



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

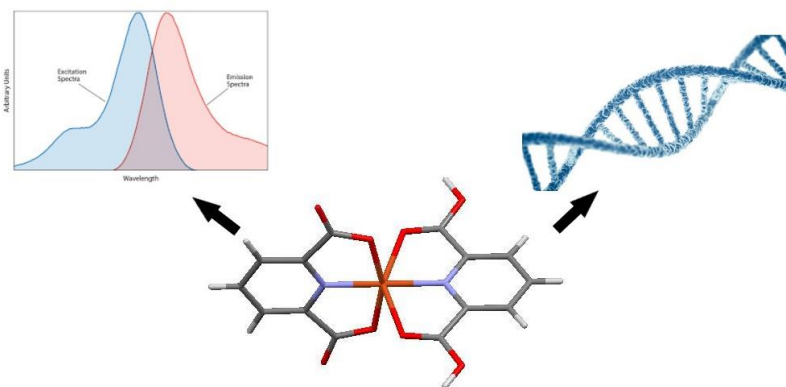
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**(Δ.Π.Μ.Σ.)**

**«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

**Σύνθεση, χαρακτηρισμός και βιολογική δραστικότητα νέων  
φθοριζόντων σύμπλοκων ενώσεων Cu(I/II) με  
υποκαταστάτες διπικολινικό οξύ ή/και τριφαίνυλοφωσφίνη**



**Μοσχοβίτης Κωνσταντίνος Χημικός**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2019**



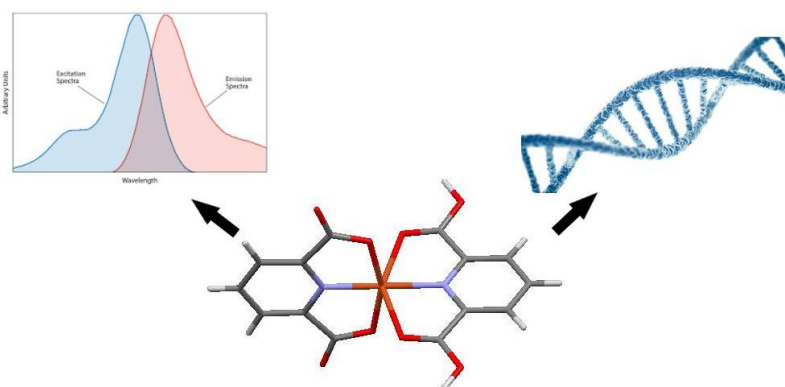
**UNIVERSITY OF IOANNINA SCHOOL OF SCIENCE**

**DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

**INTER-INSTITUTIONAL POSTGRADUATE STUDY PROGRAM**

**«BIOLOGICAL INORGANIC CHEMISTRY»**

**Synthesis, characterization, biological activity of new  
fluorescent complexes of Cu(I/II) with ligands dipicolinic  
acid and/or triphenylphosphine**



**Moschovitis Konstantinos Chemist**

**MASTER THESIS**

**IOANNINA 2019**

**Εισαγωγή στο ΔΙ-ΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
(Δ.Π.Μ.Σ.)**

**«ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

**του κ. Μοσχοβίτη Κωνσταντίνου**

Επιβλέπων μέλος ΔΕΠ: Χατζηκακού Σωτήριος

Θέμα: « Σύνθεση, χαρακτηρισμός και βιολογική δραστικότητα νέων  
φθοριζόντων σύμπλοκων ενώσεων Cu(I/II) με υποκαταστάτες διπικολινικό οξύ  
ή/και τριφαίνυλοφωσφίνη »

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από την

Ε.Δ.Ε.:.....<sup>Α</sup>/...-...-.....

- 1 Χατζηκακού Σωτήριος
- 2 Κουρκουμέλης Νικόλαος
- 3 Κουτσολέλος Αθανάσιος

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας στις \_\_\_\_\_

Ο Διευθυντής του Δ.Π.Μ.Σ.  
Καθηγητής \_\_\_\_\_

Ο/Η Γραμματέας  
\_\_\_\_\_



### Ευχαρηστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κύριο Σωτήριο Χατζηκακού που μου έδωσε ένα τόσο πρωτότυπο θέμα, που με δέχθηκε στο εργαστήριό του παρ' όλες τις δυσκολίες, και που ήταν διαθέσιμος για να με βοηθήσει σε ό,τι τον χρειαζόμουν. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη μεταδιδάκτορα κυρία Χριστίνα Μπαντή για την καθοδήγησή της και την συνεχή βοήθειά της στα βιολογικά πειράματα που πραγματοποίησα στο εργαστήριο εφαρμοσμένης βιοανόργανης χημείας, καθώς έχει μεγάλη εμπειρία και όρεξη στην δουλειά της. Ευχαριστώ την εξεταστική επιτροπή της εργασίας μου, τον κ. Κουρκουμέλη Νικόλαο και τον κ. Κουτσολέλο Αθανάσιο, για τις διορθώσεις της διατριβής. Για την ανάλυση των δομών με περίθλαση ακτίνων-Χ μονοκρυστάλλου ευχαριστώ τον κύριο Τασιόπουλο από το Πανεπιστήμιο της Κύπρου. Για την λήψη των φασμάτων φθορισμού των σύμπλοκων ενώσεων ευχαριστώ τον κύριο Λαζαρίδη από το Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Τέλος ευχαριστώ και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου εφαρμοσμένης βιοανόργανης χημείας που με βοήθησαν να προσαρμοστώ στο καινούργιο περιβάλλον δημιουργώντας ένα ωραίο κλίμα με ανταλλαγή απόψεων για επιστημονικά και μη ζητήματα. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου που με στήριξαν οικονομικά και συναισθηματικά μέχρι εδώ ώστε να μπορέσω να εκπονήσω την μεταπτυχιακή εργασία αυτή χωρίς προβλήματα. Τέλος ελπίζω να βοήθησα κι εγώ, έστω στο ελάχιστο το εργαστήριο εφαρμοσμένης βιοανόργανης χημείας στην πολύ ενδιαφέρουσα και συνεχή έρευνα που διεξάγεται.



*Αφιερώνεται στους γονείς μου και στην αδερφή μου...*





## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο χαλκός είναι ένα χημικό στοιχείο με μεγάλη βιολογική σημασία. Έχει δειχθεί ότι σύμπλοκες ενώσεις μετάλλων όπως Cu, Ag, Au, Zn, Sn με διάφορους υποκαταστάτες εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση. Η δράση αυτή σχετίζεται με την αλληλεπίδραση των συμπλόκων αυτών με το DNA των βακτηρίων. Η χρήση αντιβιοτικών φαρμάκων για την καταπολέμηση ορισμένων παθογόνων μικροοργανισμών έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών μικροβίων. Άρα είναι επιτακτική η ανάγκη παραγωγής χημειοθεραπευτικών ενώσεων με αντιμικροβική δράση που δεν είναι αντιβιοτικά. Σε αυτή την εργασία περιγράφεται η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και η βιολογική δραστηριότητα συμπλοκών ενώσεων του χαλκού με υποκαταστάτες τριφαινυλοφωσφίνη και διπικολινικό οξύ. Το διπικολινικό οξύ είναι ένα φυσικό προϊόν που παράγεται από ορισμένα είδη βακτηρίων κατά το σχηματισμό ανθεκτικών δομών, των ενδοσπορίων.

Συντέθηκαν συνολικά 4 σύμπλοκες ενώσεις, 2 νέες και 2 που έχουν συντεθεί ξανά, χαρακτηρίστηκαν με σημείο τήξης, φασματοσκοπία IR, NMR και κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. Έγινε προσδιορισμός της διαλυτότητάς τους σε διάφορους διαλύτες. Μελετήθηκε η σταθερότητα των συμπλόκων σε διαλύτη DMSO χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία UV και NMR. Μελετήθηκε η αλληλεπίδρασή τους με CT-DNA. Επίσης μελετήθηκε η αντιμικροβιακή τους ικανότητα σε βακτήρια του γένους *Pseudomonas aeruginosa*, μέσω εύρεσης των ζωνών αναστολής και της ελάχιστης συγκέντρωσης που προκαλεί αναστολή. Έγινε μέτρηση του φθορισμού των συμπλόκων αυτών για την χρήση τους σε μια νέα φθορισμομετρική μέθοδο ανίχνευσης ενδοσπορίων. Τέλος

μελετήθηκε η βιομιμική καταλυτική τους δράση στην οξείδωση της 3,5-δι-tert-βουτυλοκατεχόλη στην αντίστοιχη ο-κινόνη, σχετικά με το ένζυμο υπεροξειδική δισμουτάση (SOD).

**Λέξεις κλειδιά:** χαλκός, τριφαινυλοφωσφίνη, διπικολινικό οξύ, DNA, αντιμικροβιακές ενώσεις, υπεροξειδική δισμουτάση

**ABSTRACT**

Copper is a chemical element of great biological interest. It has been shown that complex compounds with metals such as Cu, Ag, Au, Zn, Sn with various ligands exhibit antimicrobial activity. This activity is related to the interaction of these complexes with the bacterial DNA. The use of antibiotic drugs to combat certain pathogenic microorganisms has led to the development of resistant strains of microbes. Therefore, it is imperative to produce chemotherapeutic compounds with antimicrobial activity that are not antibiotics.

This work describes the synthesis, characterization and biological activity of complex copper compounds with substituents triphenylphosphine and dipicolinic acid. Dipicolinic acid is a natural product produced by certain types of bacteria in the formation of resistant structures, the endospores.

In total 4 complex compounds, 2 new and 2 re-synthesized were characterized, characterized by melting point, IR, NMR and X-ray crystallography. The stability of the complexes in DMSO solvent was studied using UV and NMR spectroscopy. Their interaction with CT-DNA was studied. Their antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* was also studied via inhibition zone, and the minimum inhibition concentration MIC was determined. Fluorescence of these complexes was also measured for their use in a new fluorescence detection method for endospores. Finally, their biomimetic catalytic effect on the oxidation of 3,5-di-tert-butyl catechol to the corresponding o-quinone was studied.

**Keywords:** copper, triphenylphosphine, dipicolinic acid, DNA, antimicrobial compounds, superoxide dismutase



## Περιεχόμενα

Περιεχόμενα .....	13
Εισαγωγή.....	15
1.1 Χαλκός.....	15
1.1.1 Γενικά στοιχεία.....	15
1.1.2 Σύμπλοκες ενώσεις χαλκού.....	17
1.1.3 Η βιολογική σημασία του χαλκού.....	19
1.2.1 Βακτήρια .....	22
1.2.2 Ενδοσπόρια.....	24
1.3.1 Αντιβιοτικά.....	27
1.3.2 Ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.....	28
1.4 Φθορισμός .....	29
1.5 DNA και τρόποι αλληλεπίδρασης του με τις σύμπλοκες ενώσεις.....	38
1.6 Υπεροξειδική δισμουτάση.....	41
2. Σκοπός της έρευνας .....	43
3. Πειραματικό μέρος.....	45
Χημικό μέρος.....	45
3.1 Σύνθεση.....	45
3.2 Χαρακτηρισμός.....	48
3.2.1 Σημείο τήξης .....	48
3.1.2 Διαλυτότητα .....	48
3.1.3 Δονητική φασματοσκοπία υπεριώθρου.....	48
3.1.4 Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ .....	49
3.1.5 Σταθερότητα.....	51
3.1.6 Φασματοσκοπία υπεριώδους - ορατού .....	51
2.1.7 NMR .....	52
3.1.8 Φθορισμομετρία.....	53
Βιολογικά.....	53
4.1 Μελέτη της καταλυτικής δράσης των συμπλόκων .....	54
4.2 Μελέτη της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων με το DNA.....	54
4.3 Αντιμικροβιακή δράση.....	55
4.4 Ζώνη αναστολής.....	56
4.5 Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC).....	57
Αποτελέσματα .....	59
5. Αντιδράσεις .....	59
6.1 Σημείο τήξης.....	60
6.2 Διαλυτότητα.....	61
6.3 Ανάλυση με περίθλαση ακτίνων-Χ μονοκρυστάλλου.....	63
6.5 Σταθερότητα.....	78
6.6 Φθορισμομετρία.....	84
6.7 Ευθεία αναφοράς.....	88
7. Βιολογικό μέρος.....	89
7.1 Μελέτη της καταλυτικής δράσης των συμπλόκων .....	89
7.2 Αλληλεπίδραση με το DNA .....	94
7.3 Ζώνες αναστολής .....	103
7.4 Προσδιορισμός του IC <sub>50</sub> .....	104
8. Συμπεράσματα-προτάσεις : .....	108
Αναφορές.....	111



## Εισαγωγή

### 1.1 Χαλκός

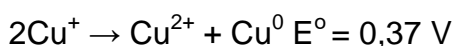
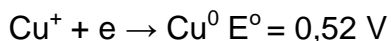
#### 1.1.1 Γενικά στοιχεία

Ο χαλκός είναι ένα χημικό στοιχείο με το σύμβολο Cu (από τη λατινική γλώσσα: *cuprum*) και το ατομικό αριθμό 29. Είναι ένα από τα λίγα μέταλλα που μπορούν να εμφανιστούν στη φύση σε μια άμεσα χρησιμοποιήσιμη μεταλλική μορφή (φυσικά μέταλλα). Στη ρωμαϊκή εποχή, ο χαλκός εξορύσσεται κατά κύριο λόγο από την Κύπρο, την προέλευση του ονόματος του μετάλλου, από το *aes cyprium* (μέταλλο της Κύπρου). Αυτό οδήγησε σε πολύ πρώιμη ανθρώπινη χρήση σε διάφορες περιοχές, από το 8000 π.Χ. Είναι ένα μαλακό, εύπλαστο και όλκιμο μέταλλο με πολύ υψηλή θερμική και ηλεκτρική αγωγιμότητα. Μια πρόσφατα εκτεθειμένη επιφάνεια καθαρού χαλκού έχει ένα ροζ-πορτοκαλί χρώμα, ενώ σχηματίζει εύκολα κράματα με άλλα μέταλλα. Λόγω των χαρακτηριστικών αυτών ιδιοτήτων του, χρησιμοποιείται ως αγωγός θερμότητας και ηλεκτρισμού ως δομικό υλικό και ως συστατικό διαφόρων μεταλλικών κραμάτων, όπως το ασήμι που χρησιμοποιείται σε κοσμήματα.

Η ηλεκτρονιακή διαμόρφωση του Cu με ένα ηλεκτρόνιο στο εξωτερικό 4s τροχιακό είναι ίδια με αυτή των αλκαλιμετάλλων, όμως η συμπληρωμένη 3d στοιβάδα δεν προστατεύει αποτελεσματικά το εξωτερικό ηλεκτρόνιο από το φορτίο του πυρήνα, με αποτέλεσμα η πρώτη ενέργεια ιοντισμού του Cu να είναι υψηλότερη από την αντίστοιχη στα αλκαλιμέταλλα. Αυτό, σε συνδυασμό με το υψηλότερο σημείο τήξεως αλλά και το γεγονός ότι τα 3d ηλεκτρόνια συμμετέχουν σε δεσμούς στο μεταλλικό πλέγμα, προσδίδουν στο χαλκό τον γνωστό χαρακτήρα ευγενούς μετάλλου. Έτσι, ο στοιχειακός χαλκός δεν αντιδρά

με το νερό και δεν προσβάλλεται από τα μη οξειδωτικά οξέα, ενώ με το οξυγόνο αντιδρά μόνο σε δραστικές συνθήκες δίνοντας  $\text{CuO}$  ή σε υψηλότερες θερμοκρασίες  $\text{Cu}_2\text{O}$ .

Ο χαλκός, ως τυπικό μεταβατικό στοιχείο, εμφανίζει χαρακτηριστική μεταβλητότητα σθένους. Σχηματίζει ιόντα στις οξειδωτικές βαθμίδες, +1 μέχρι +4 και δίνει εύκολα μεγάλη ποικιλία συμπλόκων. Οι βαθμίδες +1 και +2 είναι οι συνηθέστερες, με τη δεύτερη να επικρατεί σε σταθερότητα κάτω από κανονικές συνθήκες. Οι ενέργειες ιοντισμού των  $\text{Cu}^+$  και  $\text{Cu}^{2+}$  είναι 744 και 2700 kJ/mol αντίστοιχα. Παρόλο που η δεύτερη ενέργεια ιονισμού του χαλκού είναι σχετικά υψηλή, η μεγάλη θερμότητα εφυδάτωσης του  $\text{Cu}^{2+}$  σε σύγκριση με την αντίστοιχη του  $\text{Cu}^+$  (2300 και 581 kJ/mol αντίστοιχα) έχει ως αποτέλεσμα το εφυδατωμένο ιόν του δισθενούς χαλκού να είναι πιο σταθερό σε υδατικό διάλυμα. Η σχετική σταθερότητα των καταστάσεων  $\text{Cu}^+$  και  $\text{Cu}^{2+}$  σε υδατικά διαλύματα φαίνεται και από τα παρακάτω κανονικά δυναμικά:



Η θετική τιμή του  $E^\circ$  δείχνει ότι τα άλατα του μονοσθενούς χαλκού σε διαλύματα μετατρέπονται σχεδόν ποσοτικά σε άλατα του  $\text{Cu(II)}$ , κατά συνέπεια η χημεία του  $\text{Cu(I)}$  σε υδατικά διαλύματα είναι περιορισμένη.





Εικόνα 1. Άλας CuCl

Εικόνα 2. Άλας Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O

### 1.1.2 Σύμπλοκες ενώσεις χαλκού

Η χημεία του μονοσθενούς χαλκού ήταν πριν από δύο δεκαετίες σημαντικά λιγότερο εκτεταμένη από αυτή του δισθενούς χαλκού. Όμως, τα τελευταία χρόνια έχει γίνει αντιληπτή η σπουδαιότητα των συμπλόκων ενώσεων του Cu(I) με αποτέλεσμα το ερευνητικό ενδιαφέρον να στρέφεται πια ολοένα περισσότερο προς αυτές, με έμφαση στις δομικές, φασματοσκοπικές, οξειδοαναγωγικές, βιολογικές και καταλυτικές τους ιδιότητες και ιδιαίτερα στη διερεύνηση της σχέσης δομής-βιοδραστικότητας.

Το ιόν του μονοσθενούς χαλκού έχει  $d^{10}$  ηλεκτρονιακή διαμόρφωση και είναι διαμαγνητικό. Οι γνωστοί αριθμοί συναρμογής στα σύμπλοκα του είναι

δυο, τρία, τέσσερα και πολύ σπάνια πέντε. Επειδή στον  $\text{Cu}^+$  δεν υπάρχει δυνατότητα d-d μεταπτώσεων, τα σύμπλοκα του είναι συνήθως άχρωμα. Ορισμένα από αυτά είναι κίτρινα, κόκκινα ή πορτοκαλί λόγω απορροφήσεων μεταφοράς φορτίου ( $\text{L} \rightarrow \text{M}$  και  $\text{M} \rightarrow \text{L}$ ). Το ιόν του δισθενούς χαλκού με  $3d^9$  ηλεκτρονιακή διαμόρφωση είναι παραμαγνητικό και σχηματίζει σύμπλοκα με συνήθεις αριθμούς συναρμογής τέσσερα, πέντε και έξι, τα οποία είναι έγχρωμα λόγω των d-d μεταπτώσεων.

Σε αντίθεση με τον  $\text{Cu(II)}$ , ο οποίος θεωρείται οριακά σκληρό, ο  $\text{Cu(I)}$  συμπεριφέρεται ως τυπικό μαλακό οξύ. Κατά συνέπεια, στα σύμπλοκα του  $\text{Cu(II)}$  κυριαρχεί η συναρμογή μέσω σκληρών ατόμων-δότη όπως O και N, ενώ η πλειοψηφία των συμπλόκων του  $\text{Cu(I)}$  περιέχει ligands με P- και S- δότες. Ωστόσο, έχει αναφερθεί σημαντικός αριθμός συμπλόκων του μονοσθενούς χαλκού που περιέχουν αμίνες όπως η πυριδίνη και τα παράγωγά της, η αιθυλενοδιαμίνη κλπ [1 - 2]. Το ιόν  $\text{Cu}^+$  σε υδατικά διαλύματα είναι ασταθές και μετατρέπεται σε  $\text{Cu}^{2+}$ , μπορεί όμως να σταθεροποιηθεί με σχηματισμό ενώσεων που έχουν μικρή διαλυτότητα ή με σχηματισμό συμπλόκων με ligands που έχουν χαρακτήρα π-δέκτη.

Τα σύμπλοκα του  $\text{Cu(I)}$  συνήθως παρασκευάζονται:

- Με απευθείας αντίδραση των υποκαταστατών με απλά άλατα του  $\text{Cu(I)}$ .
- Με ηλεκτρολυτική αναγωγή των αντίστοιχων ενώσεων του  $\text{Cu(II)}$ .
- Με αναγωγή του  $\text{Cu(II)}$  από ligand με αναγωγικές ιδιότητες.

Στην περίπτωση της αναγωγικής σύνθεσης από άλατα του δισθενούς χαλκού, η χρήση του ακετονιτριλίου ως διαλύτη παρέχει το πλεονέκτημα της αυξημένης διαλυτότητας τόσο για το άλας του χαλκού όσο και για τα ligands, ενώ

ταυτόχρονα αυξάνει την πιθανότητα σχηματισμού κρυστάλλων κατάλληλων για κρυσταλλογραφική ανάλυση με περίθλαση ακτίνων-Χ.

Τα σύμπλοκα του Cu(II) συνήθως παρασκευάζονται:

- Με απευθείας αντίδραση των υποκαταστατών με απλά άλατα του Cu(II)
- Με ηλεκτρολυτική οξείδωση των αντίστοιχων ενώσεων του Cu(I).
- Με οξείδωση του Cu(I) από ligand με οξειδωτικές ιδιότητες.

### 1.1.3 Η βιολογική σημασία του χαλκού

Ο χαλκός είναι το τρίτο σε αφθονία ιχνοστοιχείο μετά τον ψευδάργυρο και βρίσκεται σε ίχνη στους ζωντανούς οργανισμούς. Στον ανθρώπινο οργανισμό απαντάται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο ήπαρ, τον εγκέφαλο και τους πνεύμονες και σε χαμηλές συγκεντρώσεις στους νεφρούς. Η ζωή στη Γη έχει εξελιχθεί σαν ένα μίγμα οργανικών και ανόργανων ενώσεων. Τα οργανικά μόρια όπως αμινοξέα, υδατάνθρακες και νουκλεοτίδια, είναι δομικά συστατικά των πρωτεϊνών και του γενετικού υλικού όλων των οργανισμών. Αυτά τα βασικά συστατικά των μακρομορίων συντίθενται μέσω ενζυμικών αντιδράσεων και τελικά αποικοδομούνται. Ανόργανα μέταλλα όπως ο χαλκός (Cu), σίδηρος (Fe) και ψευδάργυρος (Zn) όταν διαλυθούν από το φλοιό της Γης δεν δημιουργούνται ούτε καταστρέφονται και η ομοιόστασή τους στους ζωντανούς οργανισμούς βρίσκονται υπό αυστηρό έλεγχο. Μία από τις ιδιότητες του χαλκού είναι η παρουσία του σε αναγμένη ( $\text{Cu}^+$ ) ή οξειδωμένη κατάσταση ( $\text{Cu}^{2+}$ ) και έχει μεγάλη σημασία στα βιολογικά συστήματα. Ο μονοσθενής χαλκός έχει συγγένεια με θειολομάδες (-RSH) και θειολεστερομάδες (-RC=OSR') ομάδες που βρίσκονται στα αμινοξέα κυστεΐνη και μεθειονίνη αντίστοιχα. Ο δισθενής

χαλκός εμφανίζει προτιμώμενη συναρμογή με -O ή ιμιδαζολικό άτομο -N τα οποία βρίσκονται στα αμινοξέα ασπαρτικό οξύ και ιστιδίνη αντίστοιχα. Άρα τα μεταλλικά ιόντα του χαλκού μπορούν να συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες οδηγώντας σε ποικιλία δομών και βιοχημικών αντιδράσεων. [3] Ο χαλκός σε ελεύθερη κατάσταση απαντάται με τη μορφή οξειδίων του μονοσθενούς και δισθενούς  $\text{Cu}_2\text{O}$  και  $\text{CuO}$  και έχει κόκκινο-πορτοκαλί χρώμα.

Ο χαλκός είναι ένα στοιχείο απαραίτητο στους ανθρώπους και σε όλα τα ζώα. Καθώς χρειάζεται σε μικρές ποσότητες το ανθρώπινο σώμα περιέχει περίπου 100 mg Cu. Συμμετέχει σε πολλά ένζυμα στο ανθρώπινο σώμα, με τη σερουλοπλασμίνη να είναι το ένζυμο με χαλκό σε μεγαλύτερη αφθονία στο ανθρώπινο σώμα. Η σερουλοπλασμίνη είναι ένα ένζυμο που παίζει ρόλο στο μεταβολισμό του σιδήρου στο ανθρώπινο σώμα. Εκτός από αυτό το ένζυμο συμμετέχει και σε πολλές άλλες βιολογικές διαδικασίες, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η αντιοξειδωτική άμυνα και η σύνθεση πεπτιδίων. Είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο για τον άνθρωπο και έχει δειχθεί ότι η έλλειψή του κατά την εμβρυακή ανάπτυξη προκαλεί καρδιαγγειακά προβλήματα, παραμορφώσεις στα οστά και ανωμαλίες στο ανοσοποιητικό σύστημα. Στην ενήλικη ζωή η έλλειψή του προκαλεί διαταραχές στο μεταβολισμό της χοληστερόλης [4].

Παρόλο που ο χαλκός είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο για τον άνθρωπο είναι τοξικό σε υψηλά επίπεδα. Περίσσεια χαλκού οδηγεί σε οξειδωτικές διαταραχές επειδή παράγονται δραστικές ρίζες οξυγόνου (ROS), μέσω μηχανισμών αντιδράσεων Fenton και Haber-Weiss, κάτι που οδηγεί σε οξειδωτική βλάβη στο κύτταρο και κυτταρικό θάνατο [5]. Στον άνθρωπο

προκαλούν νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως Alzheimer και Parkinson [6,7]. Άλλες ασθένειες που σχετίζονται με την ομοιόσταση του χαλκού είναι η ασθένεια Wilson και η ασθένεια Menke. Η ασθένεια Wilson είναι μία αυτοσωμική υπολειπόμενη ασθένεια που προκαλείται από μετάλλαξη στο ATP7B γονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί μία ATPάση που μεταφέρει χαλκό. Το αποτέλεσμα είναι η διαταραχή στην μεταφορά άρα στον μεταβολισμό του χαλκού με ταυτόχρονη συσσώρευση του χαλκού. Οι ασθενείς εμφανίζουν συμπτώματα όπως δυστονία, δυσαρθρία και τρέμουλο. Η θεραπεία έχει σα στόχο την μείωση του τοξικού ελεύθερου χαλκού. Η φαρμακευτική αγωγή περιλαμβάνει λήψη χηλικών ενώσεων όπως πενικιλλαμίνη και η υδροχλωρική τριεντίνη και σύμπλοκες ενώσεις όπως οξικός ψευδάργυρος. Η ασθένεια Menke προκαλείται από μετάλλαξη στο ATP7A γονίδιο και προκαλεί έλλειμα χαλκού. Αποτέλεσμα είναι νευρολογικά προβλήματα όπως υποτονία, κόπωση μυαλγία, αδυναμία και κρίσεις. Η θεραπεία γίνεται με συμπληρώματα χαλκού [8,9].

