



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Μεταπτυχιακή ερευνητική διατριβή:

Σχεδιασμός και ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών παραγόντων από τη συνέργεια δραστικών ουσιών της ρίγανης με το κύριο συστατικό φαρμάκων κατά της λεισμάνιας

Καπετανά Μαριάνθη,

Βιολόγος



Επιβλέπων καθηγητής: Δρ. Σ.Κ. Χατζηκακού



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

Μεταπτυχιακή ερευνητική διατριβή:

Σχεδιασμός και ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών παραγόντων από τη συνέργεια δραστικών ουσιών της ρίγανης με το κύριο συστατικό φαρμάκων κατά της λεισμάνιας

Καπετανά Μαριάνθη,

Βιολόγος



Επιβλέπων καθηγητής: Δρ. Σ.Κ. Χατζηκακού

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021



«Υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Δράσης ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ - ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ και συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνεΚ) (κωδικός έργου: Τ1ΕΔΚ-02990)»

**Εισαγωγή στο ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.) «ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

της κ. Μαριάνθης Καπετανά

Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ: κ. Σωτήριος Χατζηκακού

Θέμα: «Σχεδιασμός και ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών παραγόντων από τη συνέργεια δραστικών ουσιών της ρίγανης με το κύριο συστατικό φαρμάκων κατά της λειψιμάνια»

Ορισμός Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: από την Ε.Δ.Ε.: :....^A/....-.....-....

1 Καθηγητής Σωτήριος Χατζηκακού, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

2 Καθηγητής Περλεπές Σπυρίδων, Πανεπιστήμιο Πατρών

3 Αναπληρωτής Καθηγητής Νικόλαος Κουρκουμέλης, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας στις:/...../.....

Ο Διευθυντής του Δ.Π.Μ.Σ.

Ο/Η Γραμματέας

Καθηγητής

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Εφαρμοσμένης Βιολογικής Χημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του Καθηγητή, κ. Χατζηκακού Κ. Σωτήριου, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος – «Ανόργανη Βιολογική Χημεία».

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Χατζηκακού Κ. Σωτήριου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε να φέρω εις πέρα αυτή την επιστημονική εργασία καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγηση του. Ακόμη θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την συνεχή στήριξη που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια της εργασίας και της παρουσίας μου στο εργαστήριο αλλά και για την άριστη συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το διάστημα της παρουσίας μου στο εργαστήριο.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη μεταδιδάκτορα κ. Μπαντή Χριστίνα, για την στήριξη της, την πολύτιμη βοήθεια της, τις επιστημονικές της συμβουλές και την καθοδήγηση της σε μεγάλο μέρος των πειραμάτων της παρούσας εργασίας. Η βοήθεια και η συμβολή της ήταν πραγματικά πολύτιμη για την διεκπεραίωση της εργασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Σ. Περλεπέ, καθηγητή του τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Πατρών και τον κ. Ν. Κουρκουμέλη, αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Β. Ψυχάρη και την κ. Κ. Ραπτοπούλου, ερευνητές του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος» (ΕΚΕΦΕ «ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ») για την επίλυση της δομής, καθώς και τους την κ. Χ. Παπαχριστοδούλου, μέλος ΕΔΙΠ του τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη λήψη των φασμάτων XRF και XRPD, τον κ. Τ.

Βαϊμάκη, αναπλ. Καθηγήτη του τμήματος Χημείας, για τις θερμικές αναλύσεις TG-DTA DSC καθώς και τον κύριο Α.Καρκαμπούνα μέλος ΕΔΙΠ του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη λήψη των φασμάτων μάζας υψηλής ανάλυσης.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και σε όλη την ομάδα του εργαστηρίου, μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς, για τη βοήθεια και την πολύ καλή συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που υπήρχε όλους αυτούς τους μήνες που διανύσαμε μαζί καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού.

Θα ήθελα επίσης να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ, στις παιδικές (Παναγιώτα, Αθηνά) αλλά και στις φοιτητικές μου φίλες (Γεωργία, Αθηνά) για την ψυχολογική κυρίως στήριξη τους που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ, ωστόσο, το οφείλω στους γονείς μου (Ασημάκη και Περμαθούλα) και την αδερφή μου (Σταυρούλα), για την υπομονή, την βοήθεια και την στήριξη τους σε κάθε απόφαση και όνειρο μου όλα αυτά τα χρόνια της ζωής μου.

Η παρούσα διατριβή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Δράσης ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ - ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ και συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ) (κωδικός έργου: Τ1ΕΔΚ-02990).

Κατά την διάρκεια της παρουσίας μου στο εργαστήριο Εφαρμοσμένης Βιοανόργανης Χημείας καθώς και κατά την διάρκεια εκπόνησης της ερευνητικής μου διατριβής προέκυψαν οι εξής εργασίες:

- Συμμετοχή μεπαρουσίαση poster στο 18^ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Φαρμακευτικής Χημείας (HSMC-18) με τίτλο:
Sterilized and non –infectious contact lenses of silver salicylate
Marianthi A. Kapetana , Christina N. Banti , C. Papachristodoulou , Sotiris K. Hadjikakou,
- Υποβολή αίτησης για δίπλωμα ευρεσιτεχνίας στον Οργανισμό Βιομηχανικής Ιδιοκτησίας , για την εργασία με θέμα :
« Νέες-υδρογελες για την ανάπτυξη στείρων φακών επαφής»
 - Μια εργασία που έχει υποβληθεί για δημοσίευση με τίτλο :
"Natural products ingredients conjugated with metal ions. The novel combination of Carvacrol with pentavalent antimony as an antiproliferative agent.
M.Kapetana, C.N. Banti, S.K. Hadjikakou, et.al, 2021 submitted for publication"

Περίληψη

Ένας από τους πιο συχνούς λόγους μετάδοσης βακτηρίων καθώς και άλλων μικροοργανισμών είναι οι μολυσμένες επιφάνειες. Τα τελευταία χρόνια οι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα στα διάφορα αντιβιοτικά, που χρησιμοποιούνται για την απολύμανση κυρίως σε υγειονομικά περιβάλλοντα, όπως τα νοσοκομεία. Το γεγονός αυτό δημιουργεί την ανάγκη σύνθεσης νέων αντιμικροβιακών παραγόντων που δεν θα εμφανίζουν ανθεκτικότητα τα βακτήρια αλλά και τη δημιουργία στείρων επιφανειών που θα περιέχουν αντιμικροβιακούς παράγοντες. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα να εμποδίζουν την ανάπτυξη των μικροβίων καθώς και τη δημιουργία βιοφίλμ, που είναι επικίνδυνο για την δημόσια υγεία.

Έτσι λοιπόν, στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή μελετάται η δημιουργία ενός αντιμικροβιακού παράγοντα που θα περιέχει το δραστικό συστατικό της ρίγανης (καρβακρόλη), που είναι ένα φυσικό προϊόν και το αντιμόνιο, που έχει χρησιμοποιηθεί σε φάρμακα για την θεραπεία της λεισμανίασης. Τα φυσικά προϊόντα, λόγω της πολυπλοκότητας της χημικής τους δομής, αλλά και των βιολογικών τους ιδιοτήτων, αποτελούν μια πολύ καλή βάση για τη δημιουργία νέων χημικών δομών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ή ήδη χρησιμοποιούνται ως φάρμακα. Ακόμα, τα μεταλλικά στοιχεία χρησιμοποιούνται σε πολλά φάρμακα ως δραστικές ουσίες.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετάται η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός μιας νέας χημικής δομής με την καρβακρόλη καθώς και η βιολογική μελέτη αυτής της δομής με απώτερο στόχο τη δημιουργία νέων στείρων υλικών που θα περιέχουν αυτή την ουσία. Η ένωση που συντέθηκε αποτελεί την πρώτη δομή καρβακρόλης – αντιμονίου και παρουσιάζει μεγάλο χημικό ενδιαφέρον. Η νέα αυτή ένωση καθώς και τα στείρα υλικά που συντέθηκαν μελετήθηκαν σε τέσσερα βακτήρια και βρέθηκε ότι θα μπορούσαν να μειώσουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών.

Abstract

One of the most common causes of transmission of bacteria and other microorganisms is contaminated surfaces. In recent years, microorganisms have developed resistance to various antibiotics, which are used for disinfection mainly in sanitary environments, such as hospitals. This fact creates the need for the synthesis of new antimicrobial agents that will not show resistance to bacteria and the creation of sterile surfaces that will contain antimicrobial agents. This will prevent the growth of germs as well as the creation of biofilm, which is dangerous to public health.

Thus, in the present master's thesis, the creation of an antimicrobial agent containing the active ingredient of oregano (carvacrol), which is a natural product, and the antimony, which has been used in drugs for the treatment of leishmaniasis, is studied. Natural products, due to the complexity of their chemical structure, but also their biological properties, are a very good basis for the creation of new chemical structures that can be used or are already used as drugs. Still, minerals are used in many medicines as active ingredients.

In the present dissertation, the composition and characterization of a new chemical structure with carvacrol is studied as well as the biological study of this structure with the ultimate goal of creating new sterile materials that will contain this substance. The synthesized compound is the first carvacrol-antimony structure and is of great chemical interest. This new compound as well as the sterile materials synthesized were studied in four bacteria and found to be able to reduce the growth and multiplication of microorganisms.

Περιεχόμενα

Πρόλογος	2
Περίληψη.....	5
Abstract	6
1.Εισαγωγή.....	11
1.1 Ρίγανη και τα αιθέρια έλαια της.....	11
1.1.1 Ρίγανη.....	11
1.1.2 Αιθέρια Έλαια	13
1.1.3 Χρήσεις της ρίγανης και θεραπευτικές ιδιότητες	14
1.2.4 Καρβακρόλη	16
1.2 Αντιμόνιο	19
1.2.1 Γενικές Πληροφορίες για το Αντιμόνιο	19
1.2.2 Ανεπιθύμητες ενέργειες Αντιμονίου.....	23
1.3 Ασθένειες που χρησιμοποιείται το αντιμόνιο για την θεραπεία	24
1.3.1 Σχιστοσωμίαση	24
1.3.2 Λειψμανίαση	26
1.3.2 Φάρμακα με δραστική ουσία το αντιμόνιο	26
1.4 Βακτήρια	29
1.4.1 Γενικές Πληροφορίες για τα Βακτήρια.....	29
1.4.2 Βακτηριακή αντοχή	36
1.4.3 Αίσθηση απαρτίας (Quorum sensing).....	38
1.4.4 Αίσθηση απαρτίας στο αρνητικά κατά Gram βακτήριο <i>P. aeruginosa</i>	39
1.4.5 Βιοφίλμ	40
1.5 Αντιμικροβιακά Υλικά	41
1.5.1 Τι είναι τα αντιμικροβιακά υλικά.....	41
1.5.2 Οι κατηγορίες των αντιμικροβιακών υλικών	43
1.5.3 Η αναγκαιότητα της χρήσης των Αντιμικροβιακών Υλικών	44
2.Σκοπός	47
3.Πειραματικό Μέρος.....	49
3.1 Χημικό Μέρος.....	49
3.1.1 Σύνθεση.....	49
3.1.2 Διαλυτότητα	51
3.1.3 Ανακρυστάλλωση	51
3.1.4 Σημείο Τήξης.....	51
3.1.5 Φασματοσκοπία υπερύθρου ATR-FT-IR (Attenuated Total Reflectance, Furier Transform Infra Red).....	52

3.1.6 Φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους Uv – Vis	52
3.1.7 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός - NMR.....	53
3.1.8 Σύνθεση πολυστερενίου	54
3.2 Βιολογικό μέρος	54
3.2.1 Αντιμικροβιακή δράση	55
3.2.2 Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC)	56
3.2.3 Ελάχιστη Βακτηριακή Συγκέντρωση (MBC).....	56
3.2.4 Ζώνη Αναστολής – IZ	57
3.2.5 Βιοφίλμ	57
3.3 Τοξικότητα	58
3.3.1 Γόνотоξικότητα στον οργανισμό <i>Allium Cera</i>	58
3.3.2 Τοξικότητα στο μοντέλο της <i>Artemia Salina</i>	59
3.4.1 Μελέτες δέσμησης DNA	60
3.4.2 Φασματοσκοπικές μελέτες φθορισμού	61
4. Αποτελέσματα	63
4.1 Χημικό Μέρος.....	63
4.1.1 Περίθλαση Ακτίνων-Χ Μονοκρυστάλλου.....	63
4.1.2 Διαλυτότητα	70
4.1.3 Σημείο Τήξης.....	71
4.1.4 Φασματοσκοπία υπερίθρου ATR-FT-IR.....	71
4.1.5 Φασματοσκοπία Ακτίνων Χ (XRF).....	73
4.1.6 X-ray Powder Diffraction (XRPD)	74
4.1.7 Θερμική Ανάλυση.....	74
4.1.8 Φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους UV-vis.....	76
4.1.9 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού NMR.....	78
4.1.10 High resolution MS (HRMS)	80
4.1.12 Μελέτες Σταθερότητας	82
4.1.10.1 Σταθερότητα UV-vis.....	82
4.1.9.2 Σταθερότητα NMR.....	83
4.2 Χαρακτηρισμός πολυστερενίου.....	84
4.2.1 Φασματοσκοπία Ακτίνων Χ (XRF).....	84
4.2.2 Φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους (UV).....	85
4.3 Βιολογικό Μέρος.....	86
4.3.1 Αντιμικροβιακή δράση	86
4.3.1.2 Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC)	90
4.3.1.3 Ελάχιστη Βακτηριοκτόνος Συγκέντρωση (MBC).....	95

.....	98
4.3.1.4 Βιοφίλμ	99
4.3.2 Επίδραση πολυστυρενίου στα βακτήρια	102
4.3.3 Τοξικότητα	106
4.3.3.1 Γονοτοξικότητα στα <i>Allium Cera</i>	106
.....	110
4.3.3.2 Τοξικότητα στην <i>Artemia Salina</i>	111
4.3.4 Μελέτες δέσμησης DNA	113
4.3.4.1 Φασματοσκοπία UV-vis DNA	113
4.3.4.2 Μελέτες φασματοσκοπίας φθορισμού.....	116
5. Συμπεράσματα	120
<i>Βιβλιογραφία</i>	124

Κεφάλαιο 1^ο

Εισαγωγή

1.Εισαγωγή

1.1 Ρίγανη και τα αιθέρια έλαια της

1.1.1 Ρίγανη

Η ρίγανη (Ορίγανον το κοινό, *Origanum vulgare*) είναι αρωματικό ποώδες, πολυετές, ιθαγενές και θαμνώδες φυτό της Μεσογείου και της Κεντρικής Ασίας. Ανήκει στο γένος Ορίγανο της τάξης των λαμιωδών αγγειόσπερμων δικότυλων φυτών. Το φυτό έχει ύψος 20-80 εκ., έχει φύλλα αντίθετα μήκους 1-4 εκ. Αναπτύσσεται καλά σε εδάφη με pH 6-9 και μπορεί να εκμεταλλευτεί, όταν καλλιεργείται, ακόμα και πολύ φτωχά, ξηρά και πετρώδη εδάφη. Τα άνθη της έχουν χρώμα άσπρο-μώβ και ανθίζει από Ιούνιο κυρίως μέχρι Αύγουστο αναλόγως της περιοχής. Η ρίγανη είναι ένα γενετικά ετερογενές είδος λόγω της φυσικής διασταυρούμενης επικοινωνίας [Sung-Sook Chun Dhiraj et al, 2005]. Ένας μεγάλος αριθμός ειδών, που ονομάζεται «ρίγανη ή ορίγανο», έχουν επιτύχει οικονομικό ενδιαφέρον, αν και ανήκουν σε διαφορετικές βοτανικές οικογένειες και γένη. Μπορούν να διακριθούν τέσσερις κύριες ομάδες που χρησιμοποιούνται συνήθως για μαγειρικούς σκοπούς, δηλαδή η ελληνική ρίγανη (*Origanum vulgare ssp. Hirtum*), Ισπανική ρίγανη (*Coridohymus capitatus*), Τουρκική ρίγανη (*Origanum onites L.*) και μεξικάνικη ρίγανη (*Lippia tombolens HBK*). Στην Ευρώπη και, γενικά, σε όλο τον κόσμο, τα πιο συνηθισμένα είδη ρίγανης ανήκουν στο βοτανικό γένος *Origanum* . Δυστυχώς, υπάρχει μεγάλη σύγχυση σχετικά με τη σωστή ταξινομική ταξινόμηση της ρίγανης παρά το γεγονός ότι, το 1980, ο Ietswaart έκανε μια ταξινομική αναθεώρηση του γένους. Πριν από το 1980, ο *O. vulgare L.* ανέφερε αδιάφορα τα υποείδη που ο Ietswaart αναγνώρισε ως *ssp. hirtum Ietswaart, ssp. gracile (C. Koch) Ietswaart, ssp. vulgare* και *ssp. viride (Boiss.) Hayek*.

Δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι πολλές αναλυτικές έρευνες σχετικά με τα αιθέρια έλαια ρίγανης δεν διακρίνουν τα πολυάριθμα υποείδη που παρουσιάζουν λεπτές μορφολογικές και χημικές διαφορές. Η απόδοση σε αιθέρια έλαια είναι ο μόνος χαρακτήρας που δείχνει σχετική σταθερότητα, επομένως είναι χρήσιμος για την αναγνώριση των ειδών.



Εικόνα 1. *Origanum Vulgare*

Τα *O. vulgare L. ssp. vulgare* και *O. vulgare ssp. hirtum Ietswaart* είναι εμπορικά είδη. Μερικές αναφορές έχουν αναφερθεί στο πρώτο είδος, ενώ περισσότερα από πολλά έργα έχουν ασχοληθεί με το δεύτερο [Mariateresa Russo et al, 1998].

Μια βιβλιογραφική έρευνα αποκαλύπτει ότι το *O. vulgare ssp. vulgare L.* έχει εξαιρετικά χαμηλή απόδοση αιθέριου ελαίου. Τα κύρια συστατικά του είναι σαβενένιο, (Z)-β-οκιμενό, β-καρνοφυλλένιο και γερμακρένιο D, ενώ οι φαινόλες θυμόλη και καρβακρόλη απουσιάζουν. Αντίθετα, *O. vulgare ssp. hirtum* έχει υψηλή απόδοση αιθέριου ελαίου των οποίων τα κύρια συστατικά είναι οι φαινόλες, το π -κύμινο και το γ-τερπινένιο. Η παρούσα χημική μελέτη είναι μια προσπάθεια να ρίξουμε φως στη σχέση μεταξύ της χημικής σύνθεσης και των βιοτύπων στο *O. vulgare ssp. hirtum* [Mariateresa Russo et al, 1998].

Η Ελληνική ρίγανη (Greek Oregano) είναι φυτό πολυετές και ποώδες η ποιότητά της θεωρείται από τις καλύτερες παγκοσμίως. Η ρίγανη πέρα από το χαρακτηριστικό άρωμα και γεύση

που δίνει στο φαγητό έχει και πάρα πολλές φαρμακευτικές ιδιότητες, με κυριότερη (γνωστή φαρμακευτικά) δραστική ουσία την καρβακρόλη. Στην Ελλάδα η ρίγανη είναι αυτοφυής και βρίσκεται σε ορεινές και βραχώδεις περιοχές.

1.1.2 Αιθέρια Έλαια

Τα τελευταία χρόνια, τα αιθέρια έλαια έχουν λάβει μεγάλη προσοχή ως πόροι δυνητικά χρήσιμων βιοδραστικών ενώσεων. Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στην αντιμικροβιακή, αντιμυκητιακή, αντικαρκινική και εντομοκτόνο δράση τους, καθώς και στη δράση τους στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

Τα αιθέρια έλαια (EOs) είναι δευτερογενείς μεταβολίτες φυτών που αποτελούνται κυρίως από τερπενοειδείς ενώσεις και παίζουν σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και εντόμων. Τα αποτελέσματα των EOs στα έντομα κυμαίνονται από έλξη ή υπεροχή έως τοξικότητα ή ακόμη και θνησιμότητα. Παρόλο που η χρήση «εντομοκτόνων» φυτών είναι γνωστή από την αρχαιότητα, μόνο μερικά από αυτά διατίθενται στο εμπόριο.

Τα αρωματικά φυτά *Origanum vulgare* subsp. *letswaart*, *Coridothymus capitatus* (L.) Reichenb., και *Saturejathymbra* L. είναι μέλη του Labiatae και έχουν μια ευρεία εγγενή διανομή στην Ελλάδα. Οι τρεις αυτές τάξεις είναι πολύ σημαντικές από οικονομική άποψη και με την εμπορική ονομασία «ρίγανη» χρησιμοποιούνται ως πολύ δημοφιλές μπαχαρικό στη βιομηχανία τροφίμων. Ως μέρος μιας συνεχιζόμενης μελέτης σχετικά με τη χρήση φυτικών εκχυλισμάτων ως εντομοκτόνων παραγόντων, αναλύθηκαν οι EO των παραπάνω αρωματικών φυτών και μαζί με δύο από τα κύρια συστατικά τους, την καρβακρόλη και θυμόλη, εξετάστηκαν για εντομοκτόνο δράση.

1.1.3 Χρήσεις της ρίγανης και θεραπευτικές ιδιότητες

Είναι γνωστό από το παρελθόν ότι τα αιθέρια έλαια της ρίγανης έχουν πολλές θεραπευτικές ιδιότητες. Είναι κυρίως γνωστή για την αντιδιαρροϊκή, αντιφλεγμονώδη και βακτηριοκτόνο δράση. Υπό μορφή αφεψημάτων χρησιμοποιείται για την ατονία των εντέρων, αποχρεμπτικό για το βήχα, βοηθάει στην υπέρταση και την αρτηριοσκλήρυνση. Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης (οριγανέλαιο) χρησιμοποιείται για τον πονόδοντο. Η ρίγανη έχει 12 φορές περισσότερο αντιοξειδωτική δράση από το πορτοκάλι, 30 από την πατάτα και 42 από το μήλο. Επίσης, η ρίγανη χρησιμοποιείται πολύ συχνά στην τροφή των πτηνών για την αποφυγή ασθενειών.

Μία άλλη κύρια χρήση της είναι κατά των χρόνιων ρευματισμών. Οι αρχαίοι Έλληνες γνώριζαν τη θεραπευτική της αξία και τη χρησιμοποιούσαν πίνοντας το τσάι της σε κολικούς και εξωτερικά σε οιδήματα. Χρησιμοποιείται ως καρύκευμα κυρίως στη μαγειρική αλλά και σπανιότερα ως αφέψημα, το οποίο αναφέρεται ως εξαιρετικό κατά του βήχα. Είναι το βασικό καρύκευμα των χωρών της Μεσογείου και βασικό συστατικό της Ελληνικής, αλλά και της Ιταλικής κουζίνας.

Η συλλογή της ρίγανης γίνεται κατά την ανθοφορία του φυτού, τα άνθη αυτά ξεραίνονται σε ειδικά υπόστεγα ή ξηραντήρια και στη συνέχεια τρίβονται και κοσκινίζονται. Επειδή η συλλογή της απαιτεί αρκετά εργατικά χέρια, η έλλειψη τους οδήγησε σε οργανωμένη καλλιέργεια στις περιοχές όπως Μαυρούδα, Τρικάλων και της Καρδίτσας. Στις Η.Π.Α η κατανάλωση της ρίγανης αυξήθηκε τα τελευταία χρόνια και έτσι άρχισε η καλλιέργεια της σε διάφορες περιοχές του νότου αλλά και στο Μεξικό.

Τα αιθέρια έλαια ρίγανης αναγνωρίζονται ευρέως για την αντιμικροβιακή τους δράση, καθώς και για τις αντιυπερτασικές και αντιμυκητιακές τους ιδιότητες. Ωστόσο, πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι αυτές οι ενώσεις είναι επίσης ισχυροί αντιοξειδωτικοί, αντιφλεγμονώδεις, αντιδιαβητικοί και κατασταλτικοί παράγοντες του καρκίνου. Αυτές οι ιδιότητες των αιθέριων ελαίων ρίγανης

παρουσιάζουν δυνητικό ενδιαφέρον για τη βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων [Nayely Leyva-López et al, 2017].

Σύμφωνα με το Encyclopedic Dictionary of Polymers , τα αιθέρια έλαια (EOs) είναι «πτητικά έλαια ή αποστάγματα που προέρχονται από τη βλάστηση και χαρακτηρίζονται από διακριτικές οσμές και ένα σημαντικό μέτρο αντίστασης στην υδρόλυση». Γενικά, τα EOs είναι σύνθετα μείγματα πτητικών ενώσεων που υπάρχουν σε αρωματικά φυτά. Αυτές οι ενώσεις μπορούν να απομονωθούν από ξεχωριστά ανατομικά μέρη των φυτών κυρίως με απόσταξη και συμπίεση. Τα κύρια συστατικά των EOs είναι τερπένια, αλλά οι αλδεΐδες, οι αλκοόλες και οι εστέρες υπάρχουν επίσης ως δευτερεύοντα συστατικά. Τα EOs συντίθενται από φυτά για να προστατευθούν από τα παράσιτα και τους μικροοργανισμούς, για να προσελκύσουν επικονιαστικά έντομα και για διαδικασίες σηματοδότησης, αλλά πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι οι EOs μπορούν να έχουν ευεργετικά αποτελέσματα στην ανθρώπινη υγεία [Nayely Leyva-López et al, 2017].

Μια μεγάλη ποικιλία φυτών είναι γνωστή και εκτιμάται για το περιεχόμενο EOs τους. Τα είδη ρίγανης είναι από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα. Η ρίγανη είναι το όνομα που χρησιμοποιείται για μια μεγάλη ποικιλία φυτών που έχουν ιδιαίτερη γεύση και μυρωδιά. Τουλάχιστον 61 είδη και 17 γένη που ανήκουν σε έξι διαφορετικές βοτανικές οικογένειες είναι γνωστά ως ρίγανη. Τα Verbenaceae και Lamiaceae είναι οι πιο εμφανείς οικογένειες λόγω της οικονομικής τους σημασίας. Στην οικογένεια Lamiaceae βρίσκονται τα φυτά που ανήκουν στα γένη *Origanum* και *Hedeoma* . ενώ τα γένη *Lippia* και *Lantana* ανήκουν στην οικογένεια Verbenaceae. Οι άλλες οικογένειες είναι οι Rubiaceae, Apiaceae και Asteraceae. Τα *Hedeoma patens* , *Lippia tombolens* , *Lippia palmeri* , *Lippia alba* , *Origanum dictamnus* , *Origanum hirtum* , *Origanum onites* , *Origanum vulgare* είναι μερικά παραδείγματα ειδών ρίγανης που παράγουν EOs [Nayely Leyva-López et al, 2017].

Οι EOs έχουν μεγάλη σημασία για τις βιομηχανίες φαρμακευτικών προϊόντων, τροφίμων και καλλυντικών . Επιπλέον, υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι τα αιθέρια έλαια ρίγανης (EOs) ενδέχεται να έχουν θετικές επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. [Nayely Leyva-López et al, 2017].

Η σύνθεση του ΕΟΟ (essential oils of oregano) έχει μελετηθεί εκτενώς. Τα ΕΟΟ είναι πολύ σύνθετα μείγματα ενώσεων, στα οποία τα κύρια συστατικά είναι τερπένια, γενικά μονο- και σεσκιτερπένια. Τα κύρια τερπένια που εντοπίζονται στα διάφορα είδη ρίγανης είναι η καρβακρόλη, η θυμόλη, το γ-τερπινένιο και το ρ -κύμινο, ενώ είναι επίσης παρόντα τα τερπινεν-4-όλη, λιναλοόλη, β-μυρκενίο, ένυδρο trans- σαβινένιο και β-καρνοφυλλένιο. Η αναλογία αυτών και άλλων συστατικών στο ΕΟ εντός του ίδιου είδους καθορίζει τον χημικό τύπο. Γενικά, ο χημικός τύπος ονομάζεται από το κύριο συστατικό του ΕΟ, π.χ., καρβακρόλη, θυμόλη, β-κιτρονελλόλη, 1,8-κινεόλη, κ.λπ [Nayely Leyva-López et al, 2017].

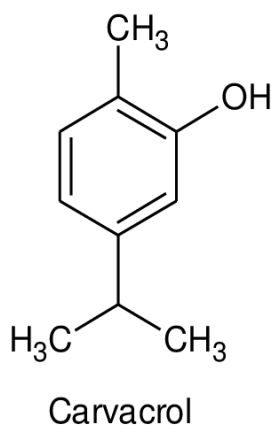


Εικόνα 2. Αιθέριο έλαιο της ρίγανης

1.2.4 Καρβακρόλη

Με την εμπορική ονομασία «ρίγανη», ένας μεγάλος αριθμός φυτικών τάξεων βρίσκεται σε διαφορετικά είδη, γένη ή ακόμη και σε οικογένειες. Συλλέγονται από την άγρια φύση ή καλλιεργούνται σε διαφορετικές χώρες, χρησιμοποιούνται ευρέως ως μπαχαρικά. Έχουν γενικά υψηλή περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο, που χαρακτηρίζεται από καρβακρόλη. Αυτό το συστατικό απαντάται κυρίως σε φυτά που αναπτύσσονται σε ξηρά ή ημι-ξηρά κλίματα.

Ο έλεγχος της αρωματικής χλωρίδας της Ελλάδας έδειξε ότι τέσσερα είδη φυτών με ευρεία κατανομή στη χώρα ήταν πλούσια σε καρβακρόλη. Αυτά είναι το *Coridothymus capitatus* (L.) *Reichenb. fil.*, το *Satureja thymbra* L., το *Origanum onites* L. και το *O. vulgare* L.. Αυτά τα είδη χρησιμοποιούνται στην Ελλάδα ως ρίγανη. Η οικονομική σημασία αυτών των ειδών ήταν ένας λόγος για μια λεπτομερή μελέτη της κατανομής τους και της σύνθεσης των αιθέριων ελαίων τους με ειδική αναφορά στην περιεκτικότητα τους σε καρβακρόλη.



Εικόνα 3. Δομή καρβακρόλης

Τα είδη αγρίου τύπου που αναπτύσσονται και χρησιμοποιούνται ως ρίγανη στην Ελλάδα είναι το *Coridothymus capitatus* (L.) *Reichenb. fil.*, το *Satureja thymbra* L., το *Origanum onites* L. και το *O. vulgare* L. Λόγω της οικονομικής τους σημασίας, μελετήθηκε η κατανομή τους στην Ελλάδα και τα αιθέρια τους έλαια. Εξετάζοντας διάφορους πληθυσμούς από όλη τη χώρα, εντοπίστηκε ενδοειδική μεταβλητότητα ως προς την περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο και την περιεκτικότητα σε καρβακρόλη των ελαίων, το κύριο συστατικό που ευθύνεται για τη χρήση τους ως ρίγανη. Τα είδη αξιολογήθηκαν με βάση την περιεκτικότητα σε λάδι και καρβακρόλη. Οι *O. onites* αποδείχτηκαν ως το πιο σταθερό είδος, που ήταν πάντα πλούσιο σε καρβακρόλη, ενώ το *O. vulgare* ήταν το πιο μεταβλητό. Το είδος *O. vulgare subsp. hirtum letswaart* ήταν πολύ πλούσιο σε αιθέριο έλαιο, σε ορισμένες περιπτώσεις βρέθηκε περιεχόμενο περίπου 8% και περιεκτικότητα σε καρβακρόλη που κυμαινόταν από 2,4% έως 95%. Το *O. vulgare subsp. vulgare* περιείχε μόνο μικρές

ποσότητες αιθέριου ελαίου (<0,3%) και ποσότητες καρβακρόλης κάτω από 0,1%. Για τους λόγους αυτούς, τα τελευταία υποείδη δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ως ρίγανη, αν και ανήκει στο γένος *Origanum*. [S. Kokkini et al, 1989].

Οι κύριες φαινολικές ενώσεις σε ρίγανη - καρβακρόλη [2-μεθυλ-5-(1-μεθυλαιθυλ) φαινόλη] και θυμόλη (2-ισοπροπυλ-5-μεθυλοφαινόλη) - είναι γνωστές για τις μεμονωμένες αντιβακτηριακές ιδιότητές τους και όταν παρέχεται μαζί ως λάδι ρίγανης, έχουν ένα πρόσθετο αποτέλεσμα. Και οι δύο έχουν αποδειχθεί ότι είναι βιοκτόνες έναντι στελεχών *Staphylococcus*, *Listeria*, *Salmonella* και *Clostridium*. Μια μελέτη δύο στελεχών μικροοργανισμών *Staphylococcus* in vitro έδειξε έλαιο ρίγανης σε να είναι εξαιρετικά αποτελεσματικό στην εξασθένιση της ανάπτυξης του βιοφίλμ *Staphylococcus*. Οι ερευνητές πρότειναν ότι οι υδρόφοβες ιδιότητες της καρβακρόλης και της θυμόλης τους επέτρεψαν να αλληλεπιδράσουν με τη λιπιδική διπλή στιβάδα των βακτηριακών κυτταρικών μεμβρανών, «προκαλώντας απώλεια ακεραιότητας και διαρροή κυτταρικού υλικού όπως ιόντων, ATP και νουκλεϊκών οξέων». Παρουσία αυτών ενώσεων, τα βακτηριακά κύτταρα αναπτύχθηκαν ως χαλαρότερες αποικίες και η ποσότητα του βιοφίλμ μειώθηκε σε άμεση αναλογία με την δόση εκχυλισμάτων ρίγανης.

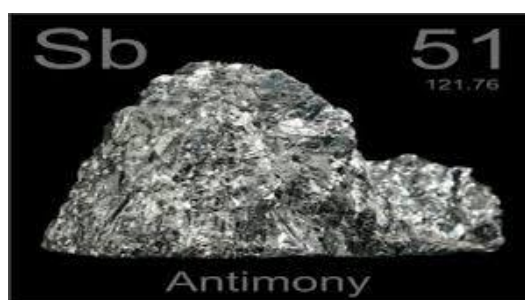
Η δραστηριότητα του ελαίου ρίγανης σε υποκυτταρικό επίπεδο επιβεβαιώνεται από μια μελέτη που έδειξε διατάραξη της κυτταρικής μεμβράνης, μεταβολές στο ενδοκυτταρικό pH και διαρροή ιόντων σε οργανισμούς *Staphylococcus* και *Pseudomonas* που εκτίθενται σε ρίγανη λάδι. Άλλες μελέτες υποστηρίζουν την αποτελεσματικότητα του ελαίου ρίγανης έναντι πολλαπλών στελεχών *Staphylococcus*, δείχνοντας ότι η ρίγανη είναι η πιο ισχυρό αντιμικροβιακό σε σύγκριση με πολλά άλλα αιθέρια έλαια, όπως δεντρολίβανο, βασιλικό και μέντα. Το περιεχόμενο της ρίγανης που δοκιμάστηκε ήταν 43,6%, σε σύγκριση με το 78,9% για τη λεβάντα. Ωστόσο, παρά τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε καρβακρόλη, η ρίγανη ήταν πολύ πιο αποτελεσματική αντιβακτηριακή από τη λεβάντα, γεγονός που υποδηλώνει συνεργιστικό ρόλο για τα άλλα χημικά της ρίγανης συστατικά. Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των κύριων ενώσεων της ρίγανης έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές,

ακόμη και έναντι δύο στελέχη ανθεκτικών στη μεθικιλίνη σταφυλόκοκκων - ένα βασικό εύρημα, με το MRSA και άλλους ανθεκτικούς στα αντιβιοτικά οργανισμούς να είναι κύρια αιτία νοσοκομειακής λοίμωξης καθώς και λοίμωξη μέσω υπο-υγειονομικών καταστάσεων σε καθημερινές συναντήσεις, όπως στο γυμναστήρια. Επιπλέον, το λάδι ρίγανης αποδείχθηκε αποτελεσματικό έναντι του εντεροβακτηρίου *Escherichia coli* και σε αντίθεση με άλλα αιθέρια έλαια που δοκιμάστηκαν (γαρίφαλο, θυμάρι και κανέλα), το λάδι ρίγανης είχε τον λιγότερο διαταρακτικό αντίκτυπο στην υγιή εντερικά κύτταρα [David M. Brady et al.].

1.2 Αντιμόνιο

1.2.1 Γενικές Πληροφορίες για το Αντιμόνιο

Το αντιμόνιο είναι ένα εύθραυστο, γαλαζοπράσινο, μεταλλικό στοιχείο (σύμβολο Sb, ατομικό αρ. 51). Το σύμβολο Sb προέρχεται από τη λατινική λέξη *stibium*. Το αντιμόνιο βρίσκεται σε ανόργανα άλατα όπως ο δυσκρασίτης, ο τζαμεσονίτης, ο κεραμεσίτης, ο πυργυρίτης, ο στεφανίτης, ο τετραεδρίτης και ο ψευδάργυρος.



Εικόνα 4. Αντιμόνιο

Η αραβική λέξη για το αντιμόνιο stibine ή το antimony trisulfate ήταν koh1, από την οποία προέρχεται τελικά η λέξη αλκούλ. Τα μεταλλεύματα αντιμόνων μερικές φορές συγγέονταν με μεταλλεύματα μολύβδου και το αλκίφου ήταν το όνομα ενός μεταλλεύματος Κορνούαλης που έμοιαζε με αντιμόνιο και χρησιμοποιήθηκε από αγγειοπλάστες για να δώσει ένα πράσινο λούστρο στα πήλινα σκεύη. Η λέξη που χρησιμοποιούν οι Ινδοί του Quechua του Περού για το αντιμόνιο είναι surúcht, που δίνει το soroché, ένα συνώνυμο της ασθένειας των βουνών, το οποίο πιστεύεται ότι προκαλεί το αντιμόνιο [Jeffrey K. Aronson et al., 2016].

Τα άλατα αντιμονίου έχουν βρει στο παρελθόν πολλές χρήσεις στην ιατρική και ενώσεις αντιμονίου, ειδικά πεντασθενείς, εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της προσβολής του *Schistosoma japonicum* και της λειψμανίας. Το αντιμόνιο χρησιμοποιείται επίσης ως εμετικό. Δίνεται προσοχή στο αντικαρκινικό δυναμικό των αντιμονικών ενώσεων [Jeffrey K. Aronson et al., 2016].

