μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συμπλόκων

Η μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συμπλόκων ενώσεων πραγματοποιήθηκε με τη γνωστή μέθοδο DPPH με τη χρήση φασματοσκοπίας ορατού. Στόχος, ήταν να μελετηθεί η διαφοροποίηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, η οποία συνδέεται έμμεσα με τη φλεγμονή, του φαρμάκου, μετά την ένωση του με το μέταλλο.

4.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ Zn

Θα αναφερθούμε μόνο στα σύμπλοκα του Zn με το NSAID mefenamic acid, καθώς η εκτενής παρουσίαση της χημικής έρευνας ξεφεύγει από τα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής.

4.4.1 Παρασκευή συμπλόκου του τύπου $[Zn(mef)_2(bipy)]$, 1

Για το σύμπλοκο **1** :

Στο μεθανολικό διάλυμα των 10 mL του $ZnCl_2$ (54 mg, 0.4 mmol) προστέθηκε συγχρόνως και κατά σταγόνα το διάλυμα του H Mef (193 mg, 0.8 mmol) σε CH_3OH (20mL), η αποπρωτονίωση του οποίου έγινε με τη παρουσία KOH (44 mg, 0.8 mmol), καθώς και το μεθανολικό διάλυμα (8 mL) bipy (62 mg, 0.4 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται και ίζημα εμφανίζεται σχεδόν αμέσως το οποίο και διηθείται. Ένα άχρωμο κρυσταλλικό προϊόν με μοριακό τύπο $[Zn(mef)_2(bipy)]$

συλλέγεται μετά από μια ημέρα κατάλληλο για επίλυση δομής με περίθλαση ακτίνων-X. Το σύμπλοκο είναι διαλυτό στο dmsο και μερικώς διαλυτό στο dmf, στο H₂O, στην CH₃OH και στο CH₃CN.

4.4.2 Παρασκευή συμπλόκου του τύπου [Zn(mef)₂(CH₃OH)₂], 2

Για το σύμπλοκο 2:

Έγινε προσθήκη μεθανολικού (CH₃OH) διαλύματος (18 mL) του mefenamic acid (241 mg, 1 mmol) και KOH (1 ml, 1 mmol), σε μεθανολικό διάλυμα (10 mL) του ZnCl₂ (54 mg, 0.4 mmol). Ακολούθησε ανάδευση για περίπου μία ώρα. Ένα υποκίτρινο μικροκρυσταλλικό προϊόν συλλέχθηκε μετά από μια μέρα με απλή διήθηση. Το σύμπλοκο είναι διαλυτό σε dmsο και dmf.

4.4.3 Παρασκευή συμπλόκου του τύπου [Zn(mef)₂(phen)(H₂O)], 3

Για το σύμπλοκο 3:

Προστέθηκαν ταυτόχρονα και κατά σταγόνα το διάλυμα CH₃OH (20 mL) με HMef (48 mg, 0.2 mmol) και KOH (11 mg, 0.2 mmol) και το μεθανολικό διάλυμα (5 mL) phen (36 mg, 0.2 mmol) στο διαυγές διάλυμα CH₃OH (20 mL) Zn(NO₃)₂·4H₂O (52 mg, 0.2 mmol). Στην συνέχεια προστίθεται στο συνολικό διάλυμα πετρελαϊκός αιθέρας (20 ml). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται έως ότου εμφανιστεί ίζημα λευκό και γίνεται διήθηση. Στην συνέχεια το διάλυμα αφήνεται. Ένα εξαγωνικό μικροκρυσταλλικό προϊόν συλλέγεται τις επόμενες ημέρες κατάλληλο για επίλυση δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων X, με μοριακό τύπο [Zn(Mef)₂(phen)(H₂O)] . Το σύμπλοκο είναι διαλυτό στους διαλύτες dmsο και dmf.

4.4.4 Παρασκευή συμπλόκου του τύπου [Zn(mef)₂(Hrko)₂], 4

Για το σύμπλοκο 4:

Έγινε προσθήκη μεθανολικού (CH₃OH) διαλύματος (15 mL) του mefenamic acid (144 mg, 0.6 mmol) και KOH (33 mg, 0.6 mmol), καθώς και μεθανολικού (CH₃OH) διαλύματος (10 mL) του Hρκο (40 mg, 0.2 mmol) σε μεθανολικό διάλυμα (10 mL) του ZnCl₂(27 mg, 0.2 mmol). Ακολούθησε ανάδευση για περίπου μία ώρα. Ένα υποκίτρινο κρυσταλλικό προϊόν συλλέχθηκε μετά από μια μέρα με απλή διήθηση, κατάλληλο για επίλυση δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, με μοριακό τύπο [Zn(mef)₂(Hρκο)₂]. Το σύμπλοκο είναι διαλυτό σε dmsο και dmf.

4.4.5 Παρασκευή συμπλόκου του τύπου [Zn(Mef)₂(bipyam)], 5

Για το σύμπλοκο 5:

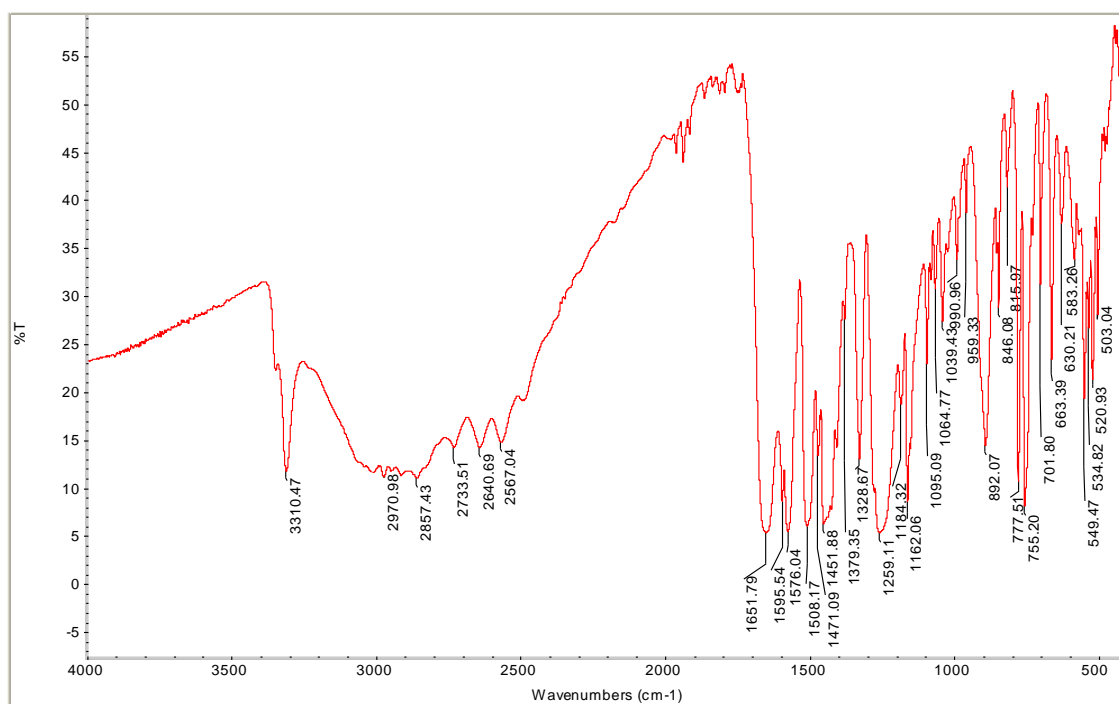
Στο μεθανολικό διάλυμα των 10 mL του ZnCl₂(27 mg, 0.2 mmol) προστέθηκε συγχρόνως και κατά σταγόνα το διάλυμα του HMef (96 mg, 0.4 mmol) σε CH₃OH (15mL), και KOH (22 mg, 0.4 mmol), αφού είχε προηγηθεί ανάδευση μίας ώρας, καθώς και το μεθανολικό διάλυμα (8 mL) bipyam (34 mg, 0.2 mmol). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται και το ίζημα καταβυθίζεται σχεδόν αμέσως. Ένα άχρωμο μικροκρυσταλλικό προϊόν συλλέγεται μετά από μια ημέρα. Το σύμπλοκο είναι διαλυτό στο dmsο και μερικώς διαλυτό στο H₂O, στην CH₃OH και στο CH₃CN.

Πίνακας 7: Στοιχειακές αναλύσεις των συμπλόκων και τιμές μοριακής αγωγιμότητας (Λ_μ σε mho.cm².mol⁻¹). Οι τιμές μέσα στις παρενθέσεις αντιστοιχούν στις θεωρητικές τιμές.

ΕνωσηMr	%C	%H	%NΛ _μ		
1,[Zn(Mef) ₂ (bipy)]	704.18	67.67(68.42)	5.24(5.16)	7.92(7.28)	12
2,[Zn(Mef) ₂ (H ₂ O) ₂]	583.98	67.29	5.68	5.21	16
3,[Zn(Mef) ₂ (phen)(H ₂ O)]	746.19	68.72(69.47)	5.11(4.99)	7.57(7.71)	7
4, [Zn(Mef) ₂ (Hρκο) ₂]	942.59	64.33(66.13)	5.24(4.91)	11.21(11.86)	9
5, [Zn(Mef) ₂ (bipyam)]	755.10	66.56(70.89)	5.37(4.58)	9.81(8.61)	14

4.4.6. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ

Στα φάσματα υπερέθρου, για όλα τα σύμπλοκα που παρασκευάστηκαν, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι κορυφές που αποδίδονται σε δονήσεις τάσης της καρβοξυλικής ομάδας που είναι ενδεικτικές του τρόπου συναρμογής της. Οι δονήσεις τάσης $\nu(\text{O-H})$ και $\nu(\text{C=O})_{\text{carboxylic}}$ της καρβοξυλικής ομάδας (COOH) του ΜΣΑΦ που μελετάται είναι στα $3310 (\text{br,m}) \text{ cm}^{-1}$, $1651(\text{s}) \text{ cm}^{-1}$ και $1379(\text{s}) \text{ cm}^{-1}$ για το *mefenamic acid*. Στο σχήμα 15 είναι το φάσμα υπερέθρου του υποκαταστάτη.



Σχήμα 15 : Φάσμα υπερέθρου του Ηmef.

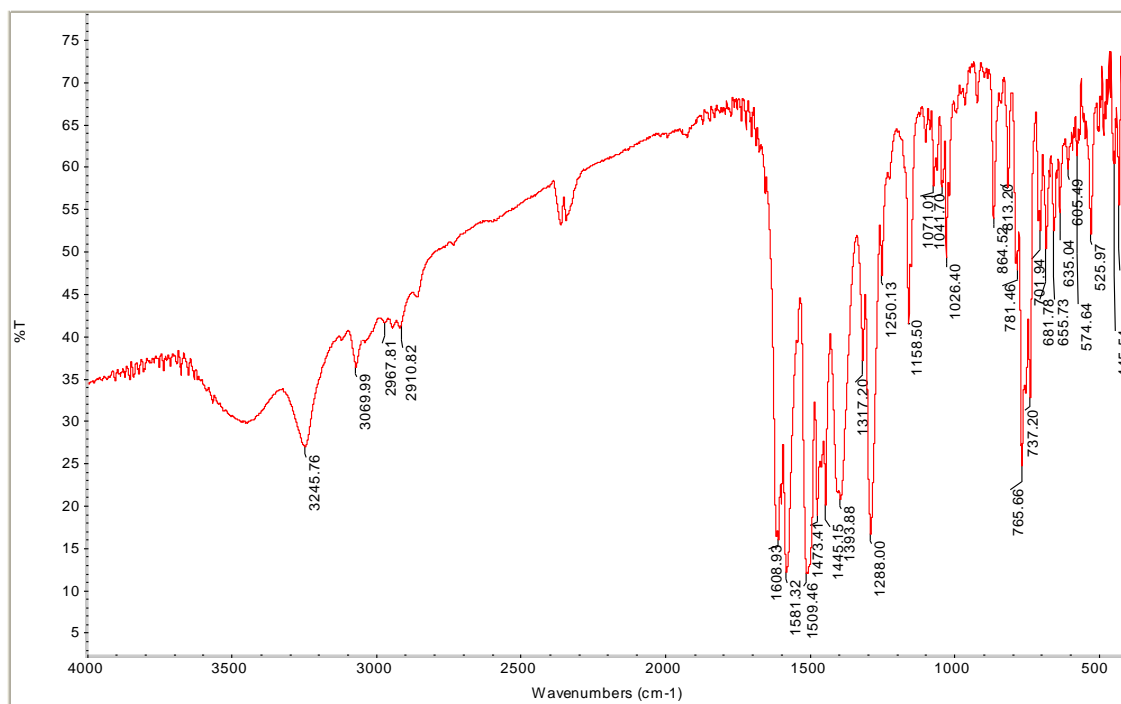
Πίνακας 8: Χαρακτηριστικές κορυφές (cm^{-1}) στο φάσμα υπερέθρου για το ελεύθερο ΜΣΑΦ mefenamic acid και για τις σύμπλοκες ενώσεις από 1-5.