Ο Cu παίζει καθοριστικό ρόλο σε μεγάλο αριθμό ενζύμων που συμμετέχουν σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων, στη μεταφορά οξυγόνου και στην κατάλυση των αντίστοιχων αντιδράσεών τους. Χρησιμεύει ως βασικό συστατικό σε πολλά καταλυτικά ένζυμα π.χ. είναι βασικό συστατικό μεταλλοπρωτεϊνών αλλά και σε ένζυμα όπως η οξειδάση του λυσουλίου (στους συνδετικούς ιστούς) και η οξειδάση του κυτοχρώματος c (πρωτεΐνη μεταφοράς ηλεκτρονίων).

Τον χαλκό ήδη από την αρχαία Αίγυπτο τον χρησιμοποιούσαν στην παραγωγή σκευών για συντήρηση νερού και φαγητού και για ιατρικές εφαρμογές. Από τότε χρησιμοποιείται κυρίως κατά τη μεταφορά και την

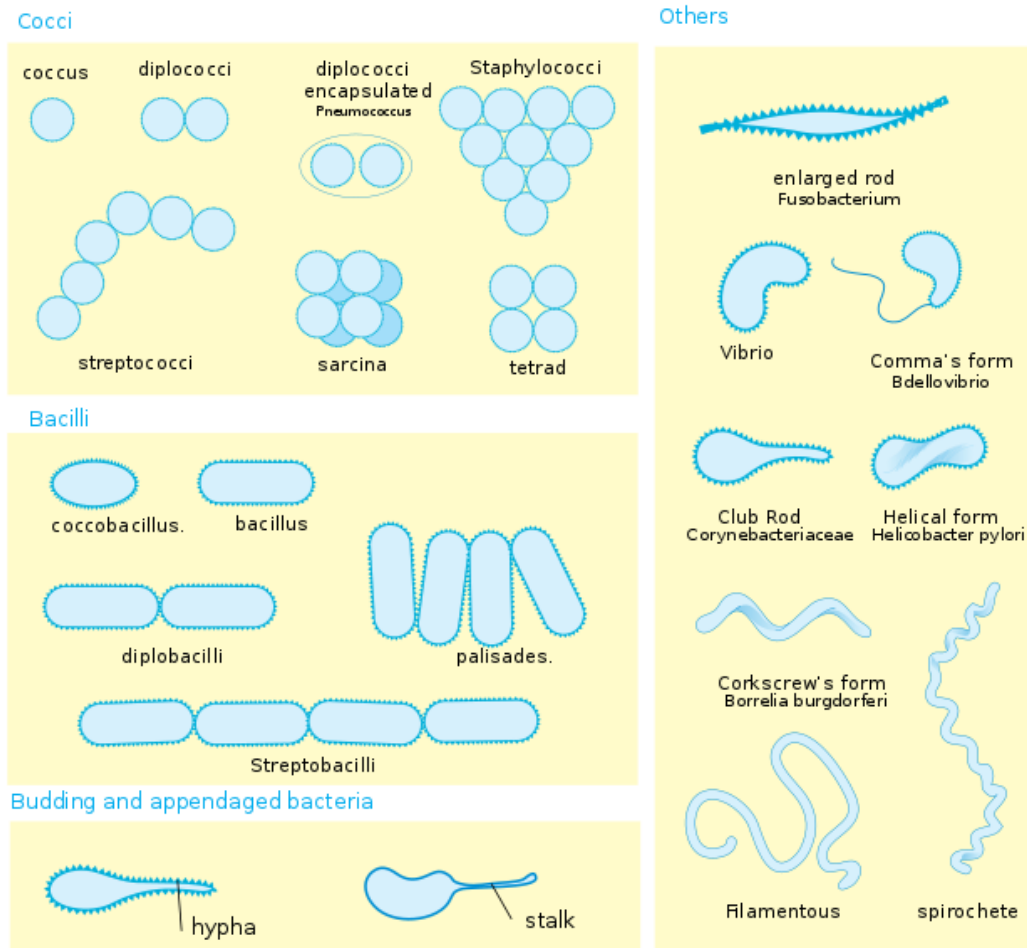
κατεργασία του νερού στις σωληνώσεις. Αυτό έχει περιορίσει την θνησιμότητα, λόγω ασθενειών που μεταφέρονται μέσω του πόσιμου νερού, στις αναπτυσσόμενες χώρες. Πειράματα έχουν δείξει ότι επιφάνειες που περιέχουν τουλάχιστον 55-70 % χαλκό καταστρέφουν πολλούς παθογόνους μικροοργανισμούς, βακτήρια όπως *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus* και μύκητες όπως *Candida albicans* [10]. Επιπλέον σύμπλοκες ενώσεις με χαλκό έχει δειχθεί ότι εμφανίζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες [11].

---

### 1.2.1 Βακτήρια

Τα βακτήρια είναι μονοκύτταροι προκαριωτικοί οργανισμοί. Το όνομα «βακτήρια» προέρχεται από την αρχαία ελληνική λέξη βακτηρία (δηλαδή ράβδος, μπαστούνι), λόγω του σχήματος που είχαν οι πρώτοι εξ αυτών παρατηρηθέντες μικροοργανισμοί. Οι διαστάσεις των βακτηρίων μετριοούνται σε μικρόμετρα, (μm), κατά συνέπεια είναι ορατά μόνο με μικροσκόπιο. Πρόκειται για τους μικρότερους μονοκύτταρους οργανισμούς μεταξύ των εμβίων όντων, μετά από τους ιούς. Για την ταξινόμηση των βακτηρίων λαμβάνονται υπόψη διάφορα χαρακτηριστικά τους όπως: το σχήμα, το μέγεθος, η μορφολογία των αποικιών, το είδος της τροφής, τα προϊόντα του μεταβολισμού, οι αντιδράσεις, καθώς και ο βαθμός αντοχής στην περιβαλλοντική αλλαγή. Ένας κλασικός, πλέον, τρόπος χαρακτηρισμού των βακτηρίων βασίζεται στη δομή του κυτταρικού τους τοιχώματος και περιλαμβάνει την χρήση της τεχνικής της χρώσης κατά Γκραμ, οπότε τα βακτήρια χαρακτηρίζονται ως αρνητικά ή θετικά κατά Γκραμ. Η χρώση Γκραμ ανιχνεύει πεπτιδογλυκάνη και διαφοροποιεί τα

βακτήρια με βάση το πάχος του κυτταρικού τους τοιχώματος που περιέχει πεπτιδογλυκάνη [12-13]



Εικόνα 3 : Διάφορα είδη και μορφολογίες βακτηρίων

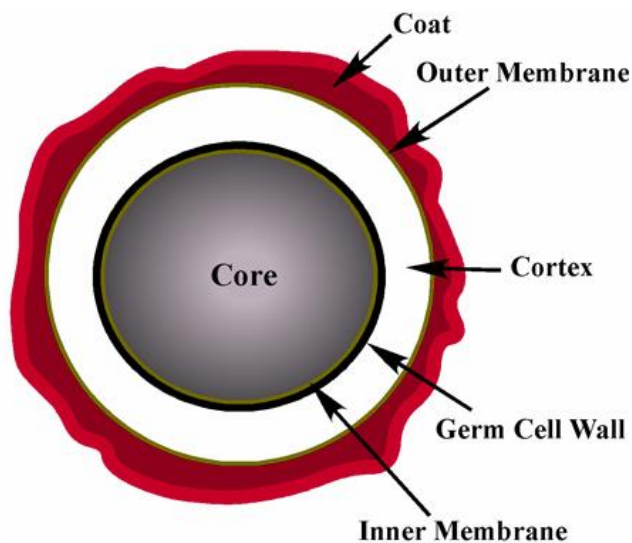
Τα βακτήρια έχουν απλή κυτταρική δομή. Η κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων περιβάλλεται από το κυτταρικό τοίχωμα, που είναι το κοινό χαρακτηριστικό όλων των βακτηρίων. Το DNA οργανώνεται στον πυρήνα, χωρίς πυρηνική μεμβράνη και χρωμοσώματα. Πολλά βακτήρια έχουν επιπλέον πλασμίδια, τα οποία είναι μικρά αυτόνομα κυκλικά μόρια DNA. Η ικανότητα των πλασμιδίων να μεταφέρονται από το ένα βακτήριο στο άλλο προσθέτοντάς του νέες ιδιότητες, έχει μεγάλη σημασία στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα

αντιβιοτικά. Τα περισσότερα βακτήρια χαρακτηρίζονται ενεργά όταν η θερμοκρασία περιβάλλοντος είναι μεγαλύτερη των +5 °C, με εξαίρεση κάποια που παραμένουν ενεργά γύρω στους 0 °C, ή λίγο χαμηλότερα, τα οποία καλούνται ψυχρόφιλα. Τα βακτήρια, γενικά, εμφανίζουν αξιοσημείωτο εύρος ιδανικής θερμοκρασίας ανάπτυξης, ανάλογα με το είδος τους [14-16]. Σε ακραίες θερμοκρασίες ή υπό την επίδραση ακτινοβολιών και άλλων ιδιαίτερα βλαβερών περιβαλλοντικών παραγόντων ορισμένα γένη βακτηρίων σχηματίζουν ανθεκτικές, μη αναπαραγωγικές δομές, τα ενδοσπόρια [17].

### **1.2.2 Ενδοσπόρια**

Ορισμένα είδη θετικών κατά Γκραμ βακτηρίων, όπως *Bacillus spp.* Και *Clostridium spp.* μπορούν να σχηματίσουν εξαιρετικά ανθεκτικές, αδρανείς μορφές που ονομάζονται ενδοσπόρια. Τα ενδοσπόρια αναπτύσσονται μέσα στο κυτταρόπλασμα κάθε κυττάρου. Κάθε ενδοσπόριο περιέχει το DNA και τα ριβοσώματα μέσα σε ένα φλοιό αποτελούμενο από πεπτιδογλυκάνη και διάφορες πρωτεΐνες. Όταν οι συνθήκες ξαναγίνουν ευνοϊκές για την επιβίωση και την ανάπτυξη του βακτηρίου το ενδοσπόριο βλασταίνει δίνοντας ένα βακτήριο.



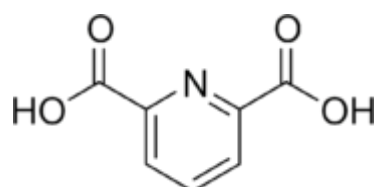


Εικόνα 4 : Αναπαράσταση ενδοσπορίου

Τα ενδοσπόρια δεν εμφανίζουν ανιχνεύσιμο μεταβολισμό άρα η ανίχνευσή τους είναι δύσκολη. Μπορούν να επιβιώσουν ακραίες συνθήκες φυσικού και χημικού στρες. Η ακτινοβολία UV και γ, τα ένζυμα που υδρολύουν τα βακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα, και μια ποικιλία τοξικών χημικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των γενοτοξικών παραγόντων, όπως οξειδωτικοί παράγοντες, αλδεΐδες, οξύ και αλκάλια. Αυτή η αντίσταση οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, οι οποίοι περιλαμβάνουν τα εξωτερικά στρώματα του ενδοσπορίου, όπως το παχύ πρωτεϊνικό τοίχωμα που αποτοξινώνει δραστικές χημικές ουσίες. Η σχετικά αδιαπέραστη εσωτερική μεμβράνη των ενδοσπορίων περιορίζει την πρόσβαση των τοξικών χημικών ουσιών στον πυρήνα των σπορίων που περιέχει το DNA του σπορίου και τα περισσότερα ένζυμα [18-19].

Επιπλέον στα ενδοσπόρια έχει ανιχνευθεί μία χημική ένωση το διπικολινικό οξύ ( $H_2DPA$ ) το οποίο δεν υπάρχει στις βλαστικές μορφές των βακτηρίων και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και την ανθεκτικότητα των ενδοσπορίων. Το διπικολινικό οξύ αποτελεί το 10 – 20 % του

ξηρού βάρους των ενδοσπορίων. Αυτή η χημική ένωση υπάρχει στον πυρήνα των ενδοσπορίων σε αναλογία 1.1 με δισθενή κατιόντα κυρίως  $\text{Ca}^{2+}$ . Ένας ρόλος του διπικολινικού οξέος είναι να εκτοπίζει και να αντικαθιστά έτσι το νερό κατά τη σπορογένεση αλλά και να προστατεύει από τις ιονίζουσες ακτινοβολίες το DNA και τα ένζυμα του κυττάρου. Μεταλλαγμένα είδη βακτηρίων που δεν παρήγαγαν DPA κατά το σχημασμό ενδοσπορίων, είχαν πιο μικρή αντοχή στις ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες [20-22].



2,6-πυριδίνωδικαρβοξυλικό οξύ (διπικολινικό οξύ)

Επειδή υπάρχει στα ενδοσπόρια των βακτηρίων και όχι στις βλαστικές μορφές μπορεί να δράσει σαν μοναδικός βιοδείκτης για την ύπαρξη ενδοσπορίων. Στις μεθόδους που έχουν αναπτυχθεί συμπεριλαμβάνεται ο φθορισμομετρικός προσδιορισμός με σύμπλοκα των λανθανίδων όπως Eu και Tb [22-23].

Παρά τους ακραία αντίσταση, τα ενδοσπόρια μπορούν να σκοτωθούν, μέσω βλαβών στο DNA, στις πρωτεΐνες των ενδοσπορίων ή στις εσωτερικές μεμβράνες. Σε αυτή την αδρανή κατάσταση, αυτοί οι μικροοργανισμοί τείνουν να παραμείνουν διαθέσιμοι για εκατομμύρια χρόνια. Ορισμένα βακτήρια τα οποία σχηματίζουν ενδοσπόρια προκαλούν σοβαρές ασθένειες όπως το *Bacillus anthracis* (βάκιλλος του άνθρακα) που προκαλεί την ασθένεια του άνθρακα, ενώ η μόλυνση με *Clostridium tetani* προκαλεί τέτανο [24-25].

### 1.3.1 Αντιβιοτικά

Παραδοσιακά ο όρος αντιβιοτικά αναφέρεται σε ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς που σε χαμηλή συγκέντρωση προκαλούν το θάνατο ή την αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών, αλλά προκαλούν μικρή ή καθόλου ζημιά στον ξενιστή. Ο όρος αντιμικροβιακός παράγοντας από την άλλη αναφέρεται σε κάποια ουσία, φυσικής, συνθετικής ή ημισυνθετικής προέλευσης που σε χαμηλές συγκεντρώσεις προκαλούν το θάνατο ή την αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και προκαλούν μικρή ή καθόλου ζημιά στον ξενιστή. Τόσο τα αντιβιοτικά όσο και τα αντιμικροβιακά δεν είναι αποτελεσματικά έναντι των ιών [26]. Στον παρακάτω πίνακα ακολουθούν οι κυριότερες κατηγορίες αντιβιοτικών και ο μηχανισμός δράσης τους.

Πίνακας 1 : Κατηγορίες εμπορικών αντιβιοτικών και ο μηχανισμός δράσης τους

Όνομασία	Μηχανισμός δράσης
Πενικιλίνες, Κεφαλοσπορίνες, Βανκομυκίνη, Κυκλοσερίνη	Σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος
Ακτινομυκίνη	Επιμύκηση του DNA
Κινολόνες	Γυράση του DNA
Πολυμυξίνες	Δομή της κυτταρικής μεμβράνης
Τετρακυκλίνη, Στρεπτομυκίνη, Καναμυκίνη, Αμικακίνη	Πρωτεϊνοσύνθεση (αναστολή της ριβοσωμικής υπομονάδας 30S)
Ερυθρομυκίνη, Κλινδαμυκίνη, Χλωραμφαινικόλη	Πρωτεϊνοσύνθεση (αναστολή της ριβοσωμικής υπομονάδας 50S)
Σουλφοναμίδες	Μεταβολισμός του φολικού οξέος

### 1.3.2 Ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά

Λόγω της ευρείας χρήσης αντιβιοτικών αναπτύσσονται στελέχη μικροοργανισμών ανθεκτικά σε αυτά τα αντιβιοτικά. Η αντίσταση στα αντιβιοτικά αποτελεί απειλή για τα άτομα, την υγειονομική περίθαλψη και τα κτηνιατρικά συστήματα και τις γεωργικές βιομηχανίες. Το αντιβιοτικό πενικιλίνη ανακαλύφθηκε το 1928 από τον Alexander Fleming. Η αντίσταση του μικροβίου *Staphylococcus* στην πενικιλίνη έγινε γνωστή ήδη πριν την ευρεία παραγωγή της το 1943. Η έρευνα δείχνει ότι απαιτείται η γενετική ποικιλομορφία για αυτό τον τύπο αντίστασης που θα αναπτυχθεί και δεν θα μπορούσε να έχει συμβεί πριν από την εισαγωγή πενικιλίνης. Αυτή η ανακάλυψη δείχνει ότι τα βακτήρια πιθανόν να έχουν μία εγγενή προτίμηση για ανθεκτικότητα αποθηκευμένη στο γονιδίωμα τους που έχει αναπτυχθεί εδώ και χιλιάδες χρόνια. Η ανάπτυξη της βακτηριακής αντοχής στα αντιβιοτικά είναι ως εκ τούτου μια φυσική διαδικασία και θα υπήρχε με ή χωρίς ανθρώπινη παρέμβαση.

Οι παράγοντες που συντελούν στην αύξηση της ανθεκτικότητας των μικροβίων είναι αρκετοί. Η έλλειψη νέων και καινοτόμων αντιβιοτικών και έρευνας στον τομέα αυτό, λόγω υψηλού κόστους. Η έρευνα από τις φαρμακευτικές εταιρίες στην κατεύθυνση αυτή είναι επίσης ελάχιστη, κυρίως λόγω έλλειψης κέρδους. Η κατάχρηση αλλά και η λάθος χρήση των αντιβιοτικών συνεισφέρει στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας. Σε ορισμένες χώρες της Αφρικής τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται χωρίς συνταγογράφηση. Η αυτό-θεραπεία έχει κινδύνους λόγω ανεπαρκούς δοσολογίας, διάρκειας χρήσης και άσκοπη κατανάλωση. Τα απόβλητα των αντιβιοτικών αυτών καταλήγουν στα υδάτινα

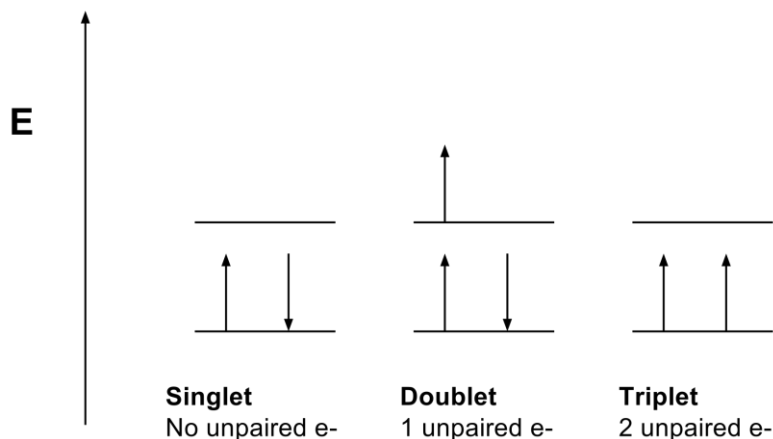
οικοσυστήματα, μολύνοντας τον υδροφόρο ορίζοντα, τα οποία προσλαμβάνονται από μικροοργανισμούς οι οποίοι αναπτύσσουν ανθεκτικότητα. [27]

#### 1.4 Φθορισμός

Ο φθορισμός αποτελεί μια μορφή του γενικότερου φαινομένου της φωταύγειας, κατά την οποία μόρια εκπέμπουν ακτινοβολία από ηλεκτρονικά διεγερμένες καταστάσεις. Ανάλογα με το είδος της ενέργειας διέγερσης, γίνεται διάκριση σε φωτοφωταύγεια (photoluminescence), χημειοφωταύγεια (chemiluminescence), ηλεκτροφωταύγεια (electroluminescence) και ραδιοφωταύγεια (radioluminescence). Η φωταύγεια μέσω διέγερσης ενός μορίου με υπεριώδη ή ορατή ακτινοβολία (φωτοφωταύγεια) υποδιαιρείται σε δύο κατηγορίες, το φθορισμό και το φωσφορισμό, ανάλογα με την ηλεκτρονική διαμόρφωση της διεγερμένης κατάστασης και του τρόπου εκπομπής. Φθορισμός είναι η ιδιότητα ορισμένων ατόμων και μορίων να απορροφούν ακτινοβολία ορισμένου μήκους κύματος και στη συνέχεια να εκπέμπουν ακτινοβολία υψηλότερου μήκους κύματος μετά από σύντομο χρονικό διάστημα, καλούμενο διάρκεια ζωής φθορισμού. Με παρόμοιο τρόπο λαμβάνει χώρα και η διεργασία του φωσφορισμού, όμως με πολύ μεγαλύτερη διάρκεια ζωής της διεγερμένης κατάστασης. Η διαδικασία του φθορισμού καθορίζεται από τρία σημαντικά φαινόμενα τα οποία παρατηρούνται σε χρονικές κλίμακες που απέχουν μεταξύ τους κατά αρκετές τάξεις μεγέθους. Η διέγερση ενός μορίου από ένα φωτόνιο λαμβάνει χώρα σε διάστημα της τάξεως  $10^{-15}$  δευτερολέπτων, ενώ η δονητική αποδιέγερση διεγερμένων ηλεκτρονίων στο χαμηλότερο

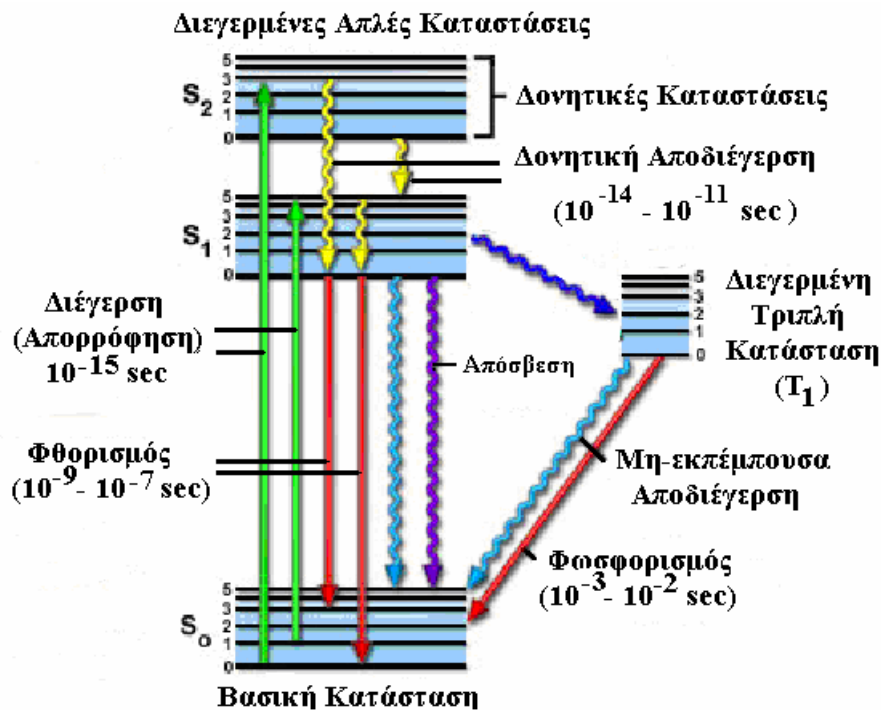
ενεργειακό επίπεδο είναι μια πολύ αργή διεργασία και μπορεί να μετρηθεί σε πτικοδευτερόλεπτα ( $10^{-12}$  δευτερόλεπτα). Η τελική διεργασία, η εκπομπή ενός φωτονίου μεγαλύτερου μήκους κύματος και η επιστροφή στη βασική κατάσταση, συμβαίνει στο σχετικά μακρό χρονικό διάστημα της τάξεως των νανοδευτερολέπτων ( $10^{-9}$  δευτερόλεπτα). Ο φθορισμός μελετάται συνήθως σε πολυκυκλικά αρωματικά μόρια με υψηλό βαθμό σύζευξης, τα οποία βρίσκονται σε οποιοδήποτε από τα διάφορα ενεργειακά επίπεδα της βασικής κατάστασης, κάθε ένα από τα οποία σχετίζεται με καθορισμένη διάταξη των μοριακών τους τροχιακών. Η ηλεκτρονιακή κατάσταση ενός μορίου καθορίζει την κατανομή του αρνητικού φορτίου και την ολική γεωμετρία του μορίου.

Για κάθε συγκεκριμένο μόριο υπάρχουν αρκετές διαφορετικές ηλεκτρονιακές καταστάσεις  $S(0)$ ,  $S(1)$ , και  $S(2)$  (εικόνα 5), ανάλογα με την ολική ηλεκτρονιακή ενέργεια και τη συμμετρία των διαφόρων καταστάσεων σπιν. Κάθε ηλεκτρονιακή κατάσταση υποδιαιρείται επιπλέον σε δονητικά και περιστροφικά επίπεδα τα οποία συνδέονται με τους ατομικούς πυρήνες και τα δεσμικά τροχιακά. Η βασική κατάσταση των περισσότερων οργανικών μορίων είναι μια απλή κατάσταση στην οποία το σπιν όλων των ηλεκτρονίων είναι συζευγμένο ( $S=0$ ). Στη θερμοκρασία περιβάλλοντος, μικρός μόνον αριθμός μορίων κατέχει ικανή ποσότητα ενέργειας ώστε να υπάρχει σε κάποια κατάσταση διαφορετική από το χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της βασικής κατάστασης και επομένως, η διέγερση λαμβάνει χώρα από αυτό το ενεργειακό επίπεδο [28-30].



Εικόνα 5 : Ηλεκτρονιακές καταστάσεις spin

Η απορρόφηση ενέργειας από τα μόρια μιας φθορίζουσας ουσίας λαμβάνει χώρα μεταξύ των (πολύ κοντινών μεταξύ τους) δονητικών και περιστροφικών ενεργειακών επιπέδων των διεγερμένων καταστάσεων σε διαφορετικά μοριακά τροχιακά. Τα διάφορα ενεργειακά επίπεδα που συμμετέχουν στην απορρόφηση και εκπομπή ακτινοβολίας, παριστάνονται με τη βοήθεια ενός ενεργειακού διαγράμματος κατά Jablonski (εικόνα 6).



Εικόνα 6 : Διάγραμμα Jablonski. Ένα ηλεκτρόνιο απορροφά ένα φωτόνιο και το σύστημα διεγείρεται ηλεκτρονικά και δονητικά. Το σύστημα αποδιεγείρεται δονητικά και φθορίζει σε μεγαλύτερο μήκος κύματος.

Ένα τυπικό διάγραμμα Jablonski αποτυπώνει την απλή βασική κατάσταση ( $S_0$ ), καθώς επίσης και την πρώτη ( $S_1$ ) και δεύτερη ( $S_2$ ) διεγερμένη απλή κατάσταση με τη μορφή οριζόντιων γραμμών. Στο σχήμα, οι έντονες γραμμές παριστάνουν ηλεκτρονικά ενεργειακά επίπεδα, ενώ οι λεπτότερες γραμμές παριστάνουν τις διάφορες δονητικές ενεργειακές καταστάσεις (οι περιστροφικές ενεργειακές καταστάσεις δεν λαμβάνονται υπ' όψη). Οι μεταπτώσεις μεταξύ των καταστάσεων παριστάνονται ως ευθύγραμμο ή κυματοειδή βέλη, ανάλογα με το αν η μετάπτωση σχετίζεται με απορρόφηση και εκπομπή ενός φωτονίου (ευθύγραμμο βέλος) ή με το αν προκύπτει από κάποια εσωτερική μετατροπή ή μια μη-εκπέμπουσα διεργασία αποδιέγερσης



(κυματοειδή βέλη). Τα ευθύγραμμα καθοδικά βέλη συμβολίζουν τη στιγμιαία φύση μιας διεργασίας διέγερσης, ενώ τα κυματοειδή βέλη χρησιμοποιούνται για τα φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα σε πολύ μεγαλύτερη χρονική κλίμακα.