Τα αντιμόνια παραμένουν ο ακρογωνιαίος λίθος της θεραπείας διαφόρων μορφών ελμινθικής νόσου. Υπάρχουν οικονομικά οφέλη στην επιλογή ενός αντιμονολογικού πάνω από το άλλο με βάση την τιμή, την αποτελεσματικότητα και τις δυσμενείς επιπτώσεις. Επίσης, το Αντιμόνιο έχει χρησιμοποιηθεί ως φάρμακο για τη θεραπεία ασθενών που έχουν μολυνθεί με παράσιτα (όπως η Λειψμανίαση). Το Αντιμόνιο αποβάλλεται από τον οργανισμό μέσω των ούρων [Jeffrey K. Aronson et al., 2016].

Τα μεταλλικά σύμπλοκα και οι οργανο-μεταλλικές ενώσεις απολαμβάνουν μια ολοένα αυξανόμενη σημασία στην ιατρική, ιδιαίτερα στην αντικαρκινική χημειοθεραπεία. Οι ενώσεις αντιμονίου έχουν χρησιμοποιηθεί για σχεδόν έναν αιώνα στην κλινική θεραπεία της παρασιτικής νόσου, της λειψμανίαση. Πριν από περίπου 70 χρόνια, τα τρισθενή αντιμονικά φάρμακα αντικαταστάθηκαν από λιγότερο τοξικά πεντασθενή αντιμόνια στη θεραπεία αυτής της νόσου. Και τώρα η προσοχή έχει στραφεί στη χημεία της οργανοαντιμονίας (V) λόγω της ποικιλομορφίας της δομής (από μονομερή μοριακά είδη, σχετιζόμενες δομές και υπερμοριακά συγκροτήματα) καθώς και

τις εφαρμογές της ως αντιμικροβιακού και αντικαρκινικού παράγοντα. Έχουν ήδη εμφανιστεί στη βιβλιογραφία μεγάλοι αριθμοί αναφορών που περιγράφουν συνθέσεις και βιολογικές δραστηριότητες παραγώγων οργανοαντιμονίας (V), όπως καρβοξυλικά οργανοαντιμόνια, σουλφονικά οργανοαντιμόνια και οξίμες οργανοαντιμονίου. Μερικά παράγωγα οργανοαντιμονίας (V) έχουν αναφερθεί ότι εμφανίζουν οριακές αντικαρκινικές δραστηριότητες. Όμως, οι αναφορές για παράγωγα οργανοαντιμονίας (V) με N- οξυφθαλμιδίο ή N- οξυ ηλεκτριμιδίο είναι περιορισμένες [F. Wang et al.].

Τα αρσενικά και τα αντιμονολογικά είναι φάρμακα πρώτης γραμμής για τη θεραπεία τρυπανοσωμικών και λεισμανικών παθήσεων. Για να δημιουργήσετε τη δραστική μορφή του φαρμάκου, το Sb (V) πρέπει να μειωθεί σε Sb (III). Επειδή το αρσενικό και το αντιμόνιο σχετίζονται με μεταλλοειδή, και τα στελέχη *Leishmania* ανθεκτικά στο αρσενικό είναι συχνά διασταυρούμενα ανθεκτικά στα αντιμονολογικά, θεωρήσαμε την πιθανότητα ότι το Sb (V) μειώνεται από μια αναγωγή As (V). Τα πεντασθενή αντιμονιακά φάρμακα Pentostam και Glucantime είναι η πρώτη γραμμή θεραπείας για λεισμανίαση και η αντίσταση σε αυτά τα φάρμακα είναι ένα σοβαρό κλινικό πρόβλημα. Για να δημιουργήσετε τη δραστική μορφή του φαρμάκου, το Sb (V) πρώτα μειώνεται σε Sb (III). Η μείωση συμβαίνει κατά προτίμηση στα αμαστιγότα, τα οποία είναι πιο ευαίσθητα στο Pentostam από ότι τα promastigotes. Το αρσενικό και το αντιμόνιο έχουν παρόμοιες ιδιότητες και μεταφέρονται από τα ίδια κανάλια, φορείς και αντλίες [Yao Zhou‡, et al 2004].

Οι αντιμονιακά πεντασθενές, μεγλουμίνη αντιμονιακή (Glucantime) και νάτριο στιβογλυκονικό (Pentostam), έχουν χρησιμοποιηθεί από τη δεκαετία του 1930 και θεωρούνται ως τα φάρμακα πρώτης γραμμής της επιλογής για όλες τις κλινικές μορφές της λεισμανίασης, αν και οι μηχανισμοί δράσης τους έχουν παραμείνει ουσιαστικά άγνωστη. Τα στοιχεία δείχνουν ότι το πεντασθενές αντιμόνιο είναι ένα προφάρμακο, το οποίο μετατρέπεται σε τρισθενές αντιμόνιο εντός του οργανισμού, και στη συνέχεια γίνεται βιολογικά ενεργό. Ωστόσο, η ακριβής τοποθεσία όπου

εμφανίζεται η μείωση και οι βασικοί μηχανισμοί μείωσης παραμένουν άγνωστοι [Luiz Felipe Domingues Passero et al., 2013].

Οι τρισθενείς ενώσεις αντιμονίου φαίνεται να αλληλεπιδρούν με το μεταβολισμό της θειόλης, προκαλώντας έτσι τον κατακερματισμό του DNA. Άλλες αναφορές έχουν δείξει ότι τα πεντασθενή αντιμόνια αναστέλλουν ειδικά την τοποϊσομεράση DNA Leishmania τύπου I, η οποία δρα στον μεταβολισμό των πουρινών για την προώθηση της εξάντλησης των ATP και GTP, στη συνέχεια μειώνοντας την ενέργεια του παρασίτου [Luiz Felipe Domingues Passero et al., 2013].

Τα αντιμονονικά φάρμακα φαίνεται επίσης να προάγουν τη θανάτωση των παρασίτων προκαλώντας την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών, οι οποίες μπορούν να ενισχύσουν την φαγοκυτταρική ικανότητα των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων, αυξάνοντας έτσι την απελευθέρωση των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) από τα φαγοκύτταρα [Luiz Felipe Domingues Passero et al., 2013].

Από το 1945, τα πεντασθενή αντιμόνια έχουν χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία της δερματικής λειψμανίας. Η N - μεθυλ-γλυκαμίνη αντιμονιακή είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη φάρμακο για τη θεραπεία του ανθρώπου και των σκύλων σπλαγγική λειψμανίαση. Αυτό το φάρμακο απαιτεί νοσηλεία, καθημερινή παρεντερική χορήγηση για τουλάχιστον τρεις συνεχόμενες εβδομάδες και συνεχή παρακολούθηση κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Η ενδομυϊκή χορήγηση του φαρμάκου συχνά συνοδεύεται από τοπικό πόνο και συστηματικές παρενέργειες, που περιλαμβάνουν ναυτία , έμετο, αδυναμία, μυαλγία , κοιλιακό κολικό, διάρροια, δερματικά εξανθήματα, ηπατοτοξικότητα και ακόμη και καρδιοτοξικότητα, και ως εκ τούτου αυτή η μορφή θεραπείας απαιτεί εντατική ιατρική παρακολούθηση. Ωστόσο, μερικές φορές τα αντιμονολογικά φάρμακα δεν είναι υπερβολικά αποτελεσματικά στη θεραπεία της λειψμάνιας, γεγονός που αποτελεί μείζονα ανησυχία, καθώς αυτό μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη στελεχών ανθεκτικών στη θεραπεία Leishmania [Luiz Felipe Domingues Passero et al., 2013].

1.2.2 Ανεπιθύμητες ενέργειες Αντιμονίου

Οι συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες στη θεραπεία με αντιμόνιο περιλαμβάνουν ανορεξία, ναυτία, έμετο, μυϊκό πόνο, κεφαλαλγία, λήθαργο και πόνο στα οστά και στις αρθρώσεις.

Το αντιμόνιο έχει προταθεί ότι αποτελεί αιτιώδη παράγοντα στο σύνδρομο ξαφνικού βρεφικού θανάτου, καθώς ο μυκητιασικός μετασχηματισμός επιβραδυντικών πυρκαγιάς που περιέχουν αντιμόνιο σε στρώματα βρεφικής κούνιας θα οδηγήσει στο σχηματισμό στιμπίνης (SbH_3). Ωστόσο, η πιθανότητα εμπλοκής της στιμπίνης στον θάνατο της βρεφικής κούνιας είναι απίθανη.



Εικόνα 5. Χρήσεις Αντιμονίου ως φάρμακο

1.3 Ασθένειες που χρησιμοποιείται το αντιμόνιο για την θεραπεία

1.3.1 Σχιστοσωμίαση

Η Σχιστοσωμίαση (γνωστή επίσης ως βιλαρζίωση, πυρετός των σαλιγκαριών και πυρετός Katayama) είναι μια νόσος που προκαλείται από το παρασιτικό σκουλήκι του γένους *Schistosoma*. Μπορεί να μολύνει το ουροποιητικό σύστημα ή τα έντερα. Στα συμπτώματα μπορεί να περιλαμβάνεται κοιλιακό άλγος, διάρροια, αίμα στα κόπρανα ή αίμα στα ούρα. Άτομα τα οποία παραμένουν μολυσμένα για μεγάλο χρονικό διάστημα ενδέχεται να παρουσιάσουν ηπατική βλάβη, νεφρική ανεπάρκεια, στειρότητα ή καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Τα παιδιά ενδέχεται να εμφανίσουν ανεπαρκή ανάπτυξη και μαθησιακές δυσκολίες. [«Schistosomiasis Fact sheet N°115». World Health Organization, 2014]

Η ασθένεια μεταδίδεται από την επαφή με το νερό που περιέχει τα παράσιτα. Τα παράσιτα απελευθερώνονται από μολυσμένο(α) σαλιγκάρι(α) του γλυκού νερού. Η ασθένεια είναι πολύ συχνή στα παιδιά των αναπτυσσόμενων χωρών, δεδομένου ότι είναι πολύ πιθανόν να παίζουν σε μολυσμένο νερό. Σε άλλες ομάδες υψηλού κινδύνου περιλαμβάνονται αγρότες, ψαράδες και άνθρωποι που χρησιμοποιούν μολυσμένο νερό για τις καθημερινές εργασίες τους. Ανήκει στην κατηγορία των ελμινθικών μολύνσεων. Η διάγνωση γίνεται με την εύρεση αυγών του παρασίτου στα ούρα ή τα κόπρανα του ατόμου. Μπορεί επίσης να επιβεβαιωθεί με την εύρεση αντισωμάτων της νόσου στο αίμα [«Schistosomiasis Fact sheet N°115». World Health Organization, 2014].

Στις μεθόδους πρόληψης της νόσου περιλαμβάνεται η βελτίωση της πρόσβασης σε καθαρό νερό και η μείωση του αριθμού των σαλιγκαριών. Σε περιοχές όπου η νόσος είναι συνηθέστερη, ολόκληρες ομάδες μπορούν να αντιμετωπίζονται ταυτόχρονα και σε ετήσια βάση με το φάρμακο πραζικουαντέλη. Αυτό γίνεται για να μειωθεί ο αριθμός των ατόμων που έχουν μολυνθεί και, ως εκ

τούτου, να μειωθεί η εξάπλωση της νόσου. Η πραζικουαντέλη είναι επίσης η θεραπεία που συνιστάται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας για τα άτομα στα οποία έχει διαπιστωθεί η μόλυνση [«Schistosomiasis Fact sheet N°115». World Health Organization, 2014].

Η σχιστοσωμίαση προσβάλλει περίπου 210 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως και υπολογίζεται ότι 12.000 με 200.000 άνθρωποι πεθαίνουν εξαιτίας της νόσου κάθε χρόνο. Η ασθένεια συναντάται πιο συχνά στην Αφρική, όπως επίσης την Ασία και τη Νότια Αμερική. Περίπου 700 εκατομμύρια άνθρωποι, σε περισσότερες από 70 χώρες, ζουν σε περιοχές όπου είναι συνήθης η νόσος. Μετά την ελονοσία, η σχιστοσωμίαση είναι η δεύτερη παρασιτική ασθένεια με τις μεγαλύτερες οικονομικές επιπτώσεις. Από την αρχαιότητα μέχρι τις αρχές του 20ου αιώνα, το σύμπτωμα του αίματος στα ούρα που συνοδεύει τη σχιστοσωμίαση, θεωρήθηκε η αρσενική εκδοχή της εμμήνου ρύσεως στην Αίγυπτο και, κατά συνέπεια, θεωρήθηκε μια τελετή ενηλικίωσης για τα αγόρια. Έχει καταχωρηθεί ως παραμελημένη τροπική νόσος.



Εικόνα 6. Παράσιτο σχιστοσωμίαςης

1.3.2 Λεισμανίαση

Η λεισμανίαση είναι λοιμώδης νόσος η οποία οφείλεται στα πρωτόζωα παράσιτα του γένους λεισμάνια. Οι λεισμάνιες είναι ενδοκυττάρια παράσιτα τα οποία μεταδίδονται μέσω των σκνιπών. Στην Αμερική ο φορέας είναι το γένος λουτζομυία και στον υπόλοιπο κόσμο με το γένος φλεβοτόμος. Το θηλυκό μολυσμένο έντομο μπορεί να μεταδώσει τη νόσο από άνθρωπο σε άνθρωπο ή από ζώο στον άνθρωπο μέσω του τσιμπήματος.

Η λεισμανίαση μπορεί να έχει ένα εύρος διαφορετικών εκφάνσεων, δερματικές, βλεννοδερματικές και σπλαχνικές. Η δερματική λεισμανίαση είναι η πιο κοινή μορφή λεισμανίασης, ενώ η σπλαχνική λεισμανίαση ή καλαζάρ είναι σοβαρή νόσος η οποία προκαλείται όταν το παράσιτο μεταναστεύσει στα όργανα [P. Myler et al., 2008].

1.3.2 Φάρμακα με δραστική ουσία το αντιμόνιο

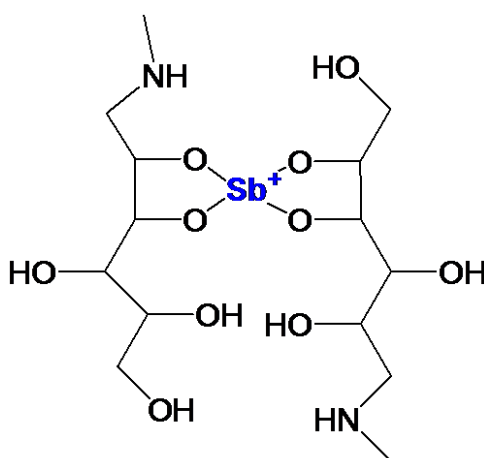
Τα άλατα αντιμονίου έχουν βρει στο παρελθόν πολλές χρήσεις στην ιατρική και ενώσεις αντιμονίου, ειδικά πεντασθενείς, εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της προσβολής από το *Schistosoma japonicum* και της λεισμανίας. Η συνήθης θεραπεία των περισσότερων δερματικών λεισμανιών της Νότιας Αμερικής είναι συστηματική, λόγω της τάσης των παρασίτων να εξαπλωθούν σε βλεννογόνους. Τα φάρμακα κοινής χρήσης παραμένουν παρεντερικά και είναι αρκετά τοξικά. Το stibogluconate νατρίου, σε δόση 20 mg / kg για 30 ημέρες, παραμένει το χρυσό πρότυπο, με λιποσωμική αμφοτερικίνη μια πιθανή εναλλακτική λύση. Και τα δύο φάρμακα είναι επίσης η προτιμώμενη επιλογή για όλα τα στελέχη σπλαχνικής λεισμανίαση . Το Stibogluconate επιτυγχάνει θεραπεία σε ορισμένες περιπτώσεις και είναι αρκετά ασφαλές, αν και παροδική

παγκρεατίτιδα , μυοσκελετικοί πόνοι και έχουν αναφερθεί απώλεια όρεξης. Η πρωτογενής μη ανταπόκριση (θεραπεία που δεν έχει ληφθεί από την πρώτη πορεία θεραπείας) αναφέρεται όλο και περισσότερο και αποτελεί ένα ιδιαίτερο πρόβλημα στην περιοχή Μπιχάρ της Βορειοανατολικής Ινδίας, όπου μια έκθεση τεκμηρίωσε την πρωτογενή μη ανταπόκριση στο 33% των περιπτώσεων. Οι νέες επιλογές θεραπείας για σπλαχνική λειψμανίαση έχουν αναθεωρηθεί [Jeffrey K. Aronson et al., 2016].

Το αντιμόνιο χρησιμοποιείται επίσης ως εμετικό. Έχει επίσης δοθεί προσοχή στο αντικαρκινικό δυναμικό των αντιμονικών ενώσεων. Όπως με πολλά άλλα μέταλλα, η επαγγελματική και περιβαλλοντική έκθεση είναι δυνατή και μπορεί να δράσει πρόσθετα με την ιατρική έκθεση [Jeffrey K. Aronson et al., 2016].

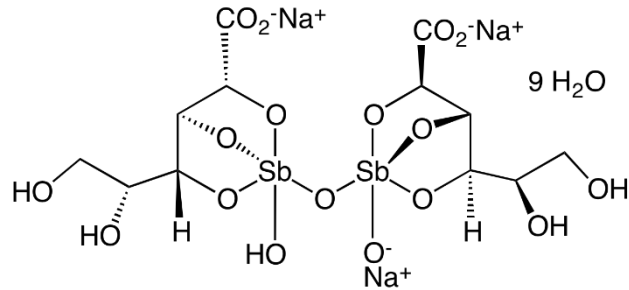
Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται και έχουν ως δραστική ουσία το αντιμόνιο είναι:

- Meglumine antimoniate : Το αντιμμωνικό Meglumine είναι ένα πεντασθενές αντιμόνιο χημικά παρόμοιο με το stibogluconate νατρίου και θεωρείται ότι έχει παρόμοια αποτελεσματικότητα και τοξικότητα. Το αντιμμωνικό διάλυμα μελουταμίνης περιέχει πεντασθενές αντιμόνιο 8,5% και το στιμπογλυκονικό 10% [Jeffrey K. Aronson et al., 2016].



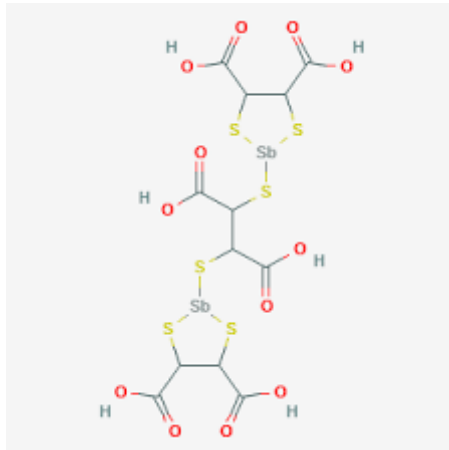
Εικόνα 7. Meglumine antimoniate

- Sodium stibogluconate : Το stibogluconate νατρίου είναι ένα πεντασθενές αντιμόνιο που περιέχει πεντασθενές αντιμόνιο 10%.



Εικόνα 8. Sodium stibogluconate

- Stibocaptate : Το Stibocaptate είναι μια τρισθενής ένωση αντιμονίου, της οποίας οι τοξικές επιδράσεις, ειδικά οι οξείες ανεπιθύμητες ενέργειές της, είναι παρόμοιες με αυτές των πεντασθενών ενώσεων [Jeffrey K. Aronson et al., 2016].



Εικόνα 9. Stibocaptate

1.4 Βακτήρια

1.4.1 Γενικές Πληροφορίες για τα Βακτήρια

Η απλοϊκή εικόνα των βακτηρίων ως απομονωμένος, πλαγκτονικός αυτοματοποιημένος οργανισμός αντικρούεται. Αναγνωρίζουμε τώρα τα βακτήρια ως μικροοργανισμούς με τεράστια ποικιλία και προσαρμοστικότητα. Μπορούν να ευδοκιμήσουν υπό συνθήκες που θεωρούμε ακραίες όπως απουσία οξυγόνου και σε υψηλές θερμοκρασίες, για να επιλέξουν αλλά δύο παραδείγματα και μπορούν να προσαρμοστούν με εκπληκτική ταχύτητα στο περιβάλλον και στις συνθήκες τους, έτσι ώστε να βελτιωθεί ικανότητά τους για επιβίωση [Jed F. Fisher et al. , 2005].

Τα βακτήρια είναι μικροοργανισμοί μήκους μερικών μικρομέτρων και έχουν σχήματα σφαιρών, ράβδων ή σπειρών. Τα βακτήρια αισθάνονται και ανταποκρίνονται στις αλλαγές θερμοκρασίας και pH, θρεπτική πείνα, στρες στις εξωτερικές και εσωτερικές μεμβράνες, νέες πηγές τροφίμων, τοξίνες και σήματα αίσθησης απαρτίας. Τα παθογόνα βακτήρια είναι επιβλαβή είδη που προκαλούν βακτηριακές λοιμώξεις και μεταδοτικές ασθένειες που έχουν ως αποτέλεσμα πολλές σοβαρές επιπλοκές. Τα κοινά παθογόνα βακτήρια και τα αποτελέσματά τους περιλαμβάνουν το *Escherichia coli* και το *Helicobacter pylori* *Salmonella* (τροφική δηλητηρίαση),(γαστρίτιδα και έλκη), *Neisseria gonorrhoeae* (σεξουαλικά μεταδιδόμενα νόσήματα), *Neisseria meningitidis* (μηνιγγίτιδα), *Staphylococcus aureus* (κέτταρίτιδα, αποστήματα, λοιμώξεις τραύματος, σύνδρομο τοξικού σοκ, πνευμονία και τροφική δηλητηρίαση) και *Streptococcus spp.* (πνευμονία, μηνιγγίτιδα, λοιμώξεις του αυτιού και φαρυγγίτιδα) [Subash C.B.Gopinatha et al., 2014].

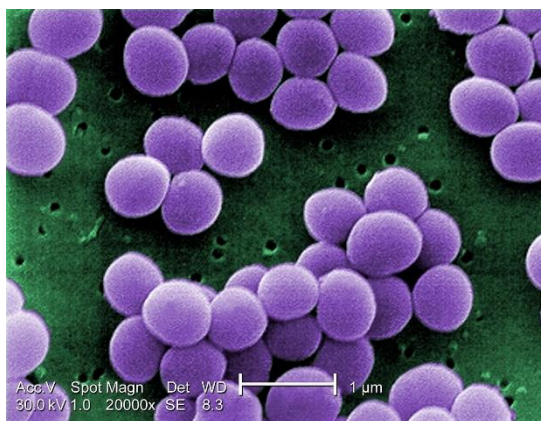
Η θεμελιώδης αναγνώριση των βακτηρίων βασίζεται στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων, τα οποία μπορούν να απεικονιστούν μέσω μικροσκοπικών παρατηρήσεων. Άλλες κοινές μέθοδοι περιλαμβάνουν χρώση κατά Gram, καλλιέργεια και βιοχημικές δοκιμασίες και ανίχνευση

βάσει αλληλουχίας. Επιπλέον, ανιχνευτές (π.χ. απταμερή ή αντισώματα) που είναι ειδικοί για τις πρωτεΐνες επιφανείας / μαστιγίνης του βακτηριδίου ή ολόκληρου του βακτηριακού κυττάρου, χρησιμοποιούνται επίσης για την ανίχνευση της παρουσίας βακτηρίων. Αυτοί οι ανιχνευτές εφαρμόζονται συχνά σε βιοαισθητήρες για την ανίχνευση συγκεκριμένων τύπων βακτηρίων. Αυτή η κριτική παρέχει μια επισκόπηση των στρατηγικών ανίχνευσης βακτηρίων που είναι διαθέσιμες αυτήν τη στιγμή [Subash C.B.Gopinatha et al., 2014].

Staphylococcus Aureus

Το *Staphylococcus aureus* θεωρείται εξοκυτταρικό παθογόνο. Ωστόσο, η επιβίωση του *S. aureus* εντός κυττάρων ξενιστή μπορεί να παρέχει μια δεξαμενή σχετικά προστατευμένη από αντιβιοτικά, επιτρέποντας έτσι μακροχρόνιο αποικισμό του ξενιστή και εξηγώντας κλινικές αποτυχίες και υποτροπές μετά από αντιβιοτική θεραπεία. Το *S. aureus* είναι η κύρια αιτία βακτηριακών λοιμώξεων σε ανθρώπους παγκοσμίως και αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας τόσο στο νοσοκομείο όσο και στην κοινότητα. Ωστόσο, το *S. aureus* δεν είναι αποκλειστικά παθογόνο και συνήθως αποικίζει πρόσθια των ρύθων και το δέρμα υγιών ατόμων. Τις τελευταίες δεκαετίες, η μόλυνση με *S. aureus* έγινε όλο και πιο δύσκολο να αντιμετωπιστεί λόγω της εμφάνισης και της ταχείας εξάπλωσης του ανθεκτικού στη μεθικιλίνη στελέχους *S. Aureus* (MRSA), το οποίο είναι ανθεκτικό σε όλα τα γνωστά αντιβιοτικά β-λακτάμης. Είναι ανησυχητικό ότι έχει ήδη αναφερθεί μειωμένη ευαισθησία στη βανκομυκίνη και αντίσταση στη λινεζολίδη και δαπτομυκίνη στα κλινικά στελέχη MRSA.

Έρευνες που ξεκινούν τουλάχιστον 50 χρόνια έχουν δείξει ότι ο *S. aureus* είναι σε θέση να εισβάλει και να επιβιώσει μέσα σε κύτταρα θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων των φαγοκυτταρικών κυττάρων που είναι υπεύθυνα για την βακτηριακή κάθαρση [Sophie M. Lehar et al].



Εικόνα 10. *Staphylococcus Aureus*

Staphylococcus Epidermidis

Το *Staphylococcus epidermidis* είναι το πιο συχνά απομονωμένο μέλος της ομάδας αρνητικών στην κοαγκουλάση σταφυλόκοκκων. Αυτή η ομάδα διακρίνεται διαγνωστικά από το *Staphylococcus aureus* από την ανικανότητά του να παράγει πήξη. Μαζί με τους πιο σπάνια απαντώμενους σταφυλόκοκκους στην κοαγκουλάση, το *S. epidermidis* αποικίζει το δέρμα και τους βλεννογόνους του ανθρώπινου σώματος και αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο μέρος της φυσιολογικής βακτηριακής χλωρίδας αυτού του οικοτόπου.

Η *S. epidermidis* έχει αποκτήσει σημαντικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια επειδή έχει γίνει η πιο σημαντική αιτία νοσοκομειακών λοιμώξεων. Ενώ το *S. epidermidis* θεωρείται εδώ και πολύ καιρό ως σχετικά αβλαβές, έχει πλέον γίνει γενικά αποδεκτό ως παθογόνο. Ωστόσο, το *S. epidermidis* απαιτεί έναν προδιάθετο ξενιστή για να αλλάξει από έναν φυσιολογικό κάτοικο του ανθρώπινου

δέρματος σε έναν μολυσματικό παράγοντα, και ως εκ τούτου πρέπει σαφώς να περιγραφεί ως ευκαιριακό [Cuong Vuong et al., 2002].

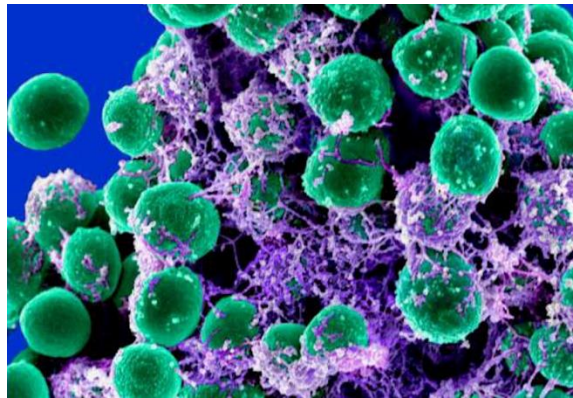
Σε αντίθεση με το *S. aureus*, το *S. epidermidis* συνήθως δεν προκαλεί πυογονικές λοιμώξεις σε ασθενείς χωρίς συμβιβασμούς, με μόνη εξαίρεση την ενδοκαρδίτιδα φυσικής βαλβίδας. Αυτό οφείλεται στο σαφώς μειωμένο οπλοστάσιό του σε σύγκριση με το *S. aureus*. Στην πραγματικότητα, υπάρχει μόνο μία τοξίνη, το αιμολυτικό πεπτίδιο δ-τοξίνη, το οποίο έχει προταθεί ότι εμπλέκεται στη νεκρωτική εντεροκολίτιδα στα νεογνά. Λόγω της έλλειψης σοβαρών τοξινών που βλάπτουν τον ιστό, οι λοιμώξεις του *S. epidermidis* είναι συνήθως υποξείες ή χρόνιες.

Το *S. epidermidis* γίνεται πολύ συχνά ο κύριος μολυσματικός παράγοντας σε ασθενείς με κίνδυνο, όπως οι χρήστες ναρκωτικών και οι ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς (ασθενείς υπό ανοσοκατασταλτική θεραπεία, ασθενείς με AIDS και πρόωρα νεογννήτα). Η θύρα εισόδου στο ανθρώπινο σώμα σε όλες αυτές τις λοιμώξεις είναι συνήθως ένας ενδοαγγειακός καθετήρας.

Η πιο σημαντική ομάδα λοιμώξεων που προκαλείται από το *S. epidermidis* είναι οι λοιμώξεις σε ξένα σώματα, όπως οι εσωτερικοί καθετήρες και τυχόν εμφυτευμένες συσκευές. Οι λοιμώξεις του *S. epidermidis* σε αυτές τις συσκευές περιπλέκονται από το σχηματισμό βιοφίλμ η οποία θα συζητηθεί λεπτομερώς παρακάτω. Τα βιοφίλμ είναι συχνά η αιτία για τη δυσκολία εξάλειψης λοιμώξεων του *S. epidermidis* σε μια κατοικία, λόγω της μειωμένης διείσδυσης των αντιβιοτικών στον στόχο και της μειωμένης ανοσοαπόκρισης. Συχνά, απαιτείται αφαίρεση και επανεισαγωγή της συσκευής. Η έλλειψη της βακτηριοκτόνου δράσης πολλών φαρμάκων έναντι σταφυλοκοκκικών βιοφίλμ είναι ελάχιστα κατανοητή (Cuong Vuong et al.). Το βακτήριο *S. Epidermidis* έχει την ικανότητα να σχηματίζει βιοφίλμ που είναι ο κύριος παράγοντας της μολυσματικότητας του [Cuong Vuong et al., 2002].

Παράγοντες μολυσματικότητας

Το *S. epidermidis* δεν παράγει πολλές τοξίνες και εξωένζυμα που καταστρέφουν τον ιστό, όπως και το *S. aureus*. Υπάρχει ένας πολύ μικρός αριθμός από αυτούς, και ο ρόλος τους ως ειδικών παραγόντων μολυσματικότητας δεν έχει ακόμη καθοριστεί λεπτομερώς. Γενικά, η επιτυχία του *S. epidermidis* ως παθογόνου πρέπει να αποδοθεί στην ικανότητά του να προσκολλάται σε επιφάνειες και να παραμένει εκεί, κάτω από το κάλυμμα ενός προστατευτικού εξωκυτταρικού υλικού, σε σχετική σιωπή [Cuong Vuong et al., 2002].



Εικόνα 11. *Staphylococcus Epidermidis*

Escherichia coli

Το *Escherichia coli* αποικίζει συνήθως τη γαστρεντερική οδό ανθρώπινων βρεφών μέσα σε λίγες ώρες μετά τη γέννηση. Συνήθως, το *E. coli* και ο άνθρωπος ξενιστής του συνυπάρχουν με αμοιβαίο όφελος για δεκαετίες. Αυτά τα κοινά στελέχη *E. coli* σπάνια προκαλούν ασθένεια εκτός από ανοσοκατεσταλμένους ξενιστές ή όπου παραβιάζονται οι φυσιολογικοί γαστρεντερικοί φραγμοί - όπως στην περιτονίτιδα, για παράδειγμα. Η θέση του κοινού *E. coli* είναι το βλεννογόνο στρώμα του παχέος εντέρου των θηλαστικών. Το βακτήριο είναι ένας πολύ επιτυχημένος ανταγωνιστής σε αυτήν την πολυσύχναστη τοποθεσία, που περιλαμβάνει τον πιο άφθονο αναισθητικό αναερόβιο της ανθρώπινης εντερικής μικροχλωρίδας [James B. Kaper et al., 2004].

Το *Escherichia coli* είναι το κυρίαρχο δυνητικά αναερόβιο της ανθρώπινης χλωρίδας του παχέος εντέρου. Ο οργανισμός αυτός συνήθως αποικίζει το γαστρεντερικό σωλήνα του βρέφους εντός των πρώτων ωρών της ζωής του και, στη συνέχεια, το *E. Coli* και ο ξενιστής αποκομίζουν αμοιβαίο όφελος. Το *E. coli* συνήθως παραμένει ακίνδυνα περιορισμένο στον εντερικό αυλό. Ωστόσο, στον εξασθενημένο ή ανοσοκατασταλμένο ξενιστή, ή όταν παραβιάζονται τα γαστρεντερικά εμπόδια, ακόμη και τα φυσιολογικά «μη παθογόνα» στελέχη του *E. coli* μπορούν να προκαλέσουν μόλυνση. Επιπλέον, ακόμη και τα πιο ισχυρά μέλη του είδους μας μπορεί να είναι ευάλωτα σε μόλυνση από ένα από τους πολλούς προσαρμοσμένους *E.coli* κλώνους που μαζί έχουν αναπτύξει την ικανότητα να προκαλούν ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων ασθενειών. Λοιμώξεις που οφείλονται σε παθογόνο *E.coli* μπορεί να περιορίζονται στις βλεννογονικές επιφάνειες ή μπορούν να εξαπλωθούν σε όλο το σώμα. Τρία γενικά κλινικά σύνδρομα προκύπτουν από λοίμωξη με εγγενώς παθογόνα στελέχη *E. Coli* : (i) λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος, (ii) σήψη / μηνιγγίτιδα και (iii) εντερική / διάρροια ασθένεια. [James P. Nataro et al., 1998]



Εικόνα 12. *Escherichia Coli*

Pseudomonas aeruginosa

Το *Pseudomonas aeruginosa* έχει εμφανιστεί ως σημαντικό παθογόνο κατά τη διάρκεια των τελευταίων δύο δεκαετιών [Kenneth V. I. Rolston et al., 2009]. Είναι ένα ευέλικτο αρνητικό κατά Gram βακτήριο που αναπτύσσεται σε εδάφη, έλη και παράκτιους θαλάσσιους οικοτόπους, καθώς και σε φυτικούς και ζωικούς ιστούς. Σχηματίζει βιοφίλμ σε υγρές επιφάνειες, όπως αυτές των πετρωμάτων και του εδάφους. Η εμφάνιση του *P. aeruginosa* ως σημαντικού ευκαιριακού ανθρώπινου παθογόνου κατά τη διάρκεια του περασμένου αιώνα μπορεί να είναι συνέπεια της αντοχής του στα αντιβιοτικά και τα απολυμαντικά που εξαλείφουν άλλα περιβαλλοντικά βακτήρια. [CK Stover et al., 2000]. Προκαλεί μεταξύ 10% και 20% των λοιμώξεων στα περισσότερα νοσοκομεία. Η λοίμωξη με ψευδομονάδα είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη σε ασθενείς με πληγές εγκαύματος, κυστική ίνωση, οξεία λευχαιμία, μεταμοσχεύσεις οργάνων και εθισμό σε ενδοφλέβια ναρκωτικά. Το βακτήριο *P. Aeruginosa* είναι ένας συνηθισμένος νοσοκομειακός μολυσματικός παραγοντας και έχουν εντοπιστεί επιδημίες σε πολλά αντικείμενα στο νοσοκομειακό περιβάλλον. Οι ασθενείς που νοσηλεύονται για μεγάλο χρονικό διάστημα προσβάλλονται συχνά από αυτόν τον οργανισμό και διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης λοίμωξης. Οι πιο σοβαρές λοιμώξεις περιλαμβάνουν κακοήθη εξωτερική ωτίτιδα, ενδοφθαλμίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, μηνιγγίτιδα, πνευμονία και σηψαιμία. Η πιθανότητα ανάρρωσης από τη μόλυνση με ψευδομονάδα σχετίζεται με τη σοβαρότητα της διαδικασίας της υποκείμενης νόσου του ασθενούς [Kenneth V. I. Rolston et al., 2009].



Εικόνα 13. *Pseudomonas aeruginosa*

1.4.2 Βακτηριακή αντοχή

Η βακτηριακή αντοχή στα αντιβιοτικά είναι ένα μακροχρόνιο πρόβλημα που έχει μελετηθεί ευρέως. Όλο και περισσότερο, δίνεται προσοχή στις αποκρίσεις διαφόρων τύπων μικροβίων σε βιοκτόνα (αντισηπτικά, απολυμαντικά και συντηρητικά). Διαφορετικές ομάδες βακτηρίων ποικίλλουν ως προς την ευαισθησία τους σε βιοκτόνα, με τα βακτηριακά σπόρια να είναι τα πιο ανθεκτικά, ακολουθούμενα από μυκοβακτήρια, με Gram negative οργανισμούς, με τους κόκκους γενικά να είναι οι πιο ευαίσθητοι [A.D.Russell et al., 1999]. Τα περισσότερα βακτήρια έχουν πολλαπλές οδούς αντίστασης σε οποιοδήποτε φάρμακο και, όταν είναι ανθεκτικά, μπορούν γρήγορα να προκαλέσουν τεράστιο αριθμό ανθεκτικών απογόνων. Η φυσική επιλογή ευνοεί μηχανισμούς που προσδίδουν αντίσταση με το λιγότερο κόστος φυσικής κατάστασης και εκείνες τις πιέσεις που επιβαρύνονται λιγότερο από την αντίστασή τους. Η επιλογή μπορεί επίσης να ευνοεί τους καθοριστικούς παράγοντες που εμποδίζουν τη δική τους αντιεπιλογή και ανθεκτικά στελέχη με αυξημένη ικανότητα επιβίωσης ή μολυσματικότητα. Σε αυτό το γενετικό και βιοχημικό δυναμικό πρέπει να προστεθεί η μεγάλη ποικιλία βακτηρίων που προκαλούν ευκαιριακές λοιμώξεις σε ευάλωτους ανθρώπους και το γεγονός ότι ο αριθμός των ευάλωτων ασθενών αυξάνεται σταθερά με την πρόοδο σε άλλους τομείς της ιατρικής [David M. Livermore, 2003].

Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αντοχή των βακτηρίων στα βιοκτόνα γίνονται καλύτερα κατανοητοί. Η ενδογενής αντίσταση (ενδογενής αδυναμία απορρόφησης) βρίσκεται με βακτηριακά σπόρια, μυκοβακτήρια και αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Αυτή η αντίσταση μπορεί, σε ορισμένες περιπτώσεις, να σχετίζεται με συστατικά αποικοδομητικά ένζυμα αλλά στην πραγματικότητα συνδέεται στενότερα με την κυτταρική στεγανότητα. Μια ειδική κατάσταση εντοπίζεται με τα βακτήρια που υπάρχουν στα βιοφίλμ, τα οποία μπορούν να θεωρηθούν ως εγγενής μηχανισμός αντίστασης που προκύπτει από φυσιολογική (φαινοτυπική) προσαρμογή των κυττάρων [A.D.Russell et al., 1999].

Η επίκτητη ανοχή στα βιοκτόνα μπορεί να προκύψει από κυτταρική μετάλλαξη ή από την απόκτηση γενετικών στοιχείων. Έχει μελετηθεί εκτενώς η αντίσταση που προκαλείται από πλασμίδιο / τρανσποζόνιο σε ανόργανες και οργανικές ενώσεις υδραργύρου από υδρολάσες και αναγωγάσες. Έχει περιγραφεί η αντίσταση που προκαλείται από πλασμίδια σε ορισμένα άλλα βιοκτόνα σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια και σε σταφυλόκοκκους, αλλά η σημασία του παραμένει αβέβαιη [A.D.Russell et al., 1999].

Η βακτηριακή αντίσταση δεν είναι νέο φαινόμενο. Τώρα αναγνωρίζουμε ότι η αντίσταση είναι η αναπόφευκτη συνέπεια των οργανισμών που ανταγωνίζονται για την ίδια οικολογική θέση. Ωστόσο, μόνο τα τελευταία 60 χρόνια η αντίσταση έχει μετατραπεί από τον άνθρωπο (ως κινητήρια εξελικτική δύναμη) από αυτό που θα μπορούσε εύλογα να περιγραφεί ως στάση βακτήρια που ανταγωνίζονται τα βακτήρια έως εκείνη της ανισορροπίας του χημικού πολέμου όπου τα βακτήρια ανταγωνίζονται επιπλέον άμεσα μαζί μας. Σίγουρα, αυτός είναι ένας διαγωνισμός με αβέβαιο αποτέλεσμα. Ενώ το φαινόμενο της βακτηριακής ανοχής είναι εξελικτικά αρχαίο, η συνέπεια αυτού του (τόσο πρόσφατου) πολέμου είναι αυτή της επιταχυνόμενης διασποράς των μηχανισμών ανοχής σε ολόκληρο το βακτηριακό βασίλειο, αύξηση της επιλογής για βακτήρια που έχουν αποκτήσει αυτούς τους μηχανισμούς και υποτίμηση του αντιβιοτικού εξοπλισμού μας [Jed F. Fisher et al., 2005].

Οι μηχανισμοί ανοχής στα βακτηρίδια σε σχέση με τα αντιβιοτικά β-λακτάμης κατανέμονται μεταξύ εκείνων που συμβαίνουν στο επίπεδο του πρωτογενούς μεταβολισμού (τροποποιημένες και ληφθείσες πρωτεΐνες και ένζυμα) και εκείνων που συμβαίνουν στο επίπεδο του δευτερογενούς μεταβολισμού (η βιοσύνθεση τροποποιημένων β-λακταμών που είναι καλύτεροι ανταγωνιστές των αλλαγμένων πρωτεϊνών). Ενώ η συνειδητοποίηση της εξαιρετικής σημασίας των δευτερογενών μεταβολιτών ως πρότυπα φαρμάκων χρονολογείται από τη στιγμή της ανακάλυψής τους από τον άνθρωπο, η αναγνώριση ότι οι εν λόγω δευτερεύοντες μεταβολίτες καταλαμβάνουν ένα λογικό μέρος

στην εξέλιξη της βακτηριακής αντοχής είναι μια πιο πρόσφατη επικρατούσα άποψη, όπως συζητείται σε αρκετές σαφείς αξιολογήσεις [Jed F. Fisher et al., 2005].

Όσον αφορά το μέλλον, υπάρχει ανάγκη να εξακριβωθεί οριστικά εάν υπάρχει σαφής σύνδεση μεταξύ αντοχής στα αντιβιοτικά και των βιοκτόνων σε βακτηρίδια που δεν σχηματίζουν σπορά και αν τα βιοκτόνα μπορούν να επιλέξουν αντοχή στα αντιβιοτικά. Επιπλέον, πρέπει να αξιολογηθούν οι απαντήσεις στα βιοκτόνα νέων και αναδυόμενων παθογόνων. Ταυτόχρονα, απαιτείται συνεχής έρευνα για την περαιτέρω ανάπτυξη των υποκείμενων μηχανισμών αντίστασης και την παροχή αποτελεσματικότερων μέσων βακτηριακής απενεργοποίησης [A.D.Russell et al., 1999].

1.4.3 Αίσθηση απαρτίας (Quorum sensing)

Η αίσθηση απαρτίας είναι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης με απόκριση στις διακυμάνσεις της πυκνότητας κυτταρικού πληθυσμού. Τα βακτήρια αίσθησης απαρτίας παράγουν και απελευθερώνουν χημικά σηματοδοτικά μόρια που ονομάζονται αυτοκρινείς που αυξάνουν τη συγκέντρωση ως συνάρτηση της πυκνότητας κυττάρων. Η ανίχνευση μίας ελάχιστης οριακής συγκέντρωσης διεγερσης ενός σηματοδοτικού μορίου οδηγεί σε αλλοίωση της γονιδιακής έκφρασης. Τα θετικά κατά Gram και τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια χρησιμοποιούν κυκλώματα επικοινωνίας αίσθησης απαρτίας για τη ρύθμιση ενός ποικίλου φάσματος φυσιολογικών δραστηριοτήτων. Αυτές οι διαδικασίες περιλαμβάνουν συμβίωση, μολυσματικότητα, ικανότητα, σύζευξη, παραγωγή αντιβιοτικών, κινητικότητα, σπορίωση και σχηματισμό βιοφίλμ. Γενικά, τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια χρησιμοποιούν ακυλιωμένες λακτόνες ομοσερίνης ως σηματοδοτικά μόρια και τα θετικά κατά Gram βακτήρια χρησιμοποιούν επεξεργασμένα ολιγο-πεπτίδια για να

επικοινωνούν. Οι πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα δείχνουν ότι η επικοινωνία κυττάρων-κυττάρων μέσω ουσιών συμβαίνει τόσο εντός όσο και μεταξύ ειδών βακτηρίων. Επιπλέον, υπάρχουν αυξανόμενα δεδομένα που υποδηλώνουν ότι τα βακτηριακά σηματοδοτικά μόρια προκαλούν συγκεκριμένες αποκρίσεις από οργανισμούς ξενιστές. Αν και η φύση των χημικών σημάτων, οι μηχανισμοί αναμετάδοσης σήματος και τα γονίδια-στόχοι που ελέγχονται από συστήματα ανίχνευσης βακτηριακής απαρτίας διαφέρουν, σε κάθε περίπτωση η ικανότητα επικοινωνίας μεταξύ τους επιτρέπει στα βακτήρια να συντονίζουν την έκφραση του γονιδίου, και συνεπώς τη συμπεριφορά ολόκληρη η κοινότητα. Προφανώς, αυτή η διαδικασία παρέχει στα βακτήρια μερικές από τις ιδιότητες των ανώτερων οργανισμών. Η εξέλιξη των συστημάτων ανίχνευσης απαρτίας στα βακτήρια θα μπορούσε, ως εκ τούτου, να ήταν ένα από τα πρώτα βήματα στην ανάπτυξη της πολυκυτταρικότητας [Melissa B. Miller et al., 2001].

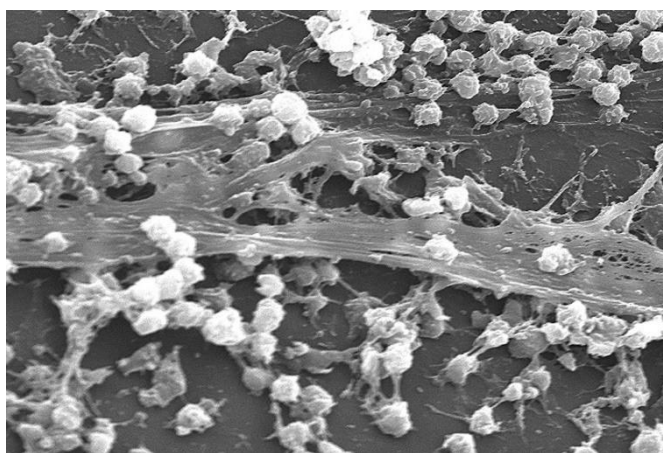
1.4.4 Αίσθηση απαρτίας στο αρνητικά κατά Gram βακτήριο *P. aeruginosa*

Όσον αφορά τα βακτήρια που χρησιμοποιούν την αίσθηση απαρτίας ως μέρος του παθογόνου τρόπου ζωής τους, το *P.aeruginosa* είναι ίσως το καλύτερα κατανοητό όσον αφορά τους παράγοντες μολυσματικότητας που ρυθμίζονται και τον ρόλο που παίζει η αίσθηση απαρτίας στην παθογένεια. Το *P. aeruginosa* , ταξινομημένο ως δυνητικά παθογόνο, μολύνει κυρίως άτομα που είναι ανοσοκατεσταλμένα, όπως ασθενείς με καρκίνο ή AIDS ή άτομα που έχουν ρήξεις σε φυσιολογικούς φραγμούς που προκαλούνται από εγκαύματα, μόνιμες ιατρικές συσκευές ή παρατεταμένη χρήση ευρέος φάσματος αντιβιοτικών. Το βακτήριο *P. Aeruginosa* έχει έναν εντυπωσιακό εξοπλισμό τόσο των κυτταρικών όσο και των εξωκυτταρικών μολυσματικών παραγόντων. Η έκφραση πολλών εξωκυτταρικών παραγόντων δεν είναι συστατική αλλά μάλλον εξαρτώμενη από την κυτταρική πυκνότητα με τη μέγιστη παραγωγή πρωτεάσης που συμβαίνει κατά τη διάρκεια των όψιμων

λογαριθμικών και πρώιμων στατικών φάσεων ανάπτυξης. Η γενετική βάση για αυτήν τη ρύθμιση φάσης ανάπτυξης αποκαλύφθηκε με την ανακάλυψη ότι το *P. aeruginosa* περιέχει γονίδια, που ονομάζονται *lasR* και *lasI*, με σημαντική ομολογία με τα γονίδια *luxR* και *luxI* του *Vibrio fischeri*. Στο *V. fischeri*, τα *luxR* και *luxI* εμπλέκονται στη ρύθμιση της παραγωγής φωτός που εξαρτάται από την πυκνότητα κυττάρων. Το γονίδιο *luxR* κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό ενεργοποιητή του οπερονίου βιοφωταύγειας, και κωδικοποιεί *luxI* για μια συνθετάση αυτοπαραγωγού που κατευθύνει τη σύνθεση του αυτοπαραγωγού 3-οξο-C6-HSL. Με τη σύνδεση του 3-οξο-C6-HSL, η πρωτεΐνη LuxR ενεργοποιείται, επιτρέποντάς της να προκαλέσει μεταγραφή του *lux* οπερονίου. Από την ανακάλυψη του συστήματος ανίχνευσης απαρτίας *lux*, ένας αριθμός αρνητικών κατά gram βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένου του *P. aeruginosa*, έχουν βρεθεί ότι παράγουν πρωτεΐνες τύπου LuxR- και LuxI [Teresa R. de Kievit, et al., 2000].

1.4.5 Βιοφίλμ

Τα βιοφίλμ είναι συσσωματώματα μικροοργανισμών που προσκολλούνται σε ένα υπόστρωμα. Πρώτον, τα βακτήρια δεσμεύονται αναστρέψιμα στην επιφάνεια και στη συνέχεια



Εικόνα 14. Βιοφίλμ *S.Aureus*

εκκρίνουν μόρια σύνδεσης όπως πρωτεΐνες προσκόλλησης που προκαλούν μη αναστρέψιμη προσκόλληση. Μόλις εγκατασταθούν, τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν αποικίες μέσα σε πεπτιδογλυκανικούς φακέλους, γεγονός που οδηγεί στην ανάπτυξη ενός ώριμου βιοφίλμ. Σε αυτό το στάδιο τα βακτήρια όχι μόνο δεν είναι προσβάσιμα σε αντιβακτηριακούς παράγοντες και στο ανοσοποιητικό σύστημα του σώματος, αλλά παρέχουν επίσης μια δεξαμενή βακτηρίων για χρόνιες λοιμώξεις σε όλο το σώμα. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο τα βιοφίλμ αποτελούν σοβαρή απειλή για την υγεία. Επιπλέον, τα βιοφίλμ ανταποκρίνονται ελάχιστα στα συμβατικά αντιβιοτικά και ενδέχεται να αναπτύξουν αντοχή στα αντιβιοτικά. Έτσι, παρά τα πολλά υπάρχοντα ισχυρά αντιβιοτικά φάρμακα και άλλα σύγχρονα αντιβακτηριακά μέσα, οι βακτηριακές λοιμώξεις εξακολουθούν να αποτελούν πρόκληση [Nurit Beyth et al., 2015].

1.5 Αντιμικροβιακά Υλικά

1.5.1 Τι είναι τα αντιμικροβιακά υλικά

Τα αντιμικροβιακά υλικά που χρησιμοποιούνται σήμερα στο κλινικό περιβάλλον αντιμετωπίζουν σημαντικές ελλείψεις, όπως αδύναμες αντιμικροβιακές δραστηριότητες, κίνδυνος μικροβιακής αντοχής, δυσκολία στην παρακολούθηση και επέκταση των αντιμικροβιακών λειτουργιών και δυσκολία λειτουργίας σε ένα δυναμικό περιβάλλον. Έτσι, αποτελεσματικά και μακροπρόθεσμα αντιβακτηριακά και βιοπροστατευτικά υλικά αποτελούν άμεση ανάγκη στην ιατρική και την οδοντιατρική. Σήμερα, οι περισσότερες λοιμώξεις που σχετίζονται με το βιοφίλμ αντιμετωπίζονται με αντιβιοτικά λόγω έλλειψης καλύτερης εναλλακτικής λύσης. Ωστόσο, είναι καλά αποδεδειγμένο ότι η επίθεση ώριμων βιοφίλμ με συμβατικά αντιβιοτικά δεν λειτουργεί. Δηλαδή,

απαιτούνται πολύ υψηλότερες από τις συνηθισμένες δόσεις φαρμάκου, καθώς όλοι αυτοί οι παράγοντες έχουν δυσκολία να διεισδύσουν στο περίβλημα εξωκυτταρικού πολυσακχαρίτη που καλύπτει το βιοφίλμ. Τα βακτήρια που σχετίζονται με το βιοφίλμ είναι 100 έως 1000 φορές λιγότερο ευαίσθητα στα αντιβιοτικά σε σχέση με τα ελεύθερα βακτήρια, οι παράγοντες που δρουν κατά των πλαγκτονικών(ελεύθερων) βακτηρίων, αλλά όχι έναντι των βιοφίλμ, αποτυγχάνουν στη θεραπεία ασθενών. Επιπλέον, οι υψηλές δόσεις συχνά δεν είναι ανεκτές από τον οργανισμό ξενιστή, ενώ οι συμβατικά χρησιμοποιούμενες χαμηλότερες δόσεις είναι αναποτελεσματικές. Επιπλέον, η χρήση συμβατικών αντιβιοτικών ενέχει σημαντικό κίνδυνο για την αντοχή των βιώσιμων βακτηρίων. Αυτό το ζήτημα γίνεται πιο περίπλοκο σε καταστάσεις όπου παράγονται μικτά βακτήρια βιοφίλμ και όπου χρησιμοποιούνται πολλαπλά αντιβιοτικά για τη στόχευση της σύνθετης μικροχλωρίδας. Κατά συνέπεια, απαιτούνται διαφορετικά μέτρα αντιμικροβιακής προστασίας. Η νανοτεχνολογία παρέχει σήμερα μια καλή πλατφόρμα για την προσαρμογή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων πολλών υλικών για τη δημιουργία αποτελεσματικών αντιμικροβιακών ουσιών. Τα νανοϋλικά (NM) μπορεί να είναι στρατηγικά πλεονεκτικά ως ενεργές αντιβακτηριακές ομάδες, δεδομένου ότι η επιφάνειά τους είναι υπερβολικά μεγάλη σε σχέση με το μέγεθός τους. Τα νανοποιημένα σωματίδια μπορεί να παρέχουν υψηλή δραστηριότητα αν και χρησιμοποιείται μόνο μια μικρή δόση των σωματιδίων. Κατά συνέπεια, τα NM θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως εναλλακτική λύση στα αντιβιοτικά για τον έλεγχο βακτηριακών λοιμώξεων [Nurit Beyth et al., 2015].

Η αντιμικροβιακή τροποποίηση των επιφανειών για την πρόληψη της ανάπτυξης επιβλαβών μικροοργανισμών είναι ένας πολύ επιθυμητός στόχος. Μικροβιακή προσκόλληση σε επιφάνειες που ακολουθείται από ανάπτυξη κυττάρων και αποικισμό οδηγεί στο σχηματισμό ενός συμπαγούς πλέγματος βιοφίλμ ικανό να προστατεύει τα υποκείμενα μικρόβια από αντιβιοτικά και μηχανισμούς άμυνας ξενιστή. Σε περίπτωση βιοϊατρικών συσκευών όπως καθετήρες, προσθετικά, εμφυτεύματα και ούτω καθεξής, η επιφανειακή μικροβιακή προσβολή μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρή λοίμωξη και αστοχία της συσκευής. Οι λοιμώξεις με επίκεντρο τις επιφάνειες εμπλέκονται επίσης στην αλλοίωση

των τροφίμων, στη διάδοση των τροφικών ασθενειών και στη βιοσύνθεση υλικών. Ως εκ τούτου, υπάρχει σημαντικό ενδιαφέρον για την ανάπτυξη αντιμικροβιακών υλικών και επιφανειών για εφαρμογές στη βιομηχανία υγείας και βιοϊατρικών συσκευών, στη βιομηχανία τροφίμων και στη βιομηχανία προσωπικής υγιεινής. Οι αντιμικροβιακές επικαλύψεις πρέπει να συνδυάζουν επιθυμητά χαρακτηριστικά όπως ισχυρή αντιβακτηριακή αποτελεσματικότητα, περιβαλλοντική ασφάλεια, χαμηλή τοξικότητα και ευκολία κατασκευής [Varun Sambhy et al., 2006].

1.5.2 Οι κατηγορίες των αντιμικροβιακών υλικών

Έχουν χρησιμοποιηθεί τρεις ευρείες κατηγορίες υλικών για την απόδοση αντιμικροβιακών επιφανειών: (α) επαφή ενεργών αμφίφιλων πολυμερών, ή συνθετικά μιμητικά φυσικώς απαντώμενα αντιβακτηριακά πεπτίδια, (β) αντι-κολλητικά πολυμερή που αποκρούουν μικροβιακά, και (γ) πολυμερή / σύνθετα υλικά φορτωμένα με βιοκτόνα αργής απελευθέρωσης όπως βαρέα μέταλλα, αντιβιοτικά, βιοκτόνα μικρών μορίων, είδη αλογόνου και νιτρικό οξείδιο. Μεταξύ της τρίτης κατηγορίας αντιμικροβιακών, τα υλικά με βάση το ασήμι παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Τα ιόντα αργύρου παρουσιάζουν βιοκτόνο δράση ευρέος φάσματος έναντι πολλών διαφορετικών βακτηρίων, μυκήτων και ιών και πιστεύεται ότι είναι το δραστικό συστατικό σε αντιμικροβιακά με βάση άργυρο. Το Ag^+ ιόν είναι γνωστό ότι απενεργοποιεί τα κυτταρικά ένζυμα και το DNA συντονίζοντας σε ομάδες που δίνουν ηλεκτρόνια όπως θειόλες, καρβοξυλικά άλατα, αμίδια, ιμιδαζόλες, ινδόλες, υδροξύλια και ούτω καθεξής. Το ασήμι είναι επίσης γνωστό ότι προκαλεί λάκκους στα τοιχώματα βακτηριακών κυττάρων, οδηγώντας σε αυξημένη διαπερατότητα και θάνατο κυττάρων. Ο άργυρος έχει χαμηλή τοξικότητα στα κύτταρα των θηλαστικών και δεν προκαλεί εύκολα μικροβιακή αντίσταση. Ως εκ τούτου, τα υλικά που περιέχουν ασήμι έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως από τη βιοϊατρική βιομηχανία σε καθετήρες, οδοντιατρικά υλικά, ιατρικές συσκευές και

εμφυτεύματα, επιδέσμους πληγών και εγκαυμάτων. Οι περισσότερες από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ενσωμάτωση αργύρου σε πολυμερείς μήτρες περιλαμβάνουν είτε χημικές επεξεργασίες όπως αναγωγή ή σύνθεση σύνθετων ενώσεων αργύρου, ανάμιξη προσχηματισμένων σωματιδίων αργύρου με πολυμερή, ή περίπλοκες φυσικές τεχνικές όπως ψεκασμός και εναπόθεση πλάσματος. Όλες αυτές οι τεχνικές προσθέτουν χρόνο, κόστος και πολυπλοκότητα στη συνολική διαδικασία της κατασκευής του αντιμικροβιακού υλικού [Varun Sambhy et al., 2006]. Ως εκ τούτου, είναι επιθυμητή μια απλούστερη μέθοδος ενσωμάτωσης ιόντων και αντιμικροβιακών ουσιών σε πολυμερή.

1.5.3 Η αναγκαιότητα της χρήσης των Αντιμικροβιακών Υλικών

Η μάχη ενάντια στις νοσοκομειακές λοιμώξεις όπως, μεταξύ άλλων, οι χειρουργικές λοιμώξεις, παραμένει μια από τις σημαντικότερες πραγματικές προκλήσεις του νοσοκομείου. Αν και οι προειδοποιήσεις είναι πολλές για να αποφευχθεί οποιαδήποτε μόλυνση επιφανειών (καθετήρες, εμφυτεύματα, ιατρικές συσκευές, δάπεδα κ.λπ.), τα φαινόμενα αντοχής που αναπτύσσονται από το μεγαλύτερο μέρος των παθογόνων οργανισμών απαιτούν, αφενός, την επεξεργασία νέων παραγόντων βιοκτόνων και από την άλλη πλευρά, ολοκλήρωση μακροπρόθεσμων βακτηριοκτόνων για τις επιφάνειες ή, σε ιδανική περίπτωση, μόνιμη επίδραση βιοκτόνου των επιφανειών χωρίς απελευθέρωση των αντιμικροβιακών δραστικών παραγόντων. Η εφαρμογή πολυμερών επικαλύψεων με βιοκτόνα με μόνιμη επίδραση εισάγει μη αμελητέα πλεονεκτήματα: μη απελευθέρωση αντιβακτηριακών παραγόντων στο περιβάλλον περιβάλλον και κατά συνέπεια, μείωση των φαινομένων αντοχής με εξασθένηση της ανάπτυξης πολυανθεκτικών μικροβίων. Σε σύγκριση με τους συμβατικούς αντιβακτηριακούς παράγοντες χαμηλού μοριακού βάρους, οι πολυμερείς

αντιβακτηριακοί παράγοντες έχουν επίσης τα πλεονεκτήματα να είναι μη πτητικοί και δύσκολο να διαπεραστούν μέσω του δέρματος. Επιπλέον, η αυξημένη απόδοση, η επιλεκτικότητα και ο χειρισμός της ασφάλειας είναι επιπρόσθετα οφέλη [Laurent Caillier et al., 2009].

Κεφάλαιο 2^ο

Σκοπός

2.Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι η σύνθεση ενός αντιμικροβιακού παράγοντα από την συνέργεια ενός συστατικού της ρίγανης, την καρβακρόλη, που είναι ένα φυσικό προϊόν και το κύριο συστατικό των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται κατά του παρασίτου λειψμάνια. Το βασικό αυτό συστατικό των φαρμάκων αυτών είναι το αντιμόνιο (Sb). Έτσι, από το τρισθενές αντιμόνιο το οποίο είναι τοξικό στόχος είναι η σύνθεση ενός πεντασθενούς φαρμάκου αντιμονίου στο οποίο θα υπάρχει και το φυσικό προϊόν καρβακρόλη.

Στη συνέχεια, αυτή η ένωση θα χαρακτηριστεί με διάφορες μεθόδους ώστε να διαπιστωθεί η δημιουργία αυτής της νέας ένωσης. Έπειτα, μελετάται η αντιμικροβιακή δράση δύο ενώσεων, του νέου συμπλόκου και της καρβακρόλης, με τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC), της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC), των ζωνών αναστολής (IZ) στα βακτήρια *P. aureoginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*. Εν συνεχεία προσδιορίζεται η τιμή της συγκέντρωσης εξάλειψης του βιοφίλμ (BEC) στα βακτήρια *P. aureoginosa*, , *S. aureus*. Ακόμα, μελετάται η γόνотоξικότητα με τον ζωντανό οργανισμό *Allium cepa* και in vivo τοξικότητα με το πειραματικό μοντέλο *Artemia salina*. Τέλος, μελετάται η επίδραση αυτού του νέου συμπλόκου στο DNA με τις φασματοσκοπικές τεχνικές ορατού – υπεριώδους και φθορισμού.

Ωστόσο, απώτερος σκοπός αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής, είναι η σύνθεση επιφανειών πολυστυρενίου οι οποίες θα περιέχουν την νέα αντιμικροβιακή ένωση. Έτσι λοιπόν, στόχος είναι να δημιουργηθούν αντιμικροβιακές επιφάνειες στις οποίες θα μελετηθεί εάν μειώνουν την ανάπτυξη των βακτηρίων όταν επωάζονται μαζί με υγρές καλλιέργειες βακτηρίων. Συνεπώς, θα συντεθεί πολυστυρένιο με τις δύο αυτές ουσίες σε συγκέντρωση 2mM (polystyrene@TPAC και polystyrene@Carvacrol) και αφού χαρακτηριστεί, ώστε να διαπιστωθεί η ύπαρξη του συμπλόκου σε αυτό, θα μελετηθεί η αντιμικροβιακή τους δράση.

Κεφάλαιο 3^ο

Πειραματικό Μέρος

3. Πειραματικό Μέρος

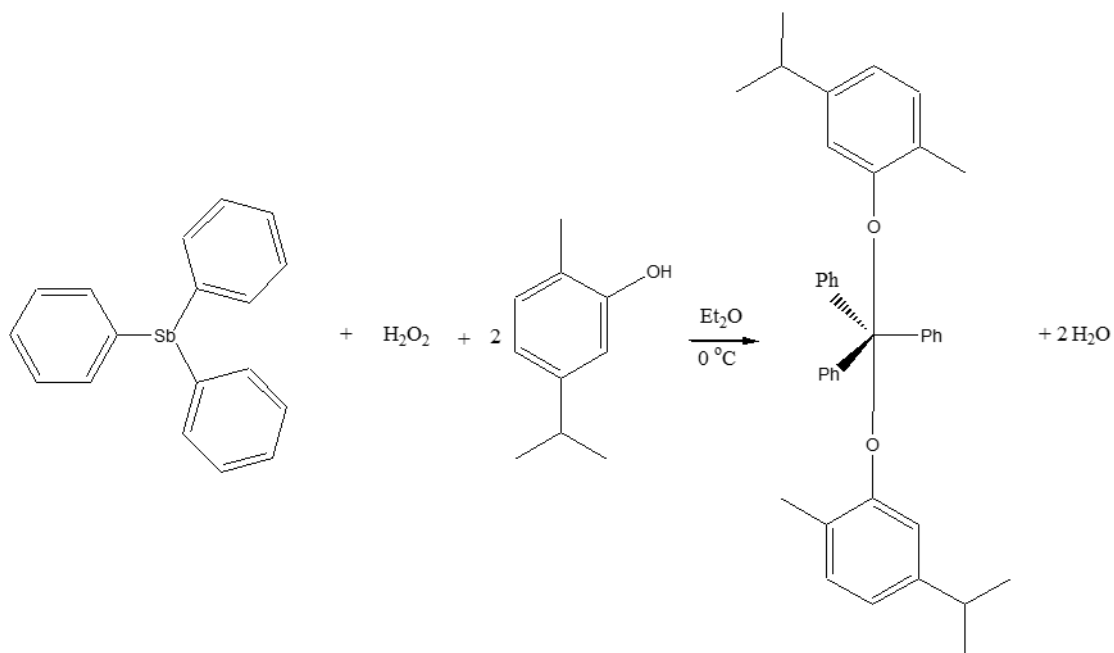
3.1 Χημικό Μέρος

Υλικά : γυάλινα σκεύη 25ml, γυάλινοι σωλήνες 15ml, σπάτουλες, μαγνήτες, ddH₂O, tips, Carvacrol Sigma – Alorich, Triphenylstibine, Dimethyl Sulfoxide, , CH₂Cl₂, στυρένιο.

Όργανα: σημείο τήξης: Melting Point SMP1-Bibby Stuart Scientific, ATR-FT-IR, UV-Vis: φασματοφωτόμετρο U.V. 1600PC Spectrophotometer VWR, NMR: Bruker Avance 400 (400MHz), Laboratory hoods (laminar flow hoods/ biosafate cabinets). Πιπέτες (1000, 100, 10μl), ζυγός ακριβείας, eppendorf 1,5ml

3.1.1 Σύνθεση

Πραγματοποιήθηκε σύνθεση της ένωσης TPAC (Triphenylantimony – carvacrol) σε σφαιρική φιάλη των 25ml. Αρχικά προστέθηκαν 0,5mmol Triphenylantimony (0.177g) σε 20ml αιθέρα τοποθετημένα σε παγόλουτρο. Έπειτα, προστέθηκαν 51μl H₂O₂ τα οποία οξειδώνουν το Sb από τρισθενές σε πεντασθενές. Τέλος προστέθηκαν 1mmol (153μl) καρβακρόλης και αφέθηκαν υπό ανάδευση overnight. Την επόμενη μέρα το διάλυμα διηθήθηκε και αφέθηκε μέχρι ξηρού. Το ίζημα συλλέχθηκε σε Eppendorf και ζυγίστηκε (0.153g). Παρακάτω απεικονίζεται και η πορεία της αντίδρασης.



Εικόνα 15. Σύνθεση συμπλόκου TPAC

Απόδοση	86,44%
Μοριακός Τύπος	$\text{C}_{38}\text{H}_{39}\text{O}_2\text{Sb}$
Μοριακό Βάρος	651,51

3.1.2 Διαλυτότητα

Έγινε έλεγχος διαλυτότητας του συμπλόκου στους διάφορους διαλύτες (Et₂O, n-Hexane, Toluene, CHCl₃, CH₂Cl₂, Acetone, EtOH, MeOH, DMF, MeCN, DMSO, H₂O) προκειμένου να αποφανθεί ποιοι διαλύτες είναι κατάλληλοι για την διεξαγωγή των υπολοίπων πειραματικών διαδικασιών. Τοποθετήθηκε ισόποση ποσότητα της ουσίας σε δοκιμαστικούς σωλήνες και προστέθηκε η ίδια ποσότητα από κάθε διαλύτη για να ελεγχθεί η διαλυτότητα κατόπιν αναδέυσεως του διαλύματος.

3.1.3 Ανακρυστάλλωση

Μετά τον έλεγχο της διαλυτότητας έγινε ανακρυστάλλωση της ουσίας. Το σύμπλοκο διαλύθηκε σε 10ml ακετοντριλίου (MeCN) και 10ml μεθανόλης (MeOH), διηθήθηκε και αφέθηκε μέχρι ξηρού. Τέλος συλλέχθηκε και πάλι το σύμπλοκο.

3.1.4 Σημείο Τήξης

Για την εύρεση του σημείου τήξης της ένωσης χρησιμοποιήθηκαν τα τριχοειδή σωληνάκια BRIS micro haematocrit tubes (Soda Lime Glass, Vitrex Medical A/S) όπου φέρουν μια χαρακτηριστική ένδειξη για την εισαγωγή του δείγματος. Αφού κλείσει η μια άκρη του τριχοειδούς

σωλήνα με την βοήθεια της φλόγας, τοποθετείται με το δείγμα και αναποδογυρίζεται το σωληνάριο, ώστε το δείγμα να μεταφερθεί στο κλειστό άκρο του τριχοειδούς. Τοποθετείται το τριχοειδές με το δείγμα στη συσκευή για την εύρεση του σημείου τήξεως (Melting Point SMP1- Bibby Stuart Scientific) και μετράται η θερμοκρασία με την χρήση ενός θερμομέτρου.

3.1.5 Φασματοσκοπία υπερύθρου ATR-FT-IR (Attenuated Total Reflectance, Furier Transform Infra Red)

Η ένωση TPAC χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία infra red (I.R.). Για την λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το όργανο ATR-FT-IR (Attenuated Total Reflectance, Furier Transform Infra Red) και το πρόγραμμα MicroLab Expert. Η πορεία που ακολουθήθηκε είναι η εξής : εκκίνηση του προγράμματος MicroLab, Start, λήψη background, ονομασία του δείγματος, λήψη του φάσματος. Όταν ολοκληρωθεί η μέτρηση, το αποτέλεσμα αποθηκεύεται και επεξεργάζεται με το κατάλληλο software.

3.1.6 Φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους Uv – Vis

Η φασματοσκοπία ορατού – υπεριώδους χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό της ουσίας, το σύμπλοκο διαλύθηκε σε DMSO. Αρχικά λήφθηκαν τα φάσματα U.V. του συμπλόκου TPAC και των ligands (Triphenylstibine και carvacrol) και από το λ_{\max} υπολογίστηκε ο συντελεστής απόσβεσης, ώστε να αποδειχθεί η δημιουργία μιας νέας ένωσης. Επίσης, ελήφθησαν τα φάσματα του

συμπλόκου σε DMSO στις 0h, 48h και στη μια εβδομάδα ώστε να αποδειχθεί η σταθερότητα της ένωσης. Αρχικά, λήφθηκε το φάσμα στις μηδέν ώρες, έπειτα αυτό διατηρήθηκε με parafilm και φωτομετρήθηκε ξανά στις 48 ώρες και στη μια εβδομάδα. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το M.Wave Professional 1.0 και βρίσκεται στο μηχάνημα U.V. 1600PC Spectrophotometer VWR. Η πορεία που ακολουθήθηκε είναι η εξής: File, New, Spectrum Scan, Operation, Set up 600 - 190nm. Αφού τέθηκαν τα όρια τοποθετούμε την κυψελίδα με το τυφλό διάλυμα και επιλέγεται η ένδειξη z1, επαληθεύονται ξανά οι ρυθμίσεις και επιλέγεται το scan. Μετά την μέτρηση του τυφλού διαλύματος, ακολουθεί η φωτομέτρηση της προς μελέτη ουσίας. Η διαδικασία αυτή γίνεται με την επιλογή της ένδειξης play. Όταν ολοκληρωθεί η μέτρηση, το αποτέλεσμα αποθηκεύεται για να πραγματοποιηθεί η επεξεργασία και η σύγκριση με τα υπόλοιπα φάσματα.

3.1.7 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός - NMR

Ο χαρακτηρισμός της ένωσης έγινε και με τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Για τα πειράματα σταθερότητας στο NMR ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε δευτεριωμένο DMSO. Ζυγίστηκαν περίπου 10 mg της ένωσης και διαλύθηκαν σε 470μl του διαλύτη. Το διάλυμα αυτό μεταφέρθηκε στο σωληνάκι του NMR και το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε είναι το Bruker Avance 400 (400MHz) και το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το Topspin 2.1. Εντοπίστηκαν οι συντονισμοί των πυρήνων ατόμων ^1H . Αυτή είναι η μέτρηση στις 0h και το αποτέλεσμα αποθηκεύτηκε και επεξεργάστηκε καταλλήλως. Το διάλυμα αυτό διατηρήθηκε με πόμα και parafilm, καθώς πάρθηκαν μετρήσεις στις 48h και τα αποτελέσματα αυτών αποθηκεύτηκαν και συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Η σύγκριση έγινε με το πρόγραμμα Mestrec23.

3.1.8 Σύνθεση πολυστυρενίου

Για την σύνθεση χρησιμοποιήθηκαν 1.5gr πολυστυρενίου το οποίο διαλύθηκε σε 5ml διχλωρομεθανίου (CH_2Cl_2) και διαλύθηκε συγκεκριμένη ποσότητα ουσίας. Στη συνέχεια το μείγμα μεταφέρθηκε σε καλούπι και τοποθετήθηκε υπό κενό για την αποφυγή σχηματισμού φυσαλίδων. Παρασκευάστηκαν διαφορετικά κομμάτια πολυστυρενίου στα οποία είχε διαλυθεί συγκεκριμένη ποσότητα ουσίας TPAC και καρβακρόλης αντίστοιχα για τα οποία ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία.

3.2 Βιολογικό μέρος

Υλικά: Αντιμικροβιακή δράση: Tryptone (Biolife), Soytone (Biolife), Beef extract (Biolife), Yeast extract (Sigma-Aldrich), NaCl (Merck KGaA), d-Glucose (Merck KGaA), K_2HPO_4 (Merck KGaA), Peptone (Biolife), Agar (Sigma-Aldrich), ddH₂O, τρυβλία petri, -σωλήνες των 15ml, -πιπέτες (1000, 100, 10μl), -κρικοφόρος στειλεός, -βαμβακοφόρος στειλεός, -χάρτινοι δίσκοι 9mm, -ορός (NaCl 0,9M), -λαβίδες, -καμινέτο, -hood με laminar air flow (HD-650 laminar flow cabinet Zhejing sujing Purification Equipment), -μπουκάλια (500, 250ml), tips, -vortex, -σακούλες-αποβλήτων, -διάλυμα της ένωσης, -ddH₂O, -βακτήρια (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* και *Staphylococcus epidermidis* ATCC), επωαστής, μηχανήμα σάρωσης (Hewlett Packard), Βολβοί κρεμμυδιών (*Allium cepa*), διαμέτρου περίπου 1,5-2,0 cm, ξυραφάκια, γυάλινη πλάκα μικροσκοπίου (75 x 25 mm), Coverslips (Fisher Scientific, αριθμός καταλόγου: 12-543D), Eppendorf 1,5 ml, Διπλά αποσταγμένο νερό (ddH₂O), Υδροχλωρικό οξύ, Οξικό οξύ, Αντιδραστήρια Schiff, οπτικό μικροσκόπιο (Olympus, 10x objective), Ψηφιακή κάμερα (Nikon, model: COOLPIX P100, 10.3 megapixel, 26x zoom).