Ενωση $\nu(\text{CO}_2)_{\text{asym}} \nu(\text{CO}_2)_{\text{sym}}$	Δ		
1, [Zn(Mef) ₂ (bipy)]	1581	1394187	
2, [Zn(Mef) ₂ (H ₂ O) ₂]	1577	1399	178
3, [Zn(Mef) ₂ (phen)(H ₂ O)]	1574	1376198	
4, [Zn(Mef) ₂ (Hpko) ₂]	1574	1389185	
5, [Zn(Mef) ₂ (bipyam)]	1581	1402179	

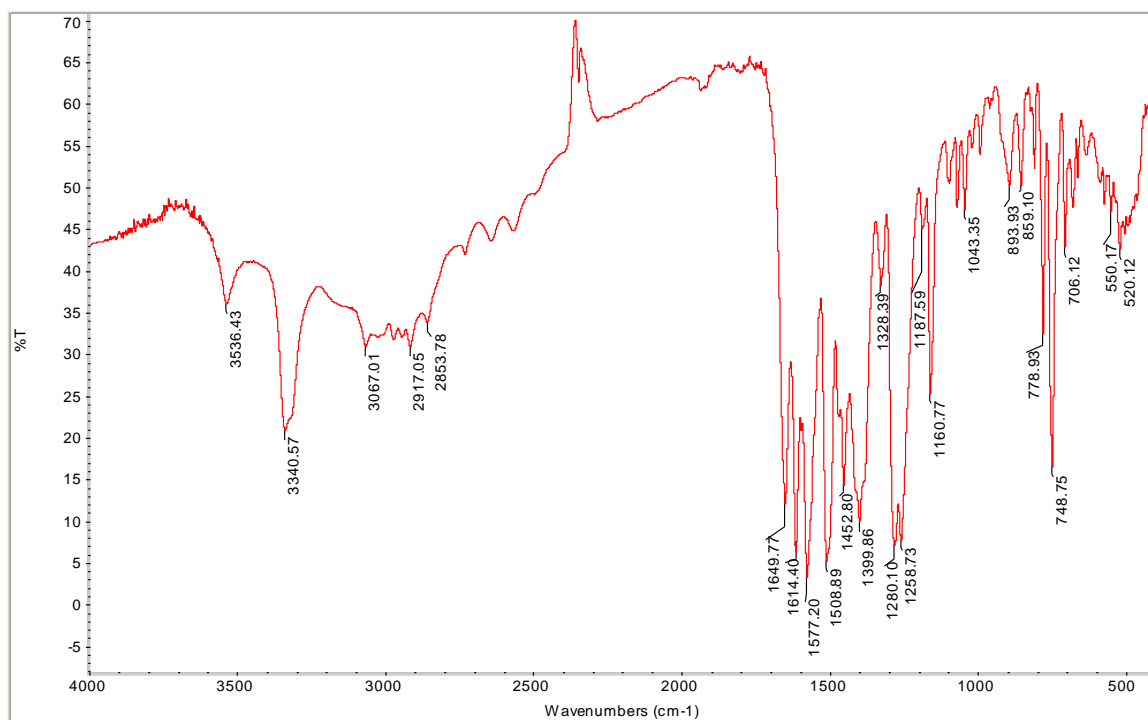
Η διαφορά μεταξύ της συμμετρικής και της ασύμμετρης δόνησης τάσης της καρβοξυλικής ομάδας, $\Delta = [\nu(\text{CO}_2)_{\text{asym}} - \nu(\text{CO}_2)_{\text{sym}}]$, κυμαίνεται μεταξύ 178-198 cm^{-1} . Το εύρος των τιμών αυτών, αποτελεί ένδειξη συναρμογής της καρβοξυλικής ομάδας των ligands με το κεντρικό μέταλλο. Στον μονοδραστικό τρόπο συναρμογής εμφανίζεται ανισοτιμία μεταξύ των δύο ατόμων οξυγόνου. Γι' αυτό το λόγο υπάρχει αύξηση της συμμετρικής δόνησης τάσης και ελάττωση της ασύμμετρης δόνησης τάσης. Για ενώσεις συναρμογής με μονοδραστικό τρόπο συναρμογής της καρβοξυλικής ομάδας, το Δ παίρνει τιμές πιο υψηλές. Ενώ στον διδραστικό τρόπο συναρμογής της καρβοξυλικής ομάδας οι τιμές Δ είναι μικρότερες.

Στην περιοχή 694-772 cm^{-1} αντιστοιχούν κορυφές με μέτρια ένταση που αποδίδονται σε δονήσεις παραμόρφωσης εκτός επιπέδου των αρωματικών υδρογόνων των πυριδινικών δακτυλίων με το κάθε υποκαταστάτη να έχει συγκεκριμένο εύρος τιμών. Συγκεκριμένα, εμφανίζεται για την φαινανθρολίνη 729 cm^{-1} , την 2,2'-διπυριδυλαμίνη 772 cm^{-1} και την 2,2'-διπυριδίνη 765 cm^{-1} .

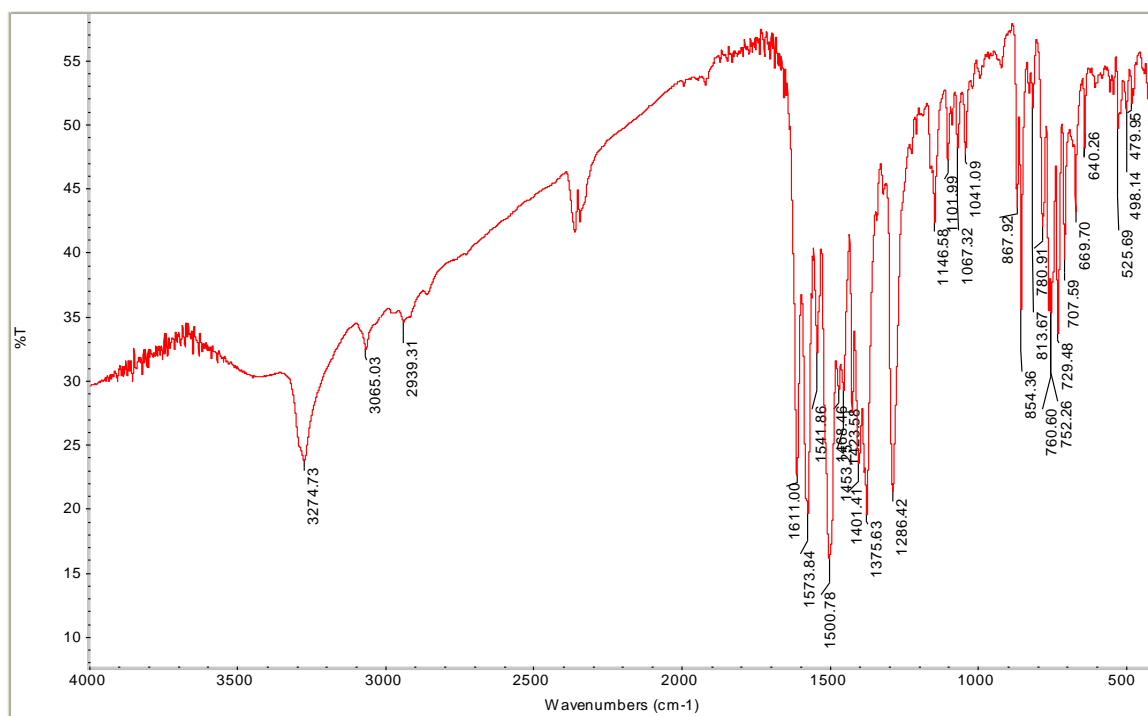
Ακολουθούν τα φάσματα υπερέθρου των συμπλόκων 1-5 :



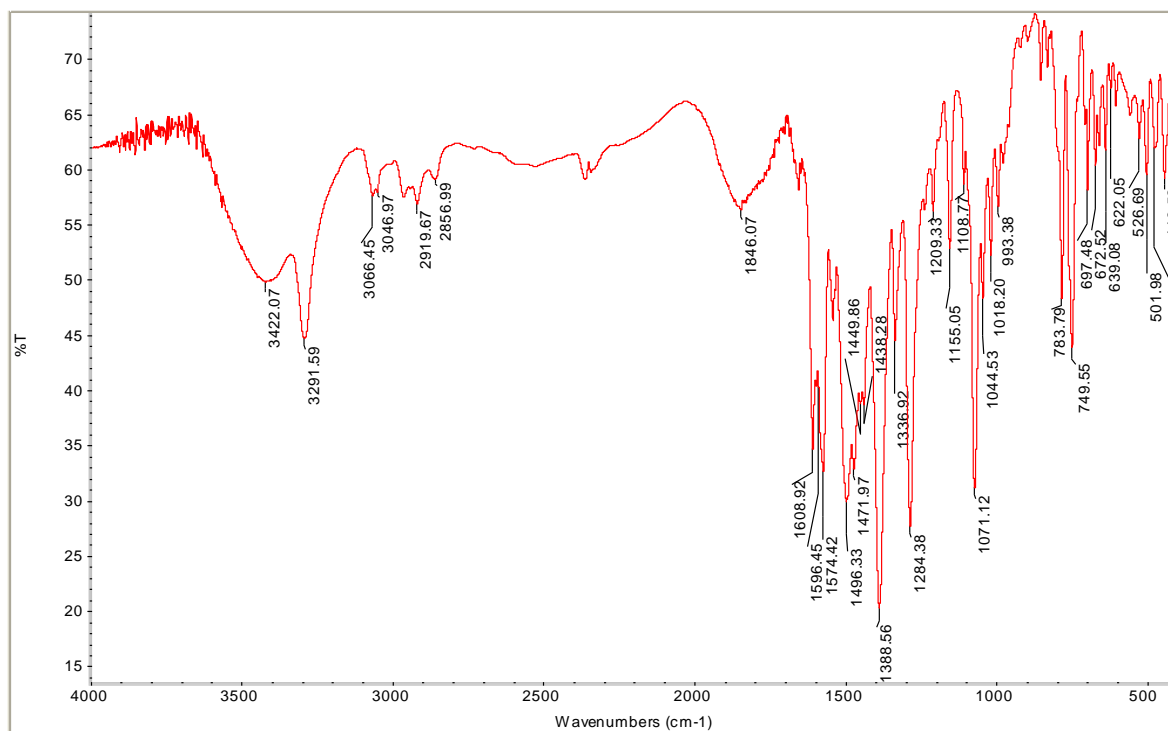
Σχήμα 16. Φάσμα υπερέθρου του συμπλόκου $[Zn(mef)_2(bipy)]$



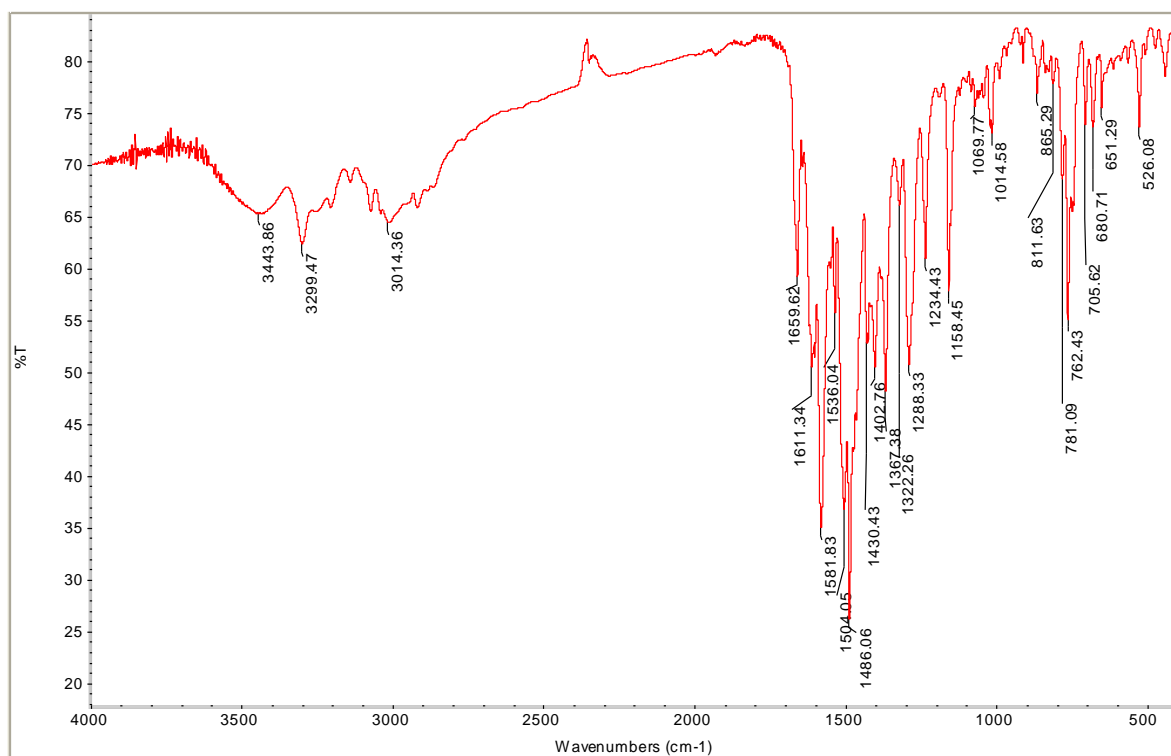
Σχήμα 17. Φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου $[Zn(mef)_2(CH_3OH)_2]$