Η απορρόφηση του φωτός σε καθορισμένες ποσότητες (κβάντα) είναι μια ταχύτατη διαδικασία και αντιστοιχεί στη διέγερση του φθοροφόρου από τη βασική σε κάποια διεγερμένη κατάσταση. Αντίστοιχα, η εκπομπή ενός φωτονίου μέσω φθορισμού ή φωσφορισμού γίνεται επίσης με όρους κβάντα, όπου η ενέργεια ενός κβάντου (νόμος του Planck) δίνεται από την εξίσωση:  $E = h\nu = hc/\lambda$ , όπου  $E$  η ενέργεια,  $h$  η σταθερά του Planck,  $\nu$  και  $\lambda$  η συχνότητα και το μήκος κύματος του φωτονίου και  $c$  η ταχύτητα του φωτός. Η απορρόφηση ενός φωτονίου από ένα φθοροφόρο προϋποθέτει αλληλεπίδραση μεταξύ του ανύσματος του παλλόμενου ηλεκτρικού πεδίου του φωτός και φορτίων (ηλεκτρονίων) του μορίου και μπορεί να συμβεί μόνον με πρόσπτωση φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος (ταινίες απορρόφησης). Αν η ενέργεια του απορροφόμενου φωτονίου είναι υψηλότερη από αυτήν που απαιτείται για την διέγερση ηλεκτρονίου, η περίσσεια ενέργειας συνήθως μετατρέπεται σε ενέργεια δόνησης ή περιστροφής. Σε περίπτωση όμως σύγκρουσης του μορίου με ένα φωτόνιο, του οποίου η ενέργεια δεν επαρκεί για τη διέγερση ηλεκτρονίου, δεν παρατηρείται απορρόφηση. Η ευρεία φασματική ταινία προκύπτει σαν αποτέλεσμα πληθώρας δονητικών ενεργειακών επιπέδων, που σε συνδυασμό με τη θερμική κίνηση καθιστά ένα πλήθος από φωτόνια με ευρεία διακύμανση ενεργειών, ικανά να προκαλέσουν μια συγκεκριμένη διέγερση. Επειδή η διέγερση ενός μορίου με απορρόφηση φωτός συνήθως δεν προκαλεί μεταβολή της σύζευξης του σπιν των ηλεκτρονίων, η διεγερμένη

κατάσταση είναι επίσης απλή. Κατά κανόνα, οι μελέτες φθορισμού πραγματοποιούνται με ακτινοβολία στην περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος από το υπεριώδες μέχρι και το ορατό (250 έως 700 νανόμετρα). Με τη βοήθεια υπεριώδους ή ορατής ακτινοβολίας, προκαλείται συνήθως διέγερση σε υψηλότερες δονητικές στάθμες της πρώτης (S1) ή δεύτερης (S2) απλής ενεργειακής κατάστασης. Μία από τις μεταπτώσεις απορρόφησης (ή διέγερσης) που παριστάνονται στην εικόνα 6 (πράσινο βέλος, αριστερά) λαμβάνει χώρα από το χαμηλότερο δονητικό ενεργειακό επίπεδο της βασικής κατάστασης προς ένα υψηλότερο δονητικό επίπεδο της δεύτερης διεγερμένης κατάστασης (μετάπτωση χαρακτηριζόμενη ως  $S(0) = 0$  σε  $S(2) = 3$ ).

Μια δεύτερη μετάπτωση διέγερσης παριστάνεται από το δεύτερο δονητικό επίπεδο της βασικής κατάστασης προς το υψηλότερο δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης κατάστασης (χαρακτηρίζεται ως  $S(0) = 1$  σε  $S(1) = 5$ ). Συνήθως, η ακτινοβολία με ένα ευρύ φάσμα από μήκη κύματος παράγει μια πλήρη περιοχή επιτρεπτών μεταπτώσεων που καλύπτουν τα διάφορα δονητικά ενεργειακά επίπεδα των διεγερμένων καταστάσεων. Ορισμένες από τις μεταπτώσεις αυτές χαρακτηρίζονται από ένα πολύ μεγαλύτερο βαθμό πιθανότητας απ' ότι κάποιες άλλες, και ο συνδυασμός τους αποτελεί το φάσμα απορρόφησης του μορίου. Να σημειωθεί ότι στις περισσότερες των περιπτώσεων, τα φάσματα απορρόφησης και εκπομπής ενός μορίου είναι διακριτά, ορισμένες όμως φορές μπορεί να αλληλεπικαλύπτονται. Αμέσως μετά την απορρόφηση ενός φωτονίου, μπορούν να συμβούν διάφορα φαινόμενα, κάθε ένα από αυτά με διαφορετική πιθανότητα. Το πιθανότερο από αυτά είναι η αποδιέγερση στο χαμηλότερο

δονητικό ενεργειακό επίπεδο της βασικής κατάστασης. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως δονητική αποδιέγερση (απώλεια ενέργειας απουσία εκπομπής φωτός) και συνήθως διαρκεί ένα picosecond ή και λιγότερο. Επειδή στη διάρκεια της παραμονής του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση λαμβάνει χώρα σημαντικός αριθμός δονητικών κύκλων, πρακτικά η πλήρης δονητική αποδιέγερση ολοκληρώνεται πάντα κατά τη διάρκεια του χρόνου παραμονής στη διεγερμένη κατάσταση. Η περίσσεια της δονητικής ενέργειας μετατρέπεται σε θερμότητα, η οποία απορροφάται από γειτονικά μόρια διαλύτη.

Ένα διεγερμένο μόριο παραμένει στη χαμηλότερη διεγερμένη απλή κατάσταση  $S(1)$  για διαστήματα της τάξης των νανοδευτερολέπτων, πριν την τελική αποδιέγερση στη βασική κατάσταση. Αν η αποδιέγερση από μια τέτοια μακρόβια κατάσταση συνοδεύεται από εκπομπή φωτονίου, το φαινόμενο ονομάζεται φθορισμός. Το πλήθος των δονητικών ενεργειακών επιπέδων της βασικής κατάστασης, σε συνδυασμό με τη θερμική κίνηση, παράγει ένα ευρύ πεδίο ενεργιών στη διάρκεια της εκπομπής, με αποτέλεσμα, ο φθορισμός να παρατηρείται συνήθως ως εκπομπή με μορφή ευρείας ταινίας από πλήθος συχνοτήτων και όχι ως οξεία γραμμή. Όπως προαναφέρθηκε, υπάρχουν κάποια φαινόμενα αποδιέγερσης που δρουν ανταγωνιστικά προς τον φθορισμό. Η ενέργεια της διεγερμένης κατάστασης μπορεί να μην αποβληθεί ως ακτινοβολία αλλά ως θερμότητα, επειδή το διεγερμένο μόριο μπορεί να συγκρουστεί με ένα άλλο μεταφέροντας ενέργεια με άλλου τύπου μη εκπέμπουσα διεργασία (για παράδειγμα, quenching, ή ένα φαινόμενο γνωστό ως intersystem crossing). Αυτό το τελευταίο φαινόμενο είναι σχετικά σπάνιο, όμως σχετίζεται με εκπομπή ενός φωτονίου μέσω φωσφορισμού ή με την

επιστροφή στην διεγερμένη απλή κατάσταση, η οποία επιφέρει καθυστερημένο φθορισμό. Μεταπτώσεις από την τριπλή διεγερμένη κατάσταση στην απλή βασική κατάσταση είναι απαγορευμένες, με αποτέλεσμα οι σταθερές ταχύτητας της τριπλής εκπομπής να είναι αρκετές τάξεις μεγέθους χαμηλότερες από αυτές του φθορισμού. Οι δύο διεργασίες από την τριπλή κατάσταση δίνονται στα δεξιά του ενεργειακού διαγράμματος στην εικόνα 6. Η μικρή πιθανότητα να συμβεί το φαινόμενο intersystem crossing, οφείλεται στο γεγονός ότι τα μόρια πρέπει πρώτα να υποστούν αλλαγή του σπιν προς σχηματισμό ασύζευκτων ηλεκτρονίων. Ένα σπουδαίο χαρακτηριστικό της τριπλής κατάστασης είναι η μεγάλη δραστηριότητα που εμφανίζουν τα μόρια στην κατάσταση αυτή, που πολλές φορές οδηγεί σε φωτολεύκανση και στο σχηματισμό καταστροφικών ελεύθερων ριζών. Πολλές φορές, το υπεριώδες φως που χρησιμοποιείται για τη διέγερση μπορεί να προκαλέσει φωτολεύκανση, με αποτέλεσμα τη βαθμιαία ελάττωση της έντασης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας, μέχρι και την πλήρη καταστροφή της φθορίζουσας ουσίας. Επειδή η ενέργεια που αντιστοιχεί στις μεταπτώσεις εκπομπής είναι κατά κανόνα μικρότερη από εκείνη της απορρόφησης, τα εκπεμπόμενα φωτόνια είναι χαμηλότερης ενέργειας και μετατοπισμένα προς υψηλότερα μήκη κύματος. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως μετατόπιση Stokes και μπορεί να αποδοθεί στην γρήγορη αποδιέγερση των διεγερμένων ηλεκτρονίων στο χαμηλότερο δονητικό ενεργειακό επίπεδο της  $S(1)$  διεγερμένης κατάστασης. Επιπρόσθετα, η εκπομπή φθορισμού συνήθως συνοδεύεται από μεταπτώσεις προς υψηλότερα ενεργειακά επίπεδα της βασικής κατάστασης, με αποτέλεσμα την περαιτέρω απώλεια ενέργειας λόγω θερμικής ισορροπίας της περίσσειας της δονητικής

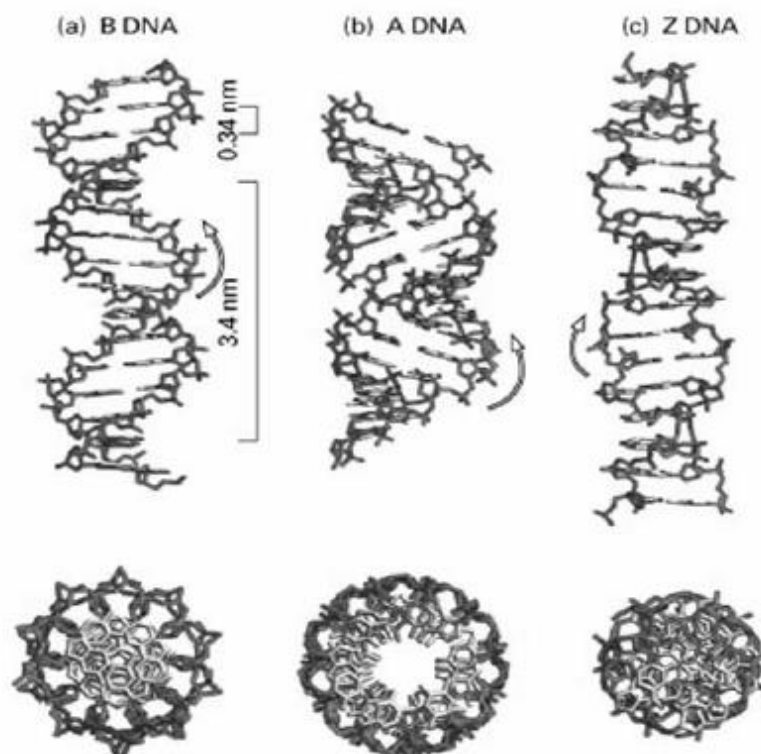
ενέργειας. Άλλες διεργασίες όπως φαινόμενα προσανατολισμού του διαλύτη, αντιδράσεις της διεγερμένης κατάστασης και σχηματισμός συμπλόκων, μπορούν επίσης να συμβάλουν στο φαινόμενο. Στην πράξη, η μετατόπιση Stokes μετράται ως η διαφορά μεταξύ των μέγιστων μήκους κύματος στα φάσματα διέγερσης και εκπομπής. Το μέγεθος της μετατόπισης ποικίλει ανάλογα με τη δομή του μορίου και μπορεί να κυμαίνεται από μερικά μέχρι αρκετές εκατοντάδες nm. Η μετατόπιση επιτρέπει τη χρήση οπτικών φίλτρων ακριβείας για την αποτελεσματική παρεμπόδιση της ακτινοβολίας διέγερσης να προσπέσει στον ανιχνευτή έτσι ώστε το ασθενές σήμα φθορισμού να μπορεί να παρατηρηθεί. Οι τρεις παράμετροι που συνήθως χρησιμοποιούνται στην περιγραφή του φθορισμού είναι ο συντελεστής απόσβεσης ( $\epsilon$ ), η κβαντική απόδοση ( $\Phi$ ) και η διάρκεια ζωής του φθορισμού ( $\tau$ ). Οι μοριακοί συντελεστές απόσβεσης εφαρμόζονται ευρέως σε όλα τα πεδία της φασματοσκοπίας, προκειμένου να γίνει μετατροπή των μονάδων απορρόφησης σε μονάδες μοριακής συγκέντρωσης για μια σειρά από χημικές ουσίες. Ο συντελεστής απόσβεσης προσδιορίζεται με τη μέτρηση της απορρόφησης σε κάποιο χαρακτηριστικό για την ουσία μήκος κύματος αναφοράς για 1 M (1 mol/L) σε κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm. Το μήκος κύματος αναφοράς είναι συνήθως το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης στο υπεριώδες ή ορατό φάσμα. Οι συντελεστές απόσβεσης είναι ένα άμεσο μέγεθος της ικανότητας ενός μορίου να απορροφά ακτινοβολία έτσι, τα μόρια με μεγάλο συντελεστή απόσβεσης εμφανίζουν αντίστοιχα μεγάλη πιθανότητα για φθορισμό [28-30].

### 1.5 DNA και τρόποι αλληλεπίδρασης του με τις σύμπλοκες ενώσεις

Το δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA) είναι ένα νουκλεϊκό οξύ που περιέχει τις γενικές πληροφορίες που καθορίζουν την βιολογική ανάπτυξη όλων των κυτταρικών μορφών ζωής και των περισσοτέρων ιών. Το DNA έχει συνήθως τη μορφή διπλής έλικας. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, το DNA αποτελείται από δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες σε μορφή δύο αντιπαράλληλων κλώνων που σχηματίζουν στο χώρο μια δεξιόστροφη διπλή έλικα. Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από μια πεντόζη, τη δεοξυριβόζη, ενωμένη με μια φωσφορική ομάδα και μια αζωτούχο βάση. Η διπλή έλικα έχει σταθερό σκελετό που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες φωσφορικής ομάδας-δεοξυριβόζης, ενωμένες με φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Η σταθεροποίηση της δευτεροταγούς δομής του DNA οφείλεται κυρίως σε π-π αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των π-τροχιακών των αρωματικών δακτυλίων των νουκλεοβάσεων. Καθώς οι αλυσίδες του DNA περιστρέφονται η μία γύρω από την άλλη, υπάρχουν αύλακες μεταξύ των φωσφορικών ομάδων, αποκαλύπτοντας έτσι τις βάσεις του εσωτερικού της έλικας. Υπάρχουν δύο διαφορετικές αύλακες που σχηματίζονται στην επιφάνεια της διπλής έλικας : Η κύρια αύλακα (major groove) με πλάτος 22 Å που είναι ευρεία και σχετικά ρηχή και η στενή δευτερεύουσα αύλακα (minor groove) με πλάτος 12 Å. Το πλάτος της δευτερεύουσας αύλακας μεταβάλλεται ευκολότερα και είναι στενότερο στις περιοχές που είναι πλουσιότερες σε ζεύγη αδενίνης-θυμίνης (A-T) από ό,τι αυτές που υπερτερούν σε γουανίνη-κυτοσίνη (G-C). Τα άκρα των βάσεων στην κύρια αύλακα είναι πιο προσιτά προς αλληλεπίδραση με άλλα μόρια σε σχέση με τις αντίστοιχες βάσεις της δευτερεύουσας αύλακας λόγω στενότητας. Το

DNA μπορεί να υπάρχει σε πολλές διαμορφώσεις. Παρόλα αυτά, μόνο η A-, η B- και η Z- μορφή του DNA (Εικόνα 7), έχουν παρατηρηθεί στους οργανισμούς. Η διαμόρφωση του DNA εξαρτάται από την ακολουθία των βάσεων του DNA, το μέγεθος και τη διεύθυνση της υπερελίκωσης, πιθανές χημικές τροποποιήσεις των βάσεων καθώς και τις συνθήκες του διαλύματος, όπως η συγκέντρωση των μεταλλικών ιόντων και των πολυαμινών. Μεταξύ των τριών παραπάνω διαμορφώσεων, η B- είναι η πιο κοινή με βάση τις συνθήκες που επικρατούν στα κύτταρα.

Οι σύμπλοκες ενώσεις μεταβατικών μετάλλων παρουσία του DNA είναι ικανές να προκαλέσουν ομοιοπολική και/ή μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση. Κατά την ομοιοπολική αλληλεπίδραση, κάποιος ευκίνητος υποκαταστάτης των συμπλόκων αντικαθίσταται από ένα άτομο αζώτου κάποιας βάσης του DNA, όπως π.χ. το άζωτο 7 της γουανίνης. Στις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του DNA και ενώσεων περιλαμβάνονται η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση, η συναρμογή στην αύλακα και η παρεμβολή.



Εικόνα 7 : Οι τρεις επικρατέστερες διαμορφώσεις του DNA. Απεικονίζονται η B-, η A- και η Z- μορφή από τα αριστερά προς τα δεξιά.

Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (electrostatic interactions) λαμβάνουν χώρα στην εξωτερική επιφάνεια του DNA με την ανάπτυξη ηλεκτροστατικών δεσμών μεταξύ των φωσφορικών ομάδων του DNA και θετικά φορτισμένου συμπλόκου ή ιόντος. Κατά τη συναρμογή μιας ένωσης στην κύρια ή τη δευτερεύουσα αύλακα (groove binding) [31-32] αναπτύσσονται ασθενείς αλληλεπιδράσεις (π.χ. δεσμοί υδρογόνου, δυνάμεις van der Waals). Στην παρεμβολή (intercalation) πραγματοποιείται μερική παράλληλη εισχώρηση αρωματικών ετεροκυκλικών δακτυλίων των υποκαταστατών με εκτεταμένο π-σύστημα ανάμεσα στις βάσεις του DNA και συγκράτησή τους λόγω π-π αλληλεπιδράσεων, δηλαδή η παρεμβολή ευνοείται από την παρουσία

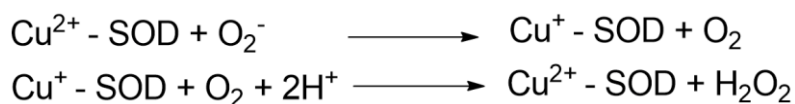


εκτεταμένου και επίπεδου αρωματικού υποκαταστάτη που έχει σαν αποτέλεσμα να απομακρύνονται τα ζεύγη των βάσεων 80 του DNA περισσότερο από 3,4 Å για να δημιουργηθεί έτσι ο κατάλληλος χώρος για τον εισερχόμενο υποκαταστάτη ώστε να προσαρμοστεί το μόριο στην περιοχή της παρεμβολής και η διπλή έλικα ελαφρώς ξετυλίγεται ανάλογα με τη γεωμετρία του νέου συμπλόκου που σχηματίζεται. Γενικότερα, οι μη-ομοιοπολικές δυνάμεις σταθεροποιούν τη δομή της ένωσης του DNA με το σύμπλοκο [33].

### 1.6 Υπεροξειδική δισμουτάση

Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) είναι η κύρια άμυνα απέναντι στις ρίζες υπεροξειδίου και είναι η πρώτη γραμμή άμυνας απέναντι στο οξειδωτικό στρες. Ανιχνεύεται σε ευκαριωτικά και πρωκαριωτικά κύτταρα. Η SOD καταλύει την αντίδραση μετατροπής των ελεύθερων ριζών ( $O_2^-$ ) σε  $H_2O_2$ .

Ο μηχανισμός δράσης του ενζύμου μπορεί να περιγραφεί με τις ακόλουθες αντιδράσεις :



1<sup>ο</sup> βήμα αναγωγή χαλκού, οξείδωση υπεροξειδικής ρίζας

2<sup>ο</sup> βήμα οξείδωση χαλκού, αναγωγή οξυγόνου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου

Το οξυγόνο μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου που είναι λιγότερο βλαβερό για το κύτταρο, το ένζυμο καταλάση μετά διαχειρίζεται το υπεροξείδιο του υδρογόνου.

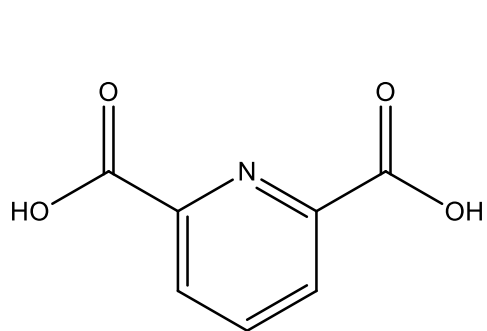
Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις μορφές SOD (SOD-1, SOD-2, SOD-3) και όλες απαιτούν ένα οξειδοαναγωγικό δραστικό μέταλλο μεταπτώσεως στην ενεργή θέση για να πραγματοποιηθεί η καταλυτική διάσπαση του ανιόντος υπεροξειδίου. Δύο από τις μορφές SOD βρίσκονται στο εσωτερικό του κυττάρου ενώ η τρίτη βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο. Η SOD-1 απαιτεί χαλκό-ψευδάργυρο ως συμπαράγοντα και κατά κύριο λόγο βρίσκεται στο κυτοσόλιο και στον μιτοχονδριακό ενδιάμεσο χώρο. Η SOD-2 χρησιμοποιεί μαγνήσιο σαν συμπαράγοντα και βρίσκεται στη μιτοχονδριακή μήτρα. Τέλος, η SOD-3 απαιτεί χαλκό-ψευδάργυρο σαν συμπαράγοντα και βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο [33-35].

Το οξειδωτικό στρες έχει δείχθει ότι συμμετέχει στην παθοφυσιολογία διάφορων ασθενιών που οφείλονται στο οξειδωτικό στρες. Οι ασθενείς φαίνεται να έχουν μειωμένη ενεργότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως SOD, καταλάση και γλουταθειόνη. Τα ένζυμα της οικογένειας SOD δρουν σαν καλός θεραπευτικός παράγοντας εναντίον ασθενιών που σχετίζονται με δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Οι ενώσεις που μιμούνται τη δράση της SOD έχουν φαρμακευτική χρήση στην θεραπεία διάφορων ασθενιών που οφείλονται στο οξειδωτικό στρες, όπως καρκίνος, ρευματοειδής αρθρίτιδα, νευροεκφυλιστικές ασθένειες και διαβήτης [35].

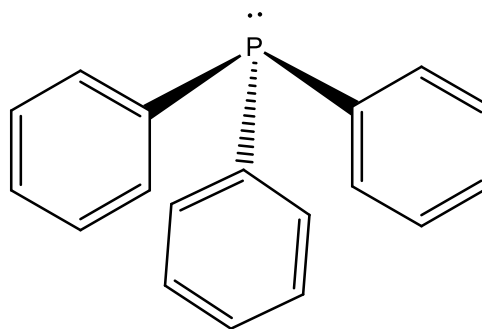
## 2. Σκοπός της έρευνας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός ενώσεων του χαλκού(I/II) με υποκαταστάτη το διπικολινικό οξύ ή/και τριφαινυλοφωσφίνη (Σχήμα 1) και η βιολογική τους δράση. Ο χαλκός είναι ένα μέταλλο με μεγάλη βιολογική σημασία, το διπικολινικό οξύ είναι ένα φυσικό προϊόν που παράγεται από ορισμένα είδη βακτηρίων όταν σχηματίζουν ανθεκτικές, αδρανείς δομές τα ενδοσπόρια και δεν ανιχνεύεται στις βλαστικές μορφές των βακτηρίων. Για τον προσδιορισμό των σπορίων των βακτηρίων μια νέα φθορισμομετρική μέθοδος αναπτύσσεται από τη μετρήθηκε του φθορισμού αυτών των συμπλόκων. Η παρουσία ενώσεων που περιέχουν το μέταλλο σε δυο βαθμίδες οξειδωσης Cu(I) μικτού υποκαταστάτη, Cu(II) και Cu(I/II) μικτού σθένους οδήγησε σε βιομιμική δράση με το ένζυμο υπεροξειδική δισμουτάση (SOD).

Μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των συμπλόκων αυτών με το CT-DNA καθώς ένας από πιθανός μηχανισμός δράσης τους ως αντιμικροβιακά περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση τους με το DNA. Επιπλέον έγινε μελέτη της αντιμικροβικής τους δράση έναντι των μικροβίων. Έτσι έγινε προσδιορισμός των ζωνών αναστολής που σχηματίζονται από τα σύμπλοκα αυτά σε καλλιέργειες του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*. Τέλος προσδιορισμός της MIC (minimum inhibition concentration), δηλαδή η ελάχιστη συγκέντρωση που προκλεί αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών.



2,6 dipicolinic acid



tri-phenylphosphine

Σχήμα 1 : Ligands που χρησιμοποιήθηκαν στην διατριβή.

### 3. Πειραματικό μέρος

#### Χημικό μέρος

Υλικά: γυάλινα σκεύη 25ml, 50 ml, γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες 15 ml, σπάτουλες, μαγνήτες, πιπέτες (1000, 100, 10μl), tips, erpendorf 1,5 ml, τριχοειδείς σωλήνες, πιπέτες Paster.

Μηχανήματα: σημείο τήξης: Melting Point SMP1 Stuart Scientific, FT-IR: Perkin Elmer Spectrum BX FT-IR System, UV-Vis: φασματοφωτόμετρο U.V. 1600PC Spectrophotometer VWR, NMR: Bruker AV 500 (500MHz), ζυγός, ζυγός ακριβείας.

Χημικά αντιδραστήρια : Copper (I) chloride (Allied Signal), Dipicolinic acid (Sigma Aldrich), Triphenylphosphine (Merck),

Διαλύτες : Dimethyl sulfoxide (DMSO-Merck), DMSO-d6 (δευτεριωμένο DMSO), ddH<sub>2</sub>O (δισ-απεσταγμένο νερό) και διάφοροι άλλοι διαλύτες για προσδιορισμό της διαλυτότητας.