3.2.1 Αντιμικροβιακή δράση

Για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δραστηριότητας των TPAC και Carvacrol πραγματοποιήθηκαν πειράματα εύρεσης της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC), της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC), ζωνών αναστολής (IZ) καθώς και της καταπολέμησης του Βιοφίλμ. Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δυο θετικά κατά Gram βακτήρια (*S. aureus* και *S. epidermidis*) και δύο αρνητικά κατά Gram βακτήρια (*E. Coli* και *P. aeruginosa*).

Τα βακτήρια διατηρούνταν στο εργαστήριό μας κάτω από κατάλληλες συνθήκες (37°C για ανάπτυξη, -80°C για αποθήκευση). Τα θρεπτικά υλικά μέσα ήταν διαφορετικά και τα βέλτιστα για το κάθε βακτήριο σύμφωνα με την American Type Culture Collection (ATCC). Για την *Pseudomonas aeruginosa* χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά tryptone (1%, 10g/L), yeast extract (0,5%, 5g/L) και NaCl (1%, 10g/L). Για τον *S. epidermidis* και τον *S. aureus* χρησιμοποιήθηκαν tryptone (1,7%, 17g/L), soytone (0,3%, 3g/L), dextrose (0,25%, 2,5g/L), NaCl (0,5%, 5g/L), και K₂HPO₄ (0,25%, 2,5g/L). Για την *E.Coli* NaCl (1%, 10g/L), yeast extract (0,5%, 5g/L), soytone (0,3%, 3g/L).

Για το υγρό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O). Για το στερεό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε επιπλέον και άγαρ (1,5%, 15g/L).

Όλα τα σκεύη που χρησιμοποιούνται στην διαχείριση των βακτηρίων έχουν αποστειρωθεί κάτω από κατάλληλες συνθήκες (με εργαστηριακό κλίβανο), καθώς αποστειρώνονται και τα θρεπτικά μέσα πριν σ' αυτά εμβολιαστούν τα βακτήρια. Τα διάφορα πειράματα που έγιναν παρουσία μικροβίων πραγματοποιήθηκαν είτε μέσα σε hood με laminar air flow είτε κάτω από στείρα φλόγα προκειμένου να εξασφαλίσουμε στείρες συνθήκες χωρίς επιμολύνσεις.

3.2.2 Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC)

Ως ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration-MIC) ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα που εμποδίζει την οπτικά εμφανή ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Για νέα υποψήφια φάρμακα, ο προσδιορισμός της MIC είναι ένα από τα πρώτα βήματα για την αξιολόγηση του αντιμικροβιακού δυναμικού. Για την εύρεση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα. Υπολογίζουμε τους κατάλληλους όγκους από το θρεπτικό, την προς εξέταση ουσία καθώς και του μικροβίου. Σε τελικό όγκο 2ml θέλουμε να έχουμε 5×10^5 cfu (colony forming unit)/ml. Έτσι σε 2 ml 0,9M NaCl διαλύουμε κατάλληλη ποσότητα.

3.2.3 Ελάχιστη Βακτηριακή Συγκέντρωση (MBC)

Η χαμηλότερη συγκέντρωση που θανατώνεται ο μικροοργανισμός κατά 99.9%. Για την MBC χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με θρεπτικά στερεά συστατικά των 10 ml. Τα τρυβλία εμβολιάστηκαν με 4 μ L από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της MIC. Τα αποτελέσματα είναι ορατά μετά το πέρας των 24h, όπου σκανάρεται το τρυβλίο και αποθηκεύεται το αποτέλεσμα.

3.2.4 Ζώνη Αναστολής – IZ

Η ζώνη αναστολής εμφανίζει την διάμετρο, κατά την οποία σταματά η ανάπτυξη των βακτηρίων. Για τα πειράματα των IZ απαιτούνται τρυβλία με θρεπτικά στερεά συστατικά κατάλληλα για την ανάπτυξη του κάθε βακτηρίου των 20 ml, αποστειρωμένος βαμβακοφόρος στείλεός και αποστειρωμένα κυλινδρικά χαρτιά διαμέτρου 10 mm. Αρχικά ο βαμβακοφόρος στείλεός εμβαπτίζεται για 20 sec σε διάλυμα βακτηρίου με $A = 0,1$ (500000 βακτήρια) και εμβολιάζεται το θρεπτικό υλικό. Εν συνεχεία τα απορροφητικά χαρτιά εμβαπτίζονται σε διάλυμα της χημικής ουσίας $C = 1 \text{ mM}$ και τοποθετούνται πάνω στο θρεπτικό υλικό. Τα αποτελέσματα καθίστανται ορατά σε 24h όπου σκανάρεται το τρυβλίο και αποθηκεύεται το αποτέλεσμα

3.2.5 Βιοφίλμ

Το βιοφίλμ απαρτίζεται από μια συνομοταξία βακτηριακών κυττάρων. Αρχικά τα βακτήρια με πυκνότητα $6,7 \cdot 10^6 \text{ cfu/ml}$ εμβολιάζονται σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό για τα μικρόβια που θα αναπτυχθούν και καλλιεργούνται για 24h στους $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Το περιεχόμενο κάθε σωλήνα απομακρύνεται και οι δοκιμαστικοί σωλήνες εκπλένονται με 1 ml ddH₂O. Τα βακτήρια επωάζονται σε συγκεντρώσεις από 200-500 μM και ο τελικός τους όγκος είναι 2 ml και επωάζονται για 20 ώρες στους $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.3 Τοξικότητα

3.3.1 Γόνотоξικότητα στον οργανισμό *Allium Cera*

Για το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν φρέσκοι βολβοί κρεμμυδιών (*Allium cera*, διαμέτρου ~ 1,0-1,5 cm). Αφαιρέθηκαν και απορρίφθηκαν τα πιο ξηρά, καφέ στρωμάτων. Έπειτα, έγινε τοποθέτηση των βολβών *Allium cera* σε τρυβλίο με πηγαδάκια που περιέχουν 2.5ml διπλά αποσταγμένο νερό. Τοποθέτηση του τρυβλίου σε έναν επωαστή στους 25 ° C, υγρασία 50-60% και 12 ώρες φωτισμό ημέρας / 12 ώρες σκοτάδι για 24 ώρες. Προσθήκη συμπλόκου στις κατάλληλες συγκεντρώσεις για να επωαστούν οι βολβοί. Έγινε επώαση των βολβών *Allium cera* (δύο ανά δόση) με τα μεταλλικά φάρμακα για 48 ώρες.

Μετά από 48 ώρες, έγινε απόρριψη του διαλύματος και προσθήκη 2,5 ml διαλύματος οξικού οξέος-μεθανόλης 1: 3, επώαστηκαν για 24 ώρες στους 4 ° C. Έγινε μεταφορά των ριζών σε σωληνάρια Eppendorf με 1,0-1,5 ml 6N HCl στους 37 ° C για 10 λεπτά. Αφαιρέθηκε το HCl και έγινε πλύση των ριζών για 1 λεπτό σε αποσταγμένο νερό. Μεταφορά των ριζών στους σωλήνες Eppendorf και προσθήκη 1,0-1,5 ml αντιδραστηρίου Schiff. Επώαση των ριζών για 40 λεπτά στους 37 ° C. Πλύση για 1 λεπτό σε 45% οξικό οξύ. Αφαίρεση των καλυμμάτων της ρίζας από τα καλά χρωματισμένα άκρα της ρίζας με μια λεπίδα ξυραφιού. Το μήκος των ριζών που θα υποστούν επεξεργασία πρέπει να είναι περίπου 0,5-2,0 cm. Μεταφορά 1 mm του μερισματικού μέρους σε μια σταγόνα 45% οξικού οξέος σε μια καθαρή πλάκα μικροσκοπίου. Τοποθέτηση μιας καλυπτρίδας πάνω στο δείγμα και τέλος παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο.

3.3.2 Τοξικότητα στο μοντέλο της *Artemia Salina*

Η *Artemia Salina* είναι ένα είδος γαρίδας που σχετίζεται περισσότερο με τα Τρίοψ και τα Cladocerans παρά με την κανονική γαρίδα. Η *Artemia Salina* συναντάται σε λίμνες και σε προσωρινά στάσιμα ύδατα στη μεσογειακή περιοχή της Νότιας Ευρώπης, την Ανατολία και τη Βόρεια Αφρική [Alireza Asem et al., 2010]. Η *Artemia Salina* έχει τρία μάτια, 11 ζεύγη ποδιών και μπορεί να αναπτυχθεί σε μέγεθος έως 15 mm. Το αίμα τους περιέχει την χρωστική αιμοσφαιρίνη, η οποία απαντάται και στα σπονδυλωτά. Τα αρσενικά διαφέρουν από τα θηλυκά, με τη διαφορά ότι τα πρώτα έχουν σημαντική μεγέθυνση των δεύτερων κεραιών και τροποποιούνται σε όργανα συστολής και χρησιμοποιούνται κατά τη διαίωσιση του είδους. Το χαρακτηριστικό αυτών των προνύμφων είναι η ανθεκτικότητά τους που τα καθιστά εξαιρετικά πειραματόζωα για πειράματα τοξικότητας των χημικών ουσιών. Επί προσθέτως, τα αυγά επιβιώνουν για πολλά χρόνια και ως συνέπεια αυτού είναι δυνατή η αγορά αυγών και η εκκόλαψη τους όποτε αυτή είναι αναγκαία. Τέλος η προνύμφη *Artemia Salina* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως τροφή για μεγαλύτερα ψάρια [Dr Ruebhart et al., 2008].



Εικόνα 16. *Artemia Salina*

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιείται 1 gr από αυγά ψαριών, τα οποία τοποθετούνται στην χοάνη εκχύλισης με 500 ml φυσικού μεταλλικού H₂O παρουσία φωτός και φυσαλίδων. Μετά από 45-60 min προστίθεται 17gr ειδικού άλατος. Τα αυγά αφήνονται να

εκκολαφθούν για 3 ημέρες. Έπειτα λαμβάνεται μια ποσότητα ψαριών από την χράνη και ακολουθεί έκπλυση με φυσιολογικό ορό 0.9% NaCl. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια πιπέτας τοποθετούνται γαρίδες σε κάθε κυψελίδα και αντιστοίχως οι προς μελέτη συγκεντρώσεις της χημικής ουσίας ανάλογες της MIC και μια κυψελίδα που χρησιμοποιείται ως control. Αρχικά προστίθεται ο απαιτούμενος αριθμός ψαριών έως τα 500 μ L. Έπειτα προστίθεται ο απαιτούμενος όγκος της ουσίας και τέλος μεταγγίζεται αντίστοιχη ποσότητα φυσιολογικού ορού (0.9 M) έως ότου ο τελικός όγκος να είναι 1 ml. Το ειδικό πλακίδιο αφήνεται για 24h σε επωαστή. Την επόμενη μέρα πραγματοποιείται παρακολούθηση και καταγραφή των ζώντων και των μη ζώντων ψαριών με τη βοήθεια στερεοσκοπίου.

3.4.1 Μελέτες δέσμευσης DNA

Το διάλυμα του stock DNA προετοιμάστηκε από αραιώση CT-DNA με ρυθμιστικό διάλυμα (που περιέχει trisodium citrate 15 mM κίτρινη και 150 mM NaCl στο pH = 7) ακολουθούμενη από ανάδευση για ημέρες, και διατηρούνται σε 4 °C για όχι περισσότερο από μια εβδομάδα. Το διάλυμα stock του CT-DNA έδωσε μια αναλογία απορρόφησης UV στα 260 και 280 nm (A_{260}/A_{280}) 1,94, γεγονός που αποδεικνύει ότι το DNA ήταν επαρκώς απαλλαγμένο από μόλυνση από πρωτεΐνες. Η συγκέντρωση του DNA καθορίστηκε από την απορρόφηση UV σε 260 nm μετά από 1 : 20 αραιώση με $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}$. Για τα πειράματα τιτλοδότησης, UV φάσματα CT-DNA στο ρυθμιστικό διάλυμα λύση απουσίας και παρουσίας TPAC σε τιμές r0 0,02 0,05 0,07 0,10 0,12 ($r = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{DNA}]$, $[\text{DNA}] = 5 \cdot 10^5 \text{ M}$) καταγράφηκαν. Για σταθερά σύνδεσης Kb τιμές προσδιορισμός, UV φάσματα του DNA απουσία και παρουσία TPAC στις τιμές r 1, 0,5, 0,25, 0,17, 0,125 και 0,1 ($r =$

σύμπλοκο]/[DNA], [σύμπλοκο] = 10 mM, [CT-DNA] = 10-100 mM) καταγράφηκαν επίσης [C. N. Banti, et al., 2012].

3.4.2 Φασματοσκοπικές μελέτες φθορισμού

Τα φάσματα εκπομπής στα 588 nm των διαλυμάτων EB (2,3 μM) που περιέχουν CT-DNA (26 μM) απουσία ή παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων συμπλόκου (0-1200 μM) καταγράφηκαν κατά τη διέγερσή τους στα 527 nm.

Κεφάλαιο 4^ο

Αποτελέσματα

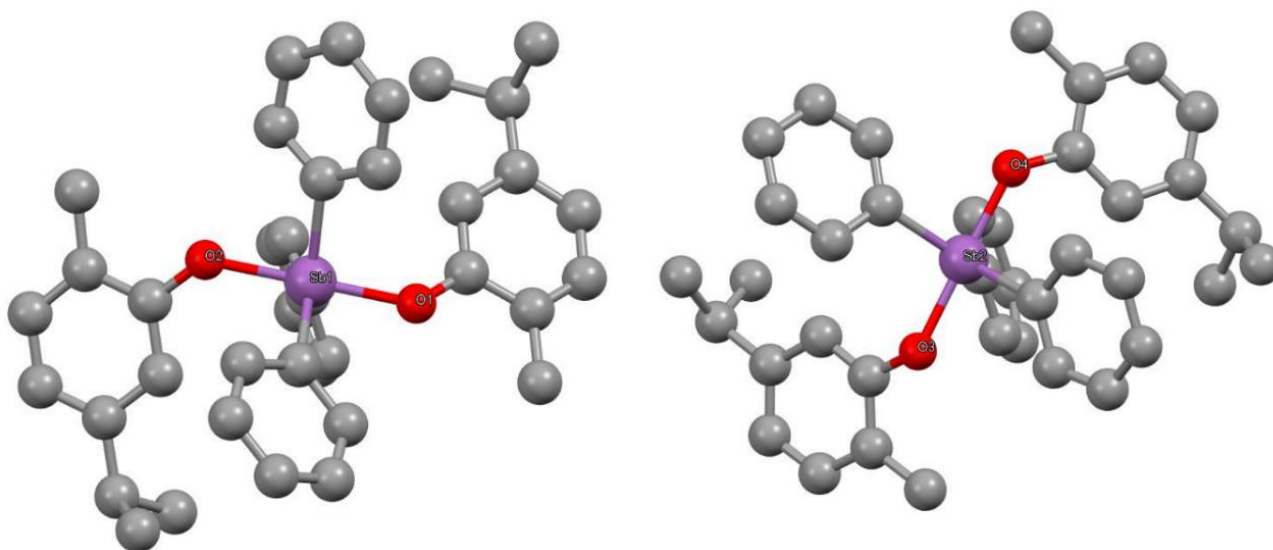
4. Αποτελέσματα

4.1 Χημικό Μέρος

Η δομή του συμπλόκου TPAC επιλύθηκε με περίθλαση ακτίνων X μονοκρυστάλλου και χαρακτηρίστηκε με την εύρεση διαλυτότητας, σημείου τήξεως καθώς και με τις φασματοσκοπίες υπεριώδους – ορατού UV-vis, πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), φθορισμού ακτίνων X (XRF) και φασματοσκοπία υπερύθρου (FTIR).

4.1.1 Περίθλαση Ακτίνων-X Μονοκρυστάλλου

Η κυβελίδα περιέχει 2 ισομερή μόρια όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα, με διαφορετικές αποστάσεις στους δεσμούς. Η γεωμετρία γύρω από το αντιμόνιο είναι τριγωνική διπυραμίδα. Γύρω από κάθε αντιμόνιο (Sb) υπάρχουν τρεις άνθρακες από τα φαινύλια στο ισημερινό επίπεδο. Τα δύο οξυγόνα από τις υδρόξυ-ομάδες της καρβακρόλης κατέχουν τις αξονικές θέσεις. Το ισημερινό επίπεδο ορίζεται από τους τρεις άνθρακες των φαινυλίων και το αντιμόνιο. Τις αξονικές θέσεις της τριγωνικής διπυραμίδας καταλαμβάνουν τα οξυγόνα των υδρόξυ-ομάδων κάθε καρβακρόλης. Κάθε μόριο καρβακρόλης έχει αποπρωτονιωθεί και έχει γίνει η ένταξη στο αντιμόνιο, με ομοιοπολικό δεσμό. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η δομή των δύο ισομερών του συμπλόκου TPAC αριστερά και δεξιά (στο πρώτο ισομερές) φαίνεται η καρβακρόλη η οποία έχει ενταχθεί στο αντιμόνιο μέσω του οξυγόνου του υδροξυλίου της, αντίστοιχα η δομή της καρβακρόλης υπάρχει πάνω και κάτω από το αντιμόνιο στο δεύτερο ισομερές. Ενδιάμεσα από τα δύο μόρια καρβακρόλης υπάρχουν τα φαινύλια. Παρακάτω φαίνονται οι δομές των δύο ισομερών του συμπλόκου.



Εικόνα 17. Τα δύο ισομερή της δομής του συμπλόκου TPAC

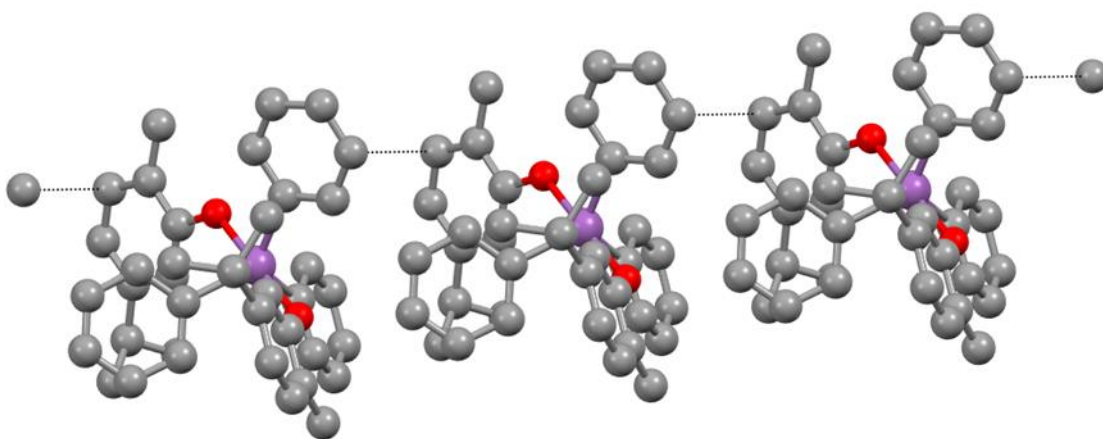
Οι αποστάσεις των δεσμών για το πρώτο μόριο είναι $\text{Sb}(1) - \text{O}(1) \rightarrow 2.054$ και $\text{Sb}(1) - \text{O}(2) \rightarrow 2.045$. Ενώ για το δεύτερο ισομερές είναι $\text{Sb}(2) - \text{O}(3) \rightarrow 2.043$ και $\text{Sb}(2) - \text{O}(4) \rightarrow 2.032$. Αντίστοιχα, οι αποστάσεις των αντιμονίου από τους γειτονικούς άνθρακες είναι για το πρώτο ισομερές $\text{Sb}(1) - \text{C}(035) \rightarrow 2.122$, $\text{Sb}(1) - \text{C}(032) \rightarrow 2.069$, $\text{Sb}(1) - \text{C}(004) \rightarrow 2.145$ και για το δεύτερο ισομερές $\text{Sb}(2) - \text{C}(006) \rightarrow 2.106$, $\text{Sb}(2) - \text{C}(012) \rightarrow 2.090$, $\text{Sb}(2) - \text{C}(0130) \rightarrow 2.129$. Οι αποστάσεις αυτές δηλώνουν πως οι δεσμοί αυτοί τείνουν προς απλό δεσμό.

Στον παρακάτω πίνακα υπάρχουν τα κρυσταλλικά δεδομένα της νέας ένωσης που περιλαμβάνουν τον μοριακό τύπο και βάρος τις γωνίες και τις αποστάσεις των δεσμών κτλ.

Πίνακας 1. Κρυσταλλικά δεδομένα του συμπλόκου TPAC

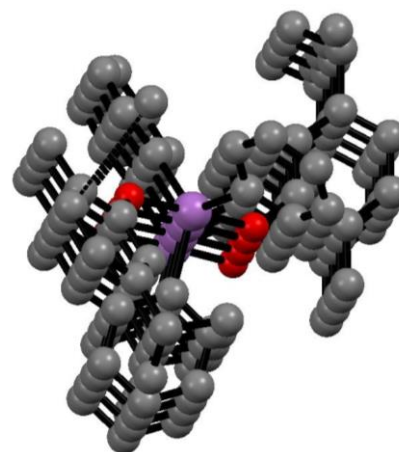
M.T.	C₃₈H₃₉O₂Sb
M.B.	651.51
Temperature (K)	0
Κρυσταλλικό Σύστημα	Τρικλινές
Space Group	P-1
a (Å)	8.8589(5)
b (Å)	19.3814(12)
c (Å)	19.9996(14)
α (°)	100.794 (2)
β (°)	99.840(2)
γ (°)	96.308(2)
V (Å)³	3287.6(4)
F (000)	1180
D_{calc} (mg/m³)	1.233
Z Z'	Z:4, Z':0
Τελικές ενδείξεις R -Factor	9.44

Διαμοριακές συνδέσεις, στην περίπτωση του συμπλόκου TPAC συμβαίνουν δημιουργώντας ένα πολυμερές μιας διάστασης (1-D). Τα μόρια συνδέονται διαμοριακά με πi-πi stacking η οποία αναφέρεται σε ελκυστικές, μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αρωματικών δακτυλίων, καθώς περιέχουν δεσμούς πi. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις είναι σημαντικές για τη συσσώρευση νουκλεοβάσεων εντός των μορίων DNA και RNA, αναδίπλωση πρωτεϊνών, σύνθεση κατευθυνόμενη σε πρότυπα, επιστήμη υλικών και μοριακή αναγνώριση, αν και κάποια έρευνα υποδηλώνει ότι το πi-πi stacking μπορεί να μην είναι λειτουργικό σε μερικές από αυτές τις εφαρμογές. Επίσης, τα συνδεδεμένα μόρια του συμπλόκου σχηματίζουν μια δομή σαν ινίδιο.



Εικόνα 18. Τρία μόρια TPAC συνδεδεμένα μεταξύ τους σχηματίζοντας ινίδιο

Στις εικόνες απεικονίζεται η ένωση TPAC με διαμοριακές συνδέσεις, η οποία οδηγεί σε ένα πολυμερικό συγκρότημα δημιουργώντας ένα 1D συγκρότημα. Τα δύο μόρια συνδέονται μεταξύ των ανθράκων και η απόσταση του δεσμού από το ένα μόριο στο άλλο είναι 3.394Å.



Εικόνα 19. Τέσσερα μόρια TPAC με ενδομοριακές συνδέσεις δημιουργούν ένα 1D συγκρότημα

Ακολουθεί πίνακας με τις κυριότερες γωνίες δεσμών της ένωσης μεταξύ αντιμονίου και οξυγόνου ή αντιμονίου και ανθράκων των δύο ισομερών.

Πίνακας 1. Επιλεγμένες γωνίες δεσμών για τα δύο ισομερή

Atom1	Atom2	Atom3	Angle		Atom1	Atom2	Atom3	Angle
O1	Sb1	C004	91.6(5)		O3	Sb2	O4	177.7(4)
O1	Sb1	O2	179.0(4)		O3	Sb2	C006	90.6(5)
O1	Sb1	C032	85.9(5)		O3	Sb2	C012	95.2(5)
O1	Sb1	C035	94.3(5)		O3	Sb2	C013	86.1(5)
C004	Sb1	O2	89.3(5)		O4	Sb2	C006	91.2(5)
C004	Sb1	C032	123.2(6)		O4	Sb2	C012	84.9(5)
C004	Sb1	C035	119.6(6)		O4	Sb2	C013	91.8(5)
O2	Sb1	C032	93.3(5)		C006	Sb2	C012	122.2(6)
O2	Sb1	C035	85.5(5)		C006	Sb2	C013	117.0(6)
C032	Sb1	C035	117.3(6)		C012	Sb2	C013	120.7(6)
Sb1	O1	C054	125.5(9)		Sb2	O3	C021	126.9(9)
Sb1	C004	C058	119(1)		Sb2	O4	C042	129.2(9)
Sb1	C004	C077	117(1)		Sb2	C006	C024	119(1)
C058	C004	C077	124(2)		Sb2	C006	C043	120(1)
Sb1	O2	C015	128.3(9)		C024	C006	C043	120(2)
Sb1	C032	C048	119(1)		C021	C007	C022	121(1)
Sb1	C032	C052	123(1)		C012	C009	C028	118(2)
C048	C032	C052	118(1)		C013	C011	C020	118(1)
Sb1	C035	C036	117(1)		Sb2	C012	C009	118(1)
Sb1	C035	C064	119(1)		Sb2	C012	C045	121(1)

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται κάποιες πληροφορίες σχετικά με ενώσεις πεντασθενούς αντιμονίου. Οι παρακάτω είκοσι πέντε ενώσεις έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό ότι είναι ενώσεις του τρυφένυλο - αντιμονίου με αλκόολες αλλά και άλλα μόρια. Στον πίνακα φαίνονται οι γωνίες και οι αποστάσεις δεσμών αντιμονίου ανθράκων και οξυγόνων.

Πίνακας 2. Παράμετροι μοναδιαίας κυψελίδας, αποστάσεις δεσμών και μέγεθος γωνιών των διάφορων πολυμόρφων του TPAC

Σύμπλοκο	Space group	Μοναδιαία Κυψελίδα		d(Sb...O) (Å)	d(Sb...C) (Å)	Πηγές
		a, b, c (Å)	α, β, γ (°)			
Shelx, TPAC (2 ισομερή) C ₃₈ H ₃₉ O ₂ Sb	P 1	8.8589(5)	100.794(2)	2.043(O1)	2.122(C035)	*
		19.3814(12)	99.840(2)	2.032(O2)	2.143(C004)	
		19.9996(14)	96.308(2)	2.054(O3)	2.069(C032)	
				2.045(O4)	2.090(C012)	
					2.106(C006)	
					2.073(C71)	
2 C ₃₃ H ₂₅ Br ₆ O ₂ Sb	P-1	9.8333(3)	110.806(2)	2.102(O1)	2.090(C11)	[Diaroxides V. V. et al., 2016]
		14.4216(4)	106.205(2)	2.103(O2)	2.109(C1)	
		14.6978(5)	103.980(2)		2.129(C013)	
1 C ₃₀ H ₂₀ Br ₂ F ₃ O ₂ Sb, C ₃ H ₃	P 21/c	8.9480(4)	90.00	2.049(O1)	2.125(C11)	[V. V. Sharutin, et al. , 2016]
		17.5127(7)19.	97.825(2)	2.055(O2)	2.105(C1)	
		8352(10)	90.00		2.124(C21)	
1_CCDC1 C ₃₀ H ₂₃ Br ₂ O ₂ Sb	P 21/c	15.5926(8)	90.00	2.063(O1)	2.107(C11)	[, V.V. Sharutin, et al., , 2016]
		9.1094(4)	111.894(2)	2.066(O2)	2.109(C1)	
		20.5019(10)	90.00		2.094(C21)	
2_CCDC1 (2 ισομερή) 2(C ₃₀ H ₁₉ Cl ₆ O ₂ Sb)	P 1	9.9802(4)	88.291(2)	2.094(O1)	2.125(C11)	-
		10.6327(5)	78.003(2)	2.100(O2)	2.118(C1)	
		15.7091(8)	68.230(2)	2.098(O3)	2.112(C21)	
				2.093(O4)	2.066(C61)	
					2.096(C51)	
					2.073(C71)	
2_CCDC1 (2 ισομερή) C ₃₀ H ₂₀ F ₃ N ₂ O ₆ Sb	P 1	10.0009(18)	108.277(12)	2.079(O1)	2.047(C11)	[Syntheses and Structures V. V. Sharutin et al.,2017]
		10.2829(19)	102.798(12)	2.059(O4)	2.007(C1)	
		14.882(3)	93.523(11)	2.076(O7)	2.117(C21)	
				2.062(O1 0)	2.176(C61)	
					2.157(C51)	
					2.155(C71)	
Sbi13 C ₃₀ H ₂₃ I ₂ O ₂ Sb	P 21/c	15.4189(8)	90.00	2.069(O1)	2.105(C41)	[V. V. Sharutin, et al., 2016]
		8.9576(5)	110.6680(10)	2.066(O2)	2.004(C51)	
		20.8616(10)	90.00		2.103(C31)	
x1_m C ₃₀ H ₂₅ O ₂ Sb	P 21/c	8.7107(12)	90.00	2.056(O1)	2.095(C41)	-
		15.728(2)	101.312(2)	2.046(O2)	2.122(C51)	
		18.308(2)	90.00		2.121 (C31)	
1_CCDC2 C ₃₂ H ₂₅ Br ₄ O ₂ Sb	P -1	10.1942(6)	87.547(3)	2.088(O1)	2.110(C1)	-
		11.0622(6)	78.460(3)	2.089(O2)	2.111(C11)	
		15.3136(8)	69.703(3)		2.090(C21)	
2_CCDC3 C ₁₅ H ₆ C ₁₅ F _{1.5} OSb _{0.5}	C 2/c	19.5509(6)	90.00		2.099(COAA)	-
		16.2475(5)	102.6680(10)	2.101(O1)	2.099(COAA)	
		10.8305(3)	90.00	2.101(O1)	2.099(COAA)	
					2.096(C11)	

omnosbph3_1 C ₄₉ H ₆₂ NO ₃ Sb	P -1	10.1118(8) 13.5373(13) 18.3274(19)	79.614(8) 75.726(8) 69.369(8)	2.094(O1) 2.103(O2)	2.107(C2) 2.158(C9) 2.159(C11)	-
3 (2 ισομερή) 2(C ₃₃ H ₂₁ F ₁₀ O ₂ Sb)	P-1	9.5396(2) 11.9366(4) 14.0181(5)	83.451(2) 87.6330(10) 76.6990(10)	2.094(O1) 2.059(O4) 2.057(O4) 2.091(O5)	2.076(C11) 2.026(C1) 2.066(C21) 2.137(C61) 2.114(C51) 2.109(C71)	[V. V. Sharutina,,et al.,2017
55 C ₃₆ H ₃₄ Br ₆ N ₃ O ₂ Sb	C 2/c	20.6516(11) 12.8059(6) 15.0699(8)	90.00 99.417(2) 90.00	2.088(O1) 2.088(O1)	2.095(C1B) 2.083(C1A) 2.083(C1A)	
1_CCDC3 C ₃₀ H ₁₅ Cl ₁₀ O ₂ Sb	P 21/c	15.9913(11) 12.3417(8) 18.3142(11)	90.00 113.454(2) 90.00	2.100(O1) 2.100(O2)	2.109(C11) 2.104(C1) 2.119(C21)	[V. V. Sharutina,,et al.,2017, 2017
2_CCDC4 C ₃₃ H ₂₉ N ₂ O ₆ Sb	P 21/c	9.6944(4) 25.6386(9) 12.9758(5)	90.00 108.604(2) 90.00	2.106(O1) 2.094(O4)	2.103(C11) 2.120(C1) 2.106(C21)	[V. V. Sharutina,,et al.,2017
1_CCDC4 3(C ₃₃ H ₂₇ Br ₄ O ₂ Sb)	R 3	22.533(2) 22.533(2) 17.8277(17)	90.00 90.00 120.00	2.088(O1) 2.068(O2)	2.127(C11) 2.100(C1) 2.088(C21)	
3_CCDC4 (2 ισομερή) 2(C ₃₀ H ₁₂ F ₁₃ O ₂ Sb)	P 1	11.1514(7) 11.4162(7) 12.9511(8)	104.365(2) 112.838(2) 99.514(3)	2.075(O1) 2.091(O2) 2.092(O4) 2.074(O5)	2.081(C11) 2.058(C1) 2.099(C21) 2.144(C61) 2.091(C51) 2.114(C71)	[V. V. Sharutina,,et al.,2017
5 C ₃₀ H ₁₈ Br ₄ F ₃ O ₂ Sb	P 2 ₁ /n	8.972(2) 16.856(4) 20.550(6)	90.00 98.081(11) 90.00	2.057(O1) 2.049(O2)	2.114(C11) 2.103(C1) 2.086(C21)	[V. V. Sharutin et al., 2016
3_CCDC2 (2 ισομερή) 2(C ₃₃ H ₂₁ Cl ₁₀ O ₂ Sb)	P 1	9.7898(5) 14.6044(8) 15.6781(9)	107.288(2) 98.780(3) 94.547(3)	2.122(O1) 2.084(O2) 2.155(O3) 2.095(O4)	2.101(C11) 2.124(C1) 2.103(C21) 2.135(C61) 2.120(C51) 2.100(C71)	
741_0m C ₃₃ H ₂₉ Br ₂ O ₂ Sb	P 4 ₁	9.4445(4) 9.4445(4) 34.6574(19)	90.00 90.00 90.00	2.064(O1) 2.044(O2)	2.098(C11) 2.087(C1) 2.098(C21)	[V. V. Sharutin et al., 2017]
2_CCDC5 C ₄₄ H ₃₉ N ₂ O ₆ Sb	P 2 ₁ /n	9.2350(5) 36.876(2) 11.5513(7)	90 90.440(2) 90	2.060(O1) 2.068(O2)	2.116(C13) 2.115(C25) 2.103(C1)	
LUPJEL C ₃₀ H ₁₉ Br ₆ O ₂ Sb	P 1	10.155(2) 10.963(2) 15.915(3)	88.859(3) 77.404(4) 67.729(3)	2.099(O1) 2.091(O2)	2.095(C13) 2.106(C7) 2.105(C1)	

2_CCDC6 C ₃₀ H ₁₂ Cl ₁₀ F ₃ O ₂ Sb	P 1	9.6108(11) 10.8945(13) 16.824(2)	98.129(5) 93.674(5) 104.553(4)	2.052(O1) 2.051(O2)	2.114(C25) 2.113(C13) 2.121(C19)	[V. V. Sharutin et al., 2017
1_CCDC5 C ₃₀ H ₂₀ Cl ₂ F ₃ O ₂ Sb, C ₃ H ₃	P 2 ₁ /c	8.9462(10) 17.178(2) 19.736(2)	90.00 97.222(4) 90.00	2.098(O1) 2.106(O2)	2.114(C21) 2.105(C1) 2.121(C11)	[V. V. Sharutin et al., 2016]

4.1.2 Διαλυτότητα

Μετά τη σύνθεση της ουσίας προσδιορίστηκε η διαλυτότητα της ουσίας σε κάποιους διαλύτες ώστε να βρεθεί πού είναι διαλυτό το σύμπλοκο και να οριστεί και ο διαλύτης ο οποίος θα χρησιμοποιείται και στα επόμενα πειράματα.

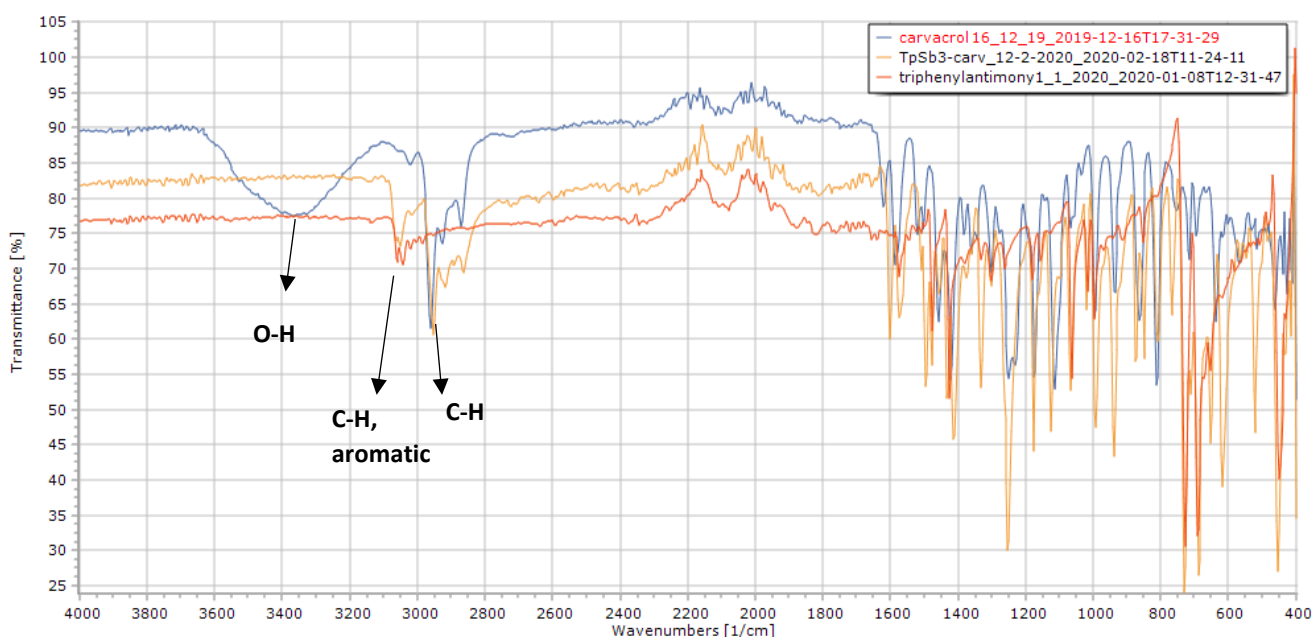
Πίνακας 3. Πίνακας διαλυτότητας

Διαλύτες	TPAC
n-hexane	+
Toluene	-
CH ₂ Cl ₂	-
CHCl ₃	-
Acetone	-
MeOH	+
MeCN	+
DMSO	+
H ₂ O	-

4.1.3 Σημείο Τήξης

Βρέθηκε το σημείο τήξης του συμπλόκου των τριών ουσιών. Η καρβακρόλη είναι υγρή στους 25 °C. Το Ph₃Sb έχει σημείο τήξης στους 52-54 °C και το σύμπλοκο TPAC στους 105-110 °C. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν τον σχηματισμό ενός νέου συμπλόκου.