Σχήμα 18. Φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου $[Zn(mef)_2(phen)(H_2O)]$



Σχήμα 19. Φάσμα υπερύθρου του συμπλόκου $[Zn(mef)_2(Hrko)_2]$



Σχήμα 20. Φάσμα υπερέυθρου του συμπλόκου $[Zn(mef)_2(bipy)]$

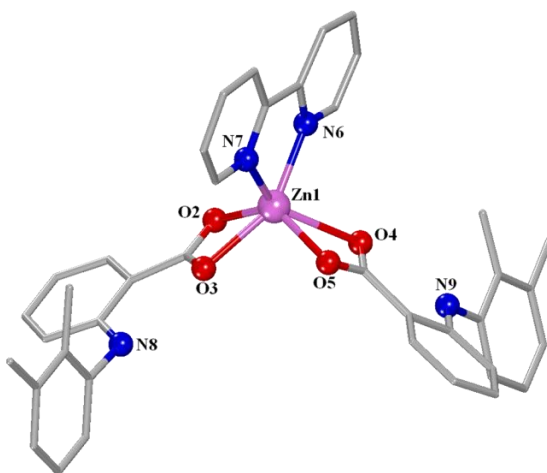
4.5 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΙΕΥΚΡΙΝΙΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

4.5.1 Περιγραφή της δομής του συμπλόκου $[Zn(mef)_2(bipy)]$

Πρόκειται για ένα μονοπυρηνικό σύμπλοκο του ψευδαργύρου με αριθμό συναρμογής έξι και γεωμετρία παραμορφωμένου οκταέδρου. Οι δύο αποπρωτονιωμένοι μεφαιναμικοί υποκαταστάτες συναρμόζονται με το Zn με διδραστικό τρόπο μέσω τεσσάρων καρβοξυλικών ατόμων οξυγόνου και η 2,2'-διπυριδίνη μέσω των δύο ατόμων N συναρμόζεται και αυτή διδραστικά. Η δομή του συμπλόκου οδηγεί στο συμπέρασμα πως πρόκειται για ένα τριγωνικό πρίσμα με τις δύο βάσεις να αποτελούνται από τα επίπεδα O(2)-O(4)-N(6) και O(3)-O(5)-N(7). Η γωνία των δύο βάσεων είναι $6,4^\circ$ οπότε δεν είναι τελείως παράλληλες. Η απόσταση

των centroids των δύο βάσεων είναι 2.272 Å και μεμονωμένα ο Zn από την πρώτη βάση είναι 1.119 Å και από την δεύτερη βάση 1.124 Å. Οι αποστάσεις για το πρώτο τρίγωνο είναι O(2)⋯O(4) = 3.437 Å, O(4)⋯N(6) = 3.126 Å και O(2)⋯N(6) = 3.295 Å και για το δεύτερο τρίγωνο είναι O(3)⋯O(5) = 2.960 Å, O(3)⋯N(7) = 3.056 Å και O(5)⋯N(7) = 3.167 Å, άρα πρόκειται για δύο σκαλινά τρίγωνα.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η απόσταση Zn(1)-O(4) καθώς ξεχωρίζει από τις υπόλοιπες αποστάσεις επειδή είναι λίγο μεγαλύτερη και οριακά δεσμική. Τέλος, παρατηρώντας τις γωνίες συμπεραίνουμε πως υπάρχει απόκλιση από τις 180° [N(6)-Zn(1)-O(3)= 152.48°] επομένως πρόκειται για ένα παραμορφωμένο οκτάεδρο. Η κρυσταλλική δομή δίνεται στο σχήμα 21 και επιλεγμένα μήκη και γωνίες δεσμών δίνονται στον πίνακα 9.



Σχήμα 21 : Κρυσταλλική δομή [Zn(Mef)₂(bipy)]

Πίνακας 9. Επιλεγμένα μήκη (Å) και γωνίες (°) δεσμών για το σύμπλοκο [Zn(Mef)₂(bipy)]

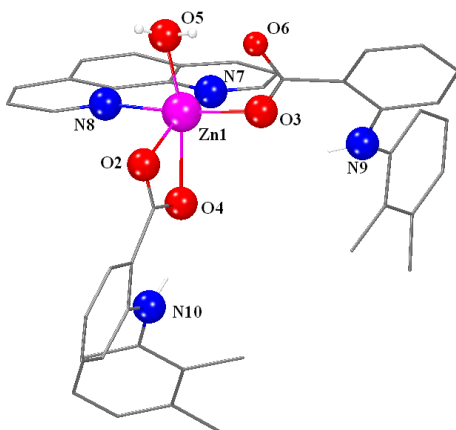
Αποστάσεις	Å	Γωνίες Δεσμών	(°)
Zn(1)-O(5)	2.000(2)	N(6)-Zn(1)-O(3)	152.48(9)
Zn(1)-N(6)	2.090(2)	N(7)-Zn(1)-O(4)	142.91(7)
Zn(1)-O(2)	2.109(2)	O(5)-Zn(1)-O(2)	129.11(8)
Zn(1)-N(7)	2.109(2)	O(2)-Zn(1)-N(7)	118.09(8)

Zn(1)-O(3)	2.195(2)	O(3)-Zn(1)-O(4)	116.50(8)
Zn(1)-O(4)	2.462(2)	O(5)-Zn(1)-N(6)	116.72(9)

4.5.2 Περιγραφή της δομής του συμπλόκου [Zn(mef)₂(phen)(H₂O)]

Σε αυτό το μονοπυρηνικό σύμπλοκο ο Zn έχει αριθμό συναρμογής έξι και γεωμετρία παραμορφωμένου οκταέδρου. Οι αποπρωτονιωμένοι μεφαιναμικοί υποκαταστάτες συναρμόζονται με τον Zn με μονοδραστικό τρόπο ο ένας μέσω του ενός ατόμου οξυγόνου της καρβοξυλικής ομάδας και ο άλλος με διδραστικό τρόπο μέσω δύο ατόμων οξυγόνου, των δύο καρβοξυλικών οξυγόνων. Από την άλλη, η 1,10'-φαινανθρολίνη συναρμόζεται με το Zn μέσω των δύο ατόμων αζώτου. Τέλος, η συναρμογή ολοκληρώνεται με ένα μόριο νερού να συναρμόζεται με το Zn μέσω ενός ατόμου οξυγόνου.

Εξετάζοντας τις αποστάσεις των δεσμών τις χαρακτηρίζουμε ως δεσμικές ή αντιδεσμικές ανάλογα με το μήκος,. Έτσι η απόσταση Zn(1)-O(4) = 2.211 Å είναι οριακά δεσμική ενώ η Zn(1)···O(6) = 3.300 Å είναι σαφώς αντιδεσμική και γι'αυτό τον λόγο δεν συναρμόζεται ο Zn(1) με το O(6). Επίσης, οι αποστάσεις του Zn με τα N του υποκαταστάτη της 1,10'-φαινανθρολίνης (2.150 Å και 2.169 Å) είναι λιγο μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες αποστάσεις με υποκαταστάτη την 2,2'-διπυριδίνη (2.090 Å και 2.109 Å) στο σύμπλοκο 1, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην στερεοχημική παρεμπόδιση που προκαλείται από την 1,10'-φαινανθρολίνη. Τέλος, από τις γωνίες συμπεραίνουμε πως έχουμε απόκλιση από τις 180° και άρα οδηγούμαστε σε παραμορφωμένη οκταεδρική δομή. Η κρυσταλλική δομή δίνεται στο σχήμα 22 και επιλεγμένα μήκη και γωνίες δεσμών δίνονται στον πίνακα 10.



Σχημα 22: Κρυσταλλική δομή $[Zn(Mef)_2(phen)(H_2O)]$

Πίνακας 10. Επιλεγμένα μήκη (Å) και γωνίες ($^{\circ}$) δεσμών για το σύμπλοκο $[Zn(Mef)_2(phen)(H_2O)]$

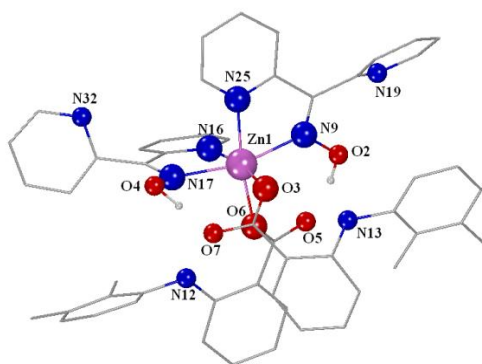
Αποστάσεις	Å	Γωνίες Δεσμών	($^{\circ}$)
Zn(1)-O(3)	2.042(15)	O(2)-Zn(1)-O(3)	99.36(6)
Zn(1)-N(7)	2.150(17)	O(2)-Zn(1)-O(4)	60.38(5)
Zn(1)-O(5)	2.075(16)	O(2)-Zn(1)-O(5)	98.19(6)
Zn(1)-N(8)	2.169(19)	O(2)-Zn(1)-N(7)	154.79(6)
Zn(1)-O(2)	2.158(14)	O(2)-Zn(1)-N(8)	92.80(6)
Zn(1)-O(4)	2.211(14)	O(3)-Zn(1)-O(5)	91.47(7)
		O(3)-Zn(1)-N(7)	90.81(6)
		O(3)-Zn(1)-N(8)	167.68(6)
		O(4)-Zn(1)-O(5)	158.52(6)
		O(4)-Zn(1)-N(7)	96.24(6)
		O(4)-Zn(1)-N(8)	90.82(6)
		O(5)-Zn(1)-N(7)	104.59(6)
		O(5)-Zn(1)-N(8)	88.74(7)

4.5.3 Περιγραφή της δομής του συμπλόκου $[Zn(Mef)_2(Hpko)_2]$

Σε αυτό μονοπυρηνικό σύμπλοκο ο Zn έχει αριθμό συναρμογής έξι και γεωμετρία παραμορφωμένου οκταέδρου. Οι πρωτονιωμένοι μεφαιναμικοί

υποκαταστάτες συναρμολογούνται μονοδραστικά με τον Zn μέσω ενός ατόμου οξυγόνου της καρβοξυλικής ομάδας ο καθένας και η δι-2-πυριδυλκετονοξίμη μέσω των δυο ατόμων N συναρμολογείται με διδραστικό τρόπο .

Οι αποστάσεις του Zn από τα δύο άτομα N του υποκαταστάτη Ηρκο, είναι μεγαλύτερες από αυτές του bipy αλλά μικρότερες σε σχέση με το σύμπλοκο με υποκαταστάτη το rhen, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην στερεοχημική παρεμπόδιση που προκαλείται από την 1,10'-φαινανθρολίνη. Οι αποστάσεις των μη-συναρμοσμένων καρβοξυλικών οξυγόνων από το κεντρικό άτομο του μετάλλου είναι $Zn(1)\cdots O(7) = 3.437 \text{ \AA}$ και $Zn(1)\cdots O(5) = 3.478 \text{ \AA}$, τιμές αρκετά μεγάλες ώστε να δικαιολογείται το γεγονός ότι είναι αντιδεσμικά. Από τις γωνίες συμπεραίνουμε πως έχουμε απόκλιση από τις 180° και άρα οδηγούμαστε σε παραμορφωμένη οκταεδρική δομή. Η κρυσταλλική δομή δίνεται στο σχήμα 23 και επιλεγμένα μήκη και γωνίες δεσμών δίνονται στον πίνακα 11.



Σχήμα 23: Κρυσταλλική δομή $[Zn(Mef)_2(Hrko)_2]$

Πίνακας 11. Επιλεγμένα μήκη (\AA) και γωνίες ($^\circ$) δεσμών για το σύμπλοκο $[Zn(Mef)_2(Hrko)_2]$

Αποστάσεις	\AA	Γωνίες Δεσμών	($^\circ$)
Zn(1)-O(3)	2.069(3)	O(6)-Zn(1)-O(3)	85.31(14)
Zn(1)-N(17)	2.165(4)	O(6)-Zn(1)-N(25)	172.41(15)
Zn(1)-O(6)	2.038(3)	O(3)-Zn(1)-N(25)	90.79(14)
Zn(1)-N(25)	2.131(4)	O(6)-Zn(1)-N(9)	97.86(14)
Zn(1)-N(9)	2.149(4)	O(3)-Zn(1)-N(9)	91.99(15)
Zn(1)-N(16)	2.159(5)	N(25)-Zn(1)-N(9)	75.74(16)

O(6)-Zn(1)-N(16)	88.95(15)
O(6)-Zn(1)-N(16)	170.50(15)
N(25)-Zn(1)-N(16)	95.74(16)
N(9)-Zn(1)-N(16)	96.31(16)
O(6)-Zn(1)-N(17)	94.31(14)
O(3)-Zn(1)-N(17)	97.82(15)
N(25)-Zn(1)-N(17)	92.66(15)
N(9)-Zn(1)-N(17)	164.95(16)
N(16)-Zn(1)-N(17)	75.03(16)

5. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ-ΟΡΑΤΟΥ (UV-Vis)

Τα φάσματα υπεριώδους-ορατού των σύμπλοκων ενώσεων λήφθηκαν σε αιώρημα nujol (nujol mulls) και σε διάλυμα dmsο με σκοπό τη διερεύνηση της δομής τους τόσο σε στερεή κατάσταση όσο και σε διάλυμα. Διαπιστώθηκε μετά από σύγκριση μεταξύ των δύο φασμάτων, ότι τα σύμπλοκα διατηρούν τη δομή τους σε διάλυμα. Οι ταινίες I και II αποδίδονται σε Intra Ligand (IL) μεταπτώσεις. Συγκεντρωτικά, δίνονται τα μήκη κύματος καθώς και ο αντίστοιχος συντελεστής μοριακής απόσβεσης των παραπάνω ταινιών. Όσον αφορά τα σύμπλοκα του ψευδαργύρου που παρουσιάζουν d^{10} διαμόρφωση, δεν εμφανίζουν d-d μεταπτώσεις.