#### 3.1 Σύνθεση

Η σύνθεση της ένωσης [Cu<sup>II</sup>(DPA)(H<sub>2</sub>DPA)].2H<sub>2</sub>O (1) και [Cu<sup>I</sup>Cl<sub>2</sub>(TPP)<sub>3</sub>] (2) αρχικά έγινε στο ίδιο ποτήρι. Χρησιμοποιήθηκαν 0.05 g (0.5 mmol) CuCl και 0.131 g (0.5 mmol) Triphenylphosphine τα οποία διαλύθηκαν σε 10 ml ακετονιτριλίου (MeCN) (ποτήρι A) και 0.083g (0.5 mmol) διπικολινικό οξύ το οποίο διαλύθηκε σε 10 ml μεθανόλης (MeOH) (ποτήρι B). Αφού αναδεύτηκαν μέχρι να διαυγάσουν, το περιεχόμενο του ποτηριού B προστέθηκε στο ποτήρι A. Το διάλυμα που προκύπτει στη συνέχεια αναδεύεται με ήπια θέρμανση (50° C) για 1 ώρα. Το χρώμα του διαλύματος ήταν σκούρο μπλε. Στο τέλος της αντίδρασης το διάλυμα διηθήθηκε σε διπλό διηθητικό ηθμό και αφέθηκε σε

ηρεμία για να σχηματιστούν οι κρύσταλλοι. Την επόμενη ημέρα έχουν σχηματισθεί κρύσταλλοι οι οποίοι διηθούνται σε διπλό διηθητικό ηθμό. Οι ενώσεις (1) και (2) στη συνέχεια συντέθηκαν ξεχωριστά. Η ένωση (1) συντέθηκε χρησιμοποιώντας 0.025 g CuCl (0.25 mmol) το οποίο διαλύθηκε σε 10 ml MeCN (ποτήρι A) και 0.166 g H<sub>2</sub>DPA (1 mmol) το οποίο διαλύθηκε σε 10 ml MeOH (ποτήρι B). Αφού αναδεύτηκαν μέχρι να διαυγάσουν το περιεχόμενο του B προστέθηκε στο A και η ανάδευση συνεχίστηκε για 1 ώρα η ανάδευση υπό θέρμανση (50°C). Την επόμενη ημέρα σχηματίζονται κρύσταλλοι έντονου μπλε χρώματος. Ο χημικός τύπος του συντιθέμενου συμπλόκου είναι [Cu<sup>II</sup>(DPA)(H<sub>2</sub>DPA)].2H<sub>2</sub>O και το μοριακό του βάρος 430 g/mol. Το βάρος του συμπλόκου ήταν 0.068 (0.158 mmol) και απόδοση της αντίδρασης είναι 63 %. Η ένωση (2) συντέθηκε χρησιμοποιώντας 0.05 g CuCl (0.5 mmol) και 0.196 g Triphenylphosphine (0.75 mmol) τα οποία διαλύθηκαν σε 10 ml MeCN και η ανάδευση συνεχίστηκε για 1 ώρα η ανάδευση υπό θέρμανση (50°C). Την επόμενη ημέρα σχηματίζονται κρύσταλλοι λευκοί. Ο χημικός τύπος του συντιθέμενου συμπλόκου είναι [Cu<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(TPP)<sub>3</sub>] και το μοριακό του βάρος 985 g/mol. Το βάρος του συμπλόκου ήταν 0.03 g (0.03 mmol) και η απόδοση της αντίδρασης είναι 83 %. Η ένωση (3) συντέθηκε χρησιμοποιώντας 0.085 g H<sub>2</sub>DPA (0.5 mmol) το οποίο διαλύθηκε σε 7 ml H<sub>2</sub>O (ποτήρι A), σε αυτό το διάλυμα προστέθηκε 0.5 ml KOH 1 M (ποτήρι A) και 0.120 g (0.5 mmol) Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O τα οποία διαλύθηκαν σε 3 ml ddH<sub>2</sub>O (ποτήρι B). Αφού αναδεύτηκαν μέχρι να διαυγάσουν, το περιεχόμενο του ποτηριού A προστέθηκε στο B και υπό ανάδευση για 1 ώρα όπου σχηματίστηκε ένα ενδιάμεσο προϊόν. Βάρος ενδιάμεσου προϊόντος 0.062 g και πιθανός χημικός τύπος CuDPAK

(μοριακό βάρος 269 g/mol, 0.230 mmol). Το ίζημα αυτό ξηραίνεται και διαλύεται σε 7 ml DMSO. Αφού διαλυθεί προσθέτω 0.062 g (2 mmol) Triphenylphosphine. Αναδεύεται για 30 min και διηθείται. Μετά από αργή εξάτμιση του διαλύτη, σχηματίζονται κρύσταλλοι κίτρινου χρώματος. Ο χημικός τύπος του συντιθέμενου συμπλόκου είναι  $[\text{Cu}(\text{HDPA})(\text{TPP})_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$  και το μοριακό του βάρος είναι 772 g/mol. Το βάρος του συμπλόκου ήταν 0.2 g (0.260 mmol) και απόδοση της αντίδρασης ήταν 52%. Η ένωση (4) συντέθηκε χρησιμοποιώντας 0.085 g  $\text{H}_2\text{DPA}$  το οποίο διαλύθηκε σε 7 ml  $\text{H}_2\text{O}$  (ποτήρι Α), σε αυτό το διάλυμα προστέθηκε 1 ml  $\text{KOH}$  1 M (ποτήρι Α) και 0.120 g (0.5 mmol)  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  τα οποία διαλύθηκαν σε 3 ml  $\text{ddH}_2\text{O}$  (ποτήρι Β). Αφού αναδεύτηκαν μέχρι να διαυγάσουν, το περιεχόμενο του ποτηριού Α προστέθηκε στο Β και υπό ανάδευση για 1 ώρα όπου σχηματίστηκε ένα ενδιάμεσο προϊόν. Βάρος ενδιάμεσου προϊόντος 0.052 g πιθανός τύπος  $\text{CuDPAK}_2$  (308 g/mol, 0.169 mmol). Το ίζημα αυτό ξηραίνεται και διαλύεται σε 7 ml DMSO. Αφού διαλυθεί προσθέτω 0.062 g (2 mmol) Triphenylphosphine. Αναδεύεται για 1 ώρα και διηθείται. Μετά από αργή εξάτμιση του διαλύτη σχηματίζονται κρύσταλλοι πρασινο-μπλε χρώματος. Ο χημικός τύπος του συντιθέμενου συμπλόκου είναι  $[\text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{I}}_2(\text{DPA})(\text{H}_2\text{DPA})(\text{TPP})_6]\cdot 11\text{H}_2\text{O}\cdot 4\text{DMSO}$  και το μοριακό του βάρος είναι 2604 g/mol. Το βάρος του συντιθέμενου συμπλόκου ήταν 0.079 g (0.030 mmol) και η απόδοση της αντίδρασης ήταν 18 %. Τα ligands που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται σχήμα 1.

## **3.2 Χαρακτηρισμός**

### **3.2.1 Σημείο τήξης**

Για την εύρεση του σημείου τήξης της ένωσης χρησιμοποιήθηκαν τριχοειδή σωληνάκια όπου φέρουν μια χαρακτηριστική ένδειξη για την εισαγωγή του δείγματος. Αφού κλείσουμε την αντίθετη άκρη του τριχοειδούς σωληναρίου με χρήση φλόγας γεμίζουμε το δείγμα και αναποδογυρίζουμε ώστε το δείγμα να μεταφερθεί στο κλειστό άκρο του τριχοειδούς σωλήνα. Τοποθετούμε το τριχοειδές με το δείγμα στη συσκευή για εύρεση του σημείου τήξης και μετράμε τη θερμοκρασία με την χρήση ενός θερμόμετρου.

### **3.1.2 Διαλυτότητα**

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της διαλυτότητας σε διάφορους διαλύτες (Et<sub>2</sub>O, n-hexane, toluene, CHCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Acetone, EtOH, MeOH, DMF, MeCN, DMSO, H<sub>2</sub>O) προκειμένου να καταλήξουμε ποιόν διαλύτη θα χρησιμοποιήσουμε για τα χημικά και βιολογικά πειράματα. Τοποθετήθηκε ισόποσα μικρή ποσότητα ουσίας σε δοκιμαστικούς σωλήνες και προστέθηκε η ίδια ποσότητα από κάθε διαλύτη για να ελεγχθεί η διαλυτότητα.

### **3.1.3 Δονητική φασματοσκοπία υπερύθρου**

Τα σύμπλοκα χαρακτηρίστηκαν με δονητική φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR). Ποσότητα του κάθε συμπλόκου αναμίχθηκε με βρωμιούχο κάλιο (KBr) σε αναλογία 1:10 και ομογενοποιήθηκαν σε ένα γουδί. Έπειτα τοποθετήθηκαν στην ειδική συσκευή για την παραγωγή μιας παστίλιας. Μετά την βοήθεια του



προγράμματος Spectrum v.5.0.1 (μηχάνημα Perkin Elmer Spectrum BX FT-IR System) θέτοντας τις εξής συνθήκες range : start = 4000  $\text{cm}^{-1}$ , end = 370  $\text{cm}^{-1}$ , 8 scans, resolution = 4  $\text{cm}^{-1}$ , interval= 2  $\text{cm}^{-1}$ , και αφού κάναμε μέτρηση του αέρα (background), πήραμε τα φάσματα της παστίλιας που περιέχουν τις σύμπλοκες ενώσεις.

#### **3.1.4 Κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ**

Τα σύμπλοκα χαρακτηρίστηκαν και με κρυσταλλογραφία με περίθλαση ακτίνων-Χ μονοκρυστάλλου. Τα πειραματικά δεδομένα φαίνονται στο παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 2 : Πειραματικά δεδομένα κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ. Η ομάδα συμμετρίας χώρου και οι διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας των σύμπλοκων ενώσεων.

Σύμπλοκο	Space group	Cell lengths	Cell angles	Cell volume
[Cu(DPA)(H <sub>2</sub> DPA)].2H <sub>2</sub> O	P c	a=13.423(1) b=10.309(1) c=13.811(3)	α=90 β=114.29 γ=90	1741.95
[Cu <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (TPP) <sub>3</sub> ]	P 2 <sub>1</sub> /n	a=18.9026(6) b=9.7615(3) c=26.2615(9)	α=90 β=109.51 2 γ=90	4567.43
[Cu(HDPA)(TPP) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O	P 1	a=9.5240(6) b=11.8793(5) c=16.566(9)	α=91.869 β=91.92 γ=106.86 59	1791.88
[Cu <sub>3</sub> (DPA)(H <sub>2</sub> DPA)(TPP) <sub>6</sub> ].11H <sub>2</sub> O.4DMSO	P 2 <sub>1</sub> /n	a=19.647(4) b=20.467(3) c=32.245(6)	α=90 β=96.697 γ=90	12878.2

### 3.1.5 Σταθερότητα

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα σταθερότητας των συμπλόκων με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (Uv-vis) χρησιμοποιώντας DMSO ως διαλύτη, όσο και με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear magnetic resonance – NMR) στα 500 MHz, χρησιμοποιώντας το DMSO-d6 ως διαλύτη. Διαπιστώθηκε ότι ήταν σταθερά σε διάλυμα μέχρι και μία εβδομάδα. Για τα πειράματα σταθερότητας με υπεριώδες-ορατό χρησιμοποιήθηκε stock διάλυμα των συμπλόκων  $10^{-3}$  M και από αυτό έγινε αραίωση στην κυβελίδα με τελική συγκέντρωση  $2.5 \times 10^{-5}$  M. Για τα πειράματα σταθερότητας με NMR οι σύμπλοκες ενώσεις διαλύθηκαν σε 375 μl δευτεριωμένου DMSO.

### 3.1.6 Φασματοσκοπία υπεριώδους - ορατού

Στα πειράματα στο UV χρησιμοποιήθηκαν οι σύμπλοκες ενώσεις διαλυμένες σε DMSO. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το M.Wave Professional 1.0 και βρίσκεται σε υπολογιστή συνδεδεμένο με το μηχάνημα U.V. 1600PC Spectrophotometer VWR, (εικόνα 8). Η πορεία που ακολουθήθηκε για τον ορισμό του εύρους μήκους κύματος που ακολουθήθηκε ήταν η εξής File→New→Spectrum Scan→Operation→Setup→600-200 nm. Αφού θέσουμε τα όρια, τοποθετούμε το τυφλό διάλυμα και πατάμε την ένδειξη  $\lambda$ , και πατάμε scan. Αφού μετρήσουμε το τυφλό διάλυμα, ξεκινάμε τις μετρήσεις μας, πατώντας start. Όταν τελειώσει η κάθε μέτρηση αποθηκεύουμε το αποτέλεσμα.



Εικόνα 8 : Το φασματοφωτόμετρο UV-vis που διαθέτει το εργαστήριο

### 2.1.7 NMR

Για την λήψη των φασμάτων NMR των συμπλόκων σαν διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το δευτεριωμένο DMSO. Ζυγίστηκαν περίπου 5 mg της ένωσης και διαλύθηκαν σε 375 μl του διαλύτη. Το διάλυμα αυτό μεταφέρθηκε στο σωληνάκι του NMR και το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε είναι το Bruker Avance 500 (500MHz) και το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το Topspin 2.1. Είδαμε συντονισμούς των πυρήνων ατόμων  $^1\text{H}$ . Αυτή είναι η μέτρηση στις 0h. Λήφθηκε και το φάσμα 1 εβδομάδα μετά για να προσδιοριστεί η σταθερότητά τους. Τα αποτελέσματα αυτά αποθηκεύτηκαν και συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Συκρίθηκαν τα φάσματα των συμπλόκων με τα φάσματα των υποκαταστατών. Η σύγκριση έγινε με το πρόγραμμα Mestrec.

### 3.1.8 Φθορισμομετρία

Για τα πειράματα μέτρησης του φθορισμού χρησιμοποιήθηκε το φθορισμόμετρο Hitachi 7000. Οι σύμπλοκες ενώσεις διαλύθηκαν σε DMSO και πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις μέχρι η απορρόφηση του στο UV, στο ίδιο μήκος κύματος που θα χρησιμοποιήσουμε αργότερα για να διεγείρουμε, να είναι  $A < 0.1$ .

### Βιολογικά

Υλικά :

Αλληλεπίδραση με το DNA: CT-DNA [Deoxyribonucleic acid, Sodium Salt, Calf-Thymus (EMD Millipore Corp, affiliate of Merck 250 mg)], Trisodium citrate, NaCl (Merck).

Καλλιέργεια βακτηρίων : Tryptone (Biolife), Yeast Extract (Sigma-Aldrich), NaCl (Merck), Άγαρ (Sigma-Aldrich), ddH<sub>2</sub>O, τρυβλία Petri, σωλήνες των 15 ml, πιπέτες (10, 100 ,1000 μl), κρικοφόρος στυλεός, βαμβακοφόρος στυλεός, χάρτινοι δίσκοι 9 mm, ορός NaCl (0.9%), λαβίδες, καμινέτο, hood με laminar air flow (HD-650 laminar flow cabinet), μπουκάλια 500, 250 ml, tips, vortex, σακούλες αποβλήτων, διάλυμα της ένωσης, βακτήρια (*Pseudomonas aeruginosa*-ATCC).

#### 4.1 Μελέτη της καταλυτικής δράσης των συμπλόκων

Μελετήθηκε η καταλυτική δράση των συμπλόκων για την οξειδωση της δι-τερτ-βουτυλκατεχόλης προς την αντίστοιχη ορθο-κινόνη. Η καταλυτική δράση των συμπλόκων, μελετήθηκε φασματοσκοπικά με την παρατήρηση της αύξησης της απορρόφησης στα 400 nm ( $\epsilon = 1800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν MeOH. Το υπόστρωμα (δι-τερτ-βουτυλοκατεχόλη) διαλύθηκε σε μεθανόλη. Προστέθηκε διάλυμα KOH σε ίση ποσότητα και συγκέντρωση με το σύμπλοκο σαν συνκαταλύτης. Στην κυψελίδα των 2ml τελική συγκέντρωση ήταν  $10^{-3} \text{ M}$  για την δι-τερτ-βουτυλοκατεχόλη,  $10^{-5} \text{ M}$  για το σύμπλοκο και  $10^{-5} \text{ M}$  για το KOH. Μελετήθηκε η αύξηση της απορρόφησης στα 400 nm, μέσω του σχηματισμού της δι-τερτ-βουτυλοκινόνης. Υπολογίστηκαν τα  $\mu\text{moles}$  υποστρώματος που παρήχθησαν, ανά mg καταλύτη, ανά λεπτό [40].

#### 4.2 Μελέτη της αλληλεπίδρασης των συμπλόκων με το DNA

Το stock διάλυμα DNA παρασκευάστηκε διαλύοντας CT DNA σε διάλυμα που περιείχε 15 mM trisodiumcitrate και 150 mM NaCl σε pH = 7. Ο λόγος των απορροφήσεων του stock διαλύματος στα 260 και 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) πρέπει να βρίσκεται στο εύρος 1.8-1.9, γεγονός που αποδεικνύει ότι δεν υπάρχουν πρωτεϊνικές προσμίξεις στο διάλυμα. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίστηκε με φασματοσκοπία UV στα 260 nm.

Για τα αρχικά πειράματα ογκομέτρησης (titration) λήφθηκαν τα φάσματα του CT DNA σε διάλυμα παρουσία και απουσία του συμπλόκου για  $r = 0, 0.02, 0.05, 0.07, 0.09, 0.10, 0.11$  και  $0.13$  ( $r = [\text{σύμπλοκο}]/[\text{DNA}]$ ,  $[\text{DNA}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ). Εδώ βγαίνει το συμπέρασμα για τον τρόπο αλληλεπίδρασης της σύμπλοκης ένωσης με το DNA. Στη συνέχεια για τον υπολογισμό των τιμών των σταθερών

$K_b$ , λήφθηκαν τα φάσματα UV του συμπλόκου, παρουσία και απουσία CT-DNA για  $r = 1, 0.5, 0.25, 0.17, 0.125$  και  $0.1$  ( $r = [\text{σύμπλοκο}] / [\text{DNA}]$ ,  $[\text{σύμπλοκο}] = 10 \mu\text{M}$ ). Η σταθερά σύνδεσης  $K_b$  των συμπλόκων είναι μέτρο της ισχυρότητας της αλληλεπίδρασης που έχει κάθε σύμπλοκο με το DNA.

Η  $K_b$  υπολογίζεται με βάση την εξίσωση Wolf-Shimer :

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

Όπου  $\varepsilon_A = A / [\text{ένωσης}]$ ,  $\varepsilon_f =$  συντελεστής μοριακής απορρόφησης της ένωσης,  $\varepsilon_b =$  συντελεστής μοριακής απορρόφησης πλήρως δεσμευμένης ένωσης,  $K_b =$  σταθερά σύνδεσης στο DNA. Η  $K_b$  ( $\text{M}^{-1}$ ) υπολογίζεται από το λόγο της τεταγμένης επί της αρχής προς την κλίση της ευθείας των ελαχίστων τετραγώνων σε διαγράμματα του  $[\text{DNA}] / (\varepsilon_a - \varepsilon_f)$  σε συνάρτηση με την  $[\text{DNA}]$ .

### 4.3 Αντιμικροβιακή δράση

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα εύρεσης των ζωνών αναστολής και της ελάχιστης συγκέντρωσης που προκαλεί αναστολή. Το βακτήριο που χρησιμοποιήθηκε είναι το Gram- *Pseudomonas aeruginosa*. Οι καλλιέργειες των βακτηρίων διατηρούνταν στο εργαστήριο κάτω από κατάλληλες συνθήκες ( $37^\circ\text{C}$  για ανάπτυξη και  $-80^\circ\text{C}$  για αποθήκευση). Το θρεπτικό υλικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το βέλτιστο σύμφωνα με την American Culture Collection (ATCC). Χρησιμοποιήθηκε tryptone (1%, 10 g/L), yeast extract (0.5%, 5 g/L) και NaCl (1%, 10g/L). Για το υγρό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε δισ απεσταγμένο νερό. Για το στερεό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε και άγαρ (1.5%, 15 g/L). Όλα τα σκεύη που

χρησιμοποιήθηκαν για την διαχείριση των βακτηρίων έχουν αποστειρωθεί κάτω από κατάλληλες συνθήκες (με βρασμό), καθώς αποστειρώνονται και τα θρεπτικά μέσα πριν σε αυτά εμβολιαστούν τα βακτήρια. Τα διάφορα πειράματα με μικρόβια πραγματοποιήθηκαν σε hood με laminar flow είτε κάτω από στείρα φλόγα προκειμένου να εξασφαλίσουμε στείρες συνθήκες, χωρίς επιμολύνσεις.

#### 4.4 Ζώνη αναστολής

Πραγματοποιήθηκαν και πειράματα ζωνών αναστολής. Παρασκευάστηκαν τρυβλία με 20 ml στερεό θρεπτικό άγαρ. Κατόπιν ποσότητα μικρόβια ( $10^8$  cfu/ml) απλώθηκαν καλά σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου με τη βοήθεια βαμβακοφόρου στυλεού ο οποίος είχε αποστειρωθεί. Παρασκευάστηκε αιώρημα κυττάρων  $10^8$  cfu/ml (σε διάλυμα ορού 0,9 %) το οποίο βρέθηκε με φωτομέτρηση στα 620 nm με  $A=0,1$ . Ο βαμβακοφόρος στυλεός εμβαπτίστηκε στο διάλυμα του μικροβίου και αφού εκδιώχθηκε η περίσσεια υγρού στα τοιχώματα του σωλήνα, με κατάλληλες κινήσεις απλήθηκε το μικρόβιο στο θρεπτικό άγαρ. Παρασκευάστηκαν stock διαλύματα από τις ουσίες προς εξέταση σε κατάλληλες συγκεντρώσεις ( $10^{-3}$  M). Μέσα σε αυτά εμβαπτίσθηκαν αποστειρωμένοι χάρτινοι δίσκοι διαμέτρου 9mm με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας και αφού εκδιώχθηκε η περίσσεια της ουσίας στα τοιχώματα του errendorf, τοποθετήθηκαν στο τρυβλίο σε σωστή απόσταση μεταξύ τους ασκώντας ελαφριά πίεση προκειμένου να σταθεροποιηθούν πάνω στην επιφάνεια του θρεπτικού. Μετά από επώαση 20h στους  $37^{\circ}\text{C}$ , ελέχθηκε η δημιουργία ζώνης αναστολής της οποίας η διάμετρος μετρήθηκε με τη βοήθεια χάρακα που μετράει σε cm [36].



#### 4.5 Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC).

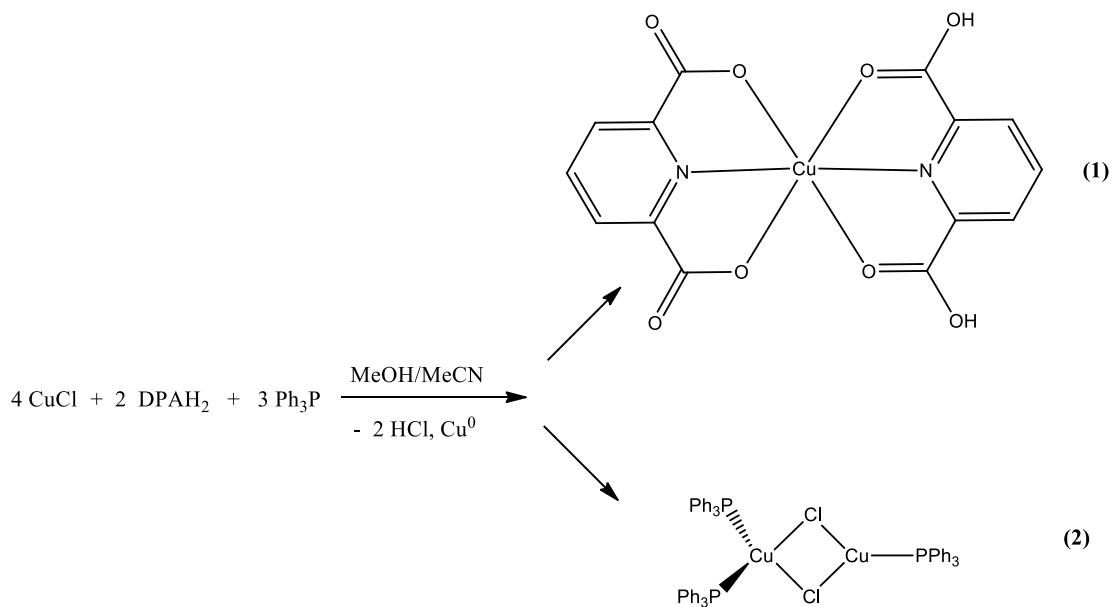
Ως ελάχιστη συγκέντρωση που προκαλεί αναστολή (Minimum inhibitory concentration-MIC) ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντι-μικροβιακού παράγοντα που εμποδίζει την εμφανή/οπτική ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες και συνήθως έχει τιμές  $\mu\text{g/ml}$  ή  $\text{mg/L}$  [37]. 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 ουσία προς εξέταση καθώς και του μικροβίου. Σε τελικό όγκο 2 ml θέλουμε να έχουμε  $5 \times 10^5$  cfu (colony forming unit)/ml [38]. Έτσι σε 2 ml 0.9 % NaCl διαλύουμε ελάχιστη ποσότητα μικροβίου ώστε να έχουμε απορρόφηση 0.1 στα 620 nm, καθώς τότε ξέρουμε ότι έχουμε διαλυμένα  $10^8$  cfu/ml. Χρησιμοποιούμε αυτή τη συγκέντρωση NaCl διότι δεν θέλουμε να προκαλέσουμε ωσμωτικό σοκ στα βακτήρια. Μετά από υπολογισμούς χρησιμοποιώντας το νόμο της αραίωσης καταλήγουμε στον όγκο 10  $\mu\text{l}$  μικροβίου από το διάλυμα του ορού στο διάλυμα του θρεπτικού με ή χωρίς την ένωση. Κατόπιν υπολογίζουμε τις συγκεντρώσεις της ένωσης που θα δοκιμάσουμε στα μικρόβια κάνοντας αρχικά ένα stock διάλυμα  $10^{-3}$  χρησιμοποιώντας διαλύτη DMSO και υπολογίζοντας σε τελικό όγκο του πειράματος 2ml. Έπειτα αφαιρούμε τους όγκους του μικροβίου και της ένωσης από τον τελικό όγκο βρίσκοντας έτσι πόση ποσότητα υγρού θρεπτικού πρέπει να βάλουμε. Ωστόσο η σειρά με την οποία τοποθετούνται οι παραπάνω όγκοι είναι αντίστροφη, δηλαδή πρώτα ξεκινάμε από την τοποθέτηση του θρεπτικού υλικού, μετά της ένωσης και τελευταίου του μικροβίου, του οποίου η

τοποθέτηση γίνεται εντός 20 λεπτών από την ώρα που θα παρασκευαστεί το διάλυμα με απορρόφηση 0.1 για να μπει η ίδια ποσότητα μικροβίου σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, καθώς τα βακτήρια διπλασιάζονται κάθε 20 περίπου λεπτά. Αφού ετοιμαστούν οι δοκιμαστικοί σωλήνες με τους κατάλληλους όγκους σε διπλά και με την παρουσία 2 σωλήνων με σκέτο θρεπτικό υλικό για χρήση του ως αρνητικό κοντρόλ και 2 σωλήνες με θρεπτικό και μικρόβιο ως θετικό κοντρόλ, αναδεύονται ελαφρά με χρήση vortex και τοποθετούνται σε επωαστή 37°C για 20 ώρες υπό ανάδευση. Μετά το πέρας 20 ωρών μετράται η απορρόφηση των δοκιμαστικών σωλήνων στα 620 nm μηδενίζοντας με το αρνητικό κοντρόλ για να αφαιρέσουμε την απορρόφηση από το σκέτο θρεπτικό (background). Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση των οπτικών απορροφήσεων ήταν το Spectro UV-vis RS Spectrophotometer (LaboMedInc.), όπου θέτοντας το μηχάνημα στη λειτουργία T (Transmittance) θέλουμε να έχουμε την ένδειξη 0. Κατόπιν τοποθετούμε το αρνητικό κοντρόλ και κλείνουμε το καπάκι ρυθμίζοντας την ένδειξη να πάει στο 100. Έπειτα γυρνάμε στη λειτουργία A (Absorbance), όπου πρέπει να μας δείξει την τιμή 0. Έτσι έχουμε μηδενίσει το background και συνεχίζουμε με την μέτρηση των οπτικών απορροφήσεων του θετικού κοντρόλ και των δειγμάτων που περιέχουν την ένωση. Αφού καταγραφούν οι τιμές των οπτικών απορροφήσεων, δημιουργείται το αντίστοιχο διάγραμμα στο Microsoft Excel  $f(C) = \% \text{ cell viability}$ . Η cell viability υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση  $(A_{\text{Complex-Bacteria}} - A_{\text{Complex}}/A_{\text{DMSO-Bacteria}}) \times 100 \%$ .