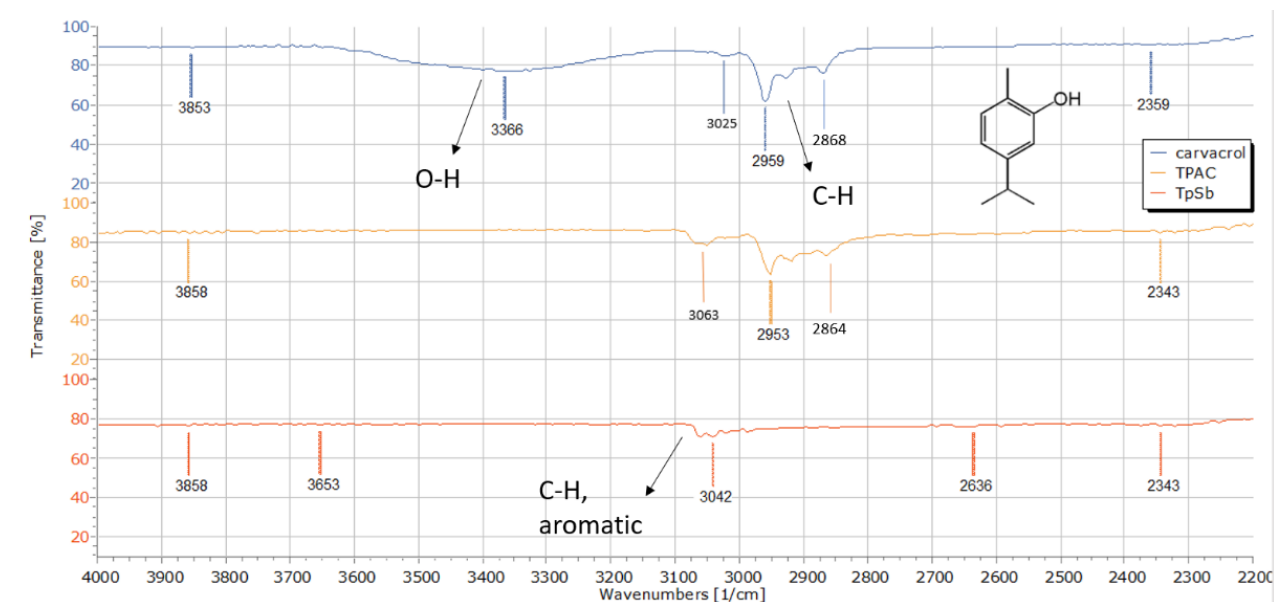
4.1.4 Φασματοσκοπία υπερύθρου ATR-FT-IR



Εικόνα 20. Φάσμα IR του συμπλόκου TPAC συγκριτικά με το φάσμα της καρβακρόλης και του τριφενυλοαντιμόνιο

Στην εικόνα 20 απεικονίζονται οι δονήσεις των δεσμών του συμπλόκου TPAC (κίτρινο χρώμα) σε συγκριση με τις δονήσεις των δεσμών των δυο ligands, τριφενυλοαντιμόνιο (κόκκινο) και καρβακρόλη (μπλέ). Παρατηρείται στους 3366 κυμματάριθμους οι δονήσεις δεσμού οξυγόνου-

υδρογόνου (O-H) με μία ευρεία κορυφή στο φάσμα της καρβακρόλης, όπου το οξυγόνο συμμετέχει σε δεσμό υδρογόνου γι' αυτό και η κορυφή είναι ευρεία. Αυτή η δόνηση απουσιάζει από το φάσμα του συμπλόκου.

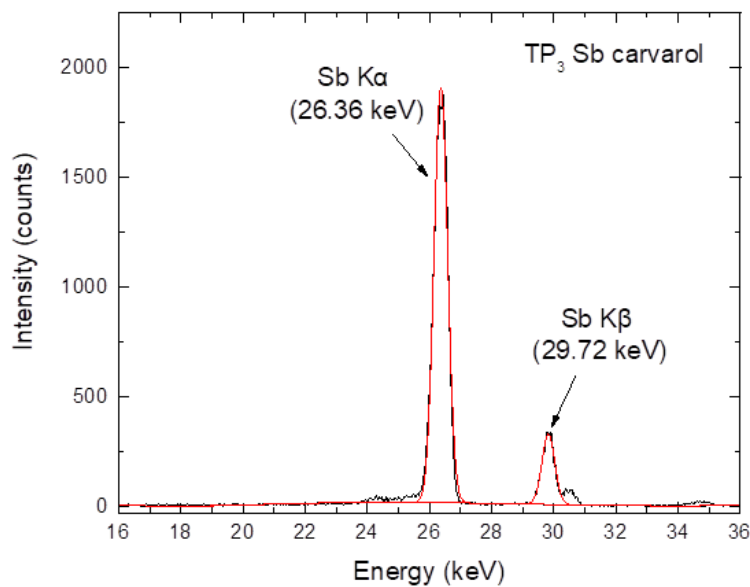


Εικόνα 21. Φάσμα IR του TPAC και των δύο ligands από 4000-2200 κυματάριθμους

Έπειτα, το φάσμα του τριφένυλο-αντιμονίου παρατηρούνται οι δονήσεις των δεσμών αρωματικού άνθρακα-υδρογόνου στους 3042 κυματάριθμους και στο φάσμα της καρβακρόλης οι ίδιες δονήσεις δεσμών εμφανίζονται στους 3025 κυματάριθμους, ενώ στο φάσμα του συμπλόκου εμφανίζονται στους 3063 κυματάριθμους, ελαφρώς μετατοπισμένες λόγω της ένταξης. Τέλος, εμφανίζονται από τους 2959 έως 2868 κυματάριθμους οι δονήσεις δεσμών του άνθρακα-υδρογόνου της αλειφατικής αλυσίδας στο φάσμα της καρβακρόλης και εμφανίζονται και στο φάσμα του συμπλόκου από τους 2953 έως τους 2864 κυματάριθμους. Από τα παραπάνω βγαίνει το συμπέρασμα πως έχει προκύψει ένα νέο σύμπλοκο.

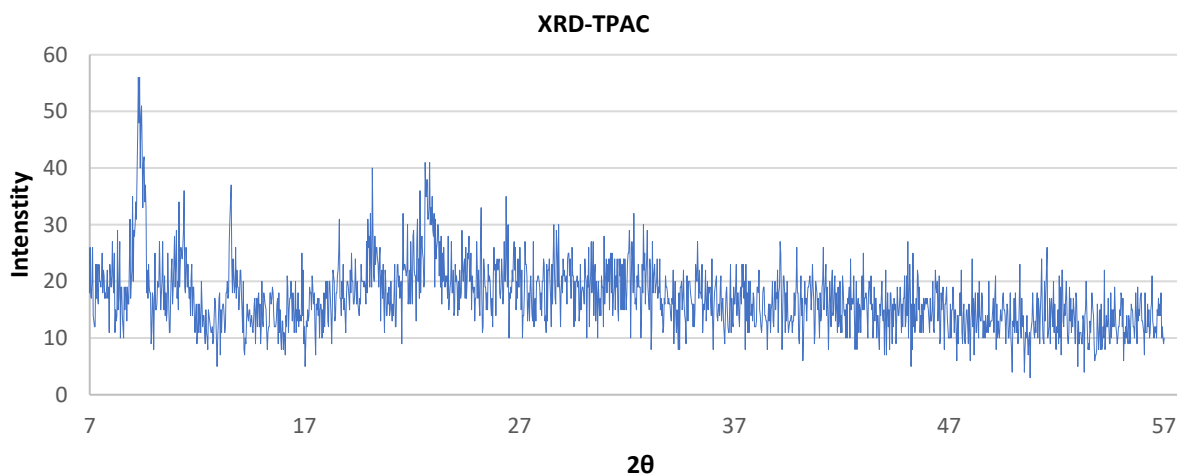
4.1.5 Φασματοσκοπία Ακτίνων X (XRF)

Από την φασματοσκοπία φθορισμού ακτίνων X βρέθηκε το ποσοστό του αντιμονίου στην ένωση το οποίο είναι $22 \pm 3\%$, το θεωρητικό ποσοστό αντιμονίου που θα περιείχε η ένωση υπολογίστηκε 19% και ταιριάζει με την μέτρηση του XRF. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται το φάσμα ακτίνων X του συμπλόκου.



Εικόνα 22. Φάσμα XRF, περιετικότητα TPAC σε αντιμόνιο

4.1.6 X-ray Powder Diffraction (XRPD)



Εικόνα 23. Φάσμα XRD του συμπλόκου TPAC

Στην παραπάνω εικόνα (23) φαίνεται το φάσμα XRD του συμπλόκου TPAC. Από το γράφημα αυτό προκύπτει ότι η σκόνη του προϊόντος είναι μικροκρυσταλλική λόγω των κορυφών που εμφανίζονται.

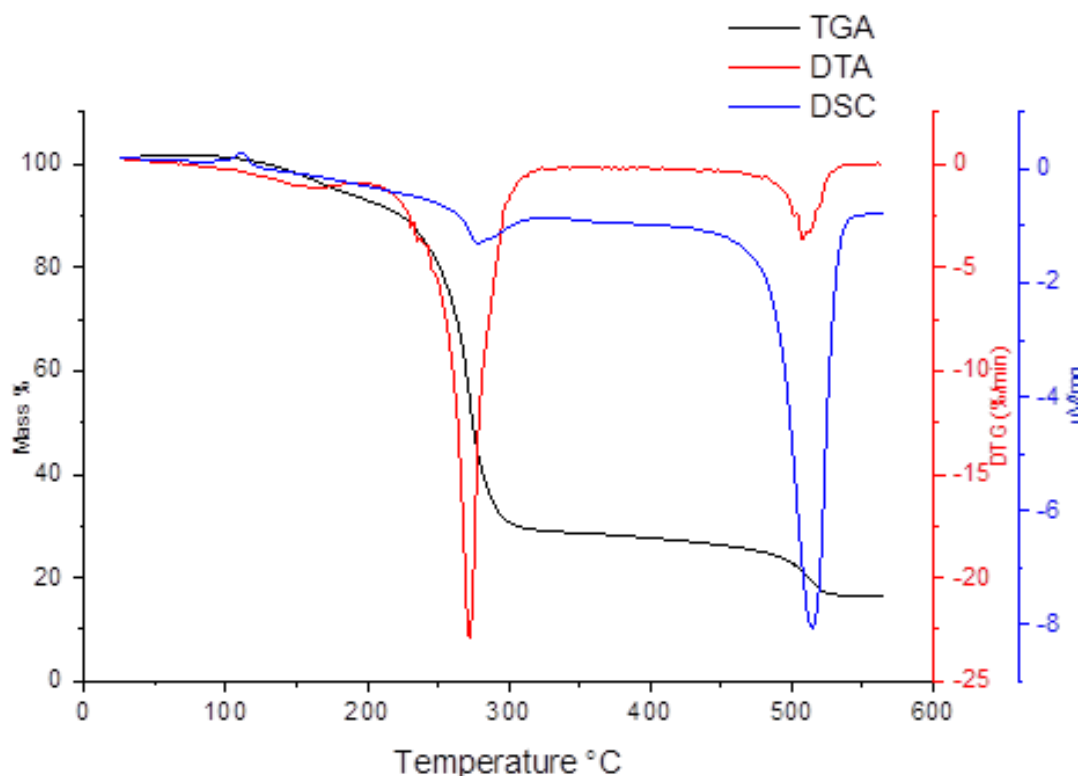
4.1.7 Θερμική Ανάλυση

Κατά την θερμοβαρτομετρική ανάλυση TGA καταγράφεται η μεταβολή βάρους του δείγματος συναρτήσει της θερμοκρασίας. Η Διαφορική Θερμική Ανάλυση DTA καταγράφει μόνο μεταβολές που συνοδεύονται από μεταβολή ενθαλπίας, δηλαδή φυσικές διεργασίες ή χημικές μεταβολές.

Οι πληροφορίες που μπορούμε να αντλήσουμε από ένα τέτοιο διάγραμμα είναι :

1. Φυσικές ενδόθερμες διεργασίες είναι η τήξη, η εξάτμιση, η εξάχνωση, η απορρόφηση και η εκρόφηση.
2. Εξώθερμες διεργασίες είναι συνήθως η προσρόφηση και η κρυστάλλωση.
3. Οι χημικές αντιδράσεις μπορούν επίσης να είναι ενδόθερμες ή εξώθερμες. Ενδόθερμες αντιδράσεις είναι η αφυδάτωση, η αναγωγή σε ατμόσφαιρα αερίου και η διάσπαση.
4. Εξώθερμες αντιδράσεις είναι η οξείδωση παρουσία αέρα ή οξυγόνου, ο πολυμερισμός και οι καταλυτικές αντιδράσεις.

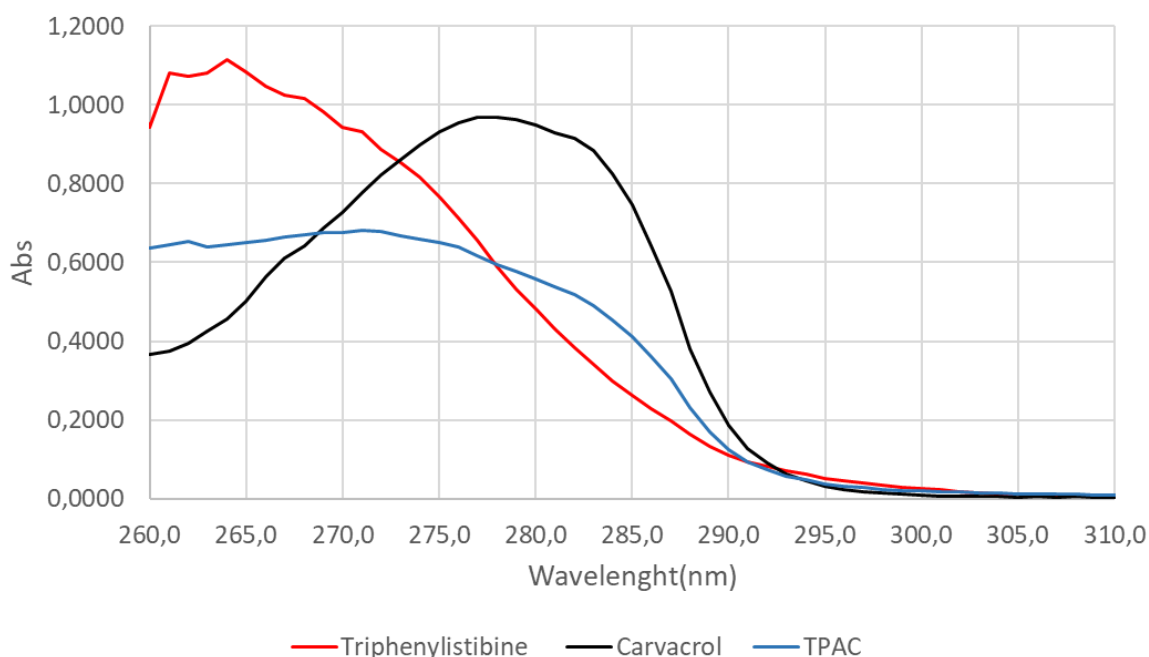
Τέλος, η τεχνική της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης DSC, συνδέεται στενά με το DTA. Η θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (DSC) είναι ένα αποτελεσματικό αναλυτικό εργαλείο για τον χαρακτηρισμό των φυσικών ιδιοτήτων ενός υλικού. Το DSC επιτρέπει τον προσδιορισμό των θερμοκρασιών τήξης, κρυστάλλωσης και μεσομορφικής μετάβασης, καθώς και τις αντίστοιχες αλλαγές ενθαλπίας και εντροπίας, και χαρακτηρισμό της υαλώδους μετάβασης που δείχνουν είτε αλλαγές στη χωρητικότητα θερμότητας είτε σε λανθάνουσα θερμότητα.



Εικόνα 24. Θερμική ανάλυση TGA, DTA

Στην παραπάνω εικόνα (24) φαίνεται το θερμογράφημα TGA-DTA-DSC του συμπλόκου TPAC. Μια μικρή απώλεια βάρους καταγράφεται στην περιοχή μεταξύ 158 και 239 °C, ενώ η κύρια απώλεια βάρους καταγράφεται στην περιοχή μεταξύ 239 και 302 °C και ακολουθεί μια τελευταία στους 500 °C . Η θερμοβαθμική ανάλυση (TG / DTA) και η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC) του συμπλόκου TPAC, πραγματοποιήθηκε υπό αέρα, ενώ ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας είναι 10°C min⁻¹ από θερμοκρασία περιβάλλοντος έως 800°C. Η ένωση αποσυντίθεται με τρία ενδοθερμικά βήματα σε μέσες θερμοκρασίες : 157, 272 και 507°C. Η συνολική απώλεια μάζας είναι 83,62%. Το υπόλοιπο 16,38% αντιστοιχεί στο οξείδιο του αντιμονίου από το οποίο περίπου το 13% αντιστοιχεί στο αντιμόνιο έναντι του 19% του θεωρητικού ποσοστού που είχε υπολογιστεί.

4.1.8 Φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους UV-vis



Εικόνα 25. Φάσμα UV του συμπλόκου συγκριτικά με την καρβακρόλη και του τριφένυλο-αντιμόνιο

Στην παραπάνω εικόνα (25) παρουσιάζονται τα φάσματα ορατού υπεριώδους σε διαλύματα DMSO του τριφένυλ-αντιμονίου (κόκκινο) σε συγκέντρωση 10^{-4} M, της καρβακρόλης (μαύρο) σε συγκέντρωση $5 \cdot 10^{-5}$ M και του συμπλόκου σε συγκέντρωση 10^{-4} M (μπλε). Από τα λ_{\max} του κάθε φάσματος βρέθηκε η απορρόφηση και υπολογίστηκε ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Συντελεστής μοριακής απορρόφησης των ligands

	Carvacrol	Triphenylstibine
λ_{\max} (nm)	277	264
ϵ ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	$1,938 \cdot 10^4$	$1,114 \cdot 10^4$

Έπειτα, από τα λ_{\max} των δύο υποκατάστατων βρέθηκε στα ίδια μήκη κύματος η απορρόφηση του συμπλόκου και υπολογίστηκε ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης (ϵ), ο οποίος είναι μοναδικός για κάθε ένωση (Πίνακας 5).

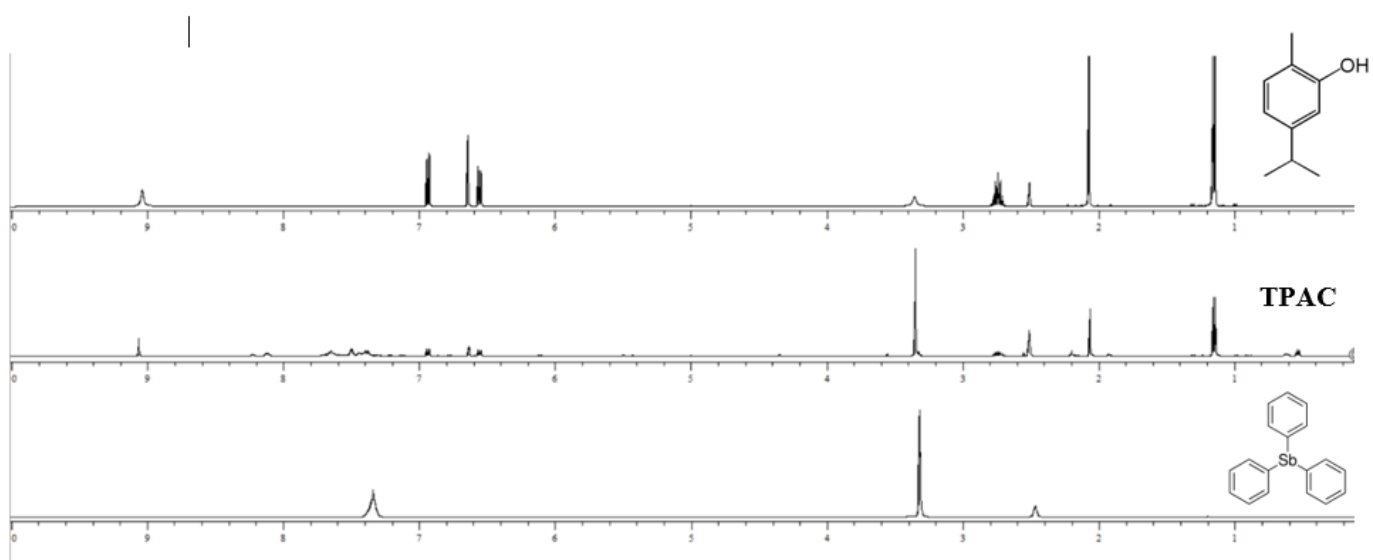
Πίνακας 5. Συντελεστής μοριακής απορρόφησης του TPAC

TPAC	
λ_{\max} (nm)	ϵ ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
277	$0,644 \cdot 10^4$
264	$0,618 \cdot 10^4$

Από τα φάσματα UV των ενώσεων σε διάλυμα DMSO υπολογίστηκε ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης ϵ για την κάθε ένωση σύμφωνα με το λ_{\max} της κάθε ουσίας και βρέθηκε διαφορετικό λ_{\max} της ένωσης TPAC σε σχέση με τις άλλες δύο ενώσεις. Άρα, έχει προκύψει μια νέα ένωση.

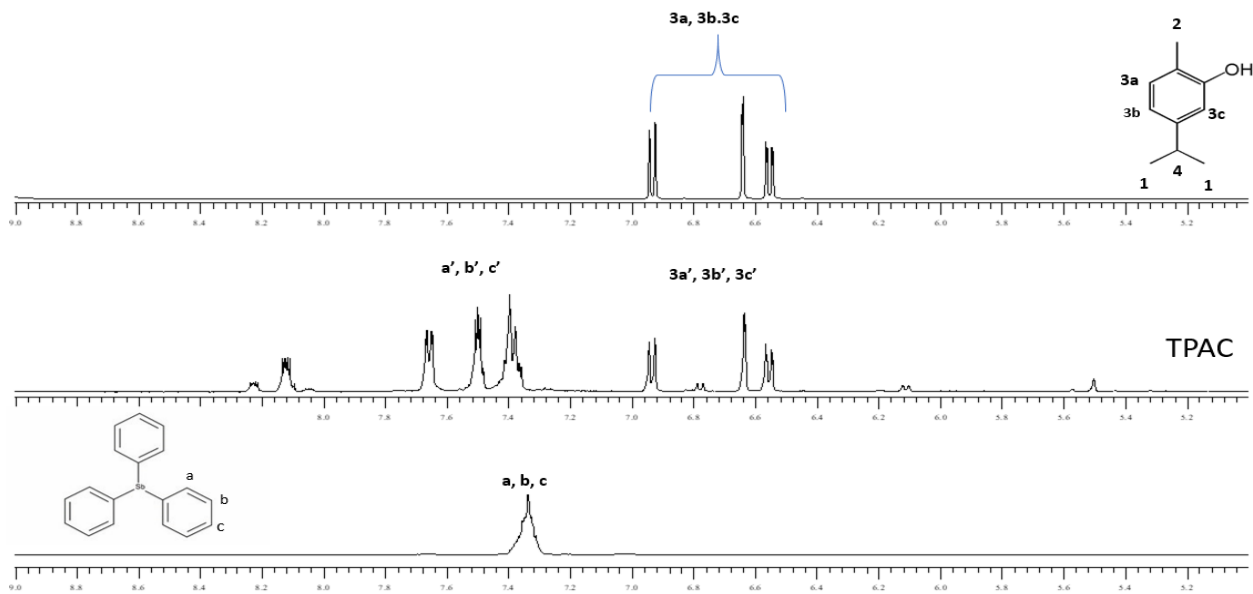
4.1.9 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού NMR

Στην παρακάτω εικόνα (26) εμφανίζεται το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της καρβακρόλης, του συμπλόκου TPAC και του τριφένυλο-αντιμονίου σε διάλυμα δευτεριωμένου DMSO (DMSO-d_6).

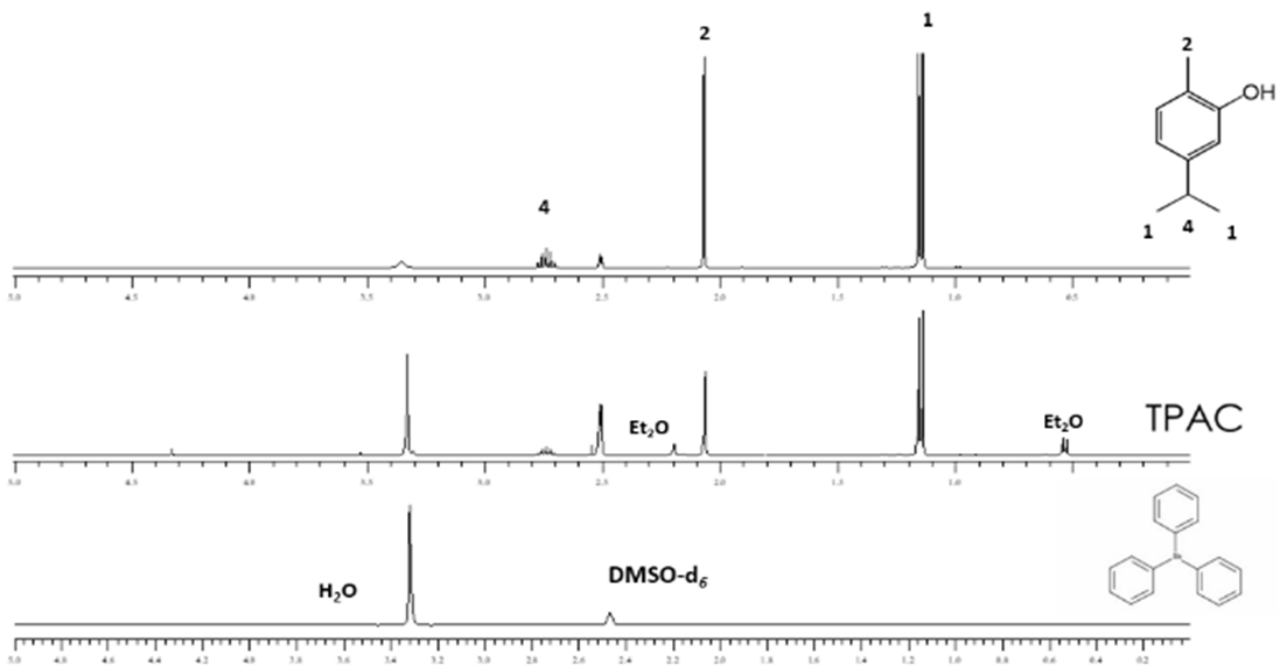


Εικόνα 26. Φάσμα NMR 10-1ppm

Στην εικόνα 27 παρουσιάζονται τα φάσματα NMR από 10-5 ppm. Στο πρώτο φάσμα της καρβακρόλης σε διάλυμα DMSO-d_6 εμφανίζονται τα σήματα συντονισμού των υδρογόνων του αρωματικού δακτυλίου από 6,5-7 ppm. Τα ίδια σήματα εμφανίζονται και στο φάσμα του συμπλόκου TPAC. Στο τρίτο φάσμα του τριφένυλο αντιμονίου εμφανίζονται με μία ευρεία κορυφή τα σήματα των υδρογόνων του αρωματικού δακτυλίου του τριφένυλο αντιμονίου. Στο φάσμα του συμπλόκου εμφανίζονται αυτά τα σήματα των υδρογόνων τα οποία έχουν σχαστεί λόγω της δημιουργίας μιας νέας ένωσης. Τα υδρογόνα a εμφανίζονται με μια διπλή κορυφή, τα υδρογόνα b με μια τετραπλή και τα c με μια διπλή.



Εικόνα 28. Φάσμα NMR 10-5 ppm



Εικόνα 27. Φάσμα NMR 5-1 ppm

Στην εικόνα 28 παρουσιάζονται τα σήματα συντονισμού της καρβακρόλης του συμπλόκου TPAC και του τριφένυλοαντιμονίου από 5-1 ppm. Στα 1.1 ppm περίπου εμφανίζονται τα σήματα συντονισμού υδρογόνου των υδρογόνων των μεθυλομάδων της αλειφατικής αλυσίδας, ενώ λίγο μετά περίπου στα 2ppm εμφανίζονται τα σήματα συντονισμού των υδρογόνων της μεθυλομάδες της αλειφατικής αλυσίδας που βρίσκεται δίπλα στην υδρόξυ-ομάδα (-OH) και είναι αποπροστατευμένα. Περίπου στα 2,8 ppm εμφανίζονται, με μία πολλαπλή κορυφή, τα σήματα συντονισμού των υδρογόνων του άνθρακα που βρίσκεται μεταξύ των μεθυλομάδων της αλειφατικής αλυσίδας. Αυτά τα σήματα συντονισμού υπάρχουν και στο σύμπλοκο ενώ απουσιάζουν από το φάσμα του τριφενυλοαντιμονίου. Συνεπώς, υπάρχει η νέα ένωση στο διάλυμα DMSO-d₆.

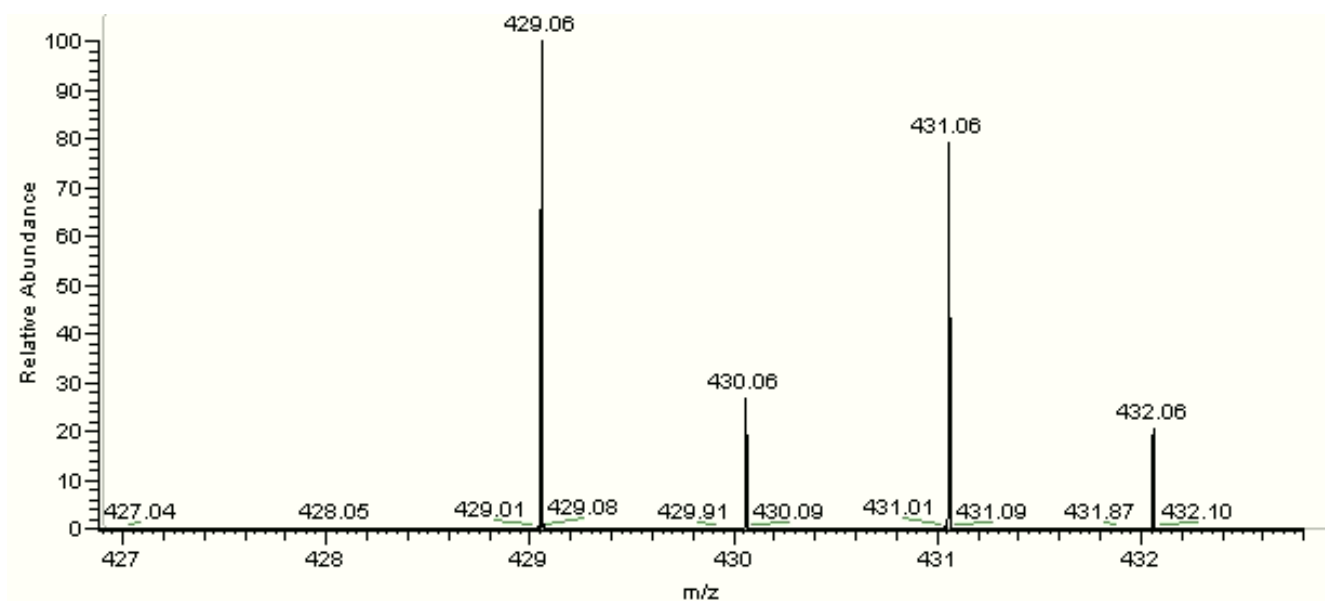
4.1.10 High resolution MS (HRMS)

Φασματομετρία μάζας (MS) είναι μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της αναλογίας μάζας προς φορτίο των ιόντων . Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συνήθως ως φάσμα μάζας , μια γραφική παράσταση έντασης ως συνάρτηση του λόγου μάζας προς φόρτιση. Η φασματομετρία μάζας χρησιμοποιείται σε πολλά διαφορετικά πεδία και εφαρμόζεται σε καθαρά δείγματα καθώς και σε σύνθετα μίγματα.

Ένα φάσμα μάζας είναι μια γραφική παράσταση του σήματος ιόντων ως συνάρτηση του λόγου μάζας προς φόρτιση. Αυτά τα φάσματα χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της στοιχειακής ή ισοτοπικής υπογραφής ενός δείγματος, των μαζών των σωματιδίων και των μορίων , και για να διευκρινιστεί η χημική ταυτότητα ή δομή των μορίων και άλλων χημικών ενώσεων .

Σε μια τυπική διαδικασία MS, ένα δείγμα, το οποίο μπορεί να είναι στερεό, υγρό ή αέριο, ιονίζεται, για παράδειγμα βομβαρδίζοντας το με μια δέσμη ηλεκτρονίων. Αυτό μπορεί να προκαλέσει

τη διάσπαση ορισμένων μορίων του δείγματος σε θετικά φορτισμένα θραύσματα ή απλά να φορτωθούν θετικά χωρίς να κατακερματιστούν. Αυτά τα ιόντα (θραύσματα) στη συνέχεια διαχωρίζονται σύμφωνα με την αναλογία μάζας προς φόρτιση, για παράδειγμα επιταχύνοντάς τα και υποβάλλοντάς τα σε ηλεκτρικό ή μαγνητικό πεδίο: ιόντα του ίδιου λόγου μάζας προς φόρτιση θα υποστούν την ίδια ποσότητα εκτροπής. Τα ιόντα ανιχνεύονται από έναν μηχανισμό ικανό να ανιχνεύει φορτισμένα σωματίδια, όπως έναν πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων. Τα αποτελέσματα εμφανίζονται ως φάσματα της έντασης σήματος των ανιχνευόμενων ιόντων ως συνάρτηση του λόγου μάζας προς φόρτιση. Τα άτομα ή τα μόρια στο δείγμα μπορούν να ταυτοποιηθούν συσχετίζοντας γνωστές μάζες (π.χ. ένα ολόκληρο μόριο) με τις αναγνωρισμένες μάζες ή μέσω ενός χαρακτηριστικού σχεδίου κατακερματισμού.



Εικόνα 29.Χαρακτηριστικό μοτίβο του αντιμονίου υπολογίστηκε με το πρόγραμμα Excalibur

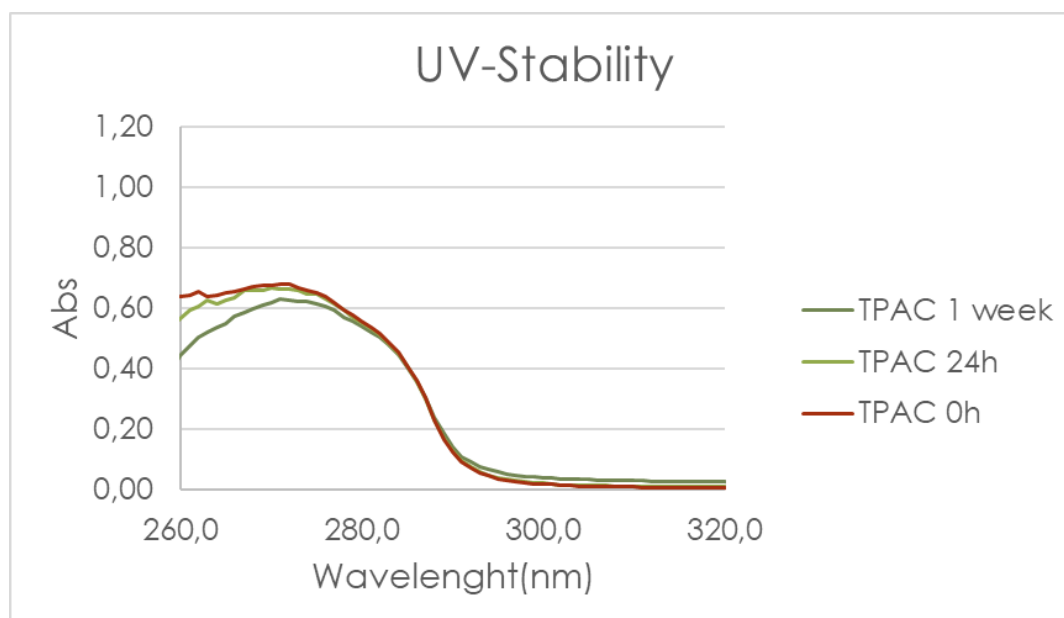
Μετά από την επίλυση της δομής του συμπλόκου TPAC βρέθηκε ότι το μοριακό βάρος είναι 651,51 για αναλογία 1:2 (1 Triphenylstibine : 2 Carvacrol). Μετά την ανάλυση HRMS του συμπλόκου η οποία έγινε σε διάλυμα MeOH, βρέθηκαν μοριακά θραύσματα στα 429 (m/z) το οποίο θα μπορούσε

να αντιστοιχεί στο θραύσμα $C_{22}H_{23}OSb$, το οποίο είναι η δομή χωρίς την μία καρβακρόλη και μία φαινυλο - ομάδα. Αυτή η θραύση αυτών των μορίων είναι πιθανό να συμβεί κατά τη διάρκεια της μέτρησης και η δημιουργία αυτών θα μπορούσε να εξηγηθεί μόνο με την ύπαρξη του TPAC στο αρχικό διάλυμα.

4.1.12 Μελέτες Σταθερότητας

4.1.10.1 Σταθερότητα UV-vis

Μελετήθηκε η σταθερότητα του συμπλόκου σε διάλυμα DMSO σε διάρκεια μια εβδομάδας, με φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους και βρέθηκε πως το σύμπλοκο είναι σταθερό.