Πίνακας12. Μήκος κύματος (λ , nm) των μεγίστων των ταινιών των ηλεκτρονικών φασμάτων σε διάλυμα dmsο και ως αιώρημα nujol (nujol mulls) των συμπλόκων του χαλκού. Σε παρένθεση δίνονται οι αντίστοιχοι συντελεστές μοριακής απόσβεσης ($\epsilon, \text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

Ένωση	Ταινία I dmsonujol		Ταινία II dmsonujol	
[Zn(mef) ₂ (bipy)]	352 (52600)	365	318 (115300)	325

[Zn(mef) ₂ (H ₂ O) ₂]	300.5 (81100)	305	282 (64300)	286
[Zn(mef) ₂ (phen)(H ₂ O)]	352 (20800)	362	320 (129800)	323
[Zn(mef) ₂ (Hpko) ₂]	368 (26100)	376	328 (77600)	335
[Zn(mef) ₂ (bipyam)]	358 (18500)	362	309.5 (67000)	315

5.1 ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

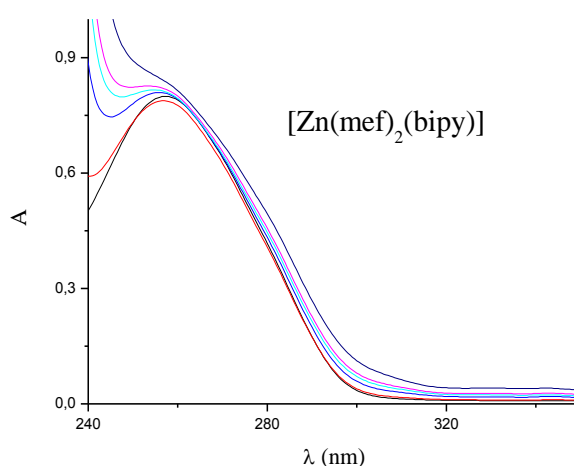
5.1.1 Τιτλοδότηση (Φασματοσκοπία UV-vis)

Η μελέτη της αλληλεπίδρασης των ενώσεων με DNA με φασματοσκοπία UV-Vis παρέχει πληροφορίες για τον τρόπο αλληλεπίδρασής της με το DNA και το πόσο ισχυρή είναι η σύνδεση της ένωσης με το DNA. Η μετατόπιση της απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (red-shift) σε συνδυασμό με μείωση της απορρόφησης (υποχρωμία) σημαίνει παρεμβολή της ένωσης στο DNA. Η παρεμβολή είναι ισχυρότερη σε ενώσεις που έχουν εκτεταμένο π-σύστημα σε επίπεδη επιφάνεια. Η έκταση της μείωσης συνδέεται με την ισχύ της σύνδεσης. Όταν παρατηρείται υπερχρωμία τότε η σύνδεση της ένωσης με το DNA πραγματοποιείται πιθανότατα στην εξωτερική επιφάνειά του, υπάρχει δηλαδή εξωτερική συναρμογή ή/και μέσω δέσμησης στην αύλακα[21]. Η σύγκριση της ισχύος συναρμογής διαφόρων ενώσεων σύμφωνα με την εξίσωση[22]:

$$\frac{[DNA]}{(\varepsilon_a - \varepsilon_f)} = \frac{[DNA]}{(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} \quad (1)$$

όπου $[DNA]$ είναι η συγκέντρωση του DNA, ϵ_a ο λόγος της απορρόφησης προς την συγκέντρωση της ένωσης σε κάθε μέτρηση, $([A]/[ένωση])$, $\epsilon_f =$ ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης της ελεύθερης ένωσης, $\epsilon_b =$ ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης της πλήρως δεσμευμένης ένωσης στο DNA και K_b είναι η σταθερά ισχύος σύνδεσης του συμπλόκου με το DNA. Η μελέτη της αλληλεπίδρασης μιας ένωσης με το DNA με φασματοσκοπία UV πραγματοποιείται σε δύο στάδια.

Στο πρώτο στάδιο προστίθενται σε διάλυμα DNA αυξανόμενες ποσότητες της ένωσης που μελετάται κάθε φορά. Από τις μεταβολές που εμφανίζονται στο φάσμα UV του CT DNA κατά την προσθήκη του συμπλόκου σε διάφορες αναλογίες (r). Εξετάζεται αν και με ποιό τρόπο η ένωση μπορεί να αλληλεπιδράσει με το CT DNA (Calf Thymus). Πιο συγκεκριμένα, εξετάζεται η μεταβολή της απορρόφησης της ταινίας με $\lambda_{max} = 260$ nm καθώς και πιθανές μετατοπίσεις του λ_{max} . Η ένταση της απορρόφησης του μεγίστου της ταινίας του CT DNA μπορεί να αυξάνεται λόγω έκθεσης των πουρινών και πυριμιδινών του CT DNA εξαιτίας της δράσης των ενώσεων στο DNA ή να ελαττώνεται ώστε να αποτελεί ένδειξη πιθανής παρεμβολής. Στο σχήμα 24, το φάσμα απορρόφησης για το σύμπλοκο $[Zn(mef)_2(bipy)]$ παρουσιάζει εμφανή ελάττωση της έντασης που αποτελεί ένδειξη παρεμβολής.

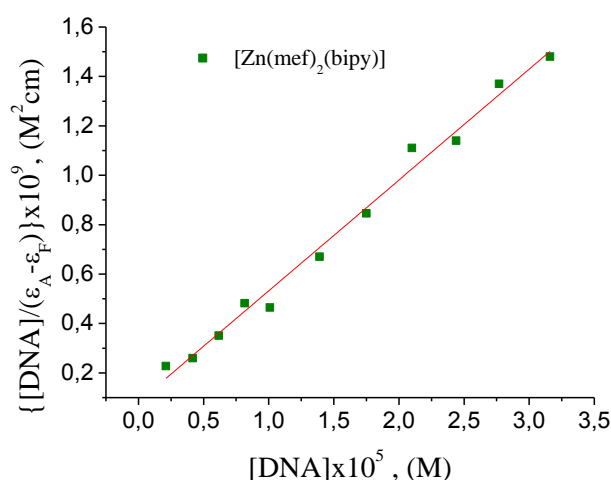


Σχήμα 24. Φάσμα UV του διαλύματος DNA παρουσία του διαλύματος $[Zn(mef)_2(bipy)]$

Στο δεύτερο στάδιο σε διάλυμα της ένωσης γίνεται προσθήκη αυξανόμενων

ποσοτήτων διαλύματος του DNA σε διάφορες αναλογίες [ένωσης]/[DNA]=(r) και καταγράφεται το φάσμα της ένωσης καθώς και οι μεταβολές της απορρόφησης και της τιμής του λ_{\max} . Οι παρατηρούμενες μεταβολές στο φάσμα UV της ένωσης μπορούν να οδηγήσουν σε συμπεράσματα σχετικά με το είδος της αλληλεπίδρασης. Η σταθερά σύνδεσης, K_b , της ένωσης με το CT DNA προσδιορίζεται από το λόγο της τεταγμένης επί της αρχής προς την κλίση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων που προσδιορίζεται σε διαγράμματα του λόγου $\frac{[DNA]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)}$ σε συνάρτηση με τη [DNA]

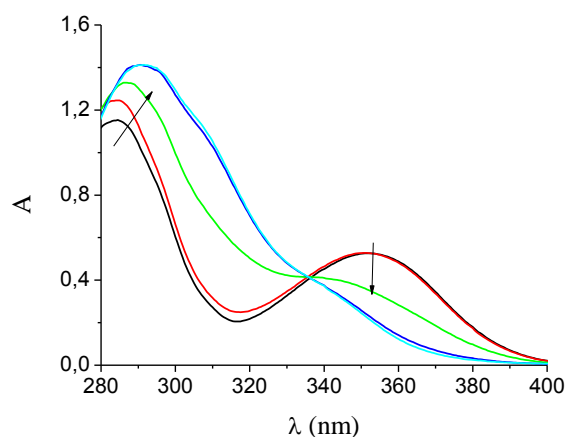
(Σχήμα 25).



Σχήμα 25. Διαγράμμα του λόγου $\frac{[DNA]}{(\epsilon_a - \epsilon_f)}$ σε συνάρτηση με τη [DNA] για τον υπολογισμό της K_b .

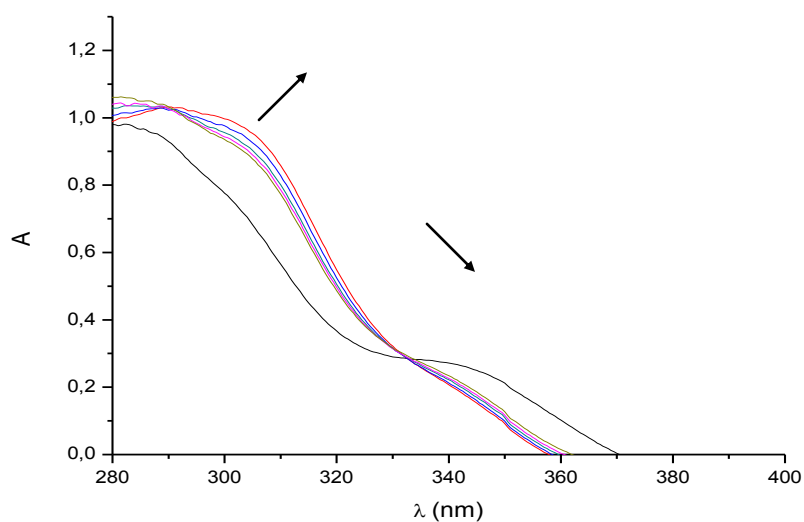
Στο φάσμα UV του συμπλόκου **1**, παρατηρείται υπερχρωμία στο $\lambda_{\max}=290$ nm με ταυτόχρονη ερυθρή μετατόπιση της τάξης των 9 nm. Η αύξηση οφείλεται στην έκθεση των πουρινών και πυριμιδινών του CT DNA, λόγω δράσης των συμπλόκων με το DNA. Η βαθυχρωμία από την άλλη υποδηλώνει τη σταθεροποίηση της δομής του DNA. Στα 340 nm παρατηρείται στο φάσμα υποχρωμία με ταυτόχρονη ερυθρή μετατόπιση της τάξης των 2-3 nm. Η συμπεριφορά αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα σύμπλοκα συναρμόζονται ισχυρά μέσω παρεμβολής με το CT DNA με επακόλουθη την σταθεροποίηση της δομής. Στα 330 nm παρατηρείται ένα ισοσβεστικό σημείο που υποδηλώνει την ύπαρξη δύο προϊόντων στο διάλυμα CT

DNA.



Σχήμα 26. Φάσμα UV του **1** σε ρυθμιστικό διάλυμα (150 mM NaCl και 15 mM κιτρικό νάτριο με pH=7.0) παρουσία διαλύματος ($[DNA]=1.89 \times 10^{-4} M$), για αυξανόμενες τιμές r . Τα βέλη υποδηλώνουν τις μεταβολές που παρατηρούνται κατά την προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων των αντίστοιχων ενώσεων.

Και τα υπόλοιπα σύμπλοκα 2-5 παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά με το σύμπλοκο 1 καθώς και αυτά συναρμόζονται ισχυρά μέσω παρμβολής με το CT DNA με σταθεροποίηση της δομής.



Σχήμα 27. Φάσμα UV του **4** σε ρυθμιστικό διάλυμα (150 mM NaCl και 15 mM κιτρικό νάτριο με pH=7.0) παρουσία διαλύματος ($[DNA]=1.89 \times 10^{-4} M$), για αυξανόμενες τιμές r .

Συμπερασματικά, όλα τα στοιχεία αυτά συνθέτουν το «πάζλ» παρεμβολής των συμπλόκων στην διπλή έλικα του CT DNA και δημιουργία νέων συμπλόκων με σταθεροποίηση της δομής του DNA.

Οι τιμές της K_b των συμπλόκων που προσδιορίστηκαν δίνονται στο πίνακα 13.