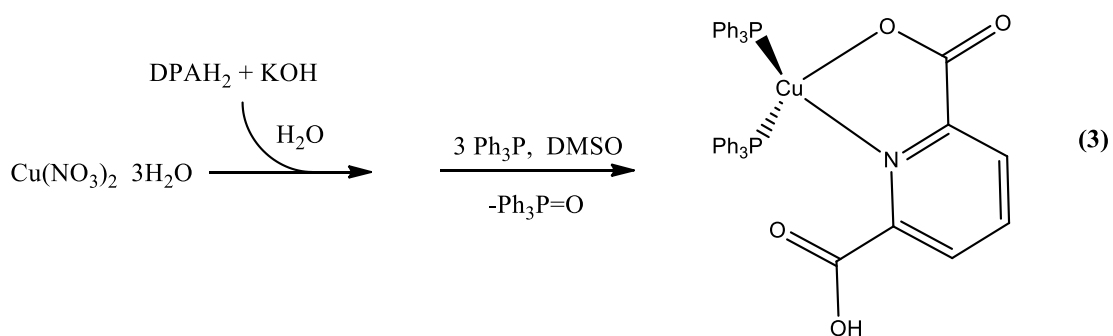
## Αποτελέσματα

### 5. Αντιδράσεις

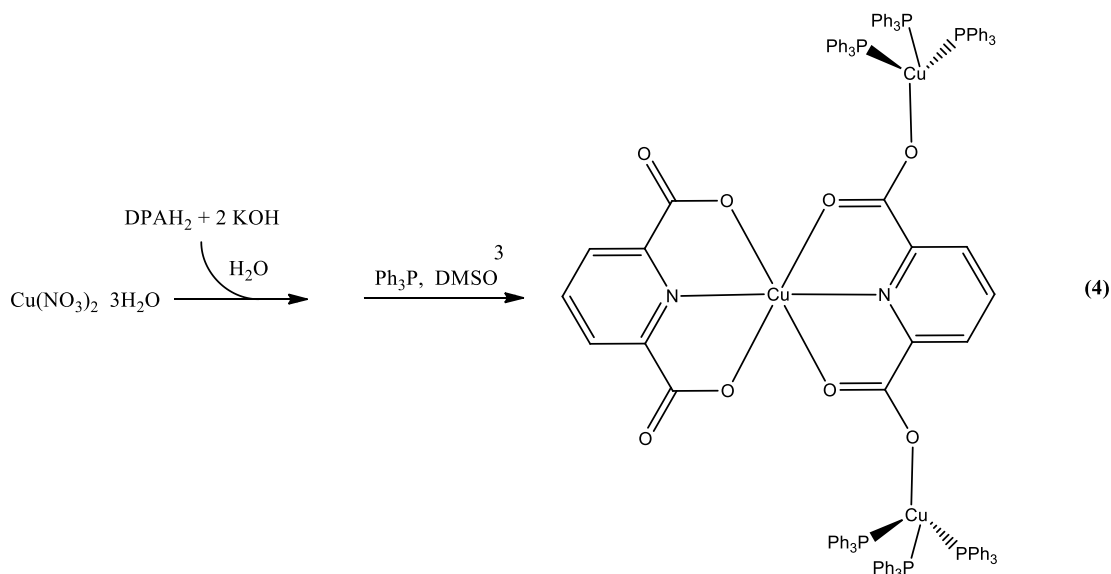
Οι αντιδράσεις που έλαβαν χώρα κατά την σύνθεση είναι οι εξής :



Σχήμα 2 : Οι αντιδράσεις για τη σύνθεση των συμπλόκων 1 και 2.



Σχήμα 3 : Οι αντιδράσεις για την σύνθεση του συμπλόκου 3.



Σχήμα 4 : Οι αντιδράσεις για την σύνθεση του συμπλόκου (4)

### 6.1 Σημείο τήξης

Τα σημεία τήξης των υποκαταστατών είναι 248-250 °C για το διπικολινικό οξύ και 80-81°C για την τριφαίνυλοφωσφίνη. Τα σημεία τήξης των συμπλόκων ήταν 238-245 °C για το σύμπλοκο [Cu(H<sub>2</sub>DPA)(DPA)], 226-233 °C για το σύμπλοκο [Cu<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(TPP)<sub>3</sub>], 224-229 για το σύμπλοκο [Cu(HDPA)(TPP)<sub>2</sub>].H<sub>2</sub>O, 110-118 για το σύμπλοκο [Cu<sub>3</sub>(DPA)(H<sub>2</sub>DPA)(TPP)<sub>6</sub>].11H<sub>2</sub>O.4DMSO. Παρατηρούμε τις διαφορές στα σημεία τήξης των ελεύθερων υποκαταστατών σε σχέση με αυτά των συμπλόκων και συμπεραίνουμε από τις διαφορές αυτές ότι είναι μία ένδειξη ότι έχει γίνει η ένταξη των υποκαταστατών στο μέταλλο.

## 6.2 Διαλυτότητα

Στους παρακάτω πίνακες φαίνονται τα αποτελέσματα της διαλυτότητας. Με τους χαρακτήρες – και +, και το πλήθος αυτών δηλώνουμε το ποσό της διαλυτότητας, στον κάθε διαλύτη.

Πίνακας 3 : Διαλυτότητα του συμπλόκου:  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{DPA})(\text{DPA})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Διαλύτης	Διαλυτότητα
n-hexane	-
Toluene	-
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	+ (θόλωμα)
$\text{CHCl}_3$	+ (θόλωμα)
Acetone	+++
MeOH	+++
MeCN	+ (θόλωμα)
DMSO	+++
$\text{H}_2\text{O}$	+++

Πίνακας 4 : Διαλυτότητα του συμπλόκου  $[\text{Cu}_2\text{Cl}_2(\text{TPP})_3]$

Διαλύτης	Διαλυτότητα
n-hexane	++
Toluene	++
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	+++
$\text{CHCl}_3$	+++
Acetone	+++
MeOH	-
MeCN	+
DMSO	+++
$\text{H}_2\text{O}$	-

Πίνακας 5 : Διαλυτότητα του συμπλόκου  $[Cu(HDPA)(TPP)_2] \cdot H_2O$

Διαλύτης	Διαλυτότητα
n-hexane	+
Toluene	++
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	+++
CHCl <sub>3</sub>	++
Acetone	+++
MeOH	+
MeCN	+
DMSO	+++
H <sub>2</sub> O	+

Πίνακας 6 : Διαλυτότητα του συμπλόκου

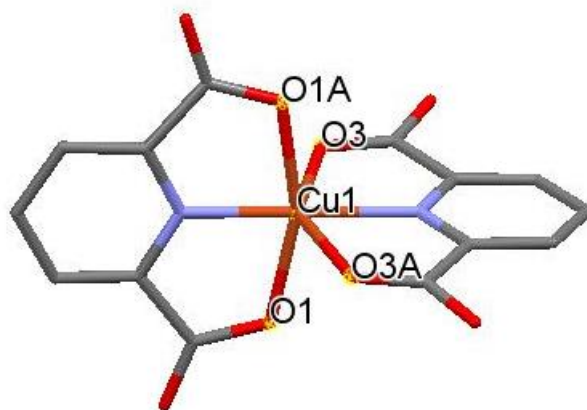


Διαλύτης	Διαλυτότητα
n-hexane	+
Toluene	++
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	+++
CHCl <sub>3</sub>	++
Acetone	+++
MeOH	+
MeCN	+
DMSO	+++
H <sub>2</sub> O	-

### 6.3 Ανάλυση με περίθλαση ακτίνων-Χ μονοκρυστάλλου

Τα αποτελέσματα της περίθλασης με ακτίνες-Χ μονοκρυστάλλου παραθέτονται παρακάτω, καθώς και οι κρυσταλλικές δομές των ενώσεων με τη χρήση του προγράμματος Mercury 3.10. Οι κρύσταλλοι των ενώσεων 1-4 ήταν σταθεροί στον αέρα.

#### Σύμπλοκο 1, χημικός τύπος $[Cu(H_2DPA)(DPA)] \cdot 2H_2O$



Εικόνα 9 : Απεικόνιση της κρυσταλλική δομή του  $[Cu(H_2DPA)(DPA)] \cdot 2H_2O$  με τη χρήση του προγράμματος Mercury 3.10.

Πρόκειται για ένα ομολειπτικό σύμπλοκο του δισθενούς χαλκού με οκταεδρική γεωμετρία γύρω από το μεταλλικό κέντρο (Cu1). Η ένταξη του υποκαταστάτη διπικολινικό οξύ στο μεταλλικό κέντρο γίνεται μέσω των καρβοξυλομάδων και του αζώτου του δακτυλίου πυριδίνης. Δύο μόρια διπικολινικού οξέος εντάσσονται σε ένα μόριο Cu. Η οξειδωτική βαθμίδα του μεταλλικού κέντρου είναι  $Cu^{2+}$  και αυτό φαίνεται από την οκταεδρική γεωμετρία. Δύο υποκαταστάτες διπικολινικού οξέος εντάσσονται στο μεταλλικό κέντρο. Το

ένα μόριο διπικολινικού οξέος εντάσσεται μέσω του αποπρωτονιωμένου οξυγόνου της καρβοξυλομάδας και το άλλο μόριο διπικολινικού οξέος εντάσσεται μέσω του μη αποπρωτονιωμένου Ο της καρβοξυλομάδας.

Στους πίνακες παρακάτω φαίνονται τα χαρακτηριστικά της μοναδιαίας κυψελίδας του κρυστάλλου της σύμπλοκης ένωσης, καθώς και τα μήκη δεσμών και οι γωνίες δεσμών γύρω από το μεταλλικό κέντρο.

Πίνακας 7 : Χαρακτηριστικά μοναδιαίας κυψελίδας

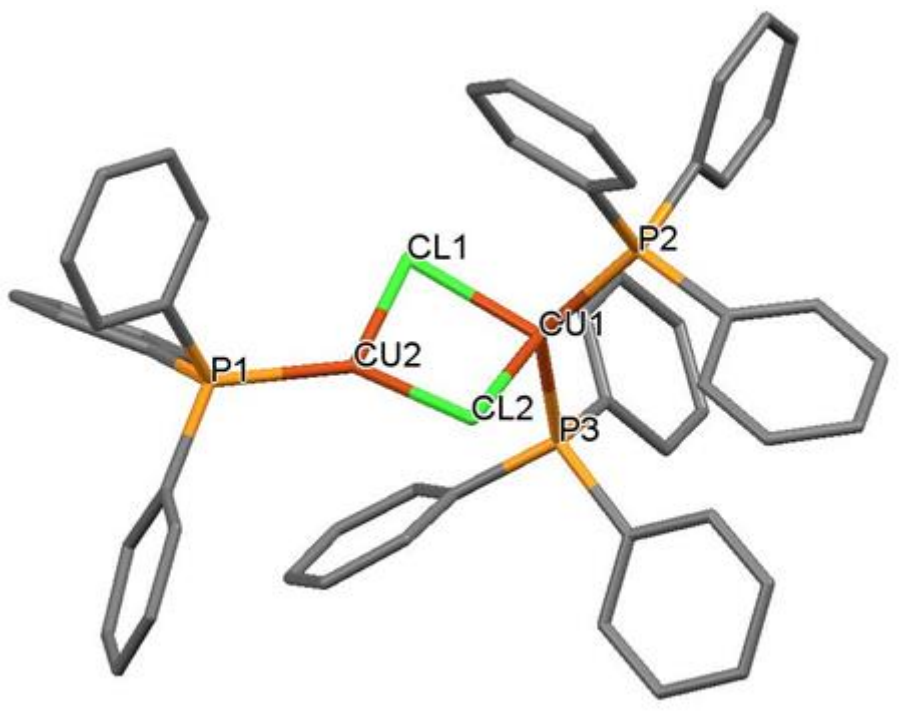
Ομάδα συμμετρίας χώρου	Μήκη κυψελίδας	Γωνίες κυψελίδας	Όγκος μοναδιαίας κυψελίδας
$P_c$	$a = 13.423 \text{ \AA}$ $b = 10.309 \text{ \AA}$ $c = 13.811 \text{ \AA}$	$\alpha = 90^\circ$ $\beta = 114.29^\circ$ $\gamma = 90^\circ$	$1741.95 \text{ \AA}^3$



Πίνακας 8 : Επιλεγμένα μήκη δεσμών και γωνίες δεσμών

Δεσμός	Μήκος (Å)	Γωνία	Μοίρες
Cu1-N1	1.911	N1-Cu1-O1	80
Cu1-N2	2.011	N1-Cu1-N2	180
Cu1-O1	2.008	N1-Cu1-O3	105.6
Cu1-O1A	2.008	N1-Cu1-O1A	80
Cu1-O3	2.425	N1-Cu1-O3A	105.6
Cu1-O3A	2.425	O1-Cu1-N2	100
		O1-Cu1-O3	95.6
		O1-Cu1-O1A	160.1
		O1-Cu1-O3A	89.8
		N2-Cu1-O3	74.4
		N2-Cu1-O3	74.4
		N2-Cu1-O1A	100
		N2-Cu1-O3A	74.4
		O1-Cu1-O3A	89.8
		N2-Cu1-O3	74.4
		N2-Cu1-O1A	100
		N2-Cu1-O3A	74.4
		O3-Cu1-O1A	89.8
		O3-Cu1-O3A	148.7
		O1A-Cu1-O3A	95.6

Από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα συμπεραίνουμε πως ο υποκαταστάτης διπικολινικό οξύ εντάσσεται μέσω του αποπρωτονιωμένου οξυγόνου της καρβοξυλομάδας στην μία περίπτωση (Cu1-O1 και Cu1-O1A), και μέσω του μη αποπρωτονιωμένου οξυγόνου της καρβονυλομάδας στην δεύτερη περίπτωση (Cu1-O3 και Cu1-O3A). Αυτό το αποτέλεσμα είναι πολύ ενδιαφέρον σχετικά με τη χημική συμπεριφορά του υποκαταστάτη διπικολινικό οξύ.

**Σύμπλοκο 2, χημικός τύπος  $[Cu_2Cl_2(TPP)_3]$ .**

Εικόνα 10 : Απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου  $[Cu_2Cl_2(TPP)_3]$  με χρήση του προγράμματος Mercury 3.10.

Πρόκειται για ένα διπυρηνικό σύμπλοκο μονοσθενούς χαλκού. Το μεταλλικό κέντρο Cu2 βρίσκεται στην οξειδωτική βαθμίδα +1 και έχει επίπεδη τριγωνική γεωμετρία, ενώ το μεταλλικό κέντρο Cu1 βρίσκεται στην οξειδωτική βαθμίδα +1 και έχει γεωμετρία τετράεδρου. Δύο μόρια Cl γεφυρώνουν τα μεταλλικά κέντρα χαλκού και σταθεροποιούν το φορτίο του κάθε μεταλλικού κέντρου ( $Cu^+$ ).

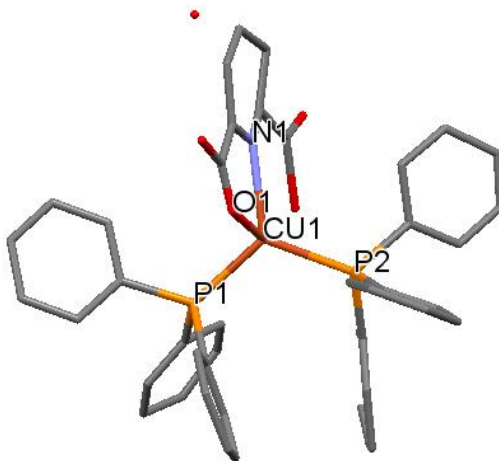
Στους πίνακες παρακάτω φαίνονται τα χαρακτηριστικά της μοναδιαίας κυψελίδας του κρυστάλλου της σύμπλοκης ένωσης, καθώς και τα μήκη δεσμών και οι γωνίες δεσμών γύρω από το μεταλλικό κέντρο.

Πίνακας 9 : Χαρακτηριστικά μοναδιαίας κυψελίδας

Ομάδα συμμετρίας χώρου	Μήκη κυψελίδας	Γωνίες κυψελίδας	Όγκος μοναδιαίας κυψελίδας
P 2 <sub>1</sub> /n	a = 18.902 Å b = 10.761 Å c = 13.261 Å	α = 90° β = 109.51° γ = 90°	4567.43 Å <sup>3</sup>

Πίνακας 10 : Επιλεγμένα μήκη δεσμών και γωνίες δεσμών

Δεσμός	Μήκος (Å)	Γωνία	Μοίρες
Cu2-N1	1.9122	O6-Cu1-P1	114.45
Cu2-N2	1.9566	O6-Cu1-P2	98.74
Cu2-O1	2.1068	O6-Cu1-P3	89.79
Cu2-O3	2.1305	P1-Cu1-P2	117.10
Cu2-O5	2.2531	P1-Cu1-P3	115.69
Cu1-O6	2.0706	P2-Cu1-P3	116.19
Cu2-Cl2	2.2472	N1-Cu2-N2	173.8
Cu2-O7	2.2604	N1-Cu2-O1	79.19
Cu3-O8	2.0672	N1-Cu2-O3	79.03
Cu1-P1	2.2691	N1-Cu2-O5	105.98
Cu1-P2	2.2992	N1-Cu2-O7	99.68
Cu1-P3	2.3086	N2-Cu2-O1	95.76
Cu3-P4	2.2936	N2-Cu2-O3	106.00
Cu3-P5	2.3258	N2-Cu2-O5	77.36
Cu3-P6	2.3227	N2-Cu2-O7	76.78
		O1-Cu2-O3	158.22
		O1-Cu2-O5	89.19
		O1-Cu2-O7	92.33
		O3-Cu2-O5	96.36
		O3-Cu2-O7	91.74
		O5-Cu2-O7	154.12
		O8-Cu3-P4	117.42
		O8-Cu3-P5	93.91
		O8-Cu3-P6	94.47
		P4-Cu3-P5	117.64
		P4-Cu3-P6	114.68
		P5-Cu3-P6	114.69

**Σύμπλοκο 3, χημικός τύπος  $[Cu(HDPA)(TPP)_2] \cdot H_2O$  :**

Εικόνα 11 : Απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου  $[Cu(HDPA)(TPP)_2] \cdot H_2O$  με τη χρήση του προγράμματος Mercury 3.10.

Πρόκειται για ένα ετεροληπτικό σύμπλοκο του μονοσθενούς χαλκού, με τετραεδρική γεωμετρία γύρω από το μεταλλικό κέντρο. Στο μεταλλικό κέντρο εντάσσεται ο υποκαταστάτης διπικολινικό οξύ, μέσω του αζώτου και του αποπρωτονιωμένου οξυγόνου της καρβοξυλομάδας. Έτσι σταθεροποιείται το φορτίο +1 του μεταλλικού κέντρου  $Cu^+$ . Ένα κρυσταλλικό μόριο νερού σταθεροποιεί τη δομή, χωρίς να εντάσσεται στο μεταλλικό κέντρο.

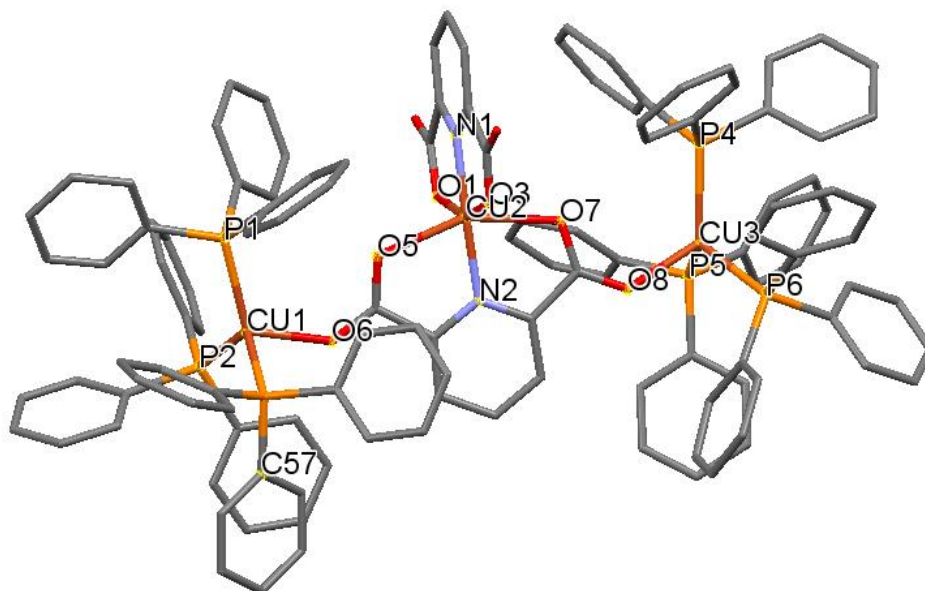
Στους πίνακες παρακάτω φαίνονται τα χαρακτηριστικά της μοναδιαίας κυψελίδας του κρυστάλλου της σύμπλοκης ένωσης, καθώς και τα μήκη δεσμών και οι γωνίες δεσμών γύρω από το μεταλλικό κέντρο.

Πίνακας 11 : Χαρακτηριστικά μοναδιαίας κυψελίδας

Ομάδα συμμετρίας χώρου	Μήκη κυψελίδας	Γωνίες κυψελίδας	Όγκος μοναδιαίας κυψελίδας
P 1	a = 9.524 Å b = 11.879 Å c = 16.566 Å	α = 91.86° β = 91.19° γ = 106.86°	1791.88 Å <sup>3</sup>

Πίνακας 12 : Επιλεγμένα μήκη δεσμών και γωνίες δεσμών

Δεσμός	Μήκος (Å)	Γωνία	Μοίρες
Cu1-P1	2.2596	O1-Cu1-P1	94.28
Cu1-P2	2.2455	O1-Cu1-P2	112.61
Cu1-O1	2.1844	N1-Cu1-P2	116.71
Cu1-N1	2.2990	P1-Cu1-P2	117.18
		N1-Cu1-P1	125.93
		O1-Cu1-N1	68.87

**Σύμπλοκο 4, χημικός τύπος  $[Cu_3(DPA)(H_2DPA)(TPP)_6] \cdot 11H_2O \cdot 4DMSO$** 

Εικόνα 12 : Απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου  $[Cu_3(DPA)(H_2DPA)(TPP)_6] \cdot 11H_2O \cdot 4DMSO$  με τη χρήση του προγράμματος Mercury 3.10.

Πρόκειται για ένα σύμπλοκο μικτού σθένους. Τα άτομα Cu1 και Cu3 βρίσκονται στην οξειδωτική βαθμίδα +1, ενώ το άτομο Cu2 βρίσκεται στην οξειδωτική βαθμίδα +2. Γύρω από τα άτομα Cu1 και Cu3 η γεωμετρία είναι τετραεδρική. Γύρω από το άτομο Cu2 η γεωμετρία είναι οκταεδρική. Συνολικά το σύμπλοκο εμφανίζει τριγωνική γεωμετρία. Τη δομή σταθεροποιούν 11 μόρια νερού και 4 μόρια διμέθυλοσουλφοξειδίου. Για το κεντρικό μεταλλικό κέντρο, Cu2, το οποίο είναι αντίστοιχο με το μεταλλικό κέντρο της σύμπλοκης ένωσης 1  $[Cu(H_2DPA)(DPA)] \cdot 2H_2O$ , από τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα συμπεραίνουμε

πως ο ένας υποκαταστάτης διπικολινό οξύ εντάσσεται μέσω του αποπρωτονιωμένου οξυγόνου της καρβοξυλομάδας και ο άλλος υποκαταστάτης διπικολινικό οξύ εντάσσεται μέσω του οξυγόνου της καρβονυλομάδας. Έτσι σταθεροποιείται το φορτίο (+2).

Στους πίνακες παρακάτω φαίνονται τα χαρακτηριστικά της μοναδιαίας κυψελίδας του κρυστάλλου της σύμπλοκης ένωσης, καθώς και τα μήκη δεσμών και οι γωνίες δεσμών γύρω από το μεταλλικό κέντρο.

Πίνακας 13 : Χαρακτηριστικά μοναδιαίας κυψελίδας

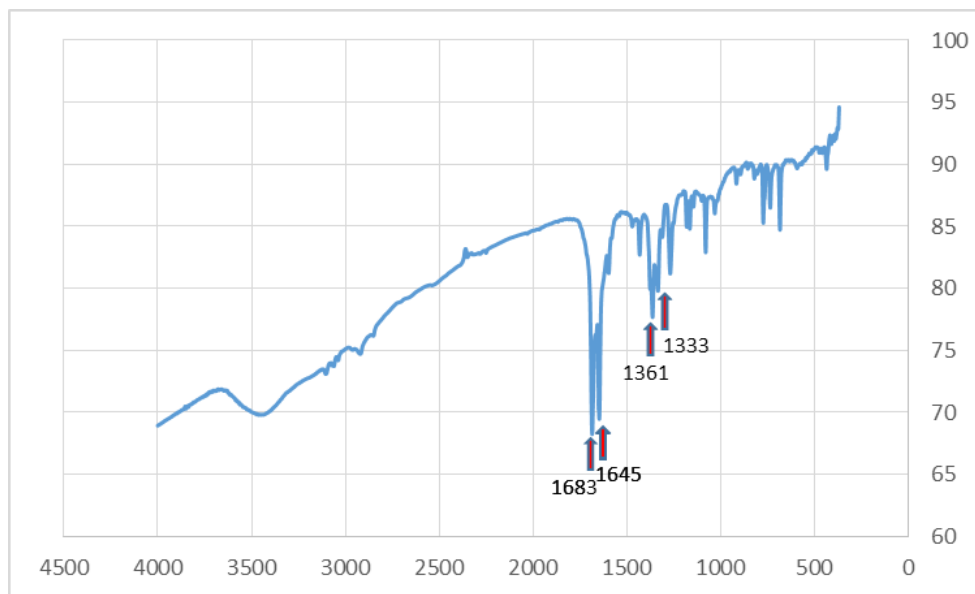
Ομάδα συμμετρίας χώρου	Μήκη κυψελίδας	Γωνίες κυψελίδας	Όγκος μοναδιαίας κυψελίδας
$P 2_1/n$	$a = 19.647 \text{ \AA}$ $b = 20.467 \text{ \AA}$ $c = 32.245 \text{ \AA}$	$\alpha = 90^\circ$ $\beta = 96.69^\circ$ $\gamma = 90^\circ$	$12878.2 \text{ \AA}^3$

Πίνακας 14 : Επιλεγμένα μήκη δεσμών και γωνίες δεσμών.