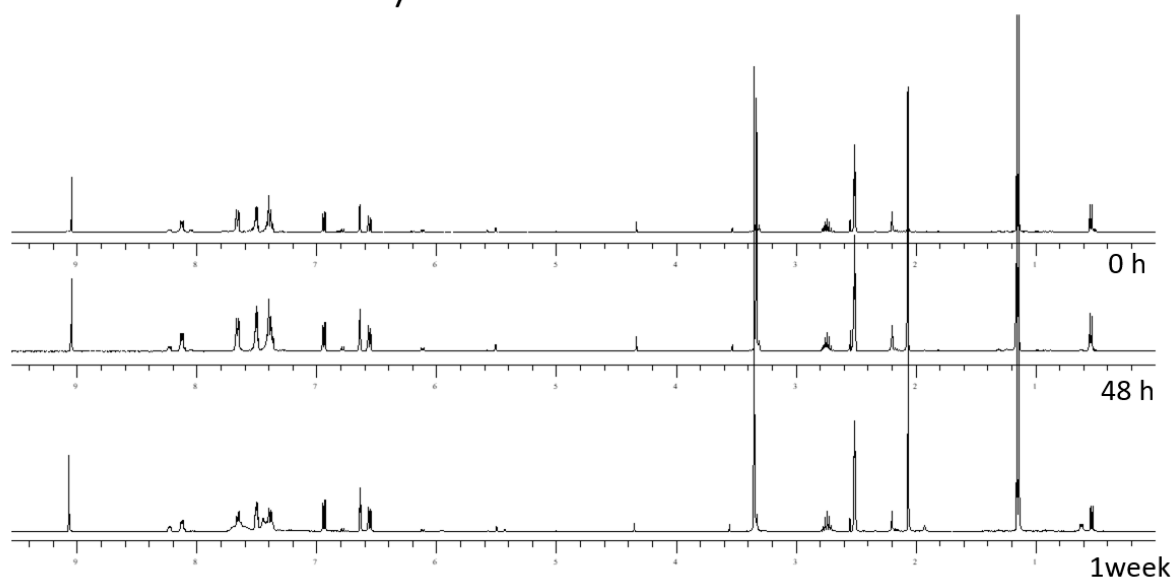


Εικόνα 30. Σταθερότητα συμπλόκου με UV-vis

Μελετήθηκε η σταθερότητα του συμπλόκου σε διάλυμα DMSO σε διάρκεια μιας εβδομάδας, στις μηδέν ώρες (κόκκινο), στις είκοσι τέσσερις ώρες (λαχανί) και στη μία εβδομάδα (πράσινο). Παρατηρήθηκε ότι τα φάσματα ταυτίζονται κυρίως για τις μηδέν και είκοσι τέσσερις ώρες, ενώ παρατηρείται μια μικρή διαφορά στο φάσμα απορρόφησης του συμπλόκου στη μία εβδομάδα όπου μπορεί να οφείλεται στην εξάτμιση του διαλύτη. Από τα φάσματα αυτά βγήκε το συμπέρασμα ότι το σύμπλοκο είναι σταθερό σε διάλυμα DMSO.

4.1.9.2 Σταθερότητα NMR

NMR - Stability



Εικόνα 31. Φάσμα NMR στο οποίο φαίνεται η σταθερότητα της ουσίας

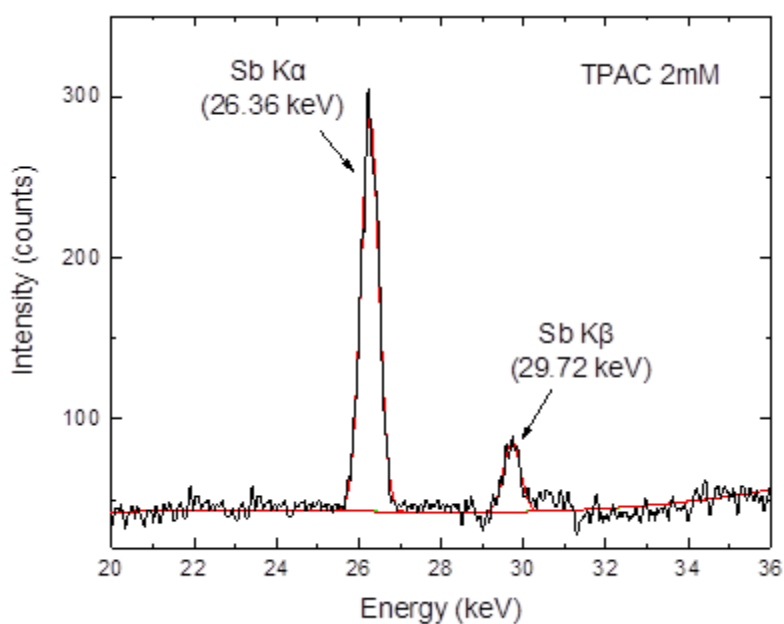
Μελετήθηκε η σταθερότητα της ένωσης TPAC σε διάλυμα DMSO σε διάρκεια μιας εβδομάδας. Στην εικόνα 30 στο πρώτο φάσμα φαίνονται τα σήματα συντονισμού υδρογόνου στις μηδέν ώρες, στο δεύτερο φάσμα είναι τα σήματα συντονισμού υδρογόνου στις σαράντα οκτώ ώρες

ενώ στο τρίτο στη μια εβδομάδα. Παρατηρήθηκε πως τα σήματα συντονισμού ταυτίζονται άρα η ένωση είναι σταθερή σε διάλυμα DMSO.

4.2 Χαρακτηρισμός πολυστυρενίου

Το πολυστυρένιο χαρακτηρίστηκε με δύο μεθόδους, με UV ορατού – υπεριώδους όπου κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη για την εύρεση του ποσοστού του συμπλόκου και με την μέθοδο XRF όπου βρέθηκε το ποσοστό του αντιμονίου σε αυτό.

4.2.1 Φασματοσκοπία Ακτίνων X (XRF)

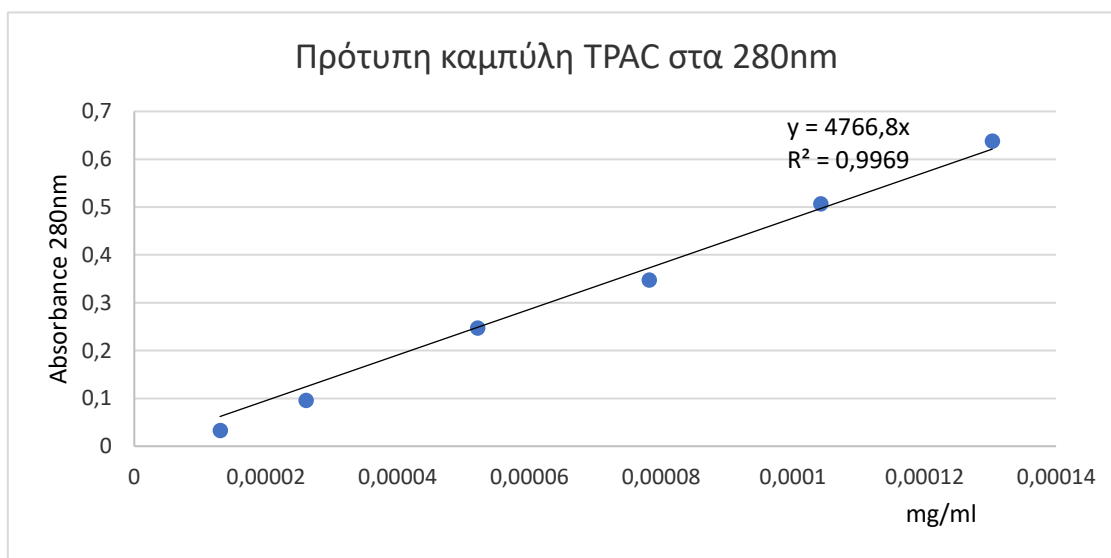


Εικόνα 32. Φάσμα XRF ποσοστού αντιμονίου στο πολυστυρένιο

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του XRF βρέθηκε ότι το ποσοστό του αντιμονίου που υπάρχει στο πολυστυρένιο είναι $(0,69 \pm 0,14)\%$ w/w.

4.2.2 Φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους (UV)

Για τον υπολογισμό του ποσοστού του συμπλόκου TPAC στο πολυστυρένιο κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη του TPAC σε διάλυμα διχλωρομεθανίου στα 280nm, όπου είναι το μήκος κύματος στο οποίο απορροφά το σύμπλοκο TPAC και όχι το πολυστυρένιο.



Εικόνα 33. Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης TPAC στα 280nm

Για το πείραμα αυτό ζυγίστηκαν 1,15g πολυστυρενίου και διαλύθηκαν σε 2ml διχλωρομεθανίου (CH_2Cl_2). Η απορρόφηση αυτού του δείγματος ήταν 0,0571 abs στα 280nm. Από την εξίσωση της γραφικής παράστασης, το μοριακό βάρος του συμπλόκου και το βάρος του πολυστυρενίου που ζυγίστηκε υπολογίστηκε το ποσοστό του συμπλόκου που βρίσκεται στο

πολυστυρένιο το οποίο είναι 1,042%. Αυτό το ποσοστό ταιριάζει με το αποτέλεσμα του XRF το οποίο δίνει το ποσοστό μόνο του αντιμονίου στο σύμπλοκο και είναι $0,69 \pm 0,14$ %. Εκτός από το πολυστυρένιο με TPAC ζυγίστηκε και διαλύθηκε σε CH_2Cl_2 πολυστυρένιο control (1,66g) το οποίο είχε απορρόφηση μικρότερη από το πολυστυρένιο με TPAC.

4.3 Βιολογικό Μέρος

4.3.1 Αντιμικροβιακή δράση

Μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση της βιοδραστικής ουσίας TPAC σε σύγκριση με την καρβακρόλη. Παρακάτω αναλύονται τα αποτελέσματα των ζωνών αναστολής (IZ), της ελάχιστης συγκέντρωσης αναστολής (MIC), της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC) και της ελάχιστης συγκέντρωσης εξάλειψης βιοφίλμ (BEC). Επίσης, βρέθηκε και η βιωσιμότητα των βακτηρίων μετά από επώαση με φύλλα πολυστυρενίου.

4.3.1.1 Ζώνες αναστολής

Πραγματοποιήθηκαν και πειράματα ζωνών αναστολής. Παρασκευάστηκαν τρυβλία με 20ml θρεπτικό άγαρ. Κατόπιν το μικρόβιο (10^8 cfu/ml) απλώθηκε στην επιφάνεια του τρυβλίου με την βοήθεια βαμβακοφόρου στειλεού, ο οποίος είχε αποστειρωθεί. Ο βαμβακοφόρος στειλεός εμβαπτίστηκε στο διάλυμα του μικροβίου για 10 δευτερόλεπτα και αφού διώχθηκε η περίσσεια του

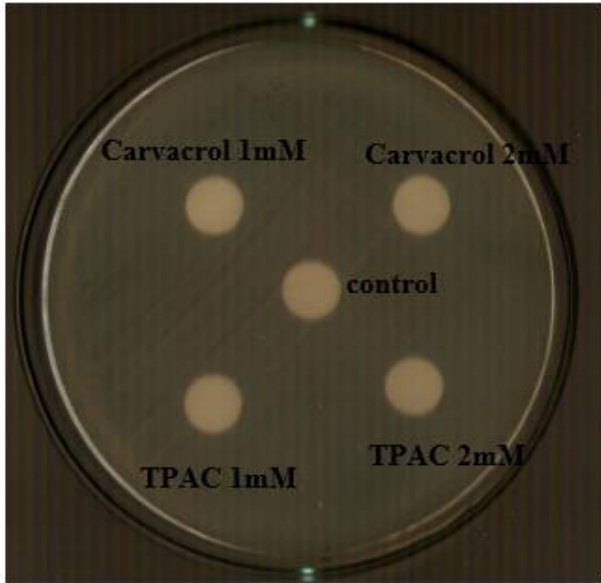
υγρού στα τοιχώματα του σωλήνα, με κατάλληλες κινήσεις απλώθηκε το μικρόβιο στο θρεπτικό άγαρ. Παρασκευάστηκαν διαλύματα stock από τις ουσίες προς εξέταση σε κατάλληλες συγκεντρώσεις 1mM. Μέσα σ' αυτά τα διαλύματα εμβαπτίσθηκαν αποστειρωμένα χάρτινα δισκία διαμέτρου 1mm με την βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας, και αφού διώχθηκε η περίσσεια της ουσίας στα τοιχώματα του erpendorf, τοποθετήθηκαν στο τρυβλίο σε σωστή απόσταση μεταξύ τους και ασκώντας ελαφριά πίεση προκειμένου να σταθεροποιηθούν πάνω στην επιφάνεια του θρεπτικού. Μετά από επώαση 24h στους 37° C ελέγχθηκε η δημιουργία ζώνης αναστολής της οποίας η διάμετρος μετρήθηκε με τη βοήθεια χάρακα που μετράει σε mm.

Τα αποτελέσματα των ζωνών αναστολής παρουσιάζονται στον επόμενο πίνακα (6). Όπως φαίνεται, μόνο στο βακτήριο *P. aeuroginosa* δεν έχει καμία δράση. Τα βακτήρια μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με τη διάμετρο της ζώνης αναστολής που εμφανίζουν μετά την επώαση με τα αντιβιοτικά : ευαίσθητα ($IZ \geq 17$ mm), ενδιάμεσα ($13 \text{ mm} \leq IZ \leq 16$ mm) και ανθεκτικά ($IZ \leq 12$ mm). Έτσι, το *P. aeuroginosa* χαρακτηρίζεται ως ανθεκτικό βακτήριο και για τις δύο ενώσεις, διότι δεν εμφανίζει ζώνες αναστολής. Η *E.coli* κρίνεται ως ανθεκτικό βακτήριο για τις συγκεντρώσεις 1mM και ως ενδιάμεσο για τις συγκεντρώσεις 2mM και για τις δύο ενώσεις. Ο *S. epidermidis* ταξινομείται ως ανθεκτικό βακτήριο για το σύμπλοκο TPAC στο οποίο εμφανίζεται μια μικρή ζώνη αναστολής και για την καρβακρόλη στην οποία δεν εμφανίζεται ζώνη αναστολής. Τέλος, το βακτήριο *S. aureus* κρίνεται ως ανθεκτικό για συγκέντρωση συμπλόκου TPAC 1mM και ως ενδιάμεσο για συγκέντρωση συμπλόκου 2mM, ενώ για την καρβακρόλη δεν εμφανίζει σημαντική ζώνη αναστολής σε καμία από τις δύο συγκεντρώσεις άρα είναι ανθεκτικό για την συγκεκριμένη ένωση. Παρατηρείται λοιπόν, ότι το αν είναι ανθεκτικό ή όχι ένα βακτήριο εξαρτάται και από την συγκέντρωση της ουσίας που χρησιμοποιείται, διότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της ουσίας παρατηρείται και αύξηση της ευαισθησίας των βακτηρίων κυρίως για το σύμπλοκο TPAC.

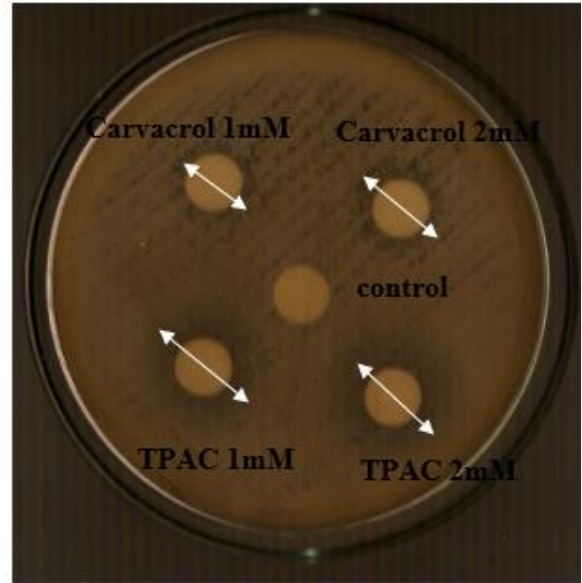
Πίνακας 6. Ζώνες αναστολής ένωσης TPAC

Ζώνες Αναστολής (mm)				
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>
TPAC 1mM	10	12,58±0.67	11,25±1.07	12,08±0.72
TPAC 2mM	10	14,5±2.1	12,4±1	14,1±0.8
Carvacrol 1mM	10	11,47 ± 0.32	10	10
Carvacrol 2mM	10	13,11±1.02	10	10,07±0.13
Control	10	10	10	10

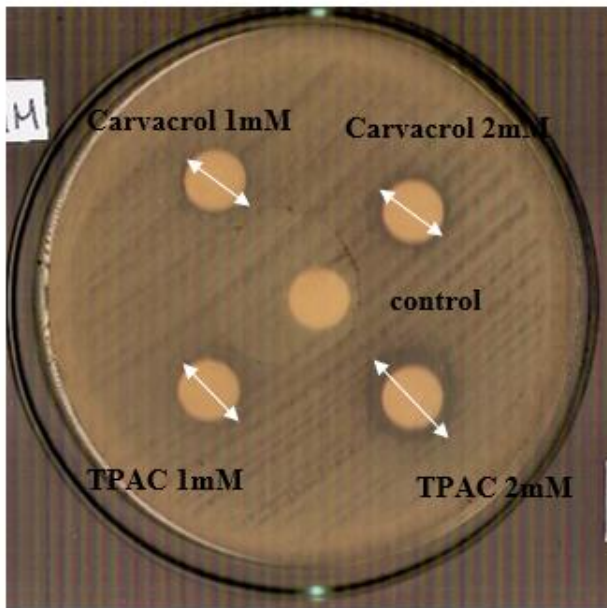
Παρακάτω απεικονίζονται φωτογραφίες με τις ζώνες αναστολής όπου αναγράφονται οι ουσίες και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ στη μέση υπάρχει το δισκίο control ήταν εμποτισμένο με DMSO το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης.



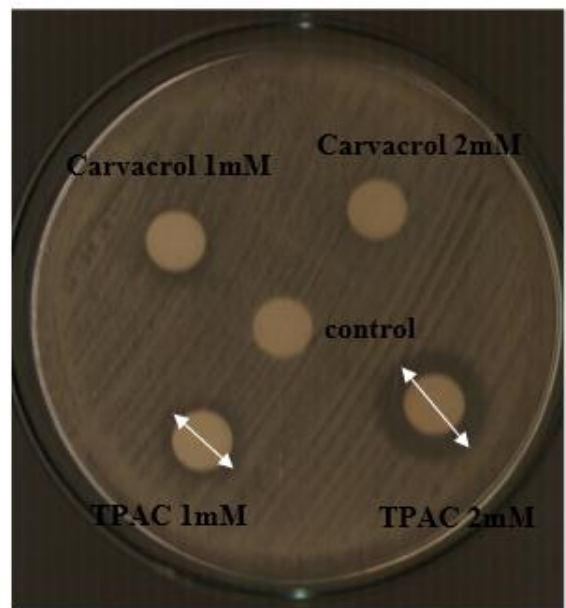
P. aeruginosa



E. coli



S. aureus



S. epidermidis

Εικόνα 34. Ζώνες αναστολής (IZ) των συμπλόκων στα τέσσερα βακτήρια

4.3.1.2 Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC)

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση μιας χημικής ουσίας, που αναστέλλει την ανάπτυξη των μικροβίων. Η MIC εξαρτάται από τον μικροοργανισμό και το ίδιο το αντιβιοτικό. Η MIC προσδιορίζεται με παρασκευή διαλυμάτων της χημικής ουσίας με θρεπτικό υλικό και αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκου, έπειτα ακολουθεί επώαση των διαλυμάτων στους 37°C για 20 ώρες και μέτρηση της οπτικής τους πυκνότητας στα 620nm ώστε να διαπιστωθεί η βιωσιμότητα των μικροοργανισμών. Τα βακτήρια μπορούν να ταξινομηθούν σε ευαίσθητα ή ανθεκτικά σε κάποιο αντιβιοτικό.

Έγινε μελέτη της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (minimum inhibitory concentration, MIC) με το σύμπλοκο TPAC και με την καρβακρόλη αντίστοιχα σε τέσσερα βακτήρια *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E.coli*, *S. epidermidis* και *S. Aureus*. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές των συγκεντρώσεων για το κάθε βακτήριο.

Πίνακας 7. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) συμπλόκου και καρβακρόλης

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)				
	<i>P. aeuroginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>
TPAC	-	231,65±9.39 μM	189,27±23.33 μM	151,46±9,63 μM
Carvacrol	-	109,58±0,10 μM	309,84±45,08 μM	256,94±42,44 μM

Στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζονται οι υγρές καλλιέργειες των τεσσάρων βακτηρίων. Απεικονίζεται το θετικό control (πρώτος δοκιμαστικός σωλήνας) που περιέχει μόνο το θρεπτικό υλικό και τον μικροοργανισμό. Έπειτα, το αρνητικό control που δεν περιέχει καθόλου βακτήρια και

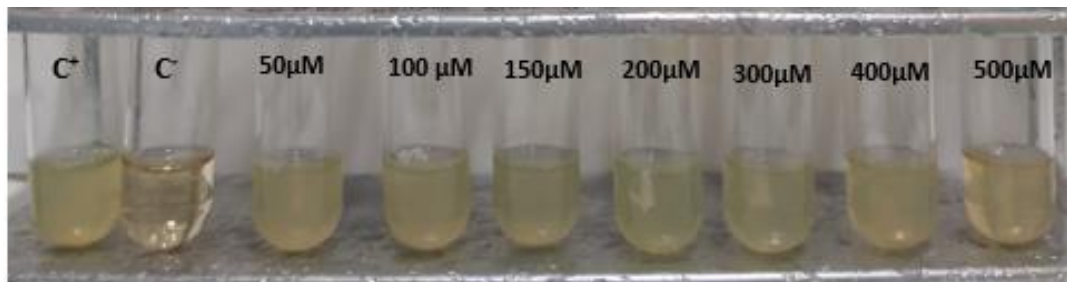
στη συνέχεια τα υπόλοιπα διαλύματα απαρτίζονται από θρεπτικό υλικό, σταθερή ποσότητα βακτηρίου(10μl) και αυξανόμενη συγκέντρωση του συμπλόκου TPAC (εικόνα 34) και της καρβακρόλης (εικόνα 35). Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση μελετήθηκε έως τα 500μM . Πάνω από αυτή τη συγκέντρωση η αναστολή των βακτηρίων επηρεάζεται και από την παρουσία DMSO στο οποίο διαλύεται η ουσία. Συγκεκριμένα όσο αυξάνεται η ποσότητα του DMSO πάνω από τα 50μl μειώνεται η οπτική απορρόφηση των υγρών καλλιιεργειών, συνεπώς και η βιωσιμότητα των βακτηρίων και αυτό μπορεί να συμβαίνει και συνεργιστικά με την ουσία. Έτσι, δεν δοκιμάστηκε να βρεθεί η MIC πάνω από αυτή τη συγκέντρωση. Χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα ουσίας $2 \cdot 10^{-2} M$ και τα μέγιστα μικρόλιτρα που τοποθετήθηκαν σε μια υγρή καλλιέργεια ήταν 50μl. Για το βακτήριο *P. Aeurogenosa* δεν βρέθηκε δράση έως την συγκέντρωση την οποία ελέγχθηκε (500μM).

Τα στελέχη μικροβίων θεωρούνται ευαίσθητα έναντι ενός αντιβιοτικού όταν το MIC του είναι <50μM ή ανθεκτικά όταν η MIC είναι > 100 μM, αντίστοιχα [Shungu DL, et al., 1983]. Οι MIC που βρέθηκαν είναι πάνω από 100μM για όλα τα βακτήρια και για τις δύο ουσίες, άρα τα βακτήρια είναι ανθεκτικά σε αυτές τις ουσίες, το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί και με το αποτέλεσμα των ζωνών αναστολής. Πιο συγκεκριμένα, το σύμπλοκο TPAC είναι πιο δραστικό για τους δύο σταφυλόκοκκους που είναι δύο θετικά κατά Gram βακτήρια και είναι αποτελεσματικό σε μικρότερες συγκεντρώσεις από ότι η καρβακρόλη, η οποία είναι εξίσου δραστική αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Συνεπώς, το σύμπλοκο είναι πιο δραστικό έναντι των Gram⁺ βακτηρίων σε σχέση με την καρβακρόλη. Ωστόσο, η καρβακρόλη έχει μικρότερη MIC στο βακτήριο *E. Coli* ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο σε σχέση με το TPAC. Καμία από τις δύο ουσίες δεν έχουν δράση στο βακτήριο *P. aeruginosa*, που είναι και αυτό ένα Gram⁻ βακτήριο. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην αίσθηση απαρτίας που έχουν τα βακτήρια, που είναι ένα σύστημα επικοινωνίας μεταξύ κυττάρων που υπάρχει ευρέως στο μικροβίωμα και σχετίζεται με την πυκνότητα των κυττάρων. Ο πληθυσμός αποικιών υψηλής πυκνότητας μπορεί να παράγει επαρκή αριθμό σημάτων μικρών μορίων, να ενεργοποιήσει μια ποικιλία κυτταρικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων μηχανισμών μολυσματικότητας και

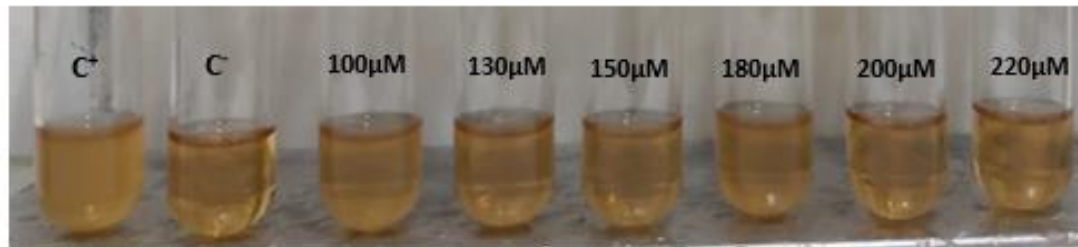
αντοχής στα φάρμακα, ώστε να ανεχθούν αντιβιοτικά και να βλάψουν τον ξενιστή [Xihong Zhao et al., 2020]. Έτσι, επειδή το βακτήριο *P. aeruginosa* είναι έχει την ικανότητα δημιουργίας βιοφίλμ και είναι ένα βακτήριο που παράγει μολυσματικούς παράγοντες γιατί προκαλεί πνευμονία, η αίσθηση απαρτίας είναι ιδιαίτερα ανεπτυγμένη από τον μικροοργανισμό αυτό, συνεπώς η αντοχή του στα φάρμακα μπορεί να είναι μεγαλύτερη. Επιπλέον, το *P. aeruginosa* είναι γνωστό για την εγγενή του αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά πρώτης γραμμής, κυρίως λόγω της χαμηλής διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης και της αναπτυγμένης ενεργού εκροής, [Robert E. W. Hancock, 1998] η οποία είναι ικανή να απομακρύνει μια ποικιλία διαφορετικών τοξικών ενώσεων από τα κύτταρα , όπως αντιβιοτικά , βαρέα μέταλλα, οργανικοί ρύποι, φυτικές ενώσεις κτλ.

Συνοψίζοντας λοιπόν, το TPAC και η καρβακρόλη είναι αποτελεσματικά έναντι Gram⁻ και Gram⁺ βακτηρίων με εξαίρεση την *P. aeruginosa* της οποίας δεν αναστέλλεται η ανάπτυξη αλλά όπως ειπώθηκε είναι ένα βακτήριο γνωστό για την αντοχή του αντοχή σε πολλά αντιβιοτικά.

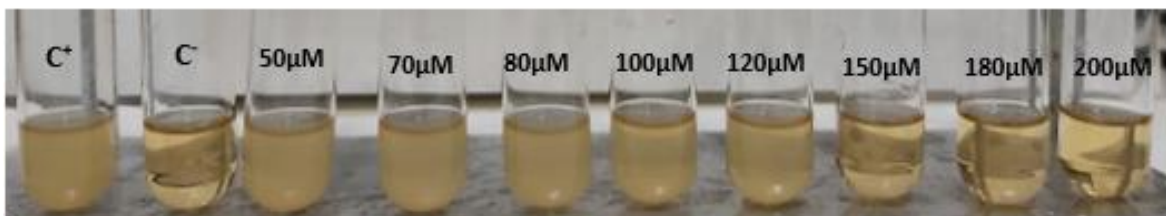
Παρακάτω ακολουθούν οι φωτογραφίες με τις υγρές καλλιέργειες των βακτηριών. Στις τελευταίες συγκεντρώσεις των τριών από τα τέσσερα βακτήρια δεν παρατηρείται ανάπτυξη των μικροοργανισμών με γυμνό μάτι (το διάλυμα δεν είναι θολό).



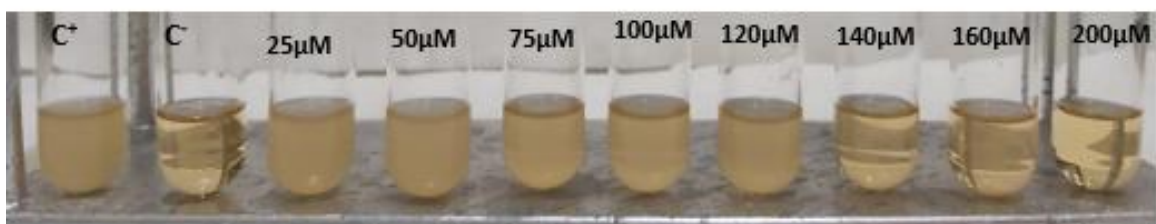
P. aeruginosa



E. coli

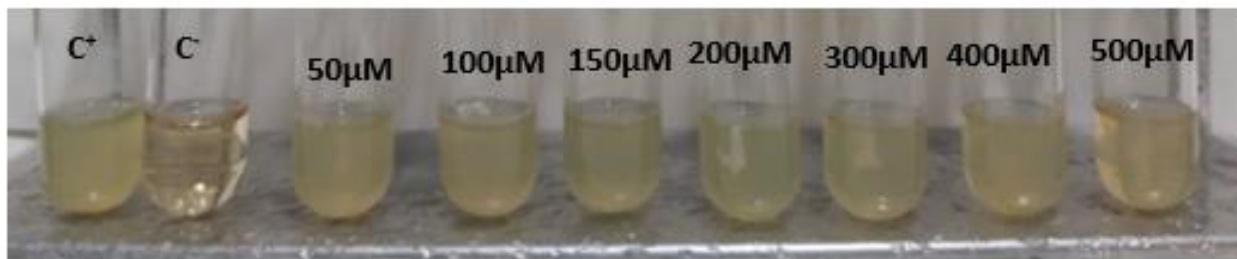


S. aureus

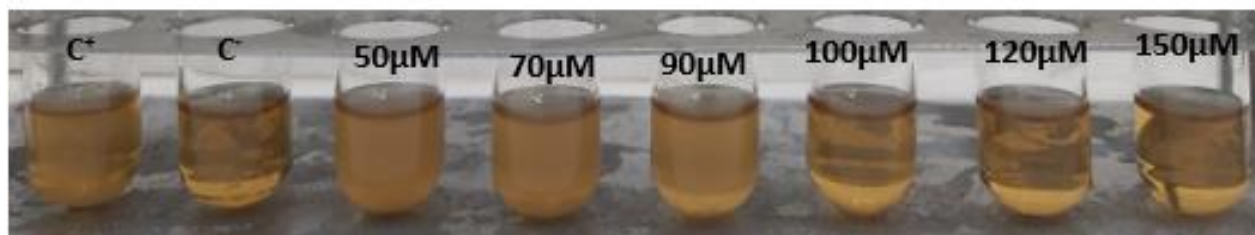


S. epidermidis

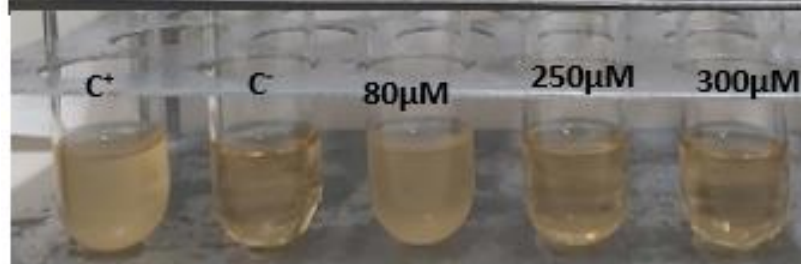
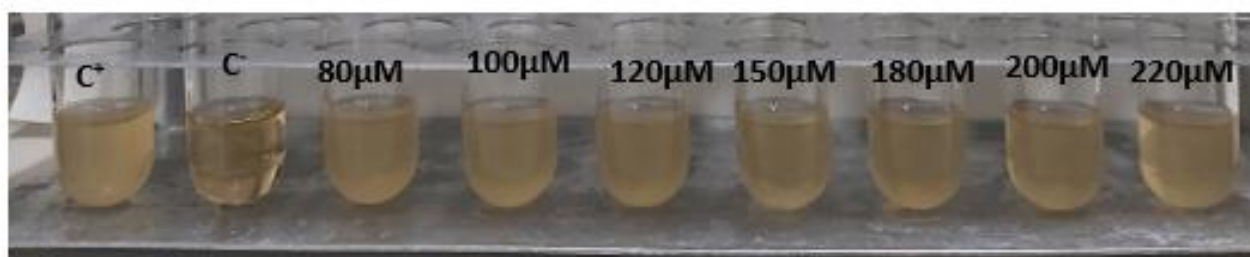
Εικόνα 35. Υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων με το σύμπλοκο TPAC



P. aeruginosa



E. coli



S. aureus



S. epidermidis

Εικόνα 36. Υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων με την καρβακρόλη

4.3.1.3 Ελάχιστη Βακτηριοκτόνος Συγκέντρωση (MBC)

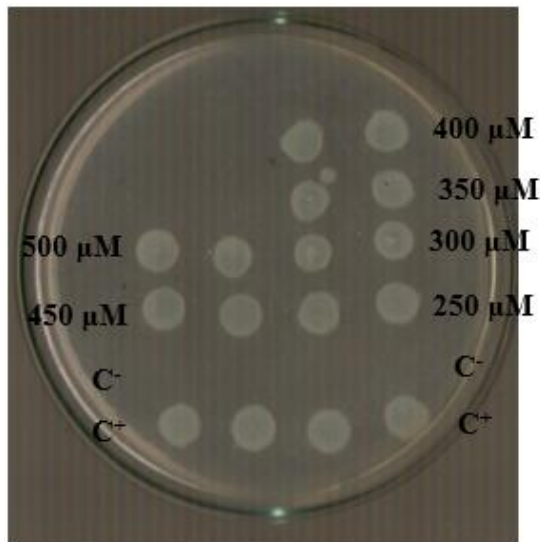
Ο προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (Minimum Bacterial Concentration – MBC) είναι η πιο κοινή εκτίμηση της βακτηριοκτόνου δράσης. Η MBC ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα που απαιτείται για να σκοτώσει το 99,9% του βακτηριακού πληθυσμού μετά από 24 ώρες επώαση υπό κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας. Η MBC μπορεί να προσδιοριστεί μετά από το πείραμα της MIC με την υποκαλλιέργεια ενός μικρού δείγματος (της τάξεως των 4 μL) σε τρυβλίο με 10 ml στερεό θρεπτικό υλικό κατάλληλο για το κάθε βακτήριο. Το τελικό βακτηριοκτόνο σημείο (MBC), ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία θανατώθηκε το 99,9 % των βακτηρίων. Η μικρότερη συγκέντρωση που δε θα εμφανιστούν αποικίες βακτηριακού πληθυσμού θεωρείται ως η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC).

Για το βακτήριο *P.aeruginosa* δεν βρέθηκε MIC συνεπώς ούτε και MBC και η ανάπτυξη του βακτηρίου ήταν πλήρης μέχρι και τη συγκέντρωση των 500 μM και για τις δύο ουσίες. Για την *E.Coli* ελέγχθηκε έως τη συγκέντρωση των 500 μM και δεν βρέθηκε MBC για καμία από τις δύο ουσίες, η ανάπτυξη του βακτηρίου στο στερεό θρεπτικό υλικό ήταν πλήρης ενώ στην υγρή καλλιέργεια φαίνεται η αναστολή ανάπτυξης του οργανισμού σε πολύ μικρότερη συγκέντρωση. Για το βακτήριο *S. aureus* ο θάνατος των μικροοργανισμών συμβαίνει στα 300 μM για το TPAC και στα 400 μM για την καρβακρόλη. Τέλος, για το βακτήριο *S. epidermidis* η ανάπτυξη σταματάει στα 400 μM για το TPAC ενώ δεν φαίνεται να θανατώνεται στην περίπτωση της καρβακρόλης έως την συγκέντρωση των 500 μM .

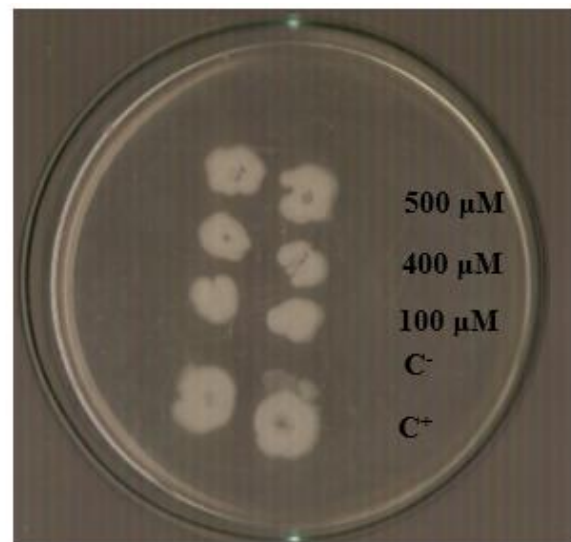
Από την αναλογία MBC/MIC συμπεραίνεται αν μια χημική ουσία είναι βακτηριοκτόνος ή βακτηριοστατική. Βακτηριοκτόνος ουσία χαρακτηρίζεται μια χημική ένωση όταν προκαλεί τον θάνατο του 99,9% των βακτηρίων και ο λόγος MBC/MIC είναι μικρότερος ή ίσος του δυο (≤ 2). Αντίθετα, εάν ο λόγος MBC / MIC μιας ένωσης είναι ≥ 4 , τότε είναι βακτηριοστατικό, πράγμα που

δείχνει ότι αναστέλλει αλλά δεν σκοτώνει τον οργανισμό. Από τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, βρέθηκε για το βακτήριο *S. Aureus* ο λόγος MBC/MIC ίσος με 1,98 για το TPAC και 1,54 για την καρβακρόλη, άρα είναι βακτηριοκτόνες ουσίες. Για το βακτήριο *S. Epidermidis* ο λόγος MBC/MIC ίσος με 2,11 για το TPAC και κατατάσσεται και αυτό στις βακτηριοκτόνες ουσίες, στο ίδιο βακτήριο δεν εντοπίστηκε MBC για την καρβακρόλη άρα δεν μπορεί να βγει συμπέρασμα για το εάν είναι βακτηριοκτόνος ή βακτηριοστατική. Επίσης, το ίδιο ισχύει και για το βακτήριο *E. Coli*, για το οποίο δεν εντοπίστηκε το σημείο που μπορεί να θανατωθεί το 99,9% του πληθυσμού της έως τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν στο συγκεκριμένο βακτήριο. Τέλος, για την *P. aeruginosa* καμία από τις δύο ουσίες δεν αναστέλλει την ανάπτυξή της, συνεπώς δεν βρέθηκε MBC.