Πίνακας 13: Τιμές K_b , σταθερά σύνδεσης

Ένωση	K_b (M^{-1})
1, [Zn(mef) ₂ (bipy)]	$5.37(\pm 0.02) \times 10^5$
2, [Zn(mef) ₂ (H ₂ O) ₂]	$6.81(\pm 0.04) \times 10^5$
3, [Zn(mef) ₂ (phen)(H ₂ O)]	$3.91(\pm 0.18) \times 10^4$
4, [Zn(mef) ₂ (Hrko) ₂]	$1.93(\pm 0.02) \times 10^7$
5, [Zn(mef) ₂ (bipyam)]	$5.82(\pm 0.12) \times 10^5$
Hmef	$1.05(\pm 0.02) \times 10^5$

Η τιμή K_b για το σύμπλοκο **3**, είναι λίγο μικρότερη από την αντίστοιχη σταθερά δεσμού EB με το CT DNA, ($K_b(EB) = 1.23(\pm 0.07) \times 10^5 M^{-1}$). Αυτό υποδηλώνει πιθανή δυνατότητα αντικατάστασης του EB από το σχηματισμένο σύμπλοκο EB–DNA ηλεκτροστατικά, πιθανότατα μέσω των φωσφορικών ομάδων της έλικας CT DNA. Για τα υπόλοιπα σύμπλοκα, η σταθερά σύνδεσης είναι μεγαλύτερη από της αντίστοιχης K_b του EB το οποίο υποδηλώνει δυνατότητα αντικατάστασης του EB στο σύμπλοκο EB–DNA από τα σύμπλοκα **1**, **2**, **4** και **5** μέσω παρεμβολής και σταθεροποίηση δομής. Συνοψίζοντας προκύπτει ότι οι τιμές K_b ελαττώνονται κατά την σειρά $K_{b(4)} > K_{b(2)} > K_{b(5)} > K_{b(1)} > K_{b(EB)} > K_{b(3)}$

5.1.2 Συμπεράσματα

Η μελέτη των φασμάτων UV του υποκαταστάτη παρουσία DNA οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν είναι παρεμβολέας, γεγονός που δεν αποκλείει βέβαια την σύνδεσή του με το DNA σε μια άλλη περιοχή της έλικας.

Από τα σύμπλοκα φαίνεται να συνδέεται μέσω παρεμβολής τα **1, 2, 4** και **5**, με το σύμπλοκο **4** να έχει την μεγαλύτερη σταθερά σύνδεσης γεγονός που αποδεικνύει ότι υπάρχει ισχυρότερη σύνδεση του συμπλόκου με το DNA απ' ό,τι τα υπόλοιπα, που μπορεί να οφείλεται σε εκτεταμένη επίπεδη/αρωματική διαμόρφωση των δύο μεφαιναμικών υποκαταστατών στη δομή του συμπλόκου **4**. Το σύμπλοκο **3** παρουσιάζει μια αρκετά μεγάλη σταθερά σύνδεσης γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι συνδέεται ισχυρά με κάποιο τρόπο, ίσως μέσω εξωτερικής συναρμογής ή μέσω συναρμογής στην κύρια ή δευτερεύουσα αύλακα. Φαίνεται ότι η συνεργιστική δράση των δύο υποκαταστατών ισχυροποιεί τη σταθερά σύνδεσης των συμπλόκων με το DNA αυξάνοντας κατά πενήντα φορές περίπου την K_b που έχει ο ελεύθερος μεφαιναμικός υποκαταστάτης. Ακόμη, οι μικτές σύμπλοκες ενώσεις είναι αυτές που εμφανίζουν δράση μέσω παρεμβολής, δράση σημαντική για την μετέπειτα διαμόρφωση και λειτουργία του DNA. Γενικά η συναρμογή είναι ισχυρότερη σε σύμπλοκα όπου έχουν εκτεταμένο π σύστημα, γιατί αυτό καταλαμβάνει μεγαλύτερη επίπεδη επιφάνεια και άρα διεισδύει πιο βαθιά στην έλικα και σταθεροποιείται περισσότερο με τα ζεύγη βάσεων.

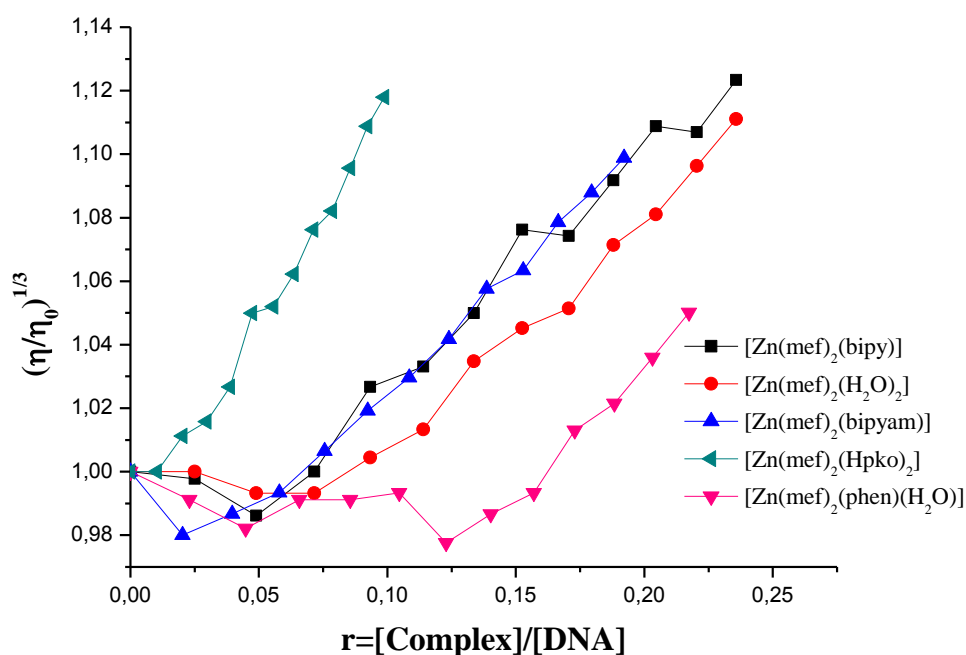
5.1.3 Ιξωδομετρία

Η αλληλεπίδραση χημικών ενώσεων με το DNA μπορεί να μελετηθεί και με τη μέτρηση του ιξώδους. Οι υδροδυναμικές μετρήσεις είναι ευαίσθητες στην αύξηση του μήκους του DNA και η ιξωδομετρία είναι ίσως η λιγότερο αμφιλεγόμενη και αρκετά αξιόπιστη μέθοδος για την εξακρίβωση του τρόπου σύνδεσης. Σ' ένα κλασσικό μοντέλο παρεμβολής παρατηρείται αύξηση του μήκους της έλικας του DNA εφόσον τα ζεύγη βάσεων διαχωρίζονται για να φιλοξενήσουν την ένωση και έτσι αυξάνεται το ιξώδες. Όταν με αύξηση της ποσότητας της ένωσης αυξάνεται σταδιακά το σχετικό ιξώδες συμπεραίνεται ότι υπάρχει κλασσική παρεμβολή.

Συνοπτικά:

- αν η ένωση παρεμβάλλεται στο DNA (intercalation), το DNA επιμηκώνεται και το ιξώδες αυξάνεται.
- αν η ένωση συνδέεται ηλεκτροστατικά με το DNA, δεν παρατηρείται καμία αντίδραση στο μήκος του DNA και δεν παρατηρείται καμία σημαντική μεταβολή στο ιξώδες.
- αν η ένωση προκαλεί ρήξη του DNA, το μήκος του DNA ελαττώνεται και το ιξώδες μειώνεται.

Για τα σύμπλοκα 1-5, ύστερα από συνεχόμενες προσθήκες των διαλυμάτων των ενώσεων σε διάλυμα DNA και μέτρηση του ιξώδους τους, έγινε σαφές ότι όλα τα σύμπλοκα προκαλούν αύξηση του ιξώδους (σχήμα 30) και επομένως συνδέονται με πιθανή παρεμβολή στην έλικα του DNA.



Σχήμα 30. Το σχετικό ιξώδες $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ σε συνάρτηση με το r ($=[\text{ένωσης}]/[\text{DNA}]$) παρουσία των συμπλόκων 1- 5.

5.1.4 Μελέτη με φασματοσκοπία φθορισμού

5.1.4.1 Μελέτη αλληλεπίδρασης των συμπλόκων με DNA σε ανταγωνισμό με το EB

Από τις προηγούμενες μελέτες προτάθηκαν κάποιοι τρόποι αλληλεπίδρασης των ενώσεων με το DNA. Για να διαπιστωθεί ή/και για να επιβεβαιωθεί ο τρόπος σύνδεσής τους με το DNA, πραγματοποιείται πολλές φορές μελέτη ανταγωνιστικής δράσης με ένωση, η οποία συνδέεται στο DNA με γνωστό τρόπο. Προϋπόθεση είναι να παρουσιάζουν οι μελετούμενες ενώσεις παραπλήσια σταθερά σύνδεσης στο DNA με την ένωση αναφοράς. Τις περισσότερες φορές, και προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο τρόπος σύνδεσης στο DNA μέσω παρεμβολής, χρησιμοποιείται ως φθορισμομετρικός αισθητήρας (ένωση αναφοράς) το αιθίδιο βρωμίδιο, EB.

Διάλυμα EB, όταν διεγερθεί με ακτινοβολία μήκους κύματος $\lambda_{\max} = 540$ nm, εμφανίζει ασθενή σχετικά φθορισμό εκπομπής με $\lambda_{\max} = 600$ nm που οφείλεται κυρίως στα μόρια του διαλύτη. Κατά την προσθήκη DNA στο διάλυμα EB, εμφανίζεται σημαντικά αυξημένος φθορισμός εκπομπής με $\lambda_{\max} = 592$ nm που οφείλεται στη σύνδεση του EB στο DNA μέσω παρεμβολής του επίπεδου δακτυλίου της φαινανθριδίνης μεταξύ δύο γειτονικών βάσεων της διπλής έλικας του DNA. Η προσθήκη μίας δεύτερης ένωσης που μπορεί να συνδέεται με το DNA πιο ισχυρά απ' ό,τι το EB μπορεί να οδηγήσει σε ελάττωση φθορισμού. Δύο είναι οι πιθανοί μηχανισμοί που έχουν προταθεί για να εξηγούν την ελάττωση της εκπομπής. Η αντικατάσταση των μορίων που φθορίζουν (EB) ή/και η μεταφορά ηλεκτρονίου.

Το σύμπλοκο CT DNA-EB παρασκευάζεται με ανάμιξη διαλυμάτων 20 μ M EB και 25 μ M CT DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα 150 mM NaCl και 15 mM κιτρικό νάτριο με pH=7.0. Η ένταση της ταινίας εκπομπής στα 592 nm που αποδίδεται στο σύμπλοκο EB-DNA πρέπει να ελαττώνεται κατά την προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων της ένωσης που συνδέεται με το DNA πιο ισχυρά από ό,τι το EB. Αυτή η ελάττωση του φθορισμού του EB αποκαλύπτει τον ανταγωνισμό μεταξύ της ένωσης και του EB στη σύνδεσή τους με το DNA. Η δυνατότητα παρεμβολής των υποκαταστατών και των συμπλόκων ενώσεων 1-5 μελετήθηκε από τις μεταβολές των φασμάτων φθορισμού διαλύματος CT DNA-EB κατά την προσθήκη των υπό μελέτη ενώσεων σε διάφορες

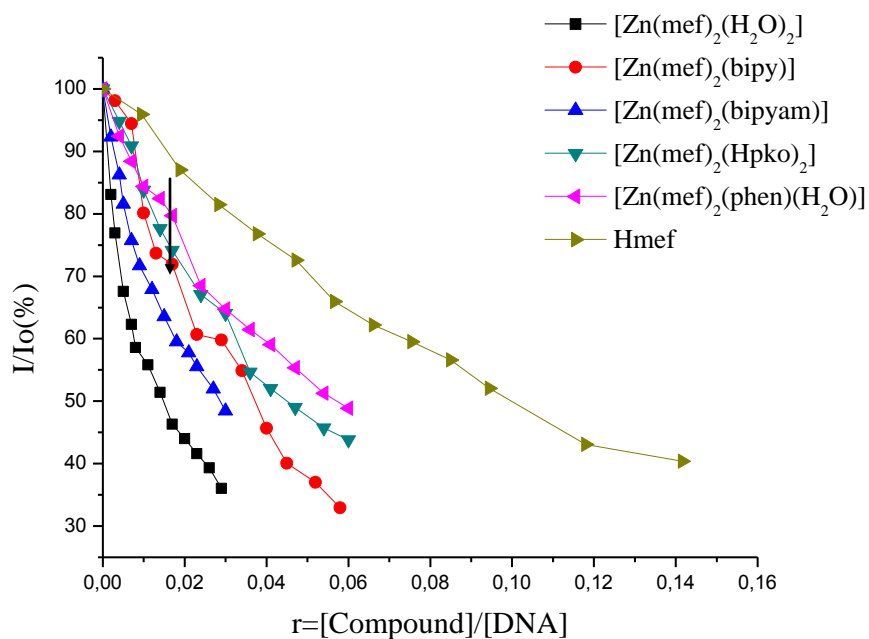
αναλογίες.