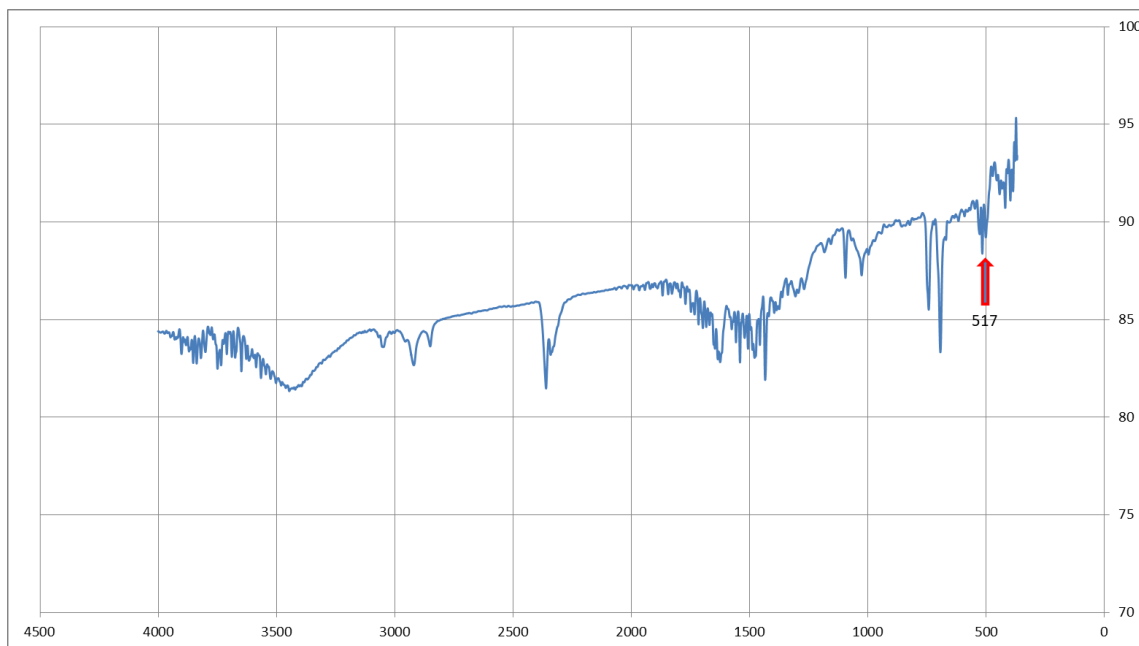
Δεσμός	Μήκος (Å)	Γωνία	Μοίρες
Cu2-N1	1.9122	N1-Cu1-O1	80
Cu2-N2	1.9566	N1-Cu1-N2	180
Cu2-O1	2.1068	N1-Cu1-O3	105.6
Cu2-O3	2.1305	N1-Cu1-O1A	80
Cu2-O5	2.2531	N1-Cu1-O3A	105.6
Cu2-O7	2.2604	O1-Cu1-N2	100
		O1-Cu1-O3	95.6
		O1-Cu1-O1A	160.1
		O1-Cu1-O3A	89.8
		N2-Cu1-O3	74.4
		N2-Cu1-O3	74.4
		N2-Cu1-O1A	100
		N2-Cu1-O3A	74.4
		O1-Cu1-O3A	89.8
		N2-Cu1-O3	74.4
		N2-Cu1-O1A	100
		N2-Cu1-O3A	74.4
		O3-Cu1-O1A	89.8
		O3-Cu1-O3A	148.7
		O1A-Cu1-O3A	95.6



## 6.4 Δονητική φασματοσκοπία υπερώθρου (FT-IR)

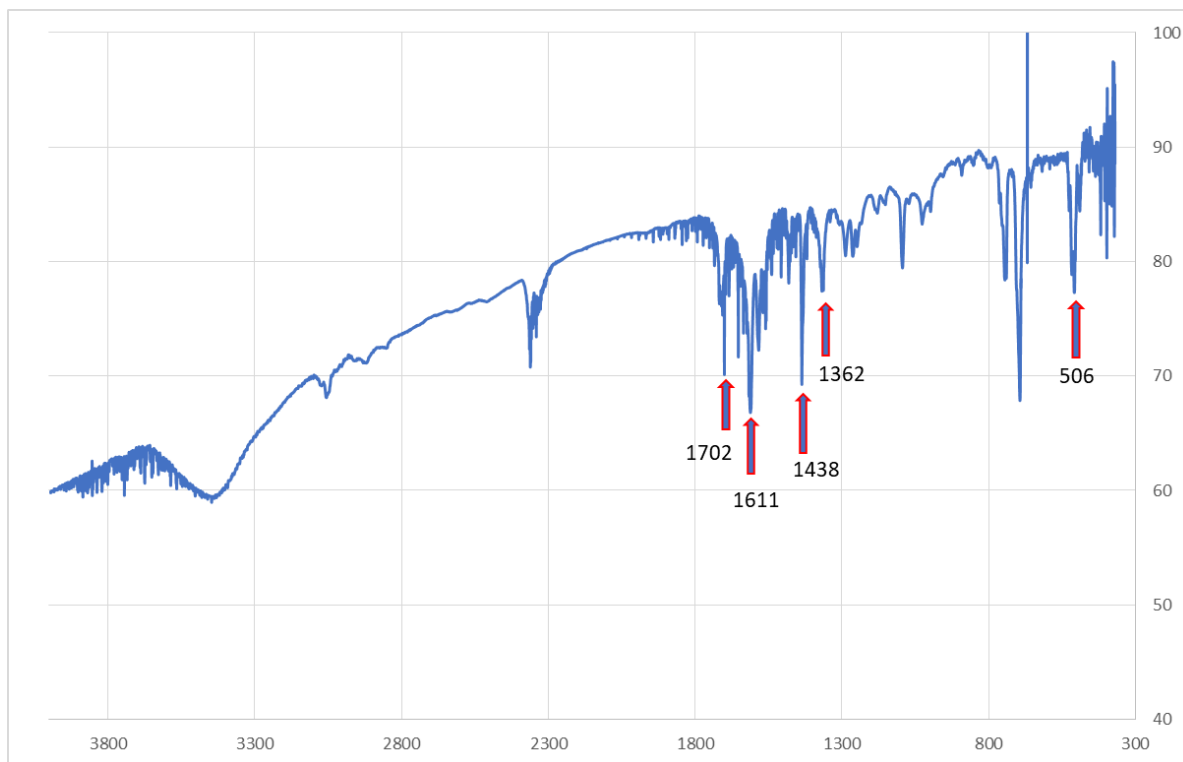
Εικόνα 13 : Φάσμα IR της σύμπλοκης ένωσης  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{DPA})(\text{DPA})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 

Στο φάσμα IR αυτής της σύμπλοκης ένωσης παρατηρούμε δύο ισχυρές δονητικές ζώνες στα  $1683$  και  $1645 \text{ cm}^{-1}$ , οι οποίες οφείλονται στην ασύμμετρη δόνηση του δεσμού  $\nu(-\text{COO}^-)$ . Η δονητική ζώνη στα  $1361 \text{ cm}^{-1}$  οφείλεται στη συμμετρική δόνηση του δεσμού  $\nu(-\text{COO}^-)$ . Η δονητική ζώνη στα  $1333 \text{ cm}^{-1}$  οφείλεται στη δόνηση του δεσμού  $\nu(\text{C-N})$ .



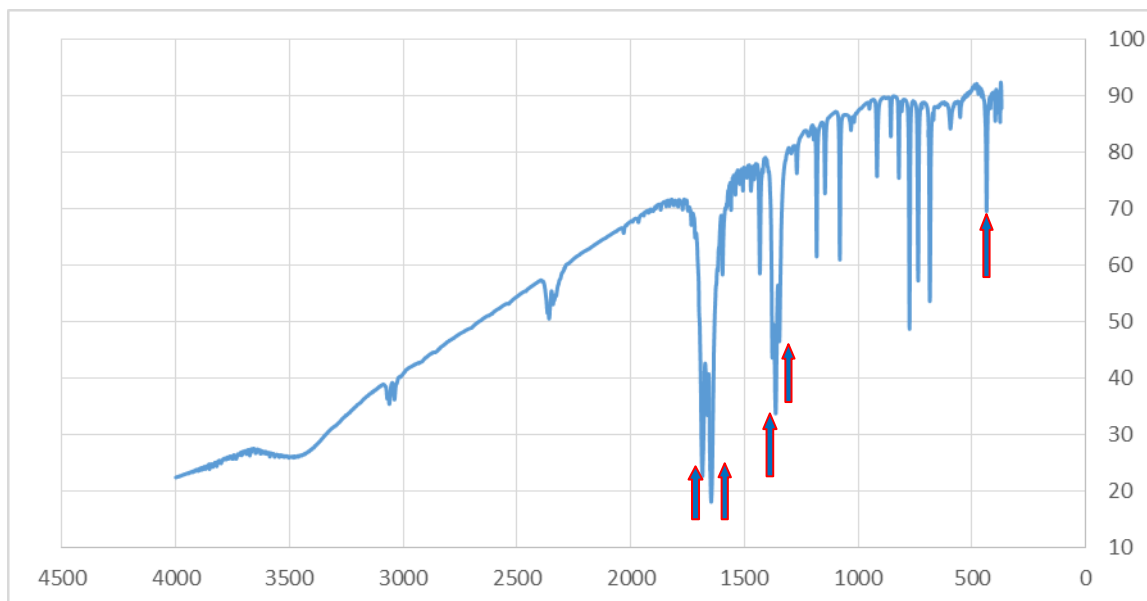
Εικόνα 14 : Το φάσμα IR της σύμπλοκης ένωσης  $[\text{Cu}_2\text{Cl}_2(\text{TPP})_3]$

Στο φάσμα IR αυτής της σύμπλοκης ένωσης παρατηρούμε μια ισχυρή δόνηση στα  $517 \text{ cm}^{-1}$ , η οποία οφείλεται στη δόνηση του δεσμού  $\nu(\text{C-P})$ .



Εικόνα 15 : Το φάσμα IR της σύμπλοκης ένωσης  $[\text{Cu}(\text{HDPA})(\text{TPP})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$

Στο φάσμα IR αυτής της σύμπλοκης ένωσης παρατηρούμε δύο ισχυρές δονητικές ζώνες στα  $1702 \text{ cm}^{-1}$  και  $1611 \text{ cm}^{-1}$ , οι οποίες οφείλονται στην ασύμμετρη δόνηση του δεσμού ( $\nu\text{-COO}^-$ ). Η δονητική ζώνη στα  $1438 \text{ cm}^{-1}$ , οφείλεται στην συμμετρική δόνηση του δεσμού ( $\nu\text{-COO}^-$ ). Η δονητική ζώνη στα  $1362 \text{ cm}^{-1}$  οφείλεται στη δόνηση του δεσμού ( $\nu\text{-C-N}$ ). Η δονητική ζώνη στα  $509 \text{ cm}^{-1}$  οφείλεται στη δόνηση του δεσμού ( $\nu\text{-C-P}$ ).



Εικόνα 16 : Το φάσμα IR της σύμπλοκης ένωσης

$[\text{Cu}_3(\text{DPA})(\text{H}_2\text{DPA})(\text{TPP})_6] \cdot 11\text{H}_2\text{O} \cdot 4\text{DMSO}$

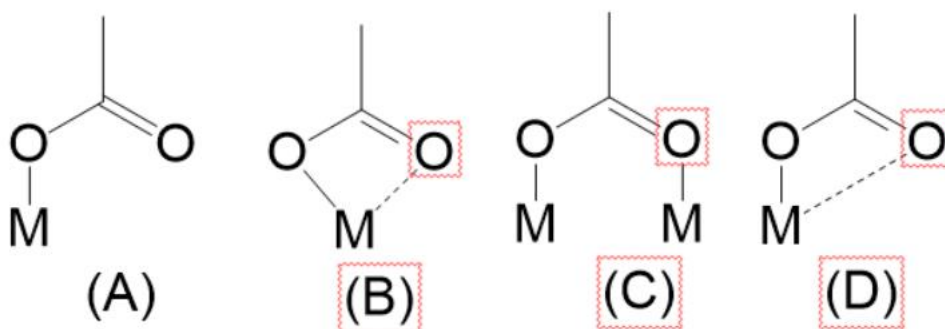
Στο φάσμα IR αυτής της σύμπλοκης ένωσης παρατηρούμε δύο ισχυρές δονητικές ζώνες στα  $1683 \text{ cm}^{-1}$  και  $1643 \text{ cm}^{-1}$ , οι οποίες οφείλονται στην ασύμμετρη δόνηση του δεσμού ( $\nu\text{-COO}^-$ ). Η δονητική ζώνη στα  $1361 \text{ cm}^{-1}$ , οφείλεται στην συμμετρική δόνηση του δεσμού ( $\nu\text{-COO}^-$ ). Η δονητική ζώνη στα  $1345 \text{ cm}^{-1}$  οφείλεται στη δόνηση του δεσμού ( $\nu\text{-C-N}$ ). Η δονητική ζώνη στα  $431 \text{ cm}^{-1}$  οφείλεται στη δόνηση του δεσμού ( $\nu\text{-C-P}$ ).

Η διαφορά της συμμετρικής δόνησης της καρβοξυλομάδας  $\Delta\nu = \{ \nu_{\text{as}}(\text{COO}^-) - \nu_{\text{s}}(\text{COO}^-) \}$  από την ασύμμετρη δόνηση και η σύγκρισή της με την αντίστοιχη διαφορά της ιοντικής ένωσης του ligand, δίνει πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο ένταξης της καρβοξυλομάδας. Οι συγκρίσεις σε αυτήν την περίπτωση έγιναν με το άλας του διπικολινικού οξέος με κάλιο  $\text{DPAK}_2$ . Αυτές οι πληροφορίες συνοψίζονται στον πίνακα παρακάτω :

Πίνακας 6 : Η σύγκριση  $\Delta\nu = \nu_{as}(\text{COO}^-) - \nu_s(\text{COO}^-)$  του συμπλόκου και του αλατος, μας δίνει πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο ένταξης της καρβοξυλομάδας στο μέταλλο.

Τρόπος ένταξης	Σύγκριση $\Delta\nu_{\text{συμπλόκου}}$ με $\Delta\nu_{\text{αλατος}}$
Μονοδοντικός	$\Delta\nu_{\text{συμπλόκου}} > \Delta\nu_{\text{αλατος}}$
Χηλικός	$\Delta\nu_{\text{συμπλόκου}} < \Delta\nu_{\text{αλατος}}$
Γεφυρωτικός	$\Delta\nu_{\text{συμπλόκου}} \approx \Delta\nu_{\text{αλατος}}$
Ασύμετρος διδοντικός	$\Delta\nu_{\text{συμπλόκου}} > \Delta\nu_{\text{αλατος}}$

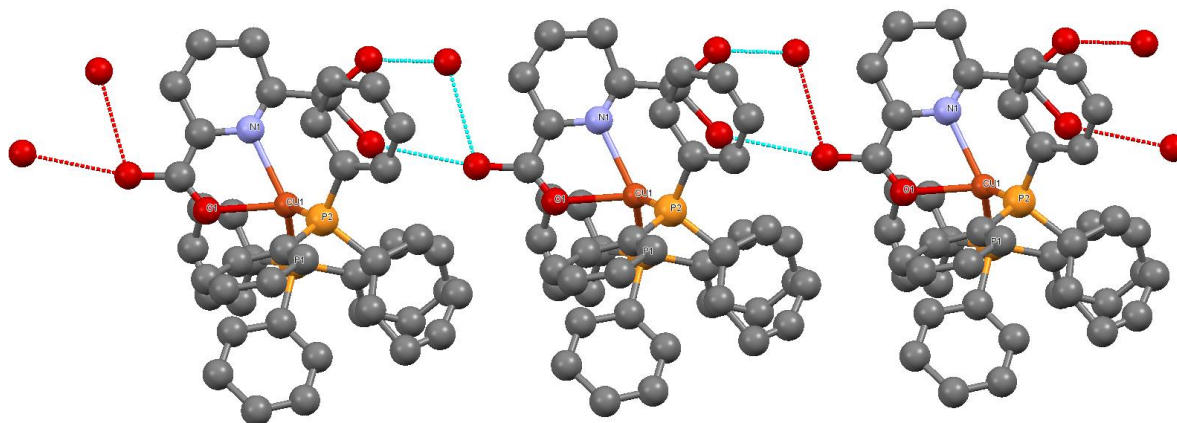
Χημική ένωση	$\Delta\nu = \nu_{as}(\text{COO}^-) - \nu_s(\text{COO}^-)$
DPAK <sub>2</sub>	269
[Cu(H <sub>2</sub> DPA)(DPA)].2H <sub>2</sub> O	313, 288
[Cu(HDPA)(TPP) <sub>2</sub> ].H <sub>2</sub> O	264
[Cu <sub>3</sub> (DPA)(H <sub>2</sub> DPA)(TPP) <sub>6</sub> ].11H <sub>2</sub> O.4DMSO	305, 289



Εικόνα 17 : Διαφορετικοί τρόποι ένταξης της καρβοξυλομάδας στο μεταλλικό κέντρο A) Μονοδοντικός, B) Χηλικός, C)Γεφυρωτικός, D) Ασύμετρος διδοντικός.

Η τιμή  $\Delta\nu[\nu_{as}(\text{COO}^-)-\nu_s(\text{COO}^-)]$  της ιοντικής ένωσης του ligand DPAK<sub>2</sub>, 2,6-πυριдиноδικαρβοξυλικό κάλιο είναι 269 cm<sup>-1</sup> [38]. Οι αντίστοιχες τιμές  $\Delta\nu[\nu_{as}(\text{COO}^-)-\nu_s(\text{COO}^-)]$  στο σύμπλοκο 1 είναι 313 and 288 cm<sup>-1</sup>, οι οποίες είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές του DPAK<sub>2</sub>. Αυτό επιβεβαιώνει το μονοδοντικό τρόπο ένταξης της καρβοξυλομάδας στο μεταλλικό κέντρο, σε όλο

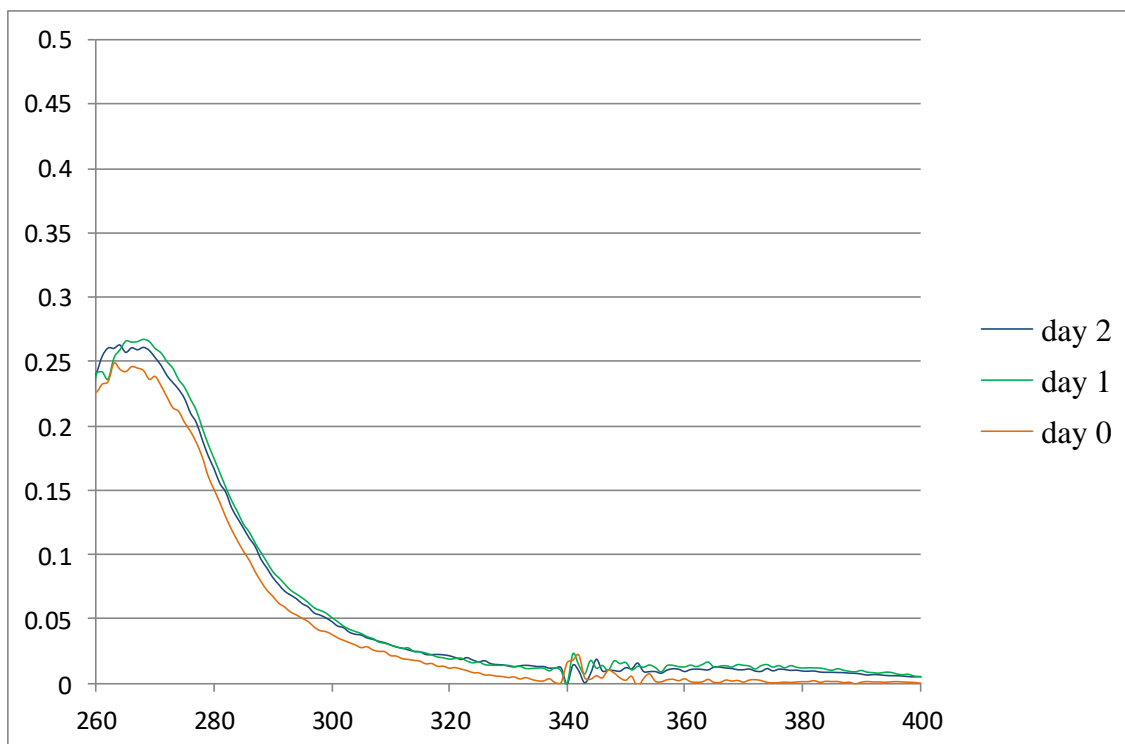
τον όγκο του δείγματος [39]. Η τιμή  $\Delta\nu[\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)-\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)]$  στην περίπτωση του **3** είναι  $264 \text{ cm}^{-1}$ , περίπου η ίδια με την τιμή του  $\text{DPAK}_2$ . Αυτό υποστηρίζει ότι η  $-\text{COO}^-$  γεφυρώνει μεταλλικά κέντρα χαλκού όπως φαίνεται στην Εικόνα 9. Η τιμή  $\Delta\nu[\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)-\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)]$  στην περίπτωση του **4** είναι  $305$  και  $289 \text{ cm}^{-1}$ , υψηλότερη από τις παρατηρούμενες τιμές στο άλας  $\text{DPAK}_2$ . Αυτό υποστηρίζει το μονοδοντικό τρόπο ένταξης της καρβοξυλομάδας στο μεταλλικό κέντρο, η οποία και είναι σε συμφωνία με την κρυσταλλική δομή της ένωσης.



Εικόνα 18 : Η καρβοξυλομάδα του υποκαταστάτη 2,6-πυριδινοκαρβοξυλικού οξέος, γεφυρώνει τα μεταλλικά κέντρα Cu.

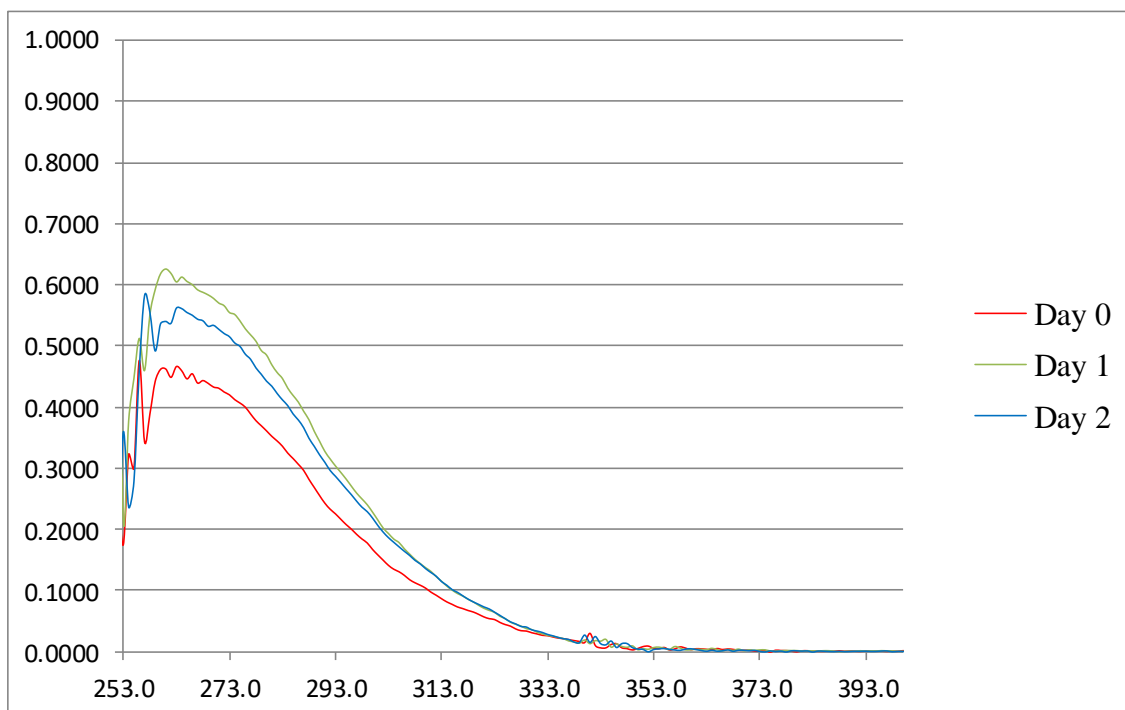
## 6.5 Σταθερότητα

Τα πειράματα σταθερότητας της ένωσης έγιναν τόσο με φασματοσκοπία UV, όσο και με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό (NMR). Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα σταθερότητας ήταν DMSO για το UV και dDMSO για το NMR. Στις παρακάτω εικόνες φαίνονται τα φάσματα των ενώσεων από το UV, σε χρόνους 0h, 24h και 48h και τα φάσματα σταθερότητας NMR 0 h και 1 week.



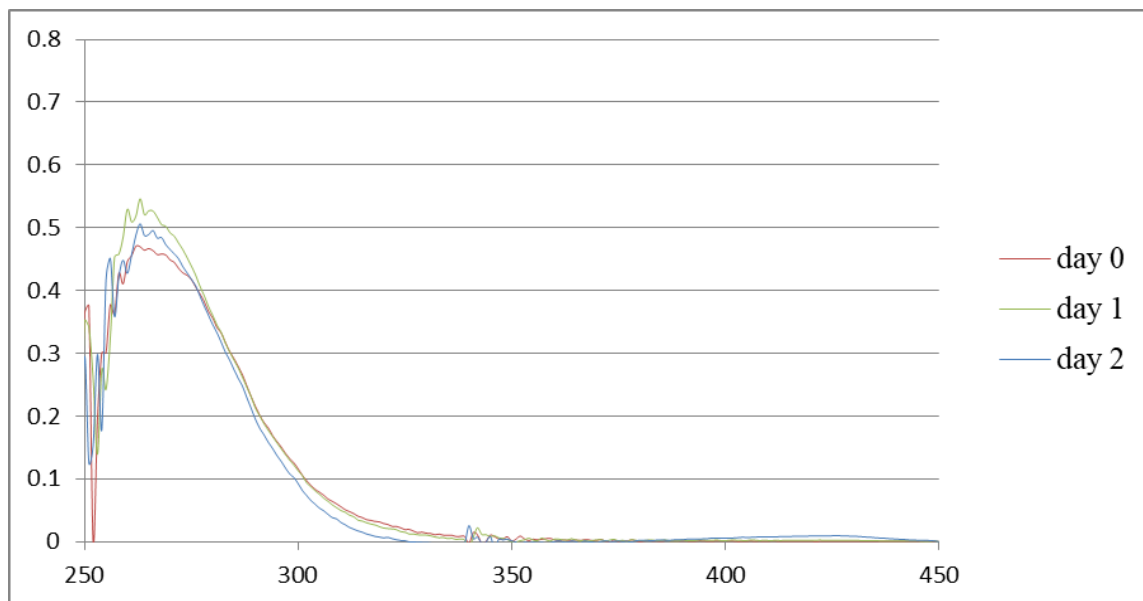
Εικόνα 19 : Τα φάσματα της σύμπλοκης ένωσης

$[\text{Cu}(\text{DPA})(\text{H}_2\text{DPA})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  σε χρόνους 0h - 48h.