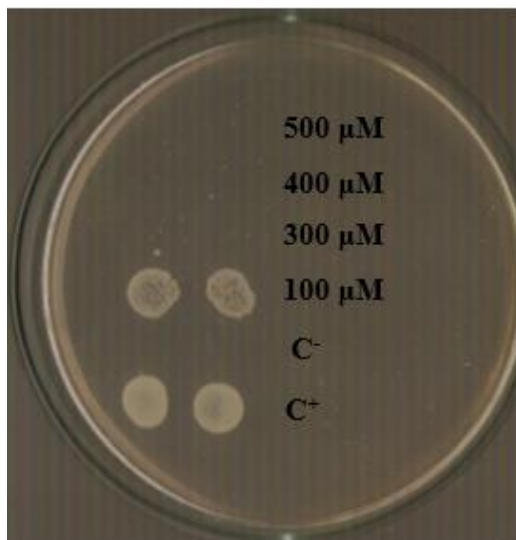
Παρακάτω ακολουθούν οι φωτογραφίες που απεικονίζουν την MBC των βακτηρίων για την δύο ουσίες.



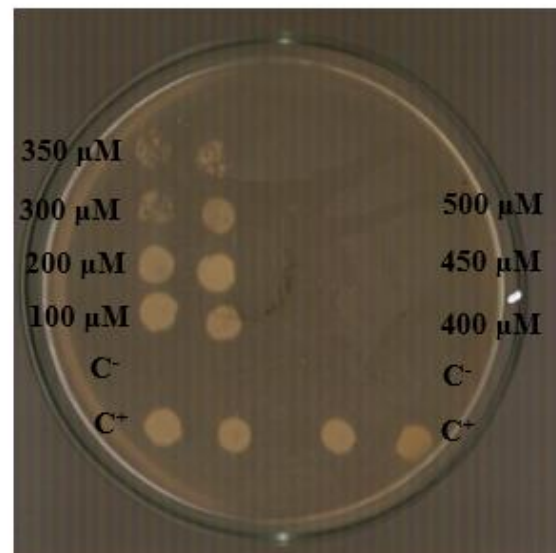
P. aeruginosa



E. coli

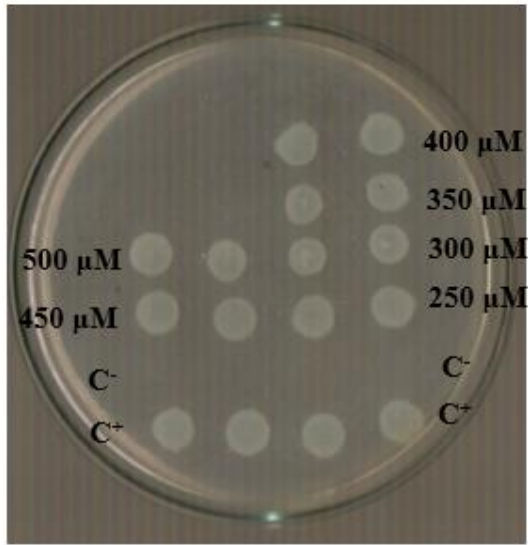


S. aureus

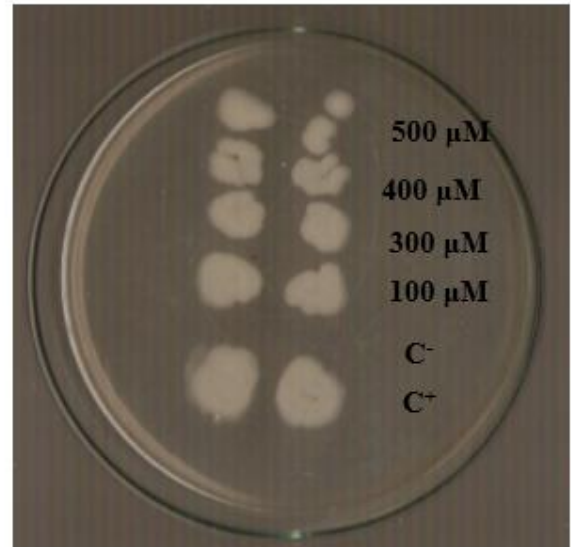


S. epidermidis

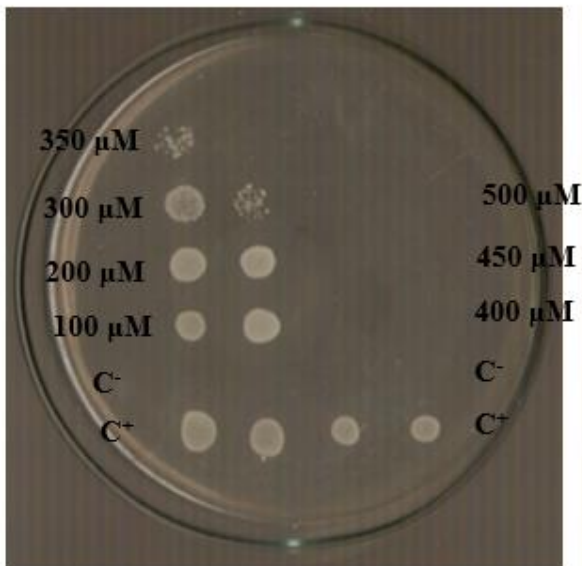
Εικόνα 37. MBC των τεσσάρων βακτηρίων για το σύμπλοκο TPAC



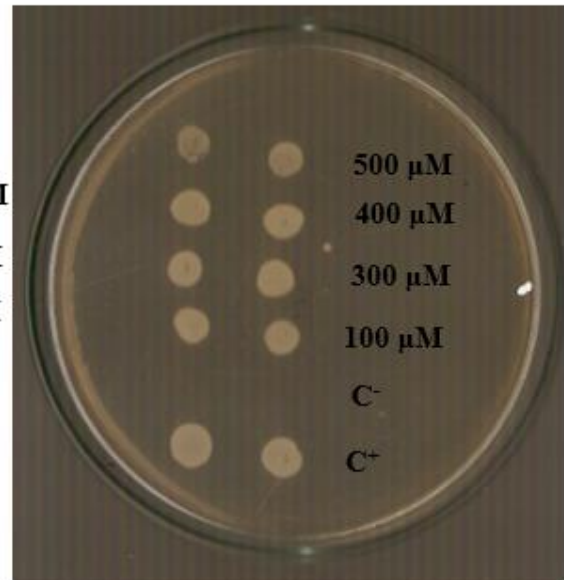
P. aeruginosa



E. coli



S. aureus



S. epidermidis

Εικόνα 38. MBC των τεσσάρων βακτηρίων για την καρβακρόλη

4.3.1.4 Βιοφίλμ

Ο σχηματισμός του βιοφίλμ ξεκινά με την προσκόλληση διαφόρων μικροοργανισμών σε μία υγρή επιφάνεια. Στην αρχή σχηματίζεται μια μικροβιακή αποικία, η οποία σταδιακά αναπτύσσεται και μεταβάλλεται σε μέγεθος και μορφή. Στη συνέχεια κάποια από αυτά τα βακτήρια μπορούν και αποχωρούν από το βιοφίλμ, μολύνοντας έτσι άλλες επιφάνειες. Κάποια από τα βακτήρια του βιοφίλμ έχουν πολύ μεγάλη ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, αυξημένη έως και 1000 φορές, συγκριτικά πάντα με τα υπόλοιπα βακτήρια. Είναι πολύ σημαντικό λοιπόν, να βρεθούν νέοι αντιμικροβιακοί παράγοντες οι οποίοι δεν θα είναι τοξικοί και τα βακτήρια δεν θα έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα σε αυτά, άρα θα είναι αποτελεσματικοί και στην εξάλειψη του βιοφίλμ που είναι επικίνδυνο για τη δημόσια υγεία.

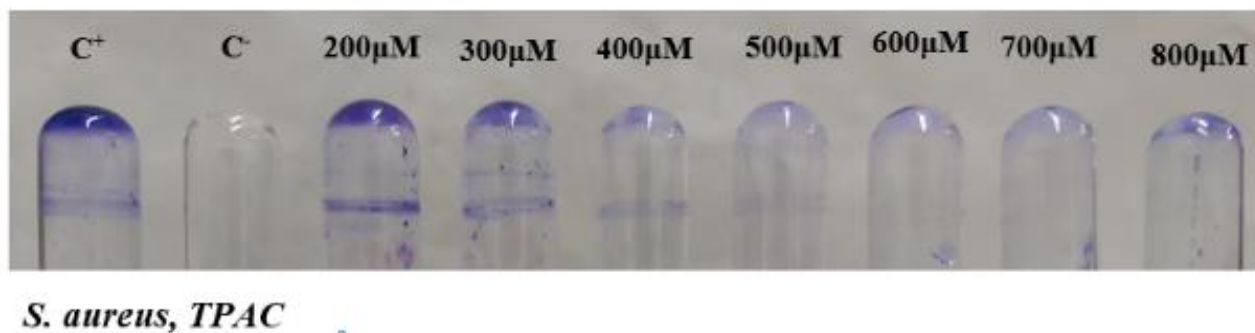
Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιλάμβανε την δημιουργία βιοφίλμ στα τοιχώματα των σωλήνων και την μετέπειτα δοκιμή τους παρουσία της ένωσης σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις από 200μM έως και 800μM στις ουσίες TPAC και καρβακρόλη. Συγκεκριμένα, σε 1,5ml υγρό θρεπτικό μέσο εμβολιάστηκαν 10μl από διάλυμα μικροβίων με 10^8 cfu/ml και επώστηκαν για 24h στους 37°C προκειμένου να δημιουργηθεί το βιοφίλμ. Η *P. aeruginosa* δημιουργεί βιοφίλμ στην διεπιφάνεια θρεπτικού με τον αέρα και ο *S. aureus* σχηματίζει σ' όλη την επιφάνεια του σωλήνα. Μετά το πέρας των 24h απορρίπτουμε το διάλυμα μαζί με το μικρόβιο και προσθέτουμε σε τελικό όγκο 2ml την αντίστοιχη συγκέντρωση της ένωσης. Μετά από 20h απορρίπτουμε το διάλυμα και ξεπλύνουμε 2 φορές με dH₂O για να φύγουν τα κύτταρα που δεν βρίσκονται στο βιοφίλμ (πλακτονικά) και να ξεπλύνουμε από το θρεπτικό. Το βιοφίλμ επειδή είναι τόσο σταθερό δεν αλλάζει. Έπειτα προσθέτουμε 2ml χρωστική crystal violet 0,1% διαλυμένη σε dH₂O και επωάζουμε για 15min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά αποχύνουμε την χρωστική και ξεπλύνουμε με διάλυμα 1:2 MeOH: H₂O με dH₂O. Βλέπουμε ότι το βιοφίλμ έχει βιολετί απόχρωση. Αφήνουμε τα σωληνάκια να στεγνώσουν για 20h. Αφού στεγνώσουν οι σωλήνες διαλυτοποιείται το

βαμμένο βιοφίλμ με 30% οξικό οξύ διαλυμένο σε απεσταγμένο νερό (2ml σε κάθε σωλήνα). Επώαζεται για 15min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας του χρόνου μετράμε την οπτική απορρόφηση των σωλήνων χρησιμοποιώντας ως αρνητικό control 2ml οξικό οξύ στα 550nm.

Μετά την ολοκλήρωση της παραπάνω διαδικασίας και την μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 550nm και στα δύο βακτήρια διαπιστώθηκε πως το σύμπλοκο TPAC δεν είχε καμία επίδραση στη δημιουργία βιοφίλμ στο βακτήριο *P. Aeruginosa*, το οποίο ήταν ένα αναμενόμενο αποτέλεσμα εφόσον δεν βρέθηκε δράση των δύο ουσιών για το συγκεκριμένο βακτήριο. Αντίθετα παρατηρήθηκε μείωση στην ανάπτυξη βιοφίλμ του βακτηρίου *S. aureus*. Δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις έως 800μM ουσίας και βρέθηκε ότι η ελάχιστη συγκέντρωση εξάλειψης βιοφίλμ είναι τα 871,69 μM ουσίας TPAC.

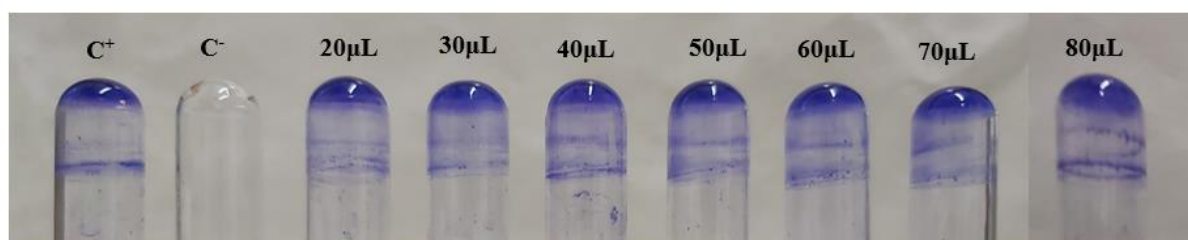
BEC (Biofilm elimination concentration), TPAC	
S.Aureus	871,69±38,74 μM

Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η ανάπτυξη βιοφίλμ έως τα 700μM TPAC και παρατηρείται πως όσο αυξάνεται η συγκέντρωση μειώνεται και η δημιουργία βιοφίλμ από τον μικροοργανισμό.



Εικόνα 39. Ανάπτυξη βιοφίλμ παρουσία συμπλόκου TPAC στο *S. aureus*

Για την διεξαγωγή αυτού του πειράματος παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα TPAC 2×10^{-2} M, άρα σε τελικό όγκο 2ml χρησιμοποιήθηκαν 20 έως 80μL ουσίας η οποία είχε διαλυθεί σε DMSO. Έτσι λοιπόν, για να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ότι το DMSO επηρεάζει την ανάπτυξη βιοφίλμ πραγματοποιήθηκε πείραμα στο οποίο προστέθηκε στους δοκιμαστικούς σωλήνες αντί της ποσότητας του πρότυπου διαλύματος ουσίας, τα αντίστοιχα μικρόλιτρα DMSO (20-80μL). Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται το αποτέλεσμα αυτού του πειράματος και όπως διαπιστώθηκε το DMSO δεν επηρεάζει την ανάπτυξη του βιοφίλμ του βακτηρίου *S. Aureus*. Στην εικόνα φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται πλήρως κι δημιουργεί βιοφίλμ ανεξάρτητα από τα μικρόλιτρα DMSO που υπάρχουν στην υγρή καλλιέργεια.



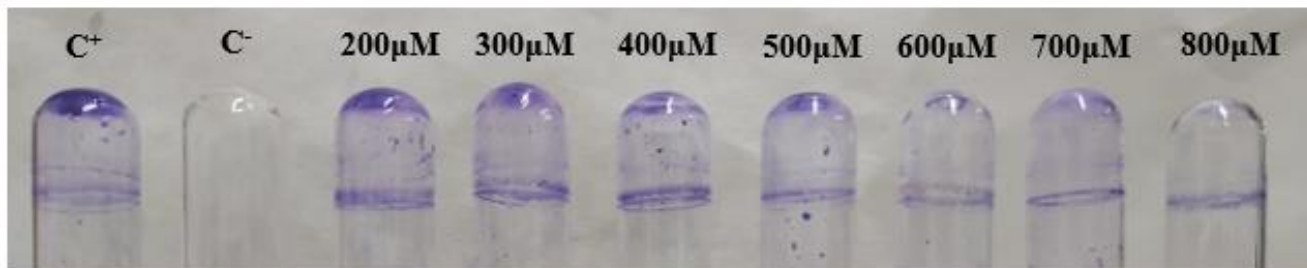
***S. aureus*, DMSO**

Εικόνα 40. Ανάπτυξη βιοφίλμ *S. aureus* παρουσία ποσότητας DMSO

Το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε και για την καρβακρόλη στις ίδιες συγκεντρώσεις και στα δύο βακτήρια. Για το βακτήριο *P.aeruginosa* ενώ παρατηρήθηκε μείωση των πλαγκτονικών βακτηρίων στην υγρή καλλιέργεια δεν υπήρχε και εδώ κάποια μείωση της ανάπτυξης του βιοφίλμ. Αντίθετα στο βακτήριο *S.aureus* υπήρχε μείωση του βιοφίλμ σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις της καρβακρόλης. Δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις έως 800μM ουσίας και βρέθηκε ότι η ελάχιστη συγκέντρωση εξάλειψης βιοφίλμ είναι τα 966,56μM καρβακρόλης.

BEC (Biofilm elimination concentration), Carvacrol	
S.Aureus	966,56 ± 120,43μM

Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η ανάπτυξη βιοφίλμ έως τα 800μM TPAC και παρατηρείται πως όσο αυξάνεται η συγκέντρωση μειώνεται και η δημιουργία βιοφίλμ από τον μικροοργανισμό.



S. aureus, Carvacrol

Εικόνα 41. Ανάπτυξη βιοφίλμ του βακτηρίου *S.aureus* έως τα 800μM

Συμπερασματικά λοιπόν, η καρβακρόλη και το TPAC μειώνουν την ανάπτυξη βιοφίλμ του *S.aureus* ενώ δεν έχουν καμία επίδραση στο βακτήριο *P.aeruginosa*. Καλύτερη δράση ωστόσο, εμφανίζει το TPAC μεταξύ των δύο.

4.3.2 Επίδραση πολυστυρενίου στα βακτήρια

Ελέγχθηκε η δράση του πολυστυρενίου σε υγρές καλλιέργειες των τεσσάρων βακτηρίων. Το πολυστυρένιο που παρασκευάστηκε κόπηκε σε τετράγωνα κομμάτια (1cm x 1cm) και στη συνέχεια επώαστη με τις υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων για 20 ώρες . Το πολυστυρένιο περιείχε τις ουσίες καρβακρόλη, τριφένυλο-αντιμόνιο και το σύμπλοκο TPAC σε συγκέντρωση 2 mM, καθώς και πολυστυρένιο control που δεν περιείχε καμία δραστική ουσία.

Μετά την επώαση των βακτηρίων με τα κομμάτια του πολυστυρενίου οι υγρές καλλιέργειες φωτομετρήθηκαν στα 620nm και μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση τους. Έπειτα, υπολογίστηκε το

ποσοστό της βιωσιμότητας των τεσσάρων βακτηρίων παρουσία των κομματιών πολυστυρενίου. Ακολουθεί ο πίνακας με τα αποτελέσματα.

Πίνακας 8. Ποσοστό βιωσιμότητας των βακτηρίων παρουσία πολυστυρενίου

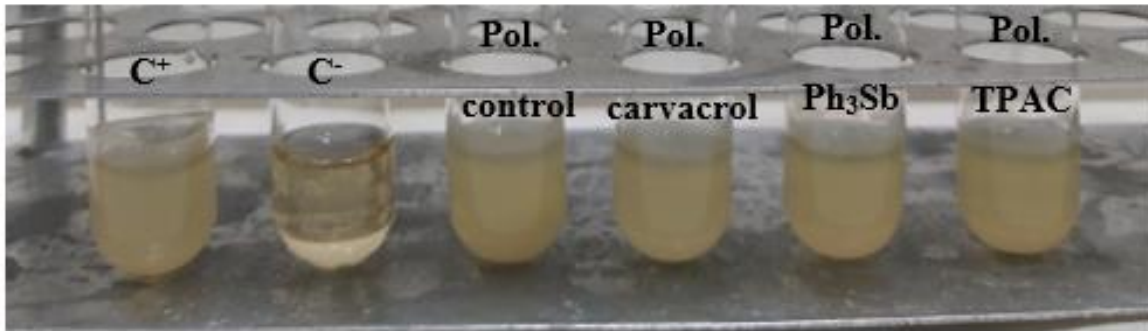
	Polystyrene@ TPAC	Polystyrene @Carvacrol
<i>P. aeruginosa</i>	73,3 ±13,9%	78,3±10,9%
<i>E.coli</i>	82,7±11,4%	83,1±12,9%
<i>S. aureus</i>	79,9±10%	74,3±9,4%
<i>S. epidermidis</i>	82,8±10,1%	78±12%

Στον παραπάνω πίνακα φαίνεται το ποσοστό ανάπτυξης των βακτηρίων σε αναλογία με την υγρή καλλιέργεια που περιείχε το πολυστυρένιο control. Η καλύτερη δράση παρατηρείται στην ανάπτυξη του βακτηρίου *P.aeruginosa* που φτάνει το 73,3%, παρουσία του polystyrene@TPAC 2mM, ακολουθούν τα βακτήρια *S.aureus* (79,9%), *E.coli* (82,7%) και *S.epidermidis* (82,8%). Αξίζει να σημειωθεί, ότι μετά από επώαση του βακτηρίου *P. aeruginosa* με το σύμπλοκο TPAC έως τη συγκέντρωση 500μM δεν παρατηρήθηκε κάποια μείωση της ανάπτυξης του, ενώ αυτή παρατηρείται παρουσία του πολυστυρενίου με αυτό το σύμπλοκο.

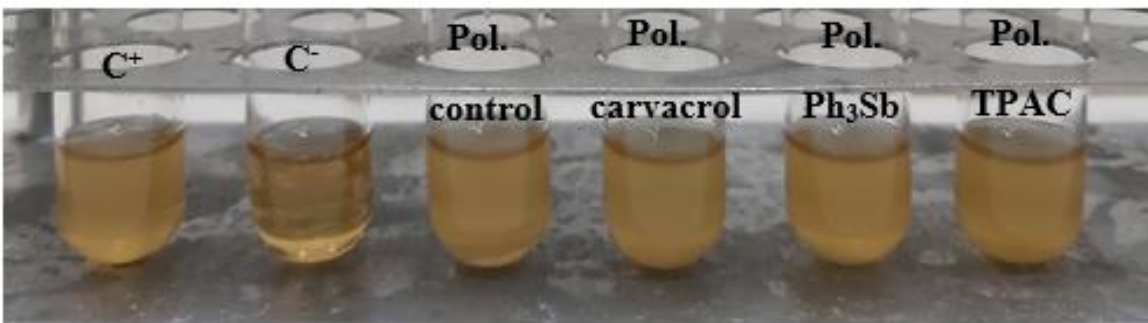
Αντίστοιχα, η καλύτερη δράση του πολυστυρενίου με καρβακρόλη (polystyrene@carvacrol 2mM) παρατηρήθηκε στο βακτήριο *S.aureus* (74,3%) και ακολουθεί το βακτήριο *S.epidermidis* (78%), το *P.aeruginosa* (78,3%) και το *E.coli* (83,1%). Όπως και το σύμπλοκο TPAC έτσι και με η καρβακρόλη δεν είχε δράση όταν επώαστηκε με το βακτήριο *P.aeruginosa* έως τη συγκέντρωση 500μM.

Συμπερασματικά λοιπόν, το υλικό polystyrene@TPAC 2mM καθώς και το polystyrene@carvacrol 2mM συμβάλουν στη μείωση της ανάπτυξης των βακτηρίων που μελετήθηκαν. Τέλος, είχε ελεγχθεί και η δράση του υλικού polystyrene@Ph₃Sb 2mM αλλά δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στα βακτήρια. Συνεπώς, αυτές οι δύο ουσίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε αντιμικροβιακές επιφάνειες, αφού είναι ικανές να μειώσουν τον πληθυσμό των βακτηρίων.

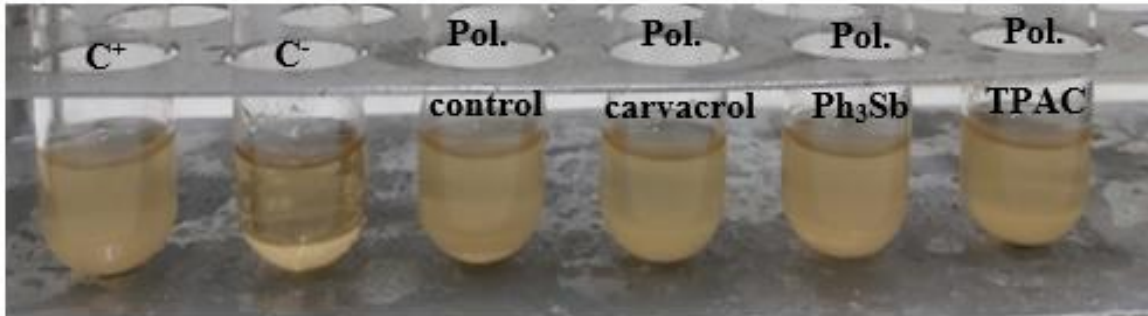
Στην παρακάτω φωτογραφία φαίνονται οι υγρές καλλιέργειες των τεσσάρων βακτηρίων παρουσία των υλικών. Στο πρώτο σωληνάκι υπάρχει μόνο θρεπτικό και ποσότητα βακτηρίων, στο δεύτερο μόνο θρεπτικό και ακολουθούν με τη σειρά οι υγρές καλλιέργειες παρουσία polystyrene@control, polystyrene @carvacrol, polystyrene@Ph₃Sb και polystyrene@TPAC.



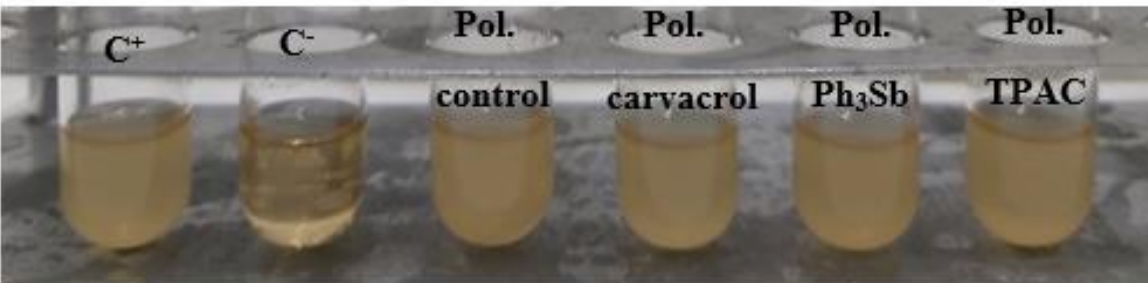
P. aeruginosa



E. coli



S. aureus



S. epidermidis

Εικόνα 42. Υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων παρουσία των υλικών

4.3.3 Τοξικότητα

4.3.3.1 Γονοτοξικότητα στα *Allium Cera*

Στη γενετική, η γονοτοξικότητα περιγράφει την ιδιότητα των χημικών παραγόντων που βλάπτουν τις γενετικές πληροφορίες σε ένα κύτταρο που προκαλεί μεταλλάξεις, οι οποίες μπορεί να οδηγήσουν σε καρκίνο. Ενώ η γονοτοξικότητα συχνά συγχέεται με τη μεταλλαξιογένεση, όλα τα μεταλλαξιγόνα είναι γονοτοξικά, ενώ δεν είναι όλες οι γονοτοξικές ουσίες μεταλλαξιγόνες. Η αλλοίωση μπορεί να έχει άμεσες ή έμμεσες επιδράσεις στο DNA: την πρόκληση μεταλλάξεων, την ενεργοποίηση των εκπληκτικών συμβάντων και την άμεση βλάβη του DNA που οδηγεί σε μεταλλάξεις. Οι μόνιμες, κληρονομικές αλλαγές μπορούν να επηρεάσουν είτε σωματικά κύτταρα του οργανισμού είτε γενετικά κύτταρα που θα μεταδοθούν στις μελλοντικές γενιές. [Kolle S. et al., 2013] Τα κύτταρα αποτρέπουν την έκφραση της γονιδιοτοξικής μετάλλαξης είτε με επιδιόρθωση DNA είτε με απόπτωση. Ωστόσο, η βλάβη δεν μπορεί πάντα να διορθωθεί οδηγώντας σε μεταλλαξιογένεση. [“Genotoxicity: Validated Non-animal Alternatives”, 2013]

Ο μιτωτικός δείκτης (Mitotic Index, MI), είναι η αναλογία μεταξύ του συνολικού αριθμού διαιρούμενων κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο (προφάση, αναφάση, μεταφάση, τελοφάση) προς τον συνολικό αριθμό κυττάρων. Για να εκτιμηθεί ο ρυθμός της κυτταρικής διαίρεσης προσδιορίστηκε η μικροσκοπική παράμετρος του μιτωτικού δείκτη (MI). Όλες οι κατηγορίες αναλύθηκαν μετρώντας 1.800 κύτταρα ανά συγκέντρωση (300 κύτταρα ανά διαφάνεια, σύνολο έξι διαφανειών, 3 διαφάνειες ανά κρεμμύδι). Τα επίπεδα κυτταροτοξικότητας ενός παράγοντα μπορούν να προσδιοριστούν από την αύξηση ή μείωση του MI. [C. N. Banti et al., 2019]

Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Chromosomal Abberations, CA) παρατηρούνται στις διάφορες φάσεις της κυτταρικής διαίρεσης (προφάση, μεταφάση, αναφάση και τελοφάση). Οι CA

μπορεί να παρατηρηθούν ως χρωμοσωμικές γέφυρες και σπάσιμο, απώλειες χρωμοσωμάτων, καθυστερήσεις, προσκόλληση, πολυπολικότητα και C-μεταφάσεις. [C. N. Banti et al., 2019]

Πυρηνικές ανωμαλίες (Nuclear Abnormalities) μπορούν να παρατηρηθούν στα θυγατρικά κύτταρα ως παρόμοια δομή με τον κύριο πυρήνα, αλλά σε μειωμένο μέγεθος (πυρήνες που έχουν συσσωρευτεί, πυρήνες που φέρουν πυρηνικούς οφθαλμούς, πολυπύρρηνα κύτταρα, μίνι κύτταρα).

Ο μικροπυρηνίσκος (Micronuclear, MN) μπορεί επίσης να παρατηρηθεί σε θυγατρικά κύτταρα ως παρόμοια δομή αλλά σε μειωμένο μέγεθος με τον κύριο πυρήνα. Ωστόσο, είναι σπάνιο να παρατηρηθεί. [C. N. Banti et al., 2019]

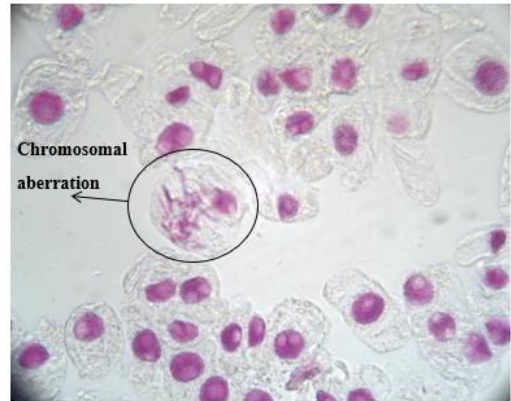
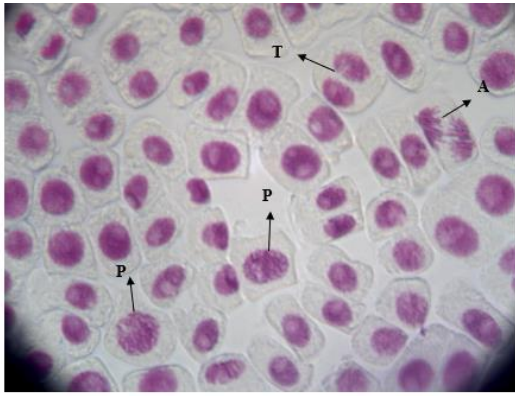
Πίνακας 9. Ποσοστό μιτωτικού δείκτη και ανωμαλιών στον κυτταρικό κύκλο

	Μιτωτικός δείκτης	Χρωμοσωμικές ανωμαλίες	Πυρηνικές ανωμαλίες	Μικροπυρηνίσκοι
control	5,54±1,95	0,21±0,31	0,051±0,098	0
TPAC 150μM	3,65±1,58	0,31±0,39	0,153±0,21	0
TPAC 300μM	5,24±3,26	0,26±0,27	0	0
Carvacrol 150μM	5,83±1.98	0,045 ± 0,08	0	0
Carvacrol 300μM	3,77±1,35	0,26±0,24	0	0

Στον παραπάνω πίνακα φαίνονται τα ποσοστά του μιτωτικού δείκτη των χρωμοσωμικών και πυρηνικών ανωμαλιών και των μικροπυρηνίσκων. Όπως φαίνεται δεν παρατηρήθηκαν καθόλου μικροπυρηνίσκοι ούτε στα κύτταρα control ούτε και στα κύτταρα που επώαστηκαν με το σύμπλοκο σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις. Επίσης, ούτε και πυρηνικές ανωμαλίες παρατηρήθηκαν σε μεγάλο ποσοστό. Ο μιτωτικός δείκτης παρουσία του συμπλόκου δεν άλλαξε σημαντικά και δεν παρατηρήθηκε μεγάλο ποσοστό χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Ομοίως, και στην περίπτωση της

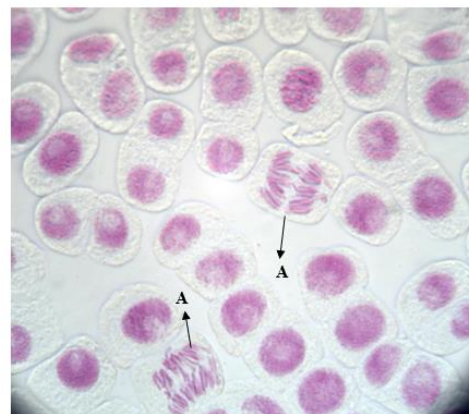
καρβακρόλης ο μιτωτικός δείκτης δε φαίνεται να αλλάζει σημαντικά σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (control) και το ποσοστό των χρωμοσωμικών ανωμαλιών είναι πολύ μικρό. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν μικροπυρηνίσκοι ούτε στην περίπτωση της καρβακρόλης. Άρα λοιπόν, οι δύο αυτές ενώσεις δεν να είναι γονοτοξικές, διότι δεν φαίνεται να επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο.

Παρακάτω παρουσιάζονται εικόνες από το οπτικό μικροσκόπιο από τα κύτταρα του *Allium cepa* σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Τα περισσότερα κύτταρα βρίσκονται στην μεσόφαση που είναι και η μεγαλύτερη σε διάρκεια φάση της κυτταρικής διαίρεσης. Έπειτα, φαίνονται χαρακτηριστικά κύτταρα στην πρόφαση (P), στη μετάφαση (M), στην ανάφαση (A) και στην τελόφαση (T). Επίσης, σημαίνονται και κύτταρα που μπορεί να έχουν κάποια χρωμοσωμική ανωμαλία.

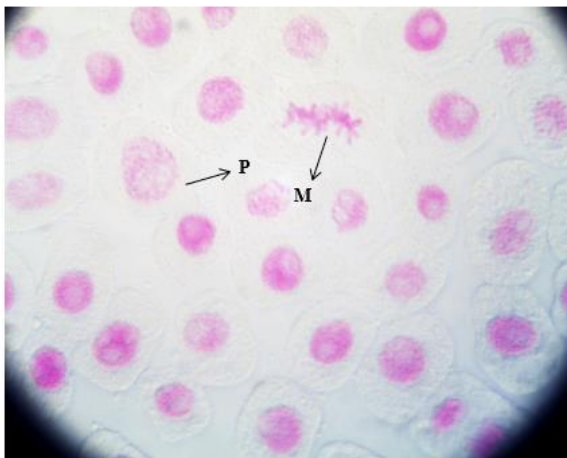
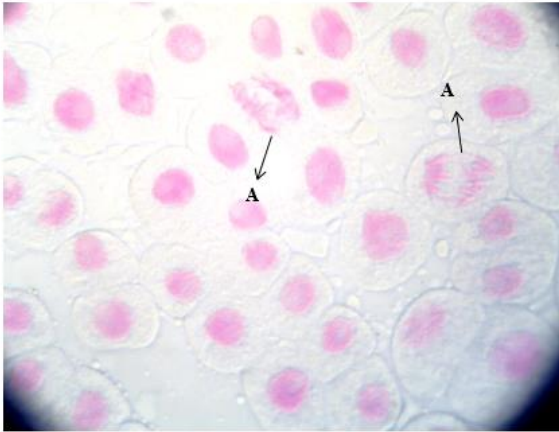


Εικόνα 45. *Allium Cepa* control

Εικόνα 44. *Allium cepa* 150 μ M TPAC



Εικόνα 43. *Allium cepa* 300 μ M TPAC



Εικόνα 46. *Allium Cepa* - Carvacrol 150 μ M

Εικόνα 47. *Allium Cepa* - Carvacrol 300 μ M

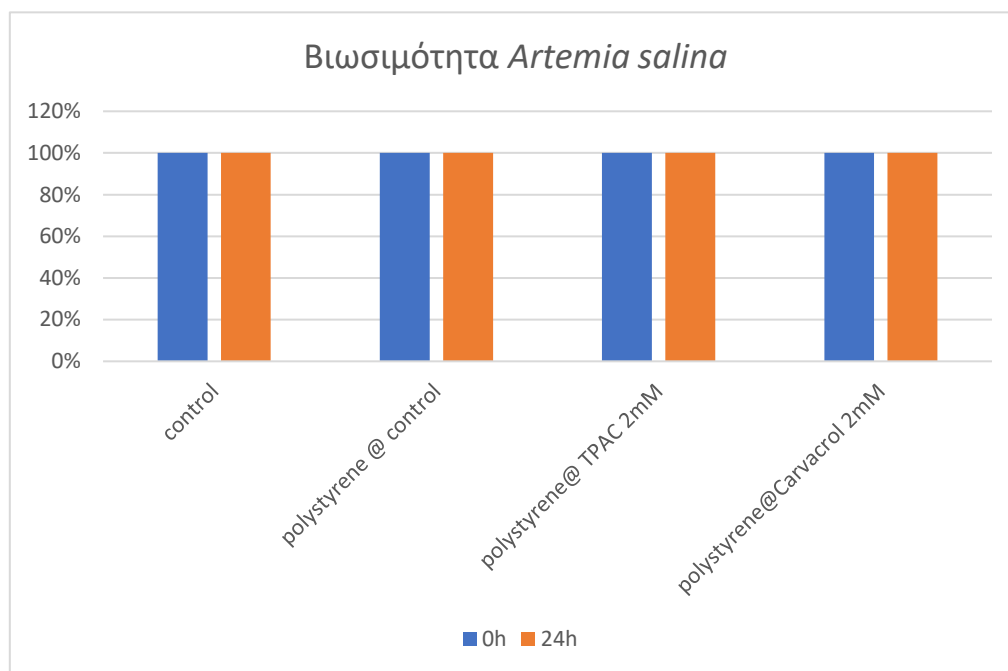
4.3.3.2 Τοξικότητα στην *Artemia Salina*

Η μελέτη της τοξικότητας *in vivo* σε μοντέλο ψαριού *Artemia salina* προσδιορίζει τη δυνατότητα βιωσιμότητας των έμβιων οργανισμών. Μελέτες που έχουν γίνει για τον έλεγχο της τοξικότητας της ρίγανης στο μοντέλο της *Artemia Salina* έδειξαν ότι η έκθεση σε υψηλή συγκέντρωση ακατέργαστου εκχυλίσματος ρίγανης ανέστειλε τη φυσιολογική ανάπτυξη της *Artemia Salina*. Εκφυλισμός των δευτέρων κεραιών (που είναι υπεύθυνη για την διηθήσεις των ληφθέντων τροφών) ήταν εμφανείς μετά από 48 ώρες έκθεσης σε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση. 100% ποσοστό θνησιμότητας παρατηρήθηκε στη διπλάσια συγκέντρωση, τόσο στις 48 ώρες όσο και στις 24 ώρες έκθεσης. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι όσο αυξάνεται ο χρόνος έκθεσης σε υψηλή συγκέντρωση του εκχυλίσματος υπάρχει αύξηση του ρυθμού τόσο των μορφολογικών ελαττωμάτων όσο και της θνησιμότητας. [Djamae L. Manzanares et al., 2015]. Παρόλο που είναι αποδεδειγμένο ότι το εκχύλισμα ρίγανης είναι τοξικό για την *Artemia Salina* ελέγχθηκε και για τις δύο ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις ανάλογες με αυτές που βρέθηκαν στην MIC των βακτηρίων. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η βιωσιμότητα ψαριών σε διαλύματα των ουσιών TPAC και καρβακρόλης σε συγκεντρώσεις 150 μM και 300 μM . Τα ψάρια έμειναν τοποθετημένα σε κατάλληλο επώαστή για 24 ώρες (12 ώρες φως και 12 ώρες σκοτάδι) και την επόμενη ημέρα τα ζωντανά ψάρια μετρήθηκαν με τη βοήθεια του στερεοσκοπίου.