Η ικανότητα ελάττωσης του φθορισμού που προκαλεί κάθε ένωση μπορεί να εκτιμηθεί μέσω της σταθεράς Stern–Volmer, K_{SV} , η οποία δίνεται από την εξίσωση:

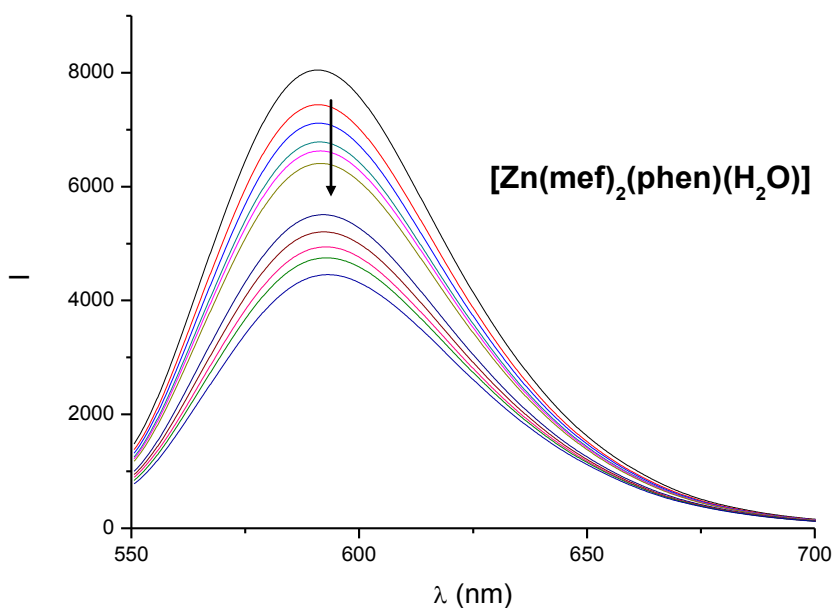
$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} \times [\text{ένωση}] \quad (2)$$

όπου I_0 και I είναι οι εντάσεις εκπομπής απουσία και παρουσία της υπό μελέτης ένωσης αντίστοιχα. Από τα διαγράμματα I_0/I σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της ένωσης, διαπιστώνεται αν υπάρχει γραμμική εξάρτηση των δύο μεγεθών και στη συνέχεια προσδιορίζεται η σταθερά K_{SV} από την κλίση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων. Το μέγεθος της τιμής της K_{SV} σχετίζεται με την ικανότητα σύνδεσης της ένωσης στο CT DNA.

Μελετήθηκε η ανταγωνιστική δράση ως προς το EB που ενδεχομένως μπορεί να εμφανίζουν οι ενώσεις **1-5**. Σύμφωνα με τα φάσματα του φθορισμού, η ένταση παρουσιάζει ελάττωση κατά την προσθήκη ποσοτήτων όλων των παραπάνω ενώσεων σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Πιο αναλυτικά, η ελάττωση της έντασης φτάνει ως το 55% της αρχικής έντασης του φθορισμού για τον υποκαταστάτη, για το **1** ως το 68%, για το **2** ως το 65%, για το **3** ως το 50% φτάνει η ένταση, για το σύμπλοκο **4** ως το 58% και για το σύμπλοκο **5** ως το 52% (Σχήμα 28). Για όλα τα παραπάνω, ο πιθανότερος τρόπος αλληλεπίδρασης με το DNA θεωρείται η δράση μέσω παρεμβολής λόγω της ικανότητας που έχουν να αντικαταστήσουν το EB. Επιπλέον φαίνεται να υπάρχει γραμμική εξάρτηση του λόγου I_0/I σε σχέση με τη συγκέντρωση των ενώσεων σύμφωνα με την εξίσωση Stern-Volmer ($R=0.99$) και στον πίνακα 14 αναφέρονται οι τιμές των αντίστοιχων K_{SV} .



Σχήμα 28. Ποσοστό φθορισμού ($I/I_0(\%)$) σε $\lambda_{em}= 592$ nm σε συνάρτηση με το r ($=[\acute{\epsilon}\nu\omega\sigma\eta\varsigma]/[DNA]$) παρουσία του Hmef και των συμπλόκων 1- 5.



Σχήμα 29. Φάσματα εκπομπής φθορισμού EB-DNA με $\lambda_{ex}= 540$ nm, $[EB]= 20$ μM , $[DNA]= 25\mu M$ σε ρυθμιστικό διάλυμα (150 mM χλωριούχο νάτριο και 15 mM κιτρικό νάτριο με $pH=7.0$) κατά την προσθήκη του $[Zn(Mef)_2(phen)(H_2O)]$

Πίνακας 14. Τιμές σταθεράς K_{sv} (M^{-1}) των μελετούμενων ενώσεων με το mefenamic acid καθώς και το % ποσοστό ελάττωσης φθορισμού

Ένωση	% ελάττωση φθορισμού	K_{sv} (M^{-1})
1, [Zn(mef) ₂ (bipy)]	68	$1.23(\pm 0.04) \times 10^6$
2, [Zn(mef) ₂ (CH ₃ OH) ₂]	65	$1.97(\pm 0.07) \times 10^6$
3, [Zn(mef) ₂ (phen)(H ₂ O)]	50	$6.27(\pm 0.01) \times 10^5$
4, [Zn(mef) ₂ (Hrko) ₂]	58	$5.27(\pm 0.01) \times 10^5$
5, [Zn(mef) ₂ (bipyam)]	52	$5.82(\pm 0.12) \times 10^5$
Hmef	80	$1.58(\pm 0.06) \times 10^5$

Συγκεντρωτικά για όλα τα σύμπλοκα του ψευδαργύρου με το mefenamic acid, παρατηρείται αρκετά μεγάλο % ποσοστό ελάττωσης φθορισμού. Το μεγαλύτερο ποσοστό το εμφανίζει το σύμπλοκο **1**, ενώ το μικρότερο (50%) το σύμπλοκο **3**. Έτσι ο πιθανότερος τρόπος αλληλεπίδρασης με το DNA θεωρείται η δράση μέσω παρεμβολής λόγω της ικανότητας που έχουν να αντικαταστήσουν το EB. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι το μέγεθος της τιμής της σταθεράς K_{sv} σχετίζεται με την ικανότητα σύνδεσής της στο CT DNA. Σύμφωνα με τον πίνακα 14 οι τιμές των σταθερών σύνδεσης είναι αρκετά υψηλές με αποτέλεσμα η αντικατάσταση του EB μέσω παρεμβολής να θεωρείται ιδιαίτερα πιθανή.

5.1.5 Αλληλεπίδραση των ΜΣΑΦ και των συμπλόκων με αλβουμίνη ορού αίματος (SerumAlbumin)

Η αλβουμίνη είναι η πλέον άφθονη πρωτεΐνη στο πλάσμα του αίματος και η πιο σημαντική στο κυκλοφορικό σύστημα του οργανισμού. Συντίθεται στο συκώτι και εξέρχεται ως μια μη γλυκοσυλιωμένη πρωτεΐνη. Σχετίζεται με τη μεταφορά μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων καθώς και διαφόρων μεταβολιτών, φαρμάκων και οργανικών ουσιών σε όλο το σώμα.

Είναι σημαντικό να εξεταστούν οι αλληλεπιδράσεις των φαρμάκων με την πρωτεΐνη αλβουμίνη ορού αίματος. Η δέσμευση σε τέτοιου είδους πρωτεΐνες μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια ή σε αύξηση των βιολογικών ιδιοτήτων του αρχικού φαρμάκου. Η καλύτερη μέθοδος για τη μελέτη σύνδεσης των φαρμάκων σε αλβουμίνες είναι η φθορισμομετρία. Αυτή η αλληλεπίδραση έχει μελετηθεί σε δύο είδη αλβουμίνης, στην ανθρώπινη αλβουμίνη ορού (Human Serum Albumin) και στην βοοειδή αλβουμίνη ορού (Bovine Serum Albumin). Η BSA είναι η εκτενέστερα μελετημένη πρωτεΐνη, λόγω της δομικής ομολογίας της με την HSA. Η BSA έχει δύο τρυπτοφάνες στις θέσεις 134 και 212, την Trp-134 και την Trp-212, στις δομικές μονάδες IB και IIA, αντίστοιχα. Η HSA περιέχει 585 αμινοξέα με μόνο μία τρυπτοφάνη να βρίσκεται στη θέση 214 κατά μήκος της αλυσίδας, στη δομική περιοχή IIA. Οι BSA και HSA μπορούν να δεσμεύσουν αντιστρεπτά έναν μεγάλο αριθμό ενώσεων. Η ικανότητα της δέσμευσης των αρωματικών και ετεροκυκλικών ενώσεων εξαρτάται κατά ένα μεγάλο μέρος από την ύπαρξη δύο σημαντικών περιοχών δέσμευσης, της περιοχής Sudlow I (ή περιοχή βενζοδιαζεπινών) και της περιοχής II (ή περιοχή warfarin), που βρίσκονται μέσα στις εξειδικευμένες κοιλότητες στις δομικές περιοχές IIA και IIIA, αντίστοιχα. Τα διαλύματα BSA και HSA παρουσιάζουν ισχυρή εκπομπή φθορισμού στα 343 nm και 351 nm αντίστοιχα, λόγω παρουσίας των τρυπτοφανών, όταν διεγείρονται στα 295 nm. Οι αλλαγές στα φάσματα εκπομπής της τρυπτοφάνης των BSA και HSA οφείλονται στην αλλαγή της πρωτεϊνικής διαμόρφωσης, στην ένωση των υπομονάδων, στη σύνδεση των υποστρωμάτων ή ακόμα και στη μετουσίωση. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο υποκαταστάτης Hmef και τα συμπλοκά του δεν εμφανίζουν φθορισμό κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες.

5.1.5.1 Εξισώσεις μελέτης πρωτεϊνικής δέσμευσης

Η πρωτεϊνική δέσμευση μελετήθηκε από την ελάττωση της έντασης του φθορισμού της τρυπτοφάνης χρησιμοποιώντας BSA (3 μ M) ή HSA (3 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα (15 mM κιτρικό νάτριο και 150 mM χλωριούχο νάτριο με pH=7.0). Η ελάττωση της έντασης εκπομπής της τρυπτοφάνης της BSA σε 343 nm ή της HSA σε 351 nm μελετήθηκε χρησιμοποιώντας τους υποκαταστάτες Hmef και τις ενώσεις 1-5 ως quenchers (ενώσεις που ελαττώνουν την ένταση του φθορισμού) με αυξανόμενη συγκέντρωση. Τα φάσματα εκπομπής φθορισμού λήφθηκαν από 300 έως 500 nm με μήκος κύματος διέγερσης 296 nm. Τα διαγράμματα Stern-Volmer και Scatchard μπορούν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να μελετηθεί ποσοτικά η αλληλεπίδραση ενός quencher παρουσία αλβουμίνης. Η εξίσωση Stern-Volmer μπορεί να έχει τη μορφή:

$$\frac{I_o}{I} = 1 + k_q \tau_o [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (3)$$

όπου I_o = η αρχική ένταση φθορισμού τρυπτοφάνης SA, I = η ένταση φθορισμού τρυπτοφάνης SA μετά από την προσθήκη του quencher, k_q = η σταθερά απόσβεσης SA, K_{sv} = η δυναμική σταθερά απόσβεσης, τ_o = η μέση διάρκεια ζωής SA χωρίς τον quencher, $[Q]$ = η συγκέντρωση του quencher αντίστοιχα και $K_{sv} = k_q \tau_o$ και λήψη ως διάρκεια ζωής φθορισμού (τ_o) τρυπτοφάνης σε SA περίπου σε 10^{-8} s. Η δυναμική σταθερά απόσβεσης (K_{sv} , M^{-1}) μπορεί να ληφθεί από την κλίση του διαγράμματος I/I_o προς $[Q]$ και στη συνέχεια μπορεί να υπολογιστεί η σταθερά απόσβεσης (k_q , $M^{-1} s^{-1}$). Από την εξίσωση Scatchard για στατική ελάττωση φθορισμού:

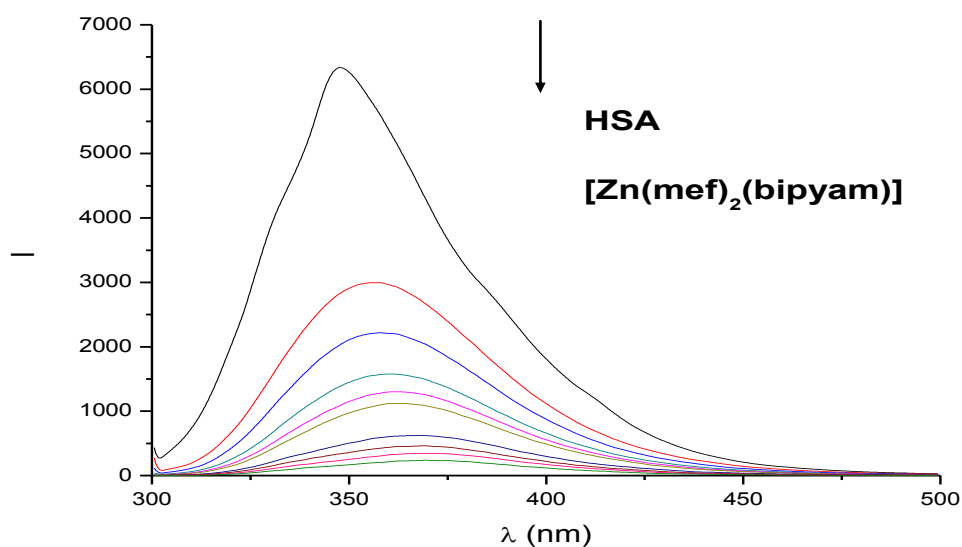
$$\frac{\Delta I}{I_o} = nK - K \frac{\Delta I}{I_o} \quad (4)$$

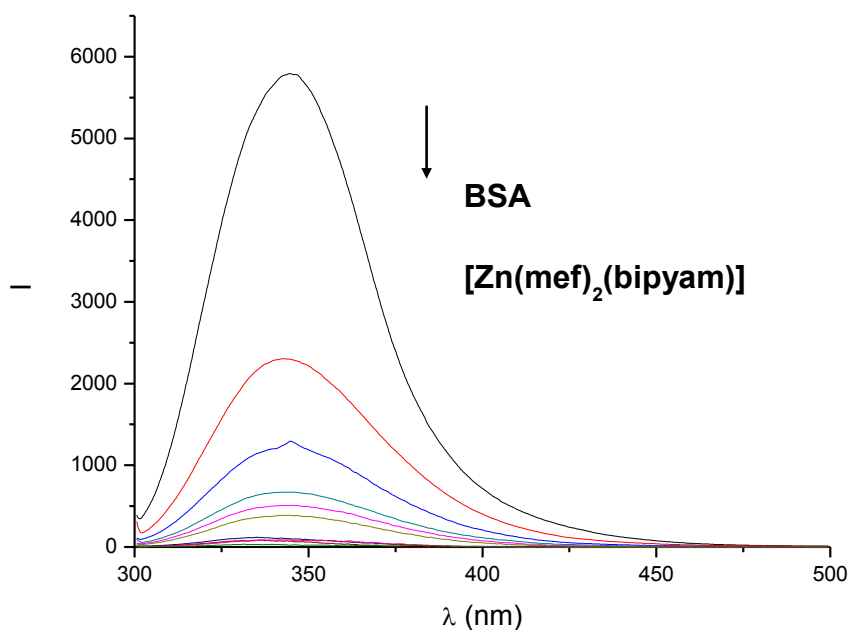
όπου $[Q]$ είναι η συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου/συμπλόκου, n ο αριθμός θέσεων σύνδεσης ανά αλβουμίνη και K η σταθερά σύνδεσης ανά θέση. Η σταθερά K

(M^{-1}) μπορεί να υπολογιστεί από την κλίση του διαγράμματος $\frac{\Delta I}{I_o}$ προς $\frac{\Delta I}{I_o}$ και στη συνέχεια υπολογίζεται και ο n από τον λόγο του γ δια την κλίση.

5.1.5.2 Μελέτη δέσμευσης αλβουμίνης

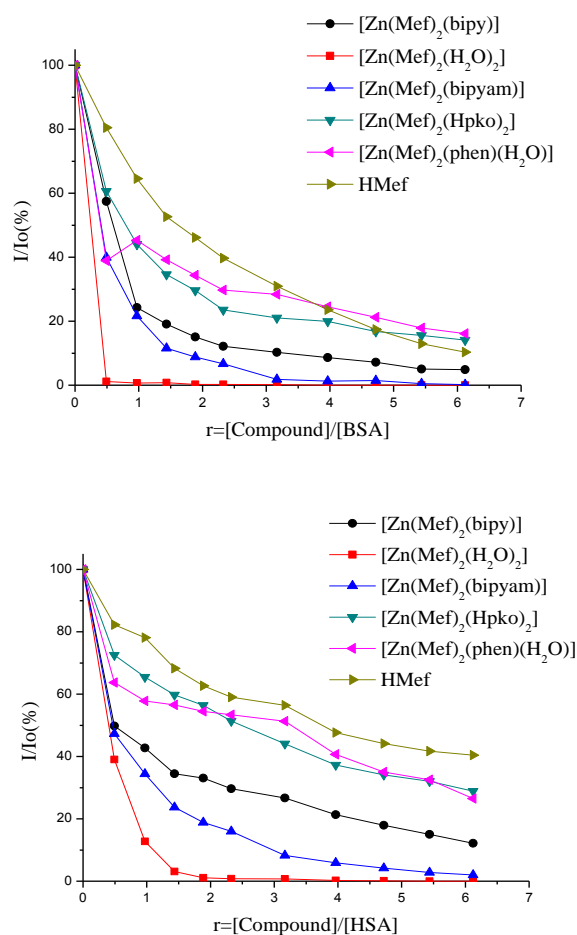
Η αλληλεπίδραση των ΜΣΑΦ καθώς και των σύμπλοκων ενώσεων με τα δύο είδη των αλβουμινών, μελετήθηκε με βάση την ελάττωση της έντασης εκπομπής φθορισμού. Σύμφωνα και με τα προηγούμενα, η BSA και η HSA παρουσιάζουν μία έντονη εκπομπή φθορισμού με μέγιστα στα 343 nm και στα 351 nm αντίστοιχα, εξαιτίας των τρυπτοφανών, όταν το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης είναι 295 nm. Στο σχήμα 30 παρατίθενται φάσματα εκπομπής φθορισμού BSA και HSA όπου παρουσιάζουν σημαντική ελάττωση της έντασης κατά την προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων της σύμπλοκης ένωσης $[Zn(mef)_2(bipyam)]$.





Σχήμα 30. Φάσματα εκπομπής φθορισμού HSA και BSA $[Zn(Mef)_2(bipyam)]$.

Συγκεκριμένα, ο φθορισμός της BSA παρουσία του mefenamic acid και των συμπλόκων του εμφανίζει ελάττωση, μέχρι το 10% για το Hmef, 2% για το **2**, 5% για το **5**, 10% για το **1**, 20% για το **4** και 25% για το **3** στο $\lambda=343\text{nm}$ χωρίς καμία άλλη φασματοσκοπική μεταβολή, πράγμα που υποδηλώνει τη σύνδεση των ενώσεων με τη BSA (Σχήμα 31). Αντίστοιχα φαινόμενα παρατηρούνται και στην αλληλεπίδραση των ίδιων ενώσεων με τη HSA. Το Hmef προκαλεί μείωση του φθορισμού της HSA μέχρι το 50% της αρχικής έντασης, 2% για το **2**, 8% για το **5**, 20% για το **1**, 30% για το **3** και 35% για το **4**. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν σημαντική ελάττωση της έντασης εκπομπής της τρυπτοφάνης και της δράσης των ενώσεων αυτών ως quenchers, (Σχήμα 31).



Σχήμα 31. Διαγράμματα ποσοστού ελάττωσης έντασης φθορισμού (I/I_0 %) των BSA και HSA παρουσία του Hmef και των αντίστοιχων συμπλόκων του Zn.

Σύμφωνα με την εξίσωση Stern-Volmer, υπολογίστηκαν οι τιμές των σταθερών K_{sv} και k_q για την αλληλεπίδραση του ΜΣΑΦ και των συμπλοκών ενώσεων 1-5 με BSA και παρατίθενται στον πίνακα 15. Από τις τιμές των δύο σταθερών φαίνεται μια τάση δέσμευσης της BSA με τα σύμπλοκα. Οι τιμές που εμφανίζουν ($>10^{13} \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) είναι υψηλότερες από άλλους quenchers που χρησιμοποιούνται στο φθορισμό βιοπολυμερών ($2.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), πράγμα που δείχνει την ύπαρξη του στατικού μηχανισμού απόσβεσης. Η σταθερά σύνδεσης ανά θέση, K εμφανίζει αυξημένες τιμές για τα σύμπλοκα σε σχέση με το Hmef. Τέλος, ο αριθμός θέσεων σύνδεσης ανά αλβουμίνη, n εμφανίζει ελαφρώς μειωμένες τιμές για τα σύμπλοκα 1-5 σε σχέση με το Hmef.

Πίνακας 15. Οι σταθερές δέσμευσης με το BSA και οι παράμετροι (K_{sv} , k_q , K , n) όπως

παρουσιάζονται από το ελεύθερο ΜΣΑΦ και τα σύμπλοκα 1-5.

Ένωση	$k_q(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$K_{sv}(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$K(\text{M}^{-1})$	n
[Zn(mef) ₂ (bipy)]	$1.00(\pm 0.45) \times 10^{14}$	$1.00(\pm 0.45) \times 10^6$	1.05×10^6	0.99
[Zn(mef) ₂ (H ₂ O) ₂]	$5.55(\pm 0.14) \times 10^{15}$	$5.55(\pm 0.14) \times 10^7$	5.05×10^7	1.00
[Zn(mef) ₂ (phen)(H ₂ O)]	$2.58(\pm 0.14) \times 10^{13}$	$2.58(\pm 0.14) \times 10^5$	4.80×10^5	0.90
[Zn(mef) ₂ (Hrko) ₂]	$3.20(\pm 0.15) \times 10^{13}$	$3.20(\pm 0.15) \times 10^5$	4.78×10^5	0.96
[Zn(mef) ₂ (bipyam)]	$2.05(\pm 0.16) \times 10^{14}$	$2.05(\pm 0.16) \times 10^6$	8.76×10^5	1.08
Hmef	$2.78(\pm 0.20) \times 10^{13}$	$2.78(\pm 0.20) \times 10^5$	1.35×10^5	1.35

Με ανάλογο τρόπο έχουν υπολογιστεί και οι αντίστοιχες τιμές των παραμέτρων που αναφέρονται στην HSA. Οι υπολογισμένες τιμές K_{sv} και k_q , όπως λαμβάνονται από την κλίση της εξίσωσης Stern-Volmer, δίνονται στον πίνακα 16 και δείχνουν μια καλή τάση δέσμευσης των ενώσεων με την HSA. Οι τιμές του k_q είναι αυξημένες σε όλα τα σύμπλοκα, πράγμα που σημαίνει ότι εμφανίζουν ισχυρή ικανότητα δέσμευσης της αλβουμίνης και προκαλούν υψηλή απόσβεση. Και σε αυτήν την περίπτωση η σταθερά σύνδεσης K εμφανίζει αυξημένες τιμές για τα σύμπλοκα σε σχέση με το Hmef. Τέλος, ο αριθμός θέσεων σύνδεσης ανά αλβουμίνη, n , σε αντίθεση με την BSA εμφανίζει ελαφρώς αυξημένες τιμές για τα σύμπλοκα **1-5** σε σχέση με το Hmef.

Πίνακας 16. Οι σταθερές δέσμευσης με το HSA και οι παράμετροι (K_{sv} , k_q , K , n) όπως παρουσιάζονται από το ελεύθερο ΜΣΑΦ και τα σύμπλοκα 1-5.

Ένωση	$k_q(M^{-1}s^{-1})$	$K_{sv}(M^{-1}s^{-1})$	$K(M^{-1})$	n
[Zn(mef) ₂ (bipy)]	$3.40(\pm 0.23) \times 10^{13}$	$3.40(\pm 0.23) \times 10^5$	3.43×10^5	1.00
[Zn(mef) ₂ (H ₂ O) ₂]	$1.46(\pm 0.48) \times 10^{15}$	$1.46(\pm 0.48) \times 10^7$	5.29×10^6	1.01
[Zn(mef) ₂ (phen)(H ₂ O)]	$1.35(\pm 0.09) \times 10^{13}$	$1.35(\pm 0.09) \times 10^5$	1.50×10^5	0.96
[Zn(mef) ₂ (Hrko) ₂]	$1.28(\pm 0.03) \times 10^{13}$	$1.28(\pm 0.03) \times 10^5$	1.58×10^5	0.94
[Zn(mef) ₂ (bipyam)]	$7.60(\pm 0.20) \times 10^{13}$	$7.60(\pm 0.20) \times 10^5$	6.19×10^5	1.06
Hmef	$7.13(\pm 0.34) \times 10^{12}$	$7.13(\pm 0.34) \times 10^4$	1.32×10^5	0.82

Μετά από σύγκριση των σταθερών σύνδεσης του BSA και HSA με τις αντίστοιχες ενώσεις φαίνεται ότι ενώνονται ισχυρότερα με τη BSA απ' ό τι με τη HSA. Για την ίδια ένωση, οι τιμές που εμφανίζει κατά τη σύνδεση της με τη BSA είναι μεγαλύτερες απ' αυτές με τη HSA. Με βάση τους δύο παραπάνω πίνακες, απ' όλες τις ενώσεις τη μεγαλύτερη σταθερά σύνδεσης με το BSA και το HSA παρουσιάζει το σύμπλοκο [Zn(mef)₂(H₂O)₂] ($k_{qBSA} = 5.55(\pm 0.14) \times 10^{15}$ και $k_{qHSA} = 1.46(\pm 0.48) \times 10^{15}$). Από τα διαγράμματα Scatchard και τις εξισώσεις 3, 4 για τη στατική απόσβεση, έχει υπολογιστεί η σταθερά σύνδεσης (K, M^{-1}) κάθε ένωσης (πίνακας 15,16). Για τη BSA και την HSA την μεγαλύτερη σταθερά σύνδεσης ανά θέση παρουσιάζει ξανά το σύμπλοκο [Zn(mef)₂(H₂O)₂] ($K_{BSA} = 5.05 \times 10^7 M^{-1}$, $K_{HSA} = 5.29 \times 10^6 M^{-1}$).