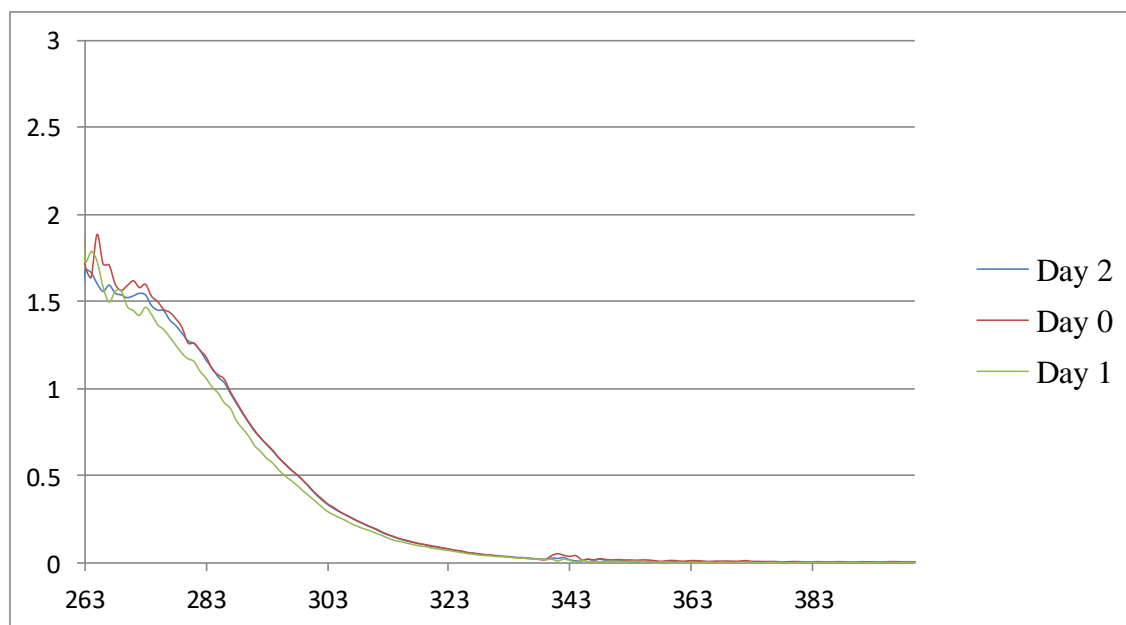


Εικόνα 20 : Τα φάσματα IR της σύμπλοκης ένωσης  $[\text{Cu}_2\text{Cl}_2(\text{TPP})_3]$  σε

χρόνους 0h - 48h.



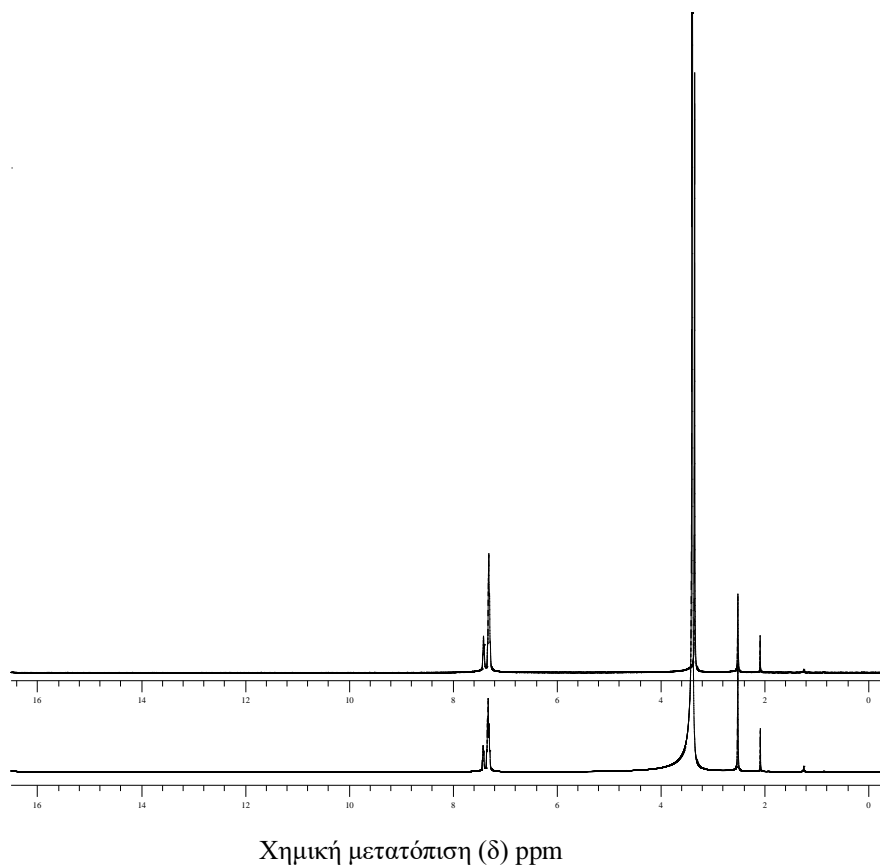
Εικόνα 21 : Τα φάσματα IR της σύμπλοκης ένωσης  $[\text{Cu}(\text{HDPA})(\text{TPP})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$  σε χρόνους 0h - 48h.



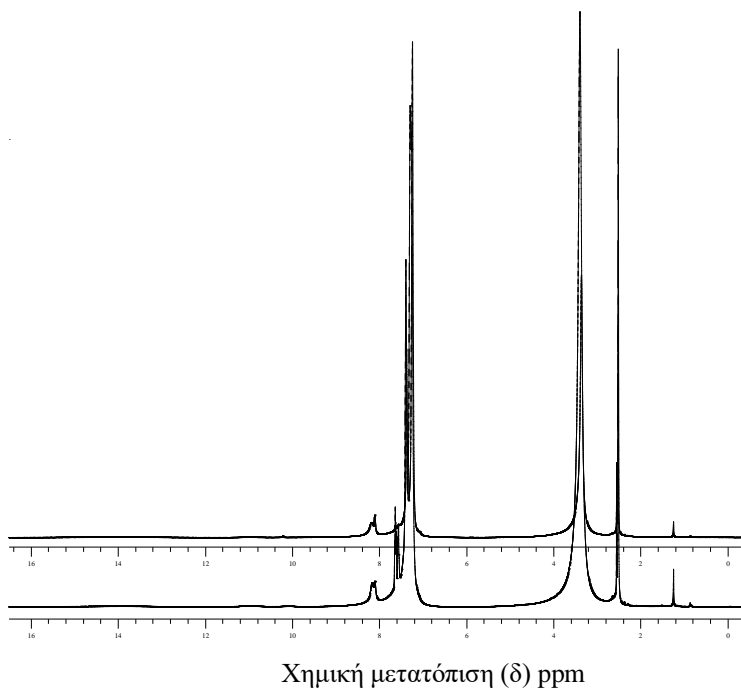
Εικόνα 22 : Τα φάσματα IR της σύμπλοκης ένωσης  $[\text{Cu}_3(\text{DPA})(\text{H}_2\text{DPA})(\text{TPP})_6] \cdot 11\text{H}_2\text{O} \cdot 4\text{DMSO}$  σε χρόνους 0h - 48h.



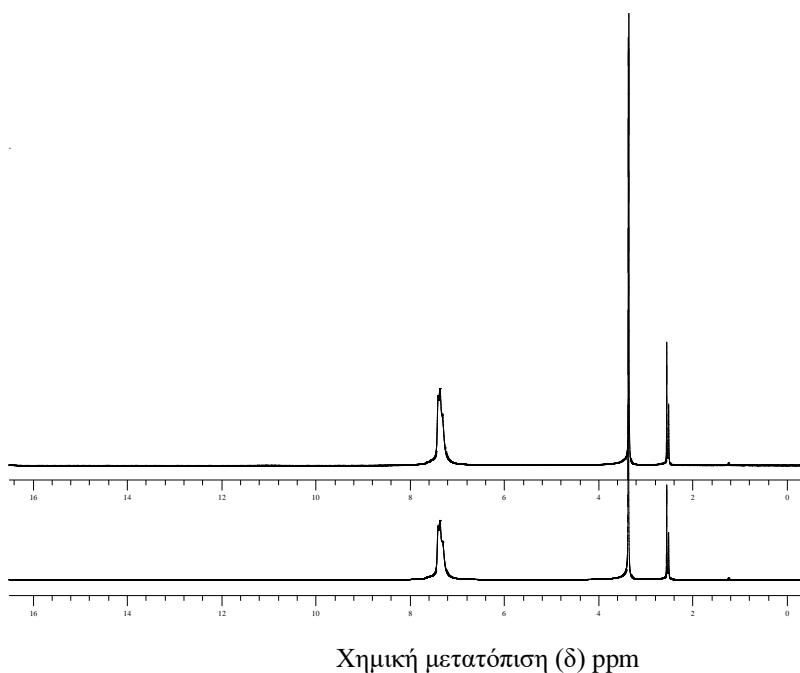
Δεν παρατηρούνται αλλαγές στα φάσματα UV. των σύμπλοκων ενώσεων  
άρα συμπεραίνουμε ότι είναι σταθερές.



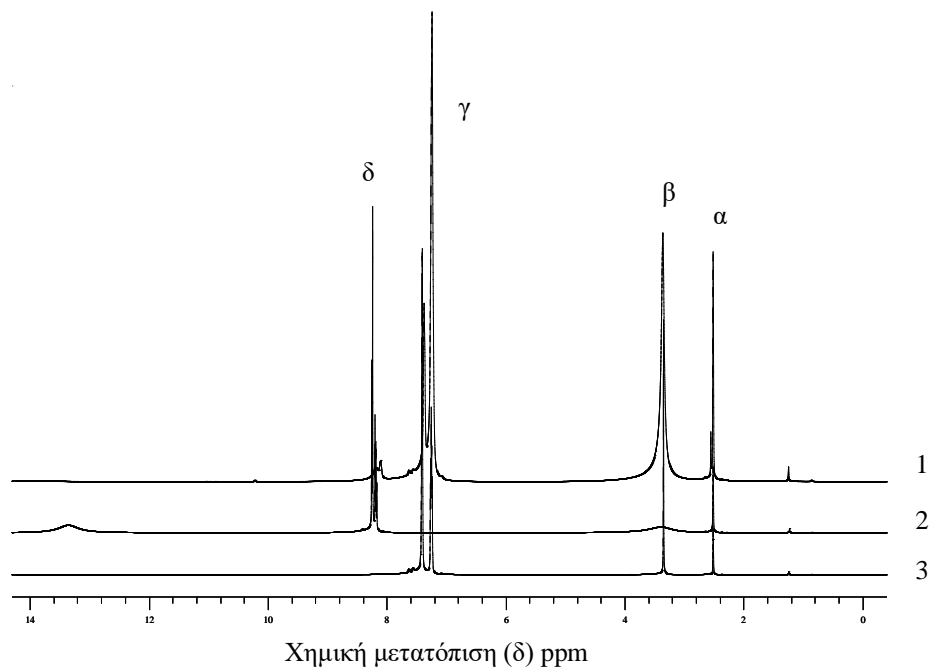
Εικόνα 23 : Σήματα συντονισμού της σύμπλοκης ένωσης  $[\text{Cu}_2\text{Cl}_2(\text{TPP})_3]$   
σε φάσμα NMR, σε χρόνους 0 h και 1 week.



Εικόνα 24 : Σήματα συντονισμού της σύμπλοκης ένωσης  $[Cu(HDPA)(TPP)_2] \cdot H_2O$  σε φάσμα NMR, σε χρόνους 0 h και 1 week.



Εικόνα 25 : Σήματα συντονισμού της σύμπλοκης ένωσης  $[Cu_3(DPA)(H_2DPA)(TPP)_6] \cdot 11H_2O \cdot 4DMSO$  σε φάσμα NMR, σε χρόνους 0 h και 1 week.



Εικόνα 26 : Φάσματα NMR 1) Σύμπλοκη ένωση  $[Cu(HDPA)(TPP)_2] \cdot H_2O$ ,  
 2) Διπικολινικό οξύ και 3) Τριφαινυλοφωσφίνης

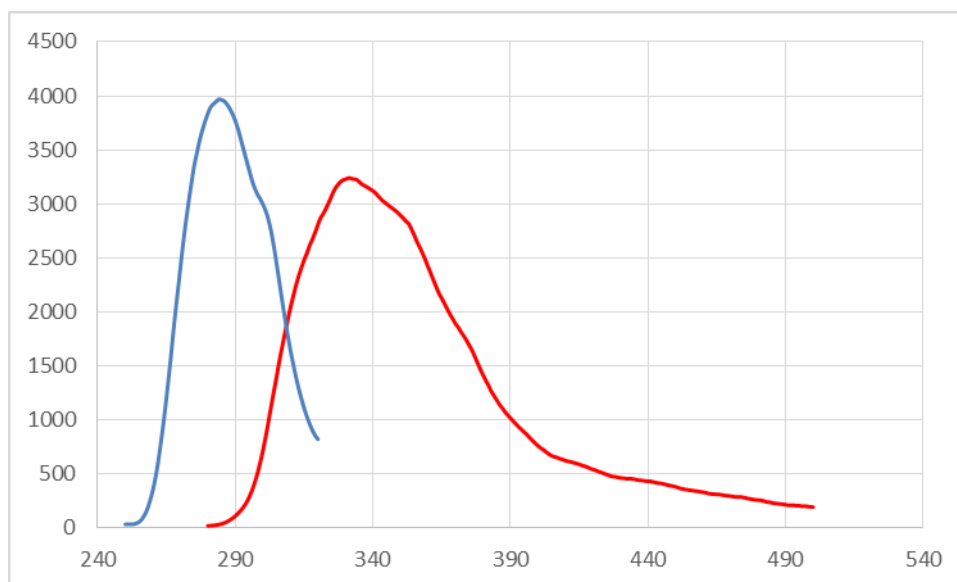
Ακολουθεί ο πίνακας με τις χημικές μετατοπίσεις NMR  $^1H$  της σύμπλοκης ένωσης  $[Cu(HDPA)(TPP)_2] \cdot H_2O$ .

Πίνακας 7 : Χημικές μετατοπίσεις και αντιστοιχία αυτών

ppm	αντιστοιχία
2.510	DMSO (α)
3.344	H <sub>2</sub> O (β)
7.238 και 7.371	TPP (γ)
8.101 και 8.157	DPA (δ)

## 6.6 Φθορισμομετρία

Παρακάτω φαίνονται τα φάσματα φθορισμού για καθεμία από τις σύμπλοκες ενώσεις που συντέθηκαν. Το φάσμα διέγερσης και το φάσμα εκπομπής, καθώς και οι μετατοπίσεις Stokes απεικονίζονται παρακάτω.

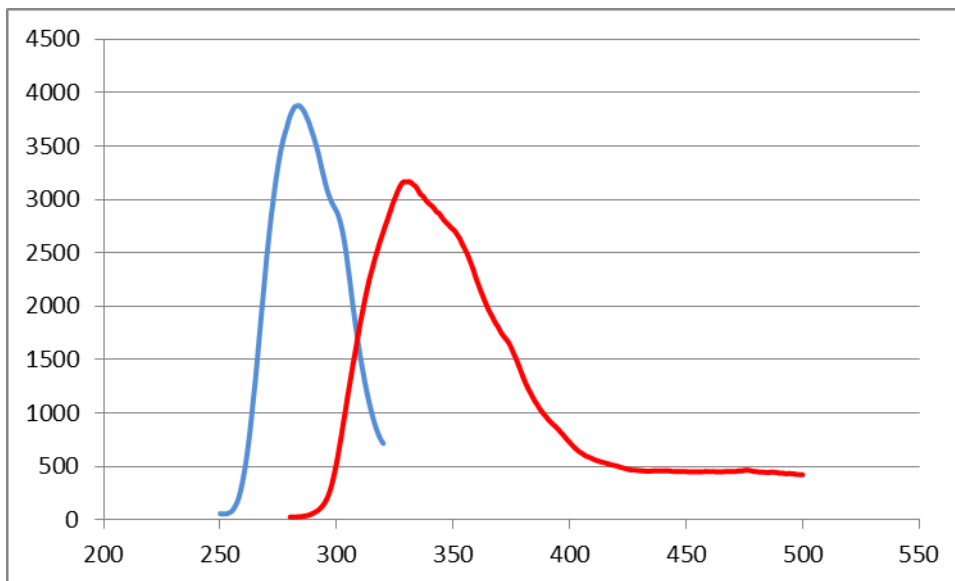


Εικόνα 27 : Φάσμα διέγερσης και εκπομπής του συμπλόκου  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{DPA})(\text{DPA})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Πίνακας 11 : Διέγερση, εκπομπή και μετατόπιση Stokes του συμπλόκου  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{DPA})(\text{DPA})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Διέγερση	Εκπομπή	Μετατόπιση Stokes
284 nm	331 nm	47 nm
3968 a.u.	3239 a.u.	729 a.u.

Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου για αυτό το σύμπλοκο είναι  $5 \times 10^{-6}$  M.

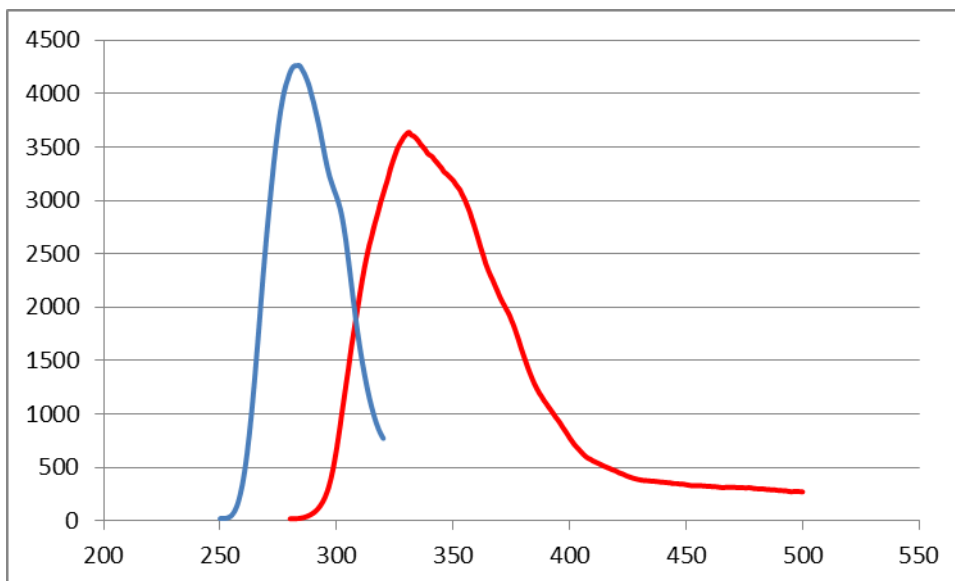


Εικόνα 28 : Φάσμα διέγερσης (μπλε γραμμή) και εκπομπής (κόκκινη γραμμή) του συμπλόκου  $[\text{Cu}_2\text{Cl}_2(\text{TPP})_3]$

Πίνακας 12 : Διέγερση, εκπομπή και μετατόπιση Stokes του συμπλόκου  $[\text{Cu}_2\text{Cl}_2(\text{TPP})_3]$

Διέγερση	Εκπομπή	Μετατόπιση Stokes
284 nm	329 nm	45 nm
3877 a.u.	3166 a.u.	711 a.u.

Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου για αυτό το σύμπλοκο είναι  $1.25 \times 10^{-6} \text{ M}$ .

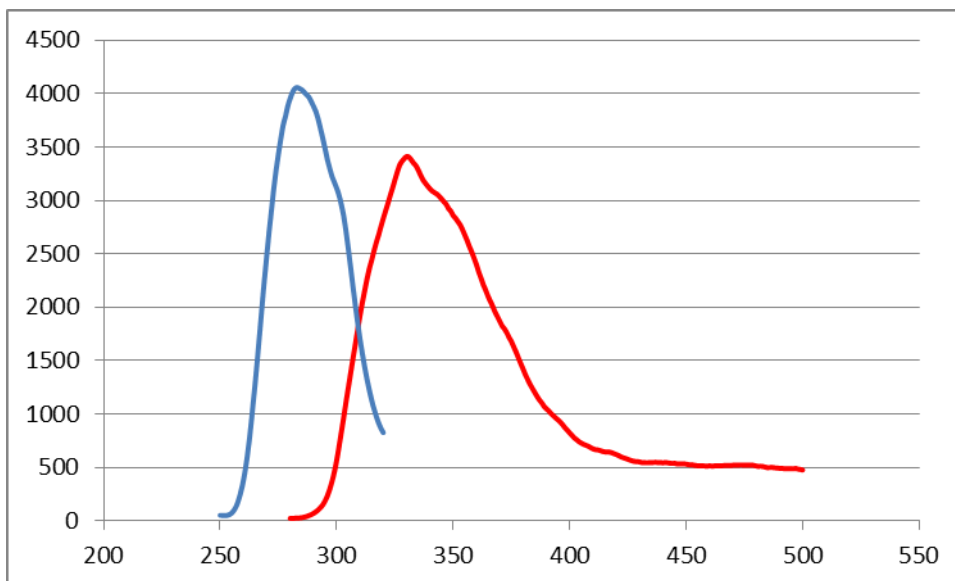


Εικόνα 29 : Φάσμα διέγερσης (μπλε γραμμή) και εκπομπής (κόκκινη γραμμή) του συμπλόκου  $[Cu(HDPA)(TPP)_2] \cdot H_2O$

Πίνακας 13 : Διέγερση, εκπομπή και μετατόπιση Stokes του συμπλόκου  $[Cu(HDPA)(TPP)_2] \cdot H_2O$

Διέγερση	Εκπομπή	Μετατόπιση Stokes
284 nm	331 nm	47 nm
4263 a.u.	3637 a.u.	626 a.u.

Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου για αυτό το σύμπλοκο είναι  $10^{-6}$  M.



Εικόνα 30 : Φάσμα διέγερσης (μπλε γραμμή) και εκπομπής (κόκκινη γραμμή) του συμπλόκου  $[Cu_3(DPA)(H_2DPA)(TPP)_6] \cdot 11H_2O \cdot 4DMSO$

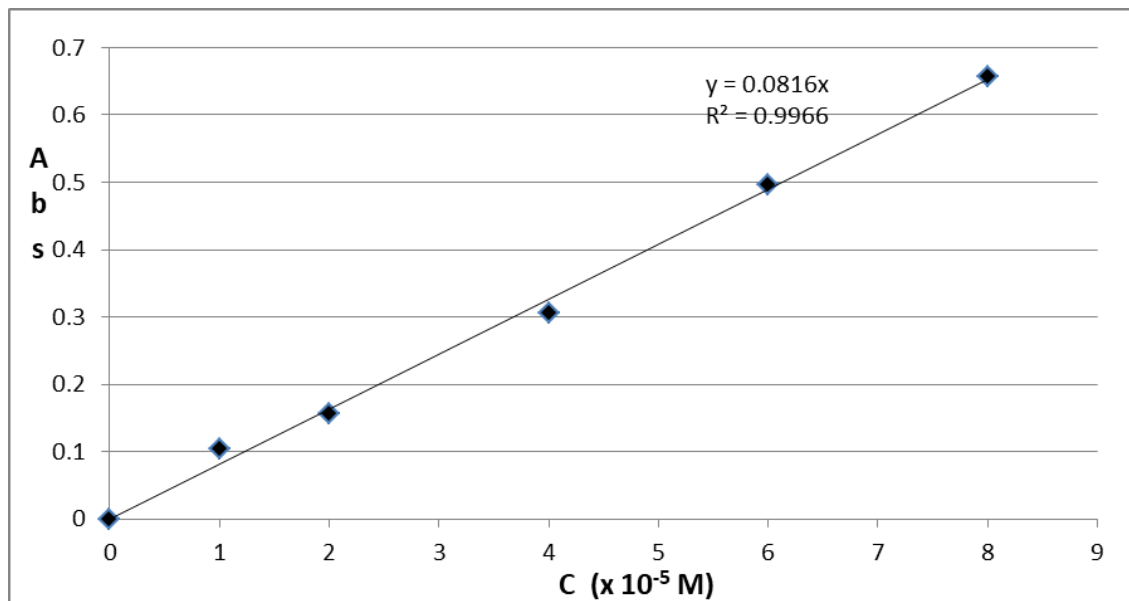
Πίνακας 14 : Διέγερση, εκπομπή και μετατόπιση Stokes του συμπλόκου  $[Cu_3(DPA)(H_2DPA)(TPP)_6] \cdot 11H_2O \cdot 4DMSO$

Διέγερση	Εκπομπή	Μετατόπιση Stokes
283 nm	330 nm	47 nm
4057 a.u.	3411 a.u.	646 a.u.

Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου για αυτό το σύμπλοκο είναι  $0.17 \times 10^{-6} M$ .

### 6.7 Ευθεία αναφοράς

Έγινε η ευθεία αναφοράς χρησιμοποιώντας τη σύμπλοκη ένωση  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{DPA})(\text{DPA})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , για τον ποσοτικό προσδιορισμό του διπικολινικού οξέος, άρα και του αριθμού των σπορίων των βακτηρίων, δεδομένου ότι το διπικολινικό οξύ αποτελεί το 10-20 % w/w του ξηρού βάρους των σπορίων



Εικόνα 31 : Ευθεία αναφοράς της σύμπλοκης ένωσης  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{DPA})(\text{DPA})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

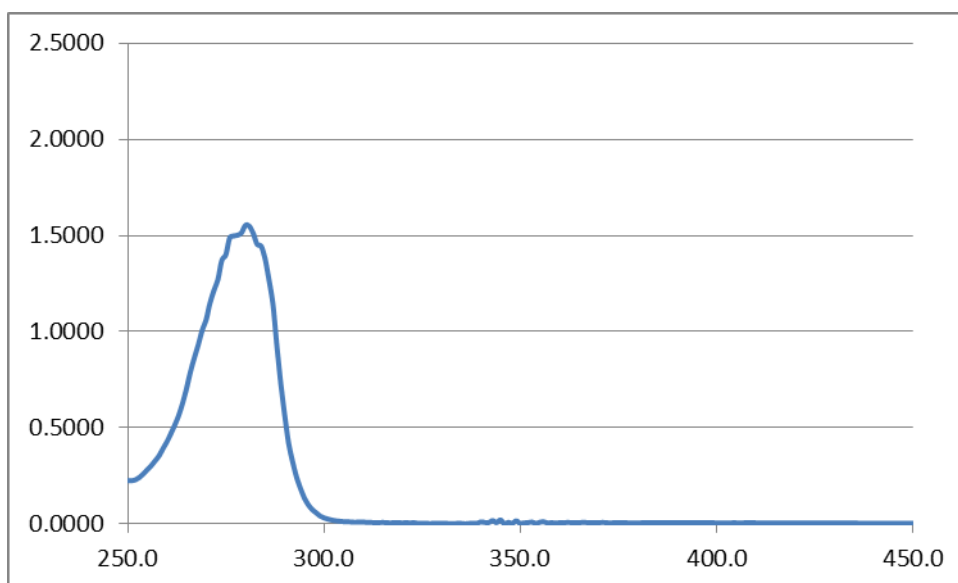


## 7. Βιολογικό μέρος

### 7.1 Μελέτη της καταλυτικής δράσης των συμπλόκων

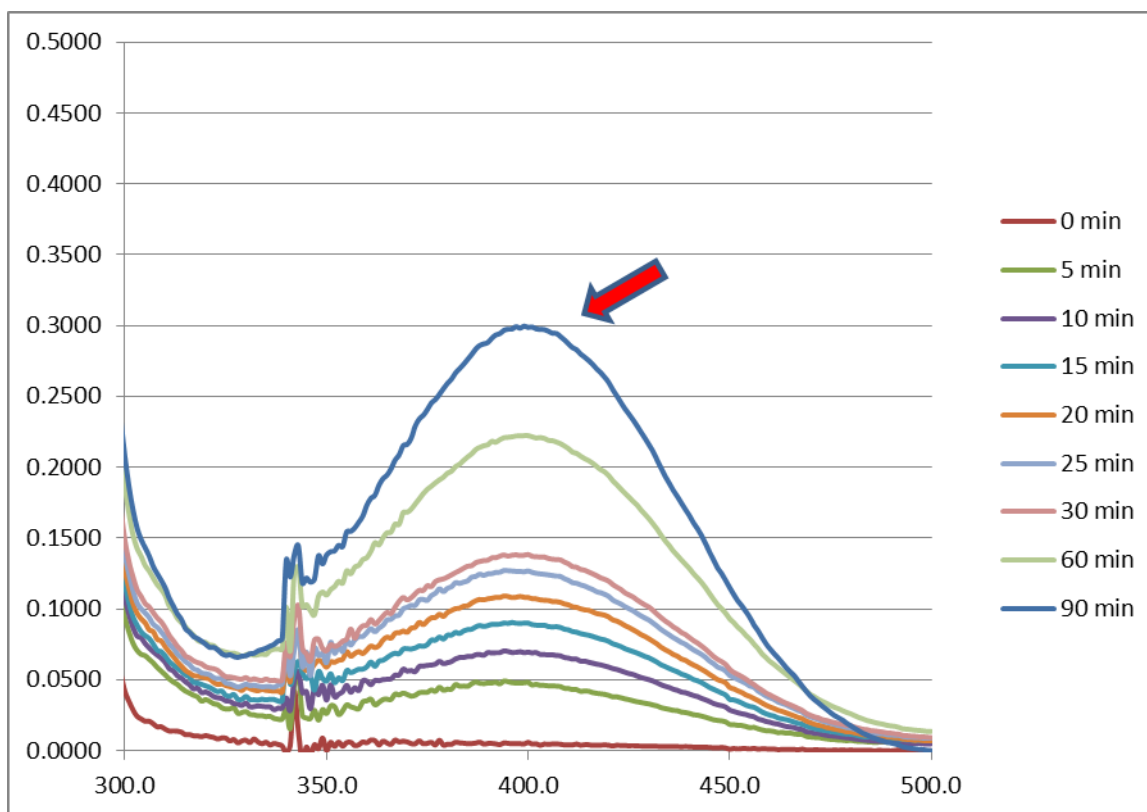
Στο ανθρώπινο σώμα ο χαλκός έχει αντιοξειδωτική δράση αποτελώντας συστατικό της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) που προστατεύει τα κύτταρα από βλάβες που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες. Για το λόγο αυτό μελετάται εδώ η ομοιότητα στη χημική συμπεριφορά των συμπλοκων ως προς την αντίστοιχη της υπεροξειδικής δισμουτάσης. Για το σκοπό αυτό εξετάζεται η οξειδωτική δράση των συμπλόκων ενώσεων στην οξείδωση της δι-τερτ-βουτυλοκατεχόλης σε δι-τερτ-βουτυλοκινόνης.