Το συγκεκριμένο πείραμα επαναλήφθηκε και για το πολυστυρένιο. Το πολυστυρένιο κόπηκε σε κομμάτια (1cm x 1 cm) και τοποθετήθηκε στα πηγαδάκια μαζί με τις προνύμφες όπου και επώαστηκε για 24 ώρες.

Μετά την επώαση των δυο ουσιών (TPAC & carvacrol), δυστυχώς οι γαρίδες δεν επέζησαν ούτε σε αυτές τις συγκεντρώσεις αλλά αυτό ήταν αναμενόμενο, αφού από την βιβλιογραφία βρέθηκε ότι το εκχύλισμα της ρίγανης είναι τοξικό για το συγκεκριμένο οργανισμό. Η καρβακρόλη είναι το

μεγαλύτερο σε ποσοστό συστατικό της ρίγανης αλλά και το σύμπλοκο TPAC περιέχει καρβακρόλη
άρα τα αποτελέσματα αυτά ήταν αναμενόμενα.



Εικόνα 48. Ποσοστό βιωσιμότητας *Artemia salina*

Ωστόσο, το πολυστυρένιο το οποίο περιέχει τις δύο αυτές ουσίες σε συγκέντρωση 2mM φαίνεται να μην είναι τοξικό για τον οργανισμό διότι μετά από επώαση με αυτό οι προνύμφες επιβιώνουν στο 100%, όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα.

Παρακάτω φαίνεται μία φωτογραφία από το στερεοσκόπιο η οποία απεικονίζει τις προνύμφες της *Artemia Salina*.



Εικόνα 49. Φωτογραφία *Artemia Salina* από το μακροσκόπιο

4.3.4 Μελέτες δέσμευσης DNA

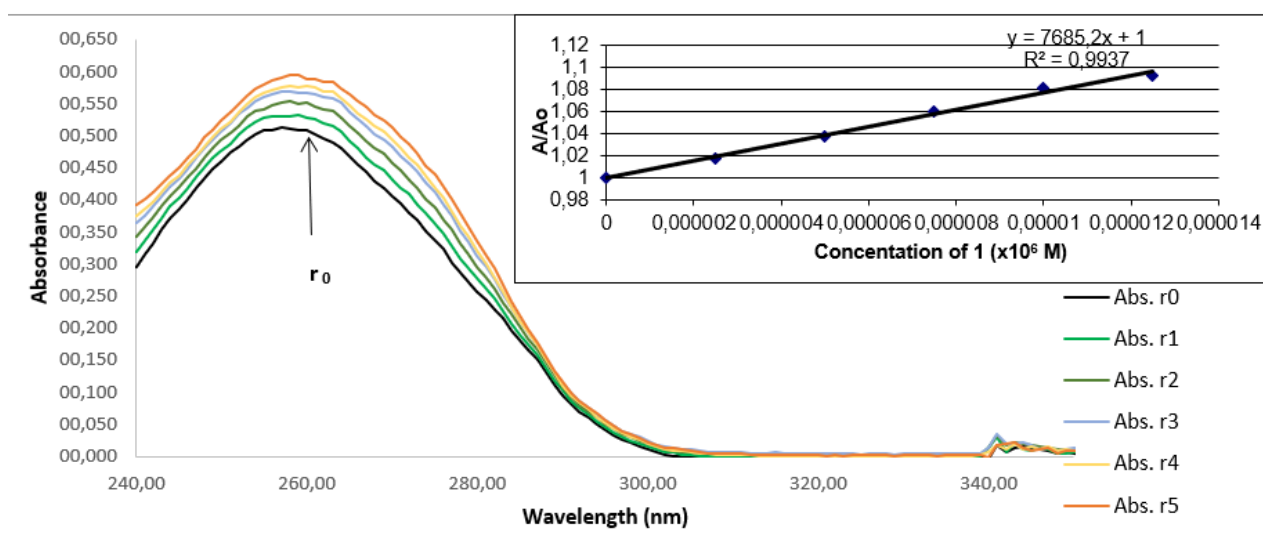
Οι μελέτες δέσμευσης των συμπλόκων στο DNA είναι σημαντικές για τον ορθολογικό σχεδιασμό και την κατασκευή νέων και πιο αποτελεσματικών αντιμικροβιακών φαρμάκων που στοχεύουν στο DNA. Η αλληλεπίδραση φαρμάκων με DNA είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της φαρμακολογίας και παίζει ζωτικό ρόλο στον προσδιορισμό των μηχανισμών δράσης των φαρμάκων και του σχεδιασμού πιο αποτελεσματικών και ειδικά στοχευμένων φαρμάκων με λιγότερες παρενέργειες. Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο τα μόρια φαρμάκων αλληλεπιδρούν με το DNA έχει γίνει μια ενεργή έρευνα μεταξύ χημείας, μοριακής βιολογίας και ιατρικής [M.Sirajuddin et al.,2013]. Ο τρόπος δέσμευσης του συμπλόκου προς το DNA θύμου αδένος μόσχου (CT-DNA) μελετήθηκαν με τη βοήθεια φασματοσκοπικών τεχνικών UV - vis και φθορισμού EB-DNA [C. N. Banti et al., 2014].

4.3.4.1 Φασματοσκοπία UV-vis DNA

Η φασματοσκοπία απορρόφησης UV-vis χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των ιδιοτήτων σύνδεσης μεταλλικών συμπλοκών με DNA. Ο υπερχρωισμός ή ο υποχρωισμός που παρατηρείται στο φάσμα UV του συμπλόκου με CT-DNA σε σχέση με το αντίστοιχο φάσμα του ελεύθερου CT-DNA σχετίζεται με τη διαμόρφωση της δομής της διπλής έλικας του DNA. Ο παρεμβατικός τρόπος δέσμευσης συνήθως οδηγεί σε υποχρωισμό μαζί με ή χωρίς μιας μικρής ερυθρής μετατόπισης (red shift) ή μπλε μετατόπισης (blue shift) λόγω της ισχυρής αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός συμπλόκου και των ζευγών βάσεων του DNA.

Ο υπερχρωισμός που παρατηρείται στα φάσματα μπορεί να αποδοθεί σε σχάση της διπλής έλικας, σε εξωτερική επαφή ή στο μερικό ξετύλιγμα της ελικοειδούς δομής του DNA, εκθέτοντας περισσότερες βάσεις του DNA, ή σε δέσμευση στην αύλακα του DNA (ένας αρωματικός δακτύλιος που ταιριάζει πολύ με την ελικοειδή στροφή είναι απαραίτητο να είναι μέρος της μεταλλικής ένωσης) [Suhani Patel et al., 2016].

Το παρακάτω σχήμα δείχνει τα φάσματα UV - vis του CT-DNA (σε σταθερή συγκέντρωση) σε ρυθμιστικό διάλυμα απουσία και παρουσία του TPAC σε διάφορες r τιμές ($r = [\text{σύμπλοκο}] / [\text{DNA}]$) και το γράφημα του A / A_0 έναντι $[\text{σύμπλοκο}]$ σε $\lambda_{\text{max}} = 257\text{nm}$. Στο παρακάτω γράφημα παρατηρείται πως σε σταθερή συγκέντρωση DNA και αυξανόμενη συγκέντρωση TPAC η απορρόφηση του DNA αυξάνεται. Άρα έχουμε υπερχρωισμό και το ποσοστό υπερχρωματικότητας είναι 3,57 %. Επίσης, παρατηρείται και μία ερυθρή μετατόπιση 3nm, άρα υπάρχει και βαθυχρωμία.



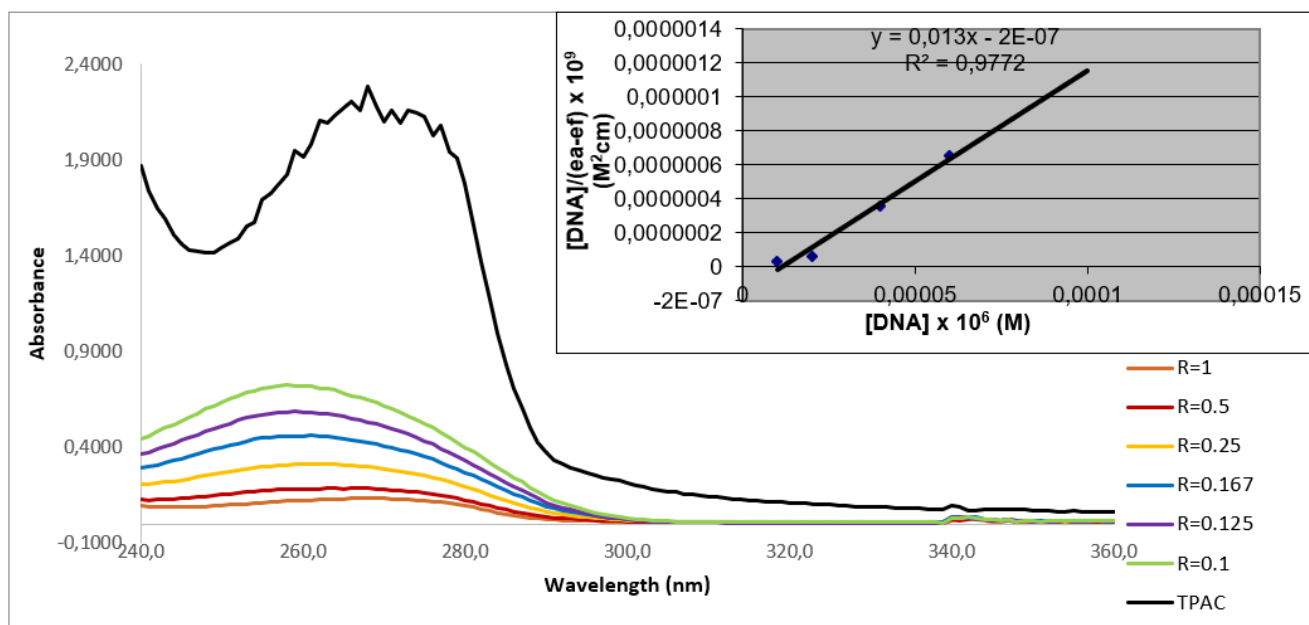
Εικόνα 50. Φάσμα UV-vis CT-DNA σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκου

Οι σταθερές δέσμευσης (K_b) του συμπλόκου TPAC προς το CT-DNA αξιολογήθηκαν παρακολουθώντας τις αλλαγές στην απορρόφηση των φασμάτων UV-vis στα 300 - 310 nm με αυξανόμενη συγκέντρωση CT-DNA. Η σταθερά K_b λαμβάνεται από την αναλογία της κλίσης της γραφικής παράστασης των $[DNA] / (\epsilon_A - \epsilon_f)$ έναντι $[DNA]$ σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$\frac{[DNA]}{(\epsilon_A - \epsilon_f)} = \frac{[DNA]}{(\epsilon_b - \epsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)}$$

όπου $[DNA]$ είναι η συγκέντρωση του CT-DNA, $\epsilon_A = A_{obsd} / [\text{σύμπλοκο}]$, ϵ_f είναι ο συντελεστής απόσβεσης για την ελεύθερη ένωση και ϵ_b είναι ο συντελεστής απόσβεσης για την ένωση στην πλήρως δεσμευμένη μορφή.

Η υπολογισμένη τιμή K_b για το TPAC είναι: $(3,2 \pm 0,96) \times 10^4$ M υποδηλώνοντας ισχυρή αλληλεπίδραση με CT-DNA. Παρακάτω φαίνεται και το φάσμα απορρόφησης του DNA με σταθερή συγκέντρωση συμπλόκου και αυξανόμενη συγκέντρωση DNA.



Εικόνα 51. Φάσμα UV-vis CT-DNA σε σταθερή συγκέντρωση συμπλόκου

4.3.4.2 Μελέτες φασματοσκοπίας φθορισμού

Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) είναι ένας από τους πιο ευαίσθητους ανιχνευτές φθορισμού που συνδέονται με το DNA μέσω παρεμβολής. Η μετατόπιση του EtBr (ποσοτικοποιημένη με φθορισμό) με την τιτλοδότηση μιας ένωσης είναι ενδεικτική μιας παρεμβατικής ή δευτερεύουσας δέσμευσης της αύλακας. Η ανταγωνιστική σύνδεση φαρμάκων στο DNA με EtBr θα μπορούσε να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη συγγένεια δέσμευσης DNA. Έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί για τη μείωση της έντασης των εκπομπών: η αντικατάσταση του EtBr και / ή η μεταφορά ηλεκτρονίων

Στην περίπτωση παραγόντων σύνδεσης της αύλακας του DNA, μπορεί να εμπλέκονται ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου ή υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και τα μόρια είναι κοντά στον σκελετό του φωσφορικού σακχάρου, είναι πιθανό να παρατηρηθεί μείωση της έντασης φθορισμού παρουσία DNA. Η φασματική τεχνική φθορισμού είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μετάλλων με το DNA και της σχετικής σύνδεσης αυτών των συμπλοκών με το CT-DNA. Το Ethidium bromide (EB) εκπέμπει έντονο φως φθορισμού παρουσία DNA λόγω της ισχυρής παρεμβολής του μεταξύ των γειτονικών ζευγών βάσεων DNA. Η μελέτη περιλαμβάνει την προσθήκη του συμπλόκου στο CT - DNA που έχει υποστεί προκαταρκτική επεξεργασία με EB και στη συνέχεια τη μέτρηση της έντασης των εκπομπών.

Τα φάσματα εκπομπής στα 588 nm των διαλυμάτων EB (2,3 μM) που περιέχουν CT-DNA (26 μM) απουσία ή παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων συμπλόκου (0-1200 μM) καταγράφηκαν κατά τη διέγερσή τους στα 527 nm. Η σταθερά K_{app} του DNA-αποσβέστη υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$K_{app} = K_{EB} \times [EB] / [Q_{50}](1)$$

όπου $[Q_{50}]$ είναι η συγκέντρωση σβέσης στη μείωση κατά 50% του φθορισμού, $K_{EB} = 10^7 M^{-1}$ και $[EB] = 2,3 \mu M$. Επιπλέον, οι σταθερές απόσβεσης καθορίζονται από την εξίσωση Stern-Volmer :

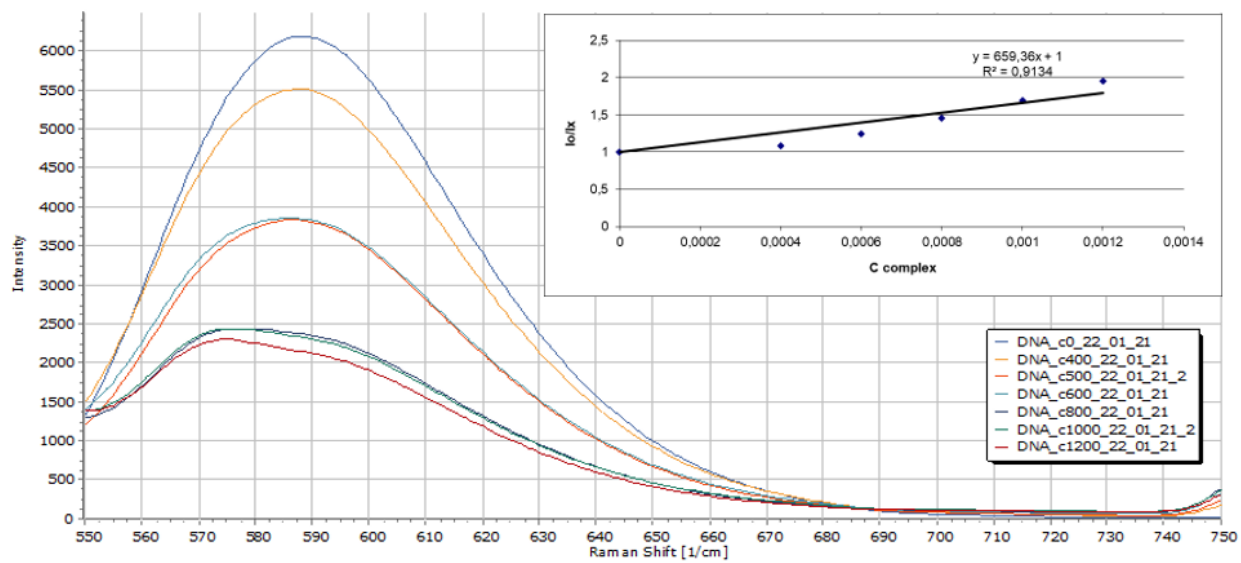
$$I_0 / I = 1 + K_{SV} \times [Q] \quad (2)$$

όπου I_0 και I είναι οι εντάσεις φθορισμού του CT-DNA απουσία και παρουσία του συμπλόκου TPAC, αντίστοιχα, το $[Q]$ είναι η συνολική συγκέντρωση του αποσβέστη (TPAC). Αντικαθιστώντας το I με $I_0 / 2$ στην εξίσωση (2), το $[Q_{50}]$ υπολογίζεται στη συνέχεια ως $[Q_{50}] = 1 / K_{SV}$. Και έτσι η εξίσωση (1) μετατρέπεται σε

$$K_{app} = K_{EB} \times [EB] \times K_{SV} \quad (3)$$

Η τιμή της K_{SV} του TPAC είναι $1,3 \pm 0,6 \times 10^4$. Οι τιμές της σταθεράς δέσμευσης K_{app} καθορίζονται από την εξίσωση (3). Οι σταθερές δέσμευσης (K_{app}) χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση των τρόπων σύνδεσης του συμπλόκου DNA. Έτσι, υπολογίστηκε η K_{app} για το σύμπλοκο TPAC ότι είναι $(2,5 \pm 1,3) \times 10^4 M^{-1}$, που υποδηλώνει ασθενή δέσμευση του συμπλόκου με την αύλακα του DNA.

Παρακάτω ακολουθεί το φάσμα εκπομπών φθορισμού του CT-DNA-EB παρουσία του συμπλόκου TPAC σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις ($[EB] = 2,3 \mu M$, $[DNA] = 26 \mu M$, $[\text{σύμπλοκο}] = 0-1200 \mu M$), $\lambda_{ex} = 527 \text{ nm}$). Στο φάσμα παρατηρείται μείωση φθορισμού που σημαίνει ότι δεν υπάρχει παρεμβολή αλλά πιθανή αλληλεπίδραση του συμπλόκου με την αύλακα του DNA, ώστε να εμποδίζεται η αλληλεπίδραση του βρωμιούχου αιθιδίου με το DNA και έτσι να υπάρχει μείωση φθορισμού.



Εικόνα 52. Φάσμα φθορισμού CT-DNA σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκου παρουσία Et-Br

Κεφάλαιο 5^ο

Συμπεράσματα

5. Συμπεράσματα

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας ένωσης (TPAC) με μοριακό τύπο $C_{38}H_{39}O_2Sb$. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία αυτή είναι η πρώτη ένωση πεντασθενούς αντιμονίου – καρβακρόλης που έχει συντεθεί και η δομή της, η οποία επιλύθηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων X μονοκρυστάλλου παρουσιάζει μεγάλο χημικό ενδιαφέρον. Από την επίλυση τις δομής μέσω της κρυσταλλογραφίας προέκυψαν δύο ισομερή της ένωσης στη μοναδιαία κυψελίδα που εμφανίζουν διαφορά στις αποστάσεις των δεσμών τους. Η νέα αυτή δομή χαρακτηρίστηκε με διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους ώστε να συλλεχθούν τα φασματοσκοπικά της δεδομένα και να διαπιστωθεί ότι αυτή η ένωση έχει σχηματιστεί επιτυχώς σε όλη της τη μάζα και στη συνέχεια να αποδειχθεί ότι είναι σταθερή σε διάλυμα DMSO έως και μία εβδομάδα. Έπειτα, συντέθηκαν αντιμικροβιακά υλικά τα οποία περιείχαν αυτές τις ουσίες και χαρακτηρίστηκαν και αυτά.

Στη συνέχεια, η ουσία TPAC καθώς και η καρβακρόλη, μελετήθηκαν ως προς την βιολογική τους δράση. Βρέθηκε λοιπόν, ότι εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση στα τρία από τα τέσσερα βακτήρια που μελετήθηκαν. Το TPAC εμφανίζει καλύτερη δράση για τα βακτήρια *S. Aureus* και *S. Epidermidis* που είναι δύο θετικά κατά Gram βακτήρια ενώ η καρβακρόλη εμφανίζει καλύτερη αντιμικροβιακή δράση στο βακτήριο *E. Coli* που είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο. Ωστόσο, καμία από τις δύο ουσίες δεν αναστέλλει την ανάπτυξη του βακτηρίου *P.aeruginosa* που είναι και αυτό ένα Gram⁻. Επιπλέον, υπολογίστηκε και η MBC για τις δύο ουσίες και βρέθηκε ότι το TPAC είναι βακτηριοκτόνο για τα βακτήρια *S. Epidermidis* και *S. Aureus*. Αντίστοιχα, και η καρβακρόλη είναι βακτηριοκτόνος για το *S. Aureus*. Το βακτήριο *P. aeruginosa* δεν θανατώνεται έως τη συγκέντρωση που μελετήθηκε. Πραγματοποιήθηκε και μελέτη της ελάχιστης συγκέντρωσης εξάλειψης του βιοφίλμ (BEC) και βρέθηκε ότι αναστέλλεται η ανάπτυξη βιοφίλμ μόνο για το βακτήριο *S.aureus* και από τις δύο ουσίες.

Έπειτα, μελετήθηκε η γονοτοξικότητα, δηλαδή η τοξικότητα στο γονίδιο και κατά συνέπεια στον κυτταρικό κύκλο, των ουσιών αυτών στον ζωντανό οργανισμό *Allium cepa*. Από αυτή τη μελέτη βρέθηκε ότι τα δύο αυτά σύμπλοκα δεν μεταβάλλει τον μιτωτικό δείκτη, άρα, δεν επηρεάζει τον κυτταρικό κύκλο. Επίσης, δεν εμφανίζονται ιδιαίτερα χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι οι δύο ενώσεις δεν είναι γονοτοξικές και αυτό ίσως είναι ένα λογικό αποτέλεσμα εφόσον το κύριο συστατικό προέρχεται από ένα φυσικό προϊόν την ρίγανη.

Επιπρόσθετα, μελετήθηκε και το πολυστυρένιο ως προς την αντιμικροβιακή του δράση και βρέθηκε ότι μειώνει σημαντικά την ανάπτυξη των υπό μελέτη βακτηρίων. Συγκριμένα, το polystyrene@TPAC σε συγκέντρωση 2mM μειώνει την βιωσιμότητα του βακτηρίου *P.aeruginosa* στο 73,3% ενώ δεν είχε βρεθεί MIC για το συγκεκριμένο βακτήριο. Αντίστοιχα, μειώνει την βιωσιμότητα και των τριών άλλων βακτηρίων. Στην περίπτωση του υλικού polystyrene@carvacrol 2mM μειώνεται και πάλι η βιωσιμότητα του βακτηρίου *P.aeruginosa* αλλά καλύτερη δράση εμφανίζεται στο βακτήριο *S.aureus* με τη βιωσιμότητα του συγκεκριμένου βακτηρίου να φτάνει στο 74,3%. Τα αποτελέσματα αυτά είναι πολύ ενθαρρυντικά για την χρήση αυτών των δύο ενώσεων σε αντιμικροβιακές επιφάνειες για την μείωση της ανάπτυξης αλλά και της μετάδοσης των μικροοργανισμών.

Ακόμη, μελετήθηκε και η in vivo τοξικότητα του πολυστυρενίου στον οργανισμό *Artemia salina* και βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει την βιωσιμότητα του η οποία ήταν στο 100% μετά από ένα εικοσιτετράωρο επώασης με το υλικό. Από την βιβλιογραφία βρέθηκε ότι το εκχύλισμα της ρίγανης είναι τοξικό για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό και προκαλεί τον θάνατό του. Παρόλα αυτά δοκιμάστηκαν και οι δύο υπό μελέτη ουσίες στην *Artemia salina* στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν αλλά δυστυχώς οι προνύμφες δεν επιβίωσαν. Αυτό το αποτέλεσμα είναι λογικό αφού η καρβακρόλη, την οποία περιέχει και το TPAC είναι το μεγαλύτερο σε ποσοστό συστατικό της ρίγανης. Το θετικό αποτέλεσμα βέβαια είναι ότι η παρουσία αυτών στο πολυστυρένιο δεν επηρεάζει την βιωσιμότητα των οργανισμών άρα το υλικό δεν είναι τοξικό.

Τέλος, έγιναν μελέτες πρόσδεσης του TPAC με το DNA με τη χρήση της φασματοσκοπίας UV-vis κα φθορισμού, ώστε να διαπιστωθεί ο μηχανισμός δράσης των συγκεκριμένων ουσιών. Παρατηρήθηκε ότι το σύμπλοκο αλληλεπιδρά με το DNA , προκαλώντας αύξηση της απορρόφησης του DNA (υπερχρωισμό). Αυτό σημαίνει ότι το σύμπλοκο μπορεί να αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με το DNA εξωτερικά είτε συνδέεται μέσω του αρωματικού του δακτυλίου στην αύλακα του DNA. Διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου και προκαλείται αποσταθεροποίηση της διπλής έλικας. Αυτό επιβεβαιώνεται από τα φάσματα εκπομπής φθορισμού, στα οποία παρατηρείται μείωση σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις συμπλόκου.

Συνοψίζοντας λοιπόν, δημιουργήθηκε μια νέα ένωση από ένα φυσικό προϊόν και το αντιμόνιο η οποία συμπεραίνουμε ότι εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία στείων υλικών που θα μπορούσαν να έχουν πολλές εφαρμογές όπως για παράδειγμα στείρες επιφάνειες, συσκευασίες τροφίμων, ιατρικές συσκευές κτλ.

Βιβλιογραφία

Βιβλιογραφία

1. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*, Sung-Sook Chun Dhiraj A.VattemYuan-Tong Lin Kalidas Shetty, *Process Biochemistry*, Volume 40, Issue 2, February 2005
2. Mariateresa Russo et al. Essential Oil Chemical Composition of Wild Populations of Italian Oregano Spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A Preliminary Evaluation of Their Use in Chemotaxonomy by Cluster Analysis. 1. Inflorescences, *Agricultural and food chemistry*, 1998
3. Essential Oil Chemical Composition of Wild Populations of Italian Oregano Spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A Preliminary Evaluation of Their Use in Chemotaxonomy by Cluster Analysis. 1. Inflorescences, Mariateresa Russo, Guido C. Galletti, Paola Bocchini, and Alberta Carnacini, *J. Agric. Food Chem.* 1998, August 14, 1998
4. Nayely Leyva-López et al, Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties, *Molecules*, 2017
5. Carvacrol-rich plants in Greece , S. Kokkini D. Vokou, *Flavour and Fragrance Journal*, 1989.
6. Oil of Oregano, David M. Brady, Suzanne Copp, *Design for health*
7. Antimony and antimonials Jeffrey K. Aronson, *Meyler's Side Effects of Drugs (Sixteenth Edition)*, 2016
8. *Leishmania major* LmACR2 Is a Pentavalent Antimony Reductase That Confers Sensitivity to the Drug Pentostam, Yao Zhou‡, Nadine Messier, Marc Ouellette, Barry P. Rosen‡ and Rita Mukhopadhyay, *The Journal of Biological Chemistry*, September 2004
9. In Vivo Antileishmanial Activity of Plant-Based Secondary Metabolites, Luiz Felipe Domingues Passero, ... João Henrique G. Lago, *Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components*, 2013

10. Antimony and antimonials Jeffrey K. Aronson, *Meyler's Side Effects of Drugs (Sixteenth Edition)*, 2016
11. «Schistosomiasis Fact sheet N°115». World Health Organization, 2014
12. *Leishmania: After The Genome*, P. Myler; Fasel Nhif, Caister Academic Press 2008
13. *Bacterial Resistance to β -Lactam Antibiotics: Compelling Opportunism, Compelling Opportunity*†, Jed F. Fisher, Samy O. Meroueh, Shahriar Mobashery, *Chemical Reviews ACS Publications* , 2005
14. *Bacterial detection: From microscope to smartphone*, Subash C.B.Gopinatha Thean-HockTang, Yeng Chen Marimuthu, Citartana Thangavel LakshmiPriya, *Biosensors and Bioelectronics*, 15 October 2014
15. *Diarrheagenic Escherichia coli*, James P. Nataro, James B. Kaper, *Clinical microbiology reviews*, April 1998
16. *Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact*, David M. Livermore, *Clinical Infectious Diseases* 2003
17. *Pathogenic Escherichia coli*. James B. Kaper, James P. Nataro & Harry L. T. Mobley *Nature Reviews Microbiology* volume, 2004
18. *Pseudomonas aeruginosa Infection in Cancer Patients*, Kenneth V. I. Rolston & Gerald P. Bodey, *Infectious complications of cancer*, 2009
19. *Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen*, C. K. Stover, X. Q. Pham, M. V. Olson, *Nature*, 2000
20. *Staphylococcus epidermidis infections*, Cuong Vuong, Michael Otto, *Microbes and Infection*, 2002

21. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems, A.D.Russell, *Journal of Hospital Infection* 1999
22. Quorum Sensing in Bacteria, Melissa B. Miller and Bonnie L. Bassler, *Annual Review of Microbiology*, October 2001
23. Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships, Teresa R. de Kievit, Barbara H. Iglewski, *Infection and Immunity*, Sept 2000
24. Alternative Antimicrobial Approach: Nano-Antimicrobial Materials, Nurit Beyth, Yael Hour-Haddad, Avi Domb, Wahid Khan, Ronen Hazan, Hindawi Publishing Corporation, 16 Mar 2015
25. Silver Bromide Nanoparticle/Polymer Composites: Dual Action Tunable Antimicrobial Materials, Varun Sambhy, Megan M. MacBride, Blake R. Peterson, and Ayusman Sen, *Journal of the American Chemical Society*, June 28, 2006
26. Polymerizable semi-fluorinated gemini surfactants designed for antimicrobial materials, Laurent Caillier, Elisabeth Taffin de Givenchy, Richard Levy, Yves Vandenberghe, Serge Geribaldi, Frederic Guittard, *Journal of Colloid and Interface*, 1 April 2009
27. Mixed ligand–silver(I) complexes with anti-inflammatory agents which can bind to lipoxygenase and calf-thymus DNA, modulating their function and inducing apoptosis, C. N. Banti, A. D. Giannoulis, N. Kourkoumelis, A. M. Owczarzak, M. Poyraz, M. Kubicki, d K. Charalabopoulosbe and S. K. Hadjidakou, April 2012
28. Synthesis and Structure of Tri(p-tolyl)antimony Diaroxides V. V. Sharutin, O. K. Sharutina, and A. N. Efremov, *Russian Journal of General Chemistry*, 2016

29. Benzene Solvates of Tris(4-Fluorophenyl)antimony Diaryloxides $(4\text{-FC}_6\text{H}_4)_3\text{Sb}(\text{OAr})_2 \cdot 1/2\text{PhH}$ (Ar = C₆H₄Cl-4, C₆H₄Br-4, C₆H₃Br₂-2,4). Synthesis and Structure V. V. Sharutin*, O. K. Sharutina, and A. N. Efremov, Russian Journal of Coordination Chemistry, 2016
30. SYNTHESIS AND STRUCTURE OF BIS(4-BROMOPHENOXY)TRIPHENYLANTIMONY, V.V. Sharutin, O.K. Sharutina, South Ural State University, Chelyabinsk, Russian Federation, 2016
31. Tris(para-Tolyl)- and Tris(4-Fluorophenyl)antimony Diaroxides: Syntheses and Structures V. V. Sharutin*, O. K. Sharutina, and A. N. Efremov Russian Journal of Coordination Chemistry, 2017
32. Synthesis and structure of bis(4iodophenoxy)triphenylantimony and 4iodophenoxytetraphenylantimony V. V. Sharutin, O. K. Sharutina, and V. S. Senchurin, Russian Chemical Bulletin, International Edition, 2016
33. Tetra- and Triarylantimony Pentafluoroand Pentachlorophenoxides: Synthesis and Structure V. V. Sharutina,, O. K. Sharutina, A. N. Efremov, and P. V. Andreev, , Russian Journal of Inorganic Chemistry, 2017
34. Tetra- and Triarylantimony Pentafluoroand Pentachlorophenoxides: Synthesis and Structure V. V. Sharutina, O. K. Sharutina, A. N. Efremov , and P. V. Andreev Russian Journal of Inorganic Chemistry, 2017
35. Benzene Solvates of Tris(4-Fluorophenyl)antimony Diaryloxides $(4\text{-FC}_6\text{H}_4)_3\text{Sb}(\text{OAr})_2 \cdot 1/2\text{PhH}$ (Ar = C₆H₄Cl-4, C₆H₄Br-4, C₆H₃Br₂-2,4). Synthesis and Structure V. V. Sharutin*, O. K. Sharutina, and A. N. Efremov, Russian Journal of Coordination Chemistry, 2016
36. Tris(para-Tolyl)- and Tris(4-Fluorophenyl)antimony Diaroxides: Syntheses and Structures V. V. Sharutin*, O. K. Sharutina, and A. N. Efremov Russian Journal of Coordination Chemistry, 2017

37. Benzene Solvates of Tris(4-Fluorophenyl)antimony Diaryloxides $(4\text{-FC}_6\text{H}_4)_3\text{Sb}(\text{OAr})_2 \cdot 1/2\text{PhH}$ (Ar = $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl-4}$, $\text{C}_6\text{H}_4\text{Br-4}$, $\text{C}_6\text{H}_3\text{Br}_2\text{-2,4}$). Synthesis and Structure V. V. Sharutin*, O. K. Sharutina, and A. N. Efremov, Russian Journal of Coordination Chemistry, 2016
38. . Effects of oregano (*Origanum vulgare*) leaf extract on early life stages of *Artemia salina*, Djamae L. Manzanares, Lady Jane G. Morilla, Anzhira D. Malawani, Nickel Jean S. Lagare, Liza R. Abrenica-Adamat Advances in Environmental Sciences - International Journal of the Bioflux Society, 2015
39. Novel metallo-therapeutics of the NSAID naproxen. Interaction with intracellular components that leads the cells to apoptosis, C. N. Banti , A. D. Giannoulis , N. Kourkoumelis , A. M. Owczarzak, M. Kubicki , S. K. Hadjidakou, Royal society of chemistry. 4th February 2014
40. Alireza Asem; Nasrullah Rastegar-Pouyani; Patricio De Los Rios (2010). "The genus *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Branchiopoda): true and false taxonomical descriptions" (PDF). Latin American Journal of Aquatic Research, 2010
 41. Alireza "The genus *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Branchiopoda): true and false taxonomical descriptions" (PDF). Latin American Journal of Aquatic Research, 2010
 atic Research. 38: 501–506. Archived from the original (PDF) on 2016-12-01. Retrieved 2018-01-30.
41. DR Ruebhart, “ Brine shrimp bioassay: importance of correct taxonomic identification of
42. *Artemia* (Anostraca) species”, *environmental toxicology*, 2008
43. Evaluation of Genotoxicity by Micronucleus Assay in vitro and by *Allium cepa* Test in vivo , C. N. Banti, S. K. Hadjidakou, Journal Inorganic Biochemistry, 2019
44. Kolle S (2012-06-01). "Genotoxicity and Carcinogenicity". BASF The Chemical Company. Archived from the original on 2013-06-28. Retrieved 2013-03-16

45. "Genotoxicity: Validated Non-animal Alternatives". AltTox.org. 2011-06-20. Retrieved 2013-03-16.
46. Quorum-Sensing Regulation of Antimicrobial Resistance in Bacteria, Xihong Zhao, Zixuan Yu, Tian Ding, Microorganisms, 2020
47. DNA binding and dispersion activities of titanium dioxide nanoparticles with UV/vis spectrophotometry, fluorescence spectroscopy and physicochemical analysis at physiological temperature, Suhani Patel, Palak Patel, Sachin B.Undre, Shivani R.Pandya, Man Singh, Sonal Bakshi, Journal of Molecular Liquids, 2016
48. Organotin derivatives of cholic acid induce apoptosis into breast cancer cells and interfere with mitochondrion; Synthesis, characterization and biological evaluation, M.E.K.Stathopoulou, N.Zoupanou, C.N.Banti, A.P.Douvalis, C.Papachristodoulou, K.D.Marousis, G.A.Spyroulias, T.Mavromoustakos, S.K.Hadjikakou, Steroids, 2021
50. Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and Other Nonfermentative Gram-Negative Bacteria, Robert E. W. Hancock, Clinical Infectious Diseases, 1998
51. Tentative interpretive standards for disk diffusion susceptibility testing with norfloxacin (MK-0366, AM-715), Shungu DL, Weinberg E, Gadebusch HH, Antimicrob Agents Chemother, 1983
52. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltammetry, Muhammad Sirajuddin, Saqib Ali, Amin Badshah, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2013