5.2 Αντιοξειδωτική δράση ενώσεων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, σκοπός της εργασίας είναι η σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των συμπλόκων ενώσεων σε σχέση με αυτή των ligands. Στον Πίνακα 17 δίνονται οι % μειώσεις της απορρόφησης του αρχικού διαλύματος της ρίζας του DPPH, σε 20 και σε 60 λεπτά.

Πίνακας 17. Επί τοις εκατό μείωσης της απορρόφησης της ρίζας του DPPH.

	20 min, 0,1mM	60 min, 0,1 mM
Htolf	14,57(±0,62)	17,86(±0,54)
[Zn ₃ (tolf) ₆ (MeOH) ₂]	27,63(±0,48)	34,75(±0,23)
[Zn(tolf)(bipy)Cl]	16,53(±0,72)	12,54(±0,64)
[Zn(tolf) ₂ (bipy)]	9,36(±0,42)	21,76(±0,92)
[Zn(tolf) ₂ (phen)]	34,51(±1,23)	36,72(±0,68)
[Zn(tolf)(phen)Cl]	21,34(±0,29)	24,65(±0,43)
[Zn(tolf) ₂ (Hpko) ₂]	26,49(±0,76)	29,52(±0,78)
Hnap	8,03(±0,32)	8,43(±0,20)
[Zn(nap) ₂ (H ₂ O) ₄]	26,51(±0,47)	28,80(±0,38)
[Zn(nap) ₂ (bipy)(MeOH)]	13,67(±1,20)	12,52(±0,27)
[Zn(nap) ₂ (phen)(MeOH)]	20,04(±0,56)	21,69(±0,57)
[Zn(nap) ₂ (bipyam)]	10,65(±0,93)	14,53(±1,03)
Hfluf	7,36(±0,52)	9,74(±0,38)
[Zn(fluf) ₂ (MeOH) ₄]	18,58(±0,70)	19,43(±0,81)
[Zn(fluf) ₂ (bipy)]	14,87(±0,48)	15,62(±0,22)
[Zn(fluf) ₂ (bipyam)]	12,63(±0,88)	11,67(±0,38)
[Zn(fluf)(phen) ₂ (H ₂ O)](fluf)	27,52(±0,31)	30,58(±0,40)
Hmef	5,72(±0,08)	11,74(±0,20)
[Zn(mef) ₂ (H ₂ O) ₄]	43,32(±0,32)	41,57(±0,82)
[Zn(mef) ₂ (bipy)]	14,64(±0,71)	16,69(±0,54)
[Zn(mef) ₂ (phen)(H ₂ O)]	24,17(±0,46)	28,39(±0,23)
[Zn(mef) ₂ (bipyam)]	15,22(±0,48)	18,90(±0,26)
[Zn(mef) ₂ (Hpko) ₂]	17,60(±0,81)	16,84(±0,35)

Hdifl	10,42(±0,56)	14,31(±0,45)
[Zn(difl) ₂ (MeOH) ₄]	22,37(±0,41)	20,74(±0,73)
[Zn(difl) ₂ (bipy)]	18,52(±0,60)	19,57(±0,32)
[Zn(difl) ₂ (phen)]	12,73(±0,49)	14,44(±0,89)
[Zn(difl) ₂ (bipyam)]	15,61(±0,51)	17,68(±0,55)
[Zn(difl) ₂ (Hpko) ₂]	14,87(±0,92)	16,80(±0,62)
Hnif	9,39(±0,72)	8,91(±0,63)
[Zn(nif) ₂ (MeOH) ₄]	17,42(±0,63)	23,44(±0,80)
[Zn(nif)(bipy)Cl]	13,03(±0,86)	14,62(±0,45)
[Zn(nif) ₂ (phen)]	21,52(±0,79)	26,73(±0,68)
[Zn(nif) ₂ (bipyam)]	10,21(±0,23)	13,47(±0,52)
[Zn(nif) ₂ (Hpko) ₂]	14,70(±1,00)	12,93(±0,79)
Nadid	18,26(±0,60)	17,43(±0,23)
[Na ₂ Zn(difl) ₄]·6MeOH	24,52(±0,97)	26,94(±0,41)
[Zn(did) ₂ (bipy)]	23,67(±0,44)	27,48(±0,74)
[Zn(did) ₂ (phen)]	38,78(±0,78)	42,90(±0,32)
[Zn(did) ₂ (bipyam)]	27,41(±0,92)	26,59(±0,90)
[Zn(did) ₂ (Hpko) ₂]	26,94(±1,04)	24,86(±0,61)
NDGA	81,02 (±0,18)	82,60 (±0,17)
BHT	31,30 (±0,10)	60,00 (±0,38)

6. Συμπεράσματα

Τα κυριότερα συμπεράσματα αυτής της εργασίας συνοψίζονται στα εξής:

Παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν ουδέτερα μονοπυρηνικά σύμπλοκα του δισθενούς ψευδαργύρου με υποκαταστάτη το μη-στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο mefenamic acid, απουσία ή παρουσία των (N-N')δοτών 1,10-φαινανθρολίνη, 2,2'-διπυριδίνη και η 2,2'-διπυριδυλαμίνη καθώς και η δι-2-πυριδυλκετονοξίμη. Τα σύμπλοκα που προέκυψαν χαρακτηρίστηκαν δομικά και μελετήθηκε η αλληλεπίδρασή τους με το CT DNA μέσω φασματοσκοπίας UV-Vis και φθορισμού. Τέλος, εξετάστηκε η αλληλεπίδραση των ενώσεων και με την αλβουμίνη ορού αίματος (HSA και BSA).

Από τη μελέτη των συμπλόκων με φασματοσκοπία υπεριώθρου, προέκυψε ότι η καρβοξυλική ομάδα του ΜΣΑΦ συναρμόζεται με το κεντρικό μέταλλο διδραστικά μέσω των καρβοξυλικών οξυγόνων σε όλα σχεδόν τα σύμπλοκα.

Οι μελέτες μοριακής αγωγιμότητας έδειξαν ότι όλα τα σύμπλοκα δεν είναι ηλεκτρολύτες. Από τη φασματοσκοπία UV-vis προκύπτει ότι τα σύμπλοκα διατηρούν τόσο σε στερεή κατάσταση όσο και σε διάλυμα DMSO την ίδια δομή.

Οι δομές επιλύθηκαν κρυσταλλογραφικά. Σε αυτά τα σύμπλοκα, το άτομο του ψευδαργύρου έχει αριθμό συναρμογής έξι και εμφανίζει παραμορφωμένη οκταεδρική γεωμετρία.

Ο τρόπος δράσης του ΜΣΑΦ και των συμπλόκων ενώσεών του με το CT DNA μελετήθηκε με φασματοσκοπία UV και υπολογίστηκε η K_b . Για τα σύμπλοκα 1-5 εξάγεται το συμπέρασμα ότι ο τρόπος αλληλεπίδρασης με το DNA είναι μέσω παρεμβολής των ενώσεων με το CT DNA και η σταθεροποίηση της δομής.

Η μελέτη του ιώδους που εμφανίζουν τα σύμπλοκα έδειξε πως ο πιθανότερος τρόπος σύνδεσης με το DNA είναι μέσω παρεμβολής, καθώς σε όλα τα σύμπλοκα παρατηρήθηκε αύξηση του ιώδους.

Από την φασματοσκοπία φθορισμού και την ανταγωνιστική μελέτη με EB συμπεραίνεται η δυνατότητα αντικατάστασης του EB ενώ η παρεμβολή είναι ο πιθανότερος τρόπος σύνδεσης με το DNA.

Μελετήθηκε η δυνατότητα δέσμευσης του υποκαταστάτη και των αντίστοιχων συμπλόκων του σε αλβουμίνη ορού αίματος (HSA, BSA) μέσω

φασματοσκοπίας φθορισμού. Ο υποκαταστάτης και τα σύμπλοκά του προκαλούν μεγάλη μείωση του φθορισμού κατά την προσθήκη σε διάλυμα BSA και HSA. Από την εξίσωση Stern-Volmer και τα αντίστοιχα διαγράμματα υπολογίστηκαν οι τιμές των σταθερών K_{sv} και k_q για όλες τις ενώσεις. Από τις τιμές των δύο σταθερών φαίνεται μια σημαντική τάση δέσμευσης της BSA και της HSA με τις ενώσεις, με μεγαλύτερη όμως στη BSA. Από τα διαγράμματα Scatchard υπολογίστηκε η σταθερά σύνδεσης K . Τέλος, οι τιμές αυτές είναι μεγαλύτερες για τη σύνδεσή τους με τη BSA απ' ό τι με τη HSA.

Σχετικά με την αντιοξειδωτική ικανότητα, παρατηρούμε ότι κατά κανόνα αυξάνεται η δραστηριότητα του φαρμάκου μετά τη συναρμογή του με το μέταλλο. Μεταξύ των συμπλόκων του ίδιου ΜΣΑΦ, αυτά τα οποία εμφανίζουν τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα είναι αυτά που χρησιμοποιούν πιο πολικά μόρια ως υποκαταστάτες. (H_2O , $MeOH$).

7. Βιβλιογραφία

- Chao H., Mei W.J., Huang Q.W. and Ji L.N. (2002). *Journal Inorganic Biochemistry*, **92**, 165–170.
- Chikaraishi Kasuga N., Sekino K., Ishikawa M., Honda A., Yokoyama M., Nakano S., Shimada N., Koumo C. and Nomiya K. (2003). *Journal Inorganic Biochemistry*, **96**, 298–310.
- Coulston L. and Dandona P. (1980). *Diabetes*, **29**, 665.
- Hanggi G., Schmalte H. and Dubler E. (1988). *Inorganic Chemistry*, **27**, 3131–3137.
- Koppenhofer., Hartmann U. and Vahrenkamp H. (1995). *Chemische Berichte*, **128**, 779–785.
- Kirschgessner M. and Roth H.P. (1983) *Metal Ions in Biological Systems*. Marcel Dekker Inc. **9**, 363–414.
- Kirschgessner M. and Weigand E. (1983). *Metal Ions in Biological Systems*. Marcel Dekker Inc. **8**, 319–361.
- Kovala–Demertzi D., Yadav P.N., Wiecek J., Skoulika S., Varadinova T. and Demertzis M.A. (2006). *Journal Inorganic Biochemistry*, **100**, 1558–1567.
- Lemoine P., Viossat B., Dung N., Tomas A., Morgant G., Greenaway F. and Sorenson R. (2004) *Inorganic Biochemistry*, **98**, 1734–1749.
- Marmur J. (1961). *Journal of Molecular Biology*, **3**, 208–211.
- Pyle A.M., Rehmann J.P., Meshoyrer R., Kumar C.V., Turro N.J. and Barton J.K. (1989). *Journal of the American Chemistry Society*, **111**, 3053–3063.
- Regtop H.L. and Biffin J.R. (1995). Divalent Metal Complexes of Indomethacin, Compositions and Medical Methods of Use There of. U.S. Patent 5466824, Biochemical Veterinary Research Pty. Ltd, Australia.
- Reichmann M.F., Rice S.A., Thomas C.A. and Doty P. (1954). *Journal of the American Chemical Society*, **76**, 3047–3053.
- Singla A.K., Mediratta D.K. and Pathak K. (1990). *International Journal of Pharmaceutics*, **60**, 27–33.
- Singla A.K. and Wadhwa H. (1994). *International Journal of Pharmaceutics*, **108**,

173–185.

- Sheldrick G.M. (1997). SHELXTL, v. 5.10; Bruker Analytical X-ray, Madison, WI.
- Sheldrick G.M. (1996). SADABS. Program for Empirical Absorption Correction of Area Detector Data, University of Gottingen: Gottingen, Germany.
- Tarushi A., Polatoglou E., Kljun J., Turel I., Psomasand G. and Kessissoglou D. (2011). Aristotle University of Thessaloniki.
- Tarushi A., Polatoglou E., Kljun J., Turel I., Psomasand G. and Kessissoglou D. (2012). Aristotle University of Thessaloniki.
- Vaira M., Bazzicalupi C., Orioli P., Messori L., Bruni B. and Zatta P. (2002). *Inorganic Chemistry*, **43**, 3795–3797.
- Μανουσάκη Γ. (1992). *Τα ιχνοστοιχεία στην υγεία του ανθρώπου*, εκδ. Αδελφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη, pp 45-55.