Λήφθηκαν τα φάσματα υπεριώδους-ορατού του υποστρώματος της δι-τερτ-βουτυλοκατεχόλης (DTBCH<sub>2</sub>) σε διαλύτη MeOH για τον χρόνο εκτέλεσης του πειράματος και βρέθηκε ότι το υπόστρωμα ήταν σταθερό στην διάρκεια αυτή.

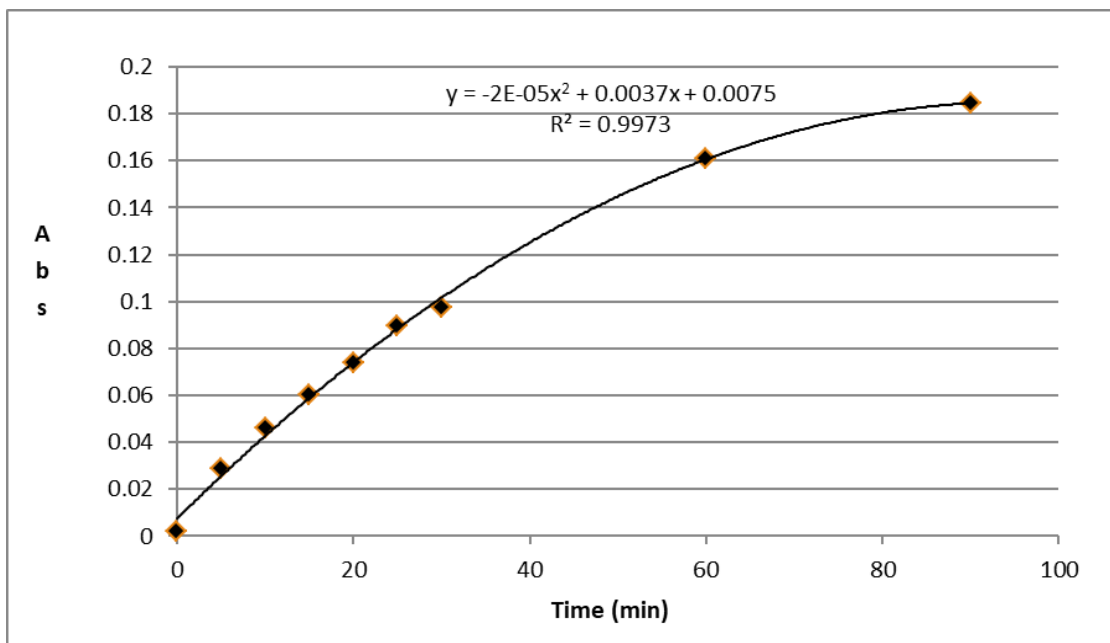


Εικόνα 32 : Το φάσμα UV-vis της δι-τερτ-βουτυλοκατεχόλης  $C=10^{-3}$  M.

Για το σύμπλοκο  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{DPA})(\text{DPA})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  τα φάσματα υπεριώδους ορατού για χρόνους 0-90 min φαίνονται στην εικόνα 33. Η αύξηση της απορρόφησης στα 400 nm οφείλεται στην παραγωγή της δι-τερτ-βουτυλοκινόνης.



Εικόνα 33 : Διάγραμμα  $f(\lambda)=\text{Abs}$ . Καταλυτική δράση του  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{DPA})(\text{DPA})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , αύξηση της απορρόφησης στα 400 nm – παραγωγή δι-τερτ-βουτυλοκινόνης (DTBQ).



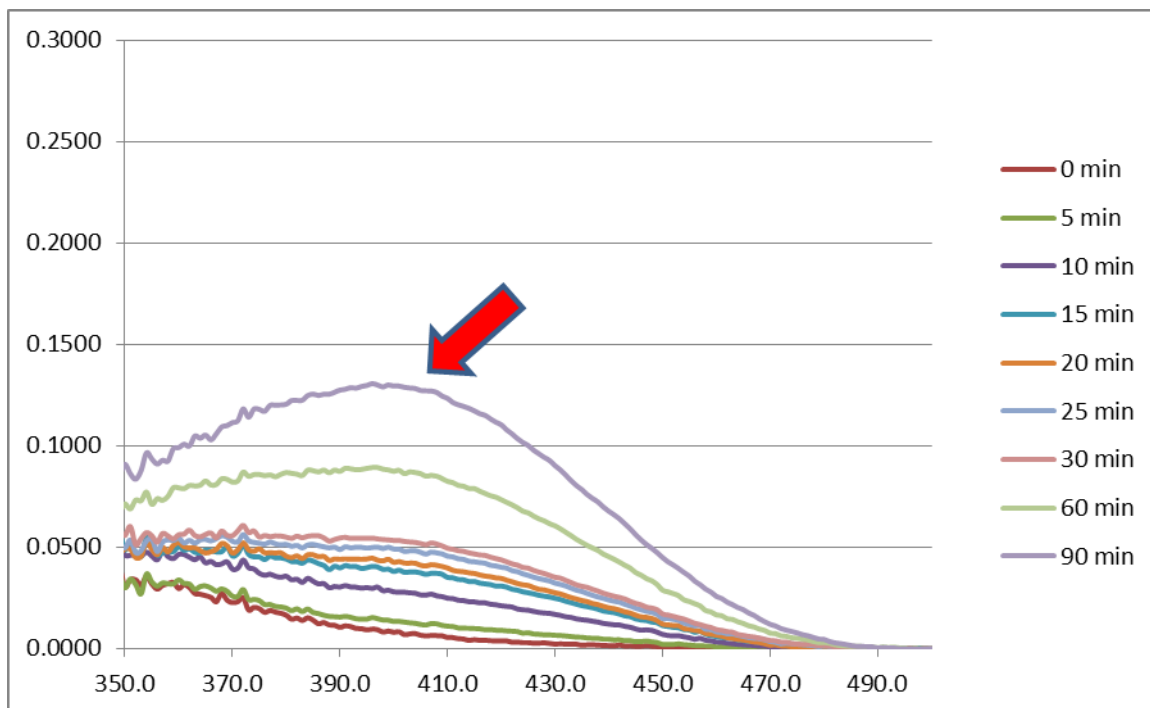
Εικόνα 34 : Διάγραμμα  $f(t)=Abs$ . Οι διορθωμένες τιμές της απορρόφησης στα 400 nm προέκυψαν από την αφαίρεση  $Abs(Complex) - Abs(KOH)$ .

Από το διάγραμμα αυτό με παραγωγή της εξίσωσης  $y = - 2 \times 10^{-5} \cdot x^2 + 0.0037 \cdot x + 0.0075$ , η αρχική ταχύτητα υπολογίζεται 0.0037 moles/min.

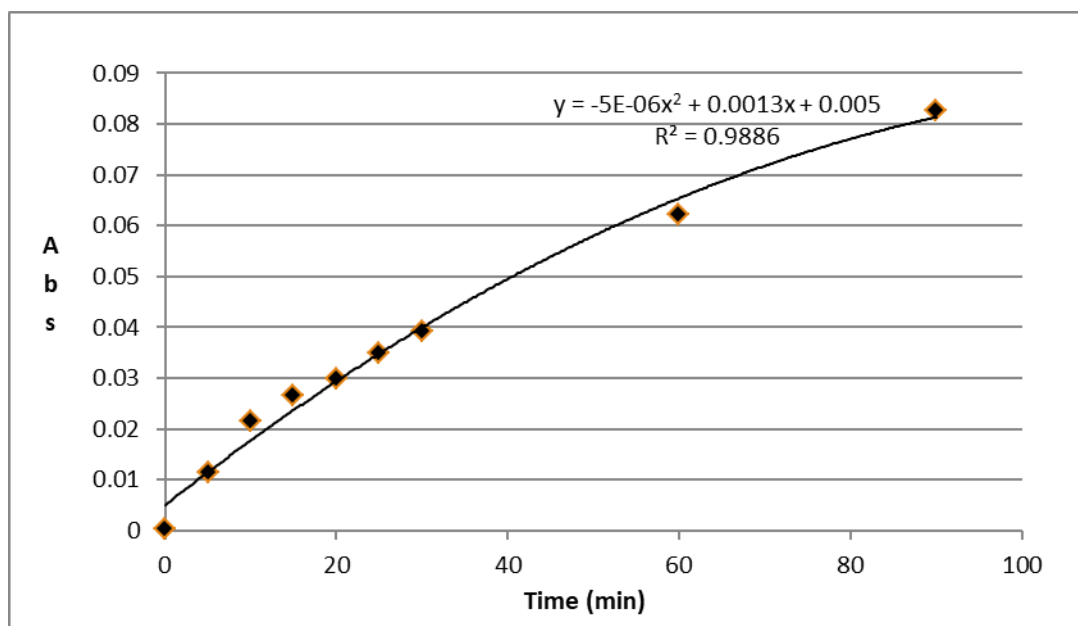
Πίνακας 15 : Υπολογισμός της ενεργότητας του καταλύτη σε  $\mu\text{moles DTBQ/mg catalyst/min}$  :

Χρόνος Min	Abs(Σύμπλοκο+KOH)	Abs(KOH)	Abs(Complex)-Abs(KOH)	C DTBQ	moles DTBQ	moles DTBQ/ 5 min
0	0.0073	0.0052	0.0021	$1.1688 \text{ E}^{-06}$	$2.3378 \text{ E}^{-09}$	
5	0.0480	0.0191	0.0289	$1.6072 \text{ E}^{-05}$	$3.2145 \text{ E}^{-08}$	$2.9807 \text{ E}^{-08}$
10	0.0694	0.0231	0.0463	$2.5734 \text{ E}^{-05}$	$5.1468 \text{ E}^{-08}$	$1.9323 \text{ E}^{-08}$
15	0.0900	0.0295	0.0605	$3.3618 \text{ E}^{-05}$	$6.7237 \text{ E}^{-08}$	$1.5768 \text{ E}^{-08}$
20	0.1081	0.0343	0.0737	$4.0996 \text{ E}^{-05}$	$8.1993 \text{ E}^{-08}$	$1.4755 \text{ E}^{-08}$
25	0.1268	0.0373	0.0894	$4.9686 \text{ E}^{-05}$	$9.9373 \text{ E}^{-08}$	$1.7380 \text{ E}^{-08}$
30	0.1384	0.0410	0.0973	$5.4071 \text{ E}^{-05}$	$1.0814 \text{ E}^{-07}$	$8.7688 \text{ E}^{-09}$
60	0.2222	0.0615	0.1607	$8.9295 \text{ E}^{-05}$	$1.7859 \text{ E}^{-07}$	
90	0.3006	0.1285	0.1847	0.0001	$2.0528 \text{ E}^{-07}$	

moles DTBQ/ min	$\mu\text{moles DTBQ/min}$	m complex (mg)	$\mu\text{moles DTBQ/mg catalyst/min}$
$3.5268 \text{ E}^{-09}$	0.0035	0.0086	0.4100



Εικόνα 35 : Διάγραμμα  $f(\lambda)=\text{Abs}$ . Καταλυτική δράση του  $[\text{Cu}_3(\text{DPA})(\text{H}_2\text{DPA})(\text{TPP})_6] \cdot 11\text{H}_2\text{O} \cdot 4\text{DMSO}$ , αύξηση της απορρόφησης στα 400 nm – παραγωγή δι-τερτ-βουτυλοκινόνης (DTBQ).



Εικόνα 36 : Διάγραμμα  $f(t)=\text{Abs}$ . Οι διορθωμένες τιμές της απορρόφησης στα 400 nm προέκυψαν από την αφαίρεση  $\text{Abs}(\text{Complex}) - \text{Abs}(\text{KOH})$ .

Από το διάγραμμα αυτό με παραγωγή της εξίσωσης  $y = - 5 \cdot 10^{-6} x^2 + 0.0013x + 0.005$ , η αρχική ταχύτητα υπολογίζεται 0.0013 moles/min.

Πίνακας 16 : Υπολογισμός της ενεργότητας του καταλύτη σε μmoles DTBQ/mg catalyst/min :

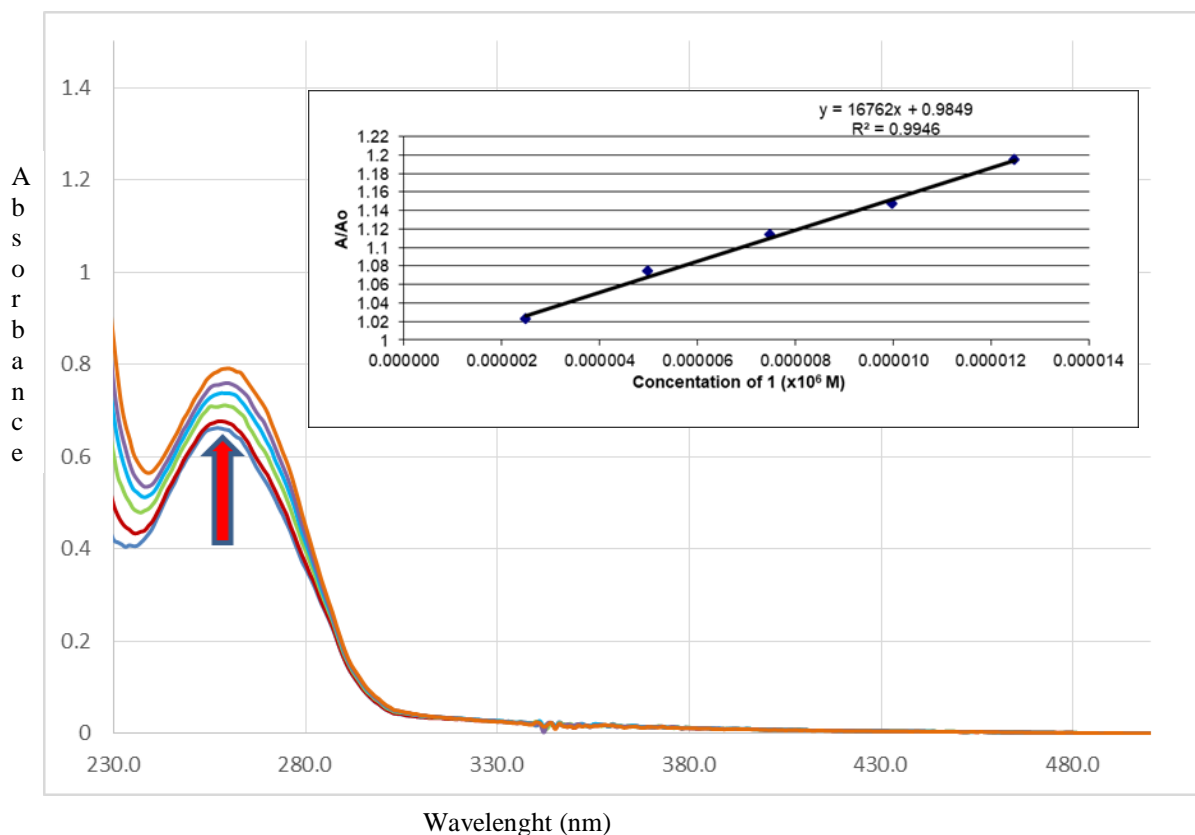
Χρόνος min	Abs(Σύμπλοκο+ΚΟΗ)	Abs(ΚΟΗ)	Abs(Complex)-Abs(ΚΟΗ)	C DTBQ	moles DTBQ	moles DTBQ/ 5 min
0	0.0153	0.0148	0.0004	$2.4888 \cdot 10^{-7}$	$4.9777 \cdot 10^{-10}$	
5	0.0235	0.0121	0.0113	$0.6325 \cdot 10^{-5}$	$1.2650 \cdot 10^{-8}$	$1.2152 \cdot 10^{-8}$
10	0.0450	0.0234	0.0215	$1.1999 \cdot 10^{-5}$	$2.3999 \cdot 10^{-8}$	$1.1349 \cdot 10^{-8}$
15	0.0562	0.0295	0.0266	$1.4817 \cdot 10^{-5}$	$2.9634 \cdot 10^{-8}$	$5.6352 \cdot 10^{-9}$
20	0.0622	0.0323	0.0298	$1.6591 \cdot 10^{-5}$	$3.3182 \cdot 10^{-8}$	$3.5478 \cdot 10^{-9}$
25	0.0682	0.0333	0.0349	$1.9383 \cdot 10^{-5}$	$3.8766 \cdot 10^{-8}$	$5.5844 \cdot 10^{-9}$
30	0.0733	0.0340	0.0392	$2.1816 \cdot 10^{-5}$	$4.3632 \cdot 10^{-8}$	$4.8655 \cdot 10^{-9}$
60	0.1136	0.0514	0.0622	$3.4567 \cdot 10^{-5}$	$6.9135 \cdot 10^{-8}$	
90	0.1985	0.1158	0.0826	$4.5923 \cdot 10^{-5}$	$9.1846 \cdot 10^{-8}$	

moles DTBQ/ min	μmoles DTBQ/min	m complex (mg)	μmoles DTBQ/mg catalyst/min
$3.5945 \cdot 10^{-8}$	0.0359	0.0520	0.6912

Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με αντίστοιχες τιμές της βιβλιογραφίας για σύμπλοκες ενώσεις  $\text{Cu}(\text{asp})_2(2\text{-Melm})_2$  (1),  $\text{Cu}(\text{asp})_2(1,2\text{-Melm})_2$  (2),  $\text{Cu}(\text{Hsal})_2(1,2\text{-Melm})_2$  (3) και  $\text{Cu}(\text{sal})(2\text{-Melm})_3$  (4) [ $\text{H}_2\text{sal}$ =σαλικυλικό οξύ και  $\text{Melm}$ =μεθυλιμιδαζόλιο], είναι 0.58 για το (1), 0.57 για το (2), 0.58 για το (3) και 0.69 για το (4) [40].

## 7.2 Αλληλεπίδραση με το DNA

Σύμπλοκη ένωση αυτή της  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{DPA})(\text{DPA})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$



Εικόνα 37 : (A) Φάσμα UV του CT-DNA σε διάλυμα buffer απουσία και παρουσία συμπλόκου για  $r=0, 0.02, 0.07, 0.1$  και  $0.12$  ( $r = [\text{complex}]/[\text{DNA}]$ ,  $[\text{DNA}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ), (B) Διάγραμμα  $A/A_0$  με  $[\text{complex}]$ , στο  $\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ nm}$ .

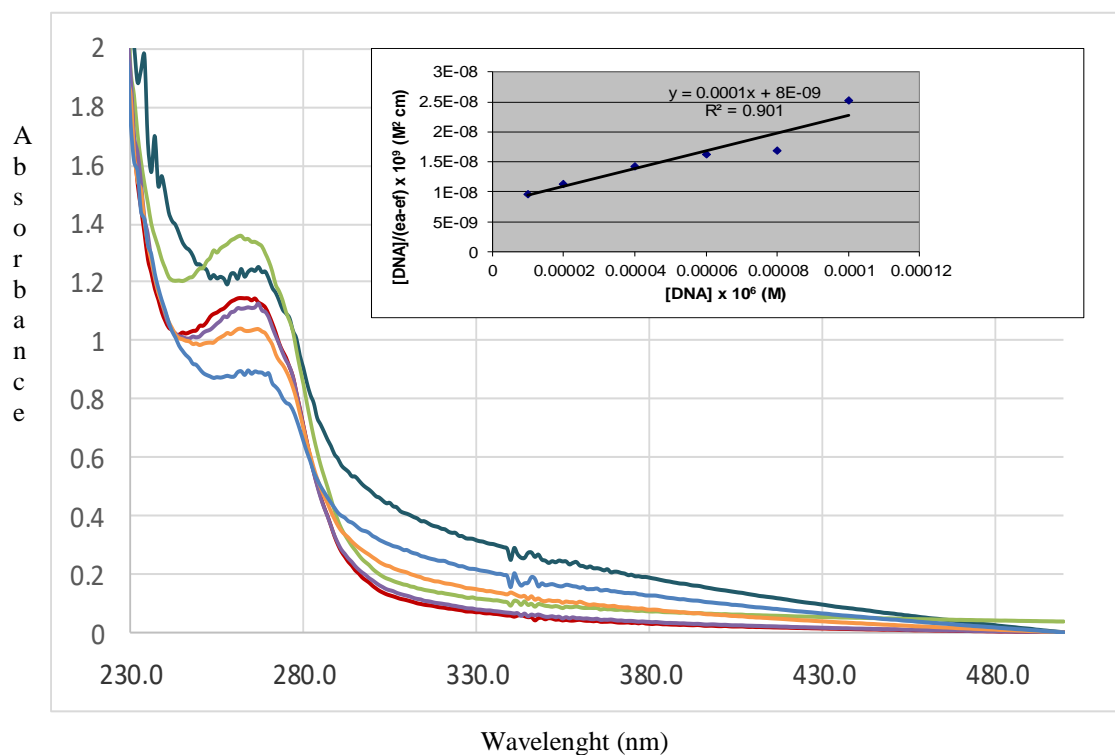
Κατά την αλληλεπίδραση της ένωσης με το CT-DNA παρατηρήθηκε αύξηση της απορρόφησης (υπερχρωτισμός) με ταυτόχρονη μετατόπιση της απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (βαθυχρωμία-redshift). Άρα συμπεραίνουμε ότι η ένωση αυτή αλληλεπιδρά με το DNA καταστρέφοντας τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων του DNA, αφού παρατηρείται υπερχρωτισμός (+19%). Τέλος η σύμπλοκη αυτή ένωση σταθεροποιεί την

δευτεροταγή δομή του DNA, αφού παρατηρείται βαθυχρωμία (μετατόπιση του  $\lambda_{\max}$  [42-46].

Στο δεύτερο στάδιο μελετώνται οι μεταβολές που λαμβάνουν χώρα στα φάσματα UV διαλύματος της ένωσης με την προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων του CT-DNA σε διάφορες αναλογίες ( $r = [\text{ένωσης}]/[\text{DNA}]$ ) όπου καταγράφονται οι μεταβολές της απορρόφησης και του  $\lambda_{\max}$ . Η σταθερά σύνδεσης  $K_b$  της ένωσης με το CT-DNA προσδιορίζεται από το λόγο της τεταγμένης επί την αρχή προς την κλίση της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων που προσδιορίζεται σε διαγράμματα του λόγου σε συνάρτηση με το [DNA] με βάση την εξίσωση Wolf-Shimer :

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

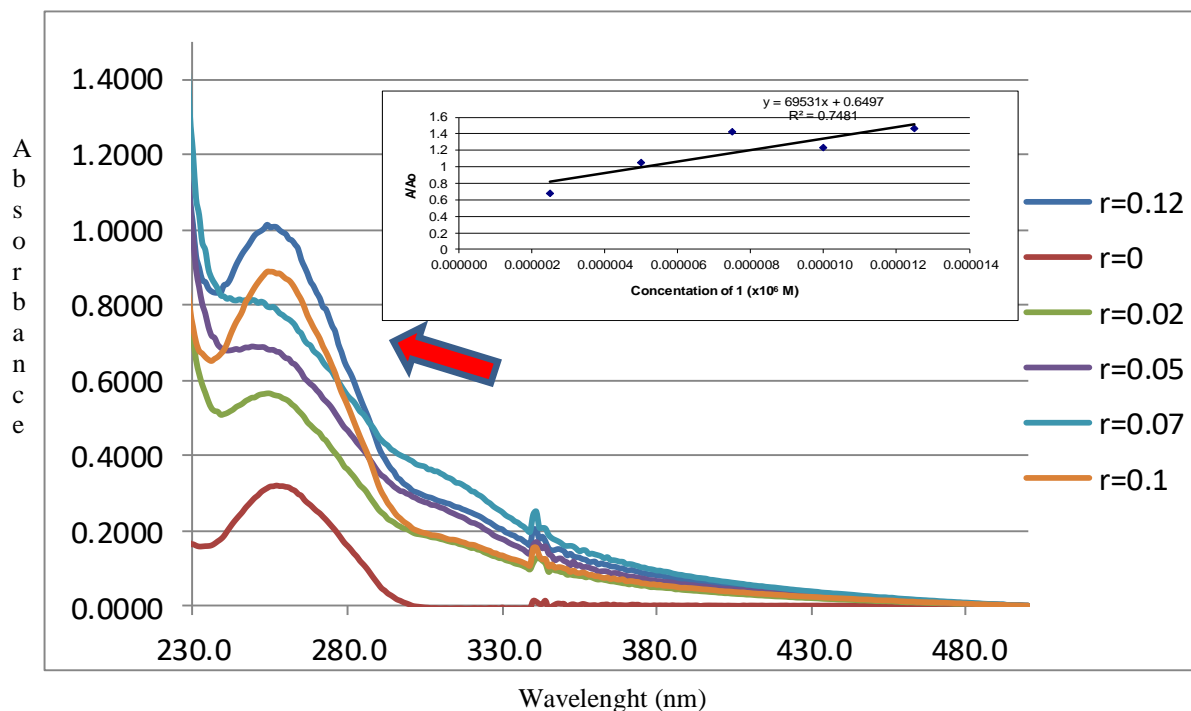
Όπου  $\epsilon_a = A / [\text{ένωσης}]$ ,  $\epsilon_f$  = συντελεστής μοριακής απορρόφησης της ένωσης,  $\epsilon_b$  = συντελεστής μοριακής απορρόφησης πλήρως δεσμευμένης ένωσης,  $K_b$  = σταθερά σύνδεσης στο DNA.



Εικόνα 38 : (Α) Φάσμα UV του συμπλόκου απουσία και παρουσία CT-DNA για  $r=1, 0.5, 0.25, 0.7, 0.125$  και  $0.1$  ( $r = [\text{complex}]/[\text{DNA}]$ ,  $[\text{complex}] = 10 \mu\text{M}$ ,  $[\text{CT-DNA}] = 10 - 100 \mu\text{M}$ ). (Β) Γραφική παράσταση  $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  με το DNA [42-46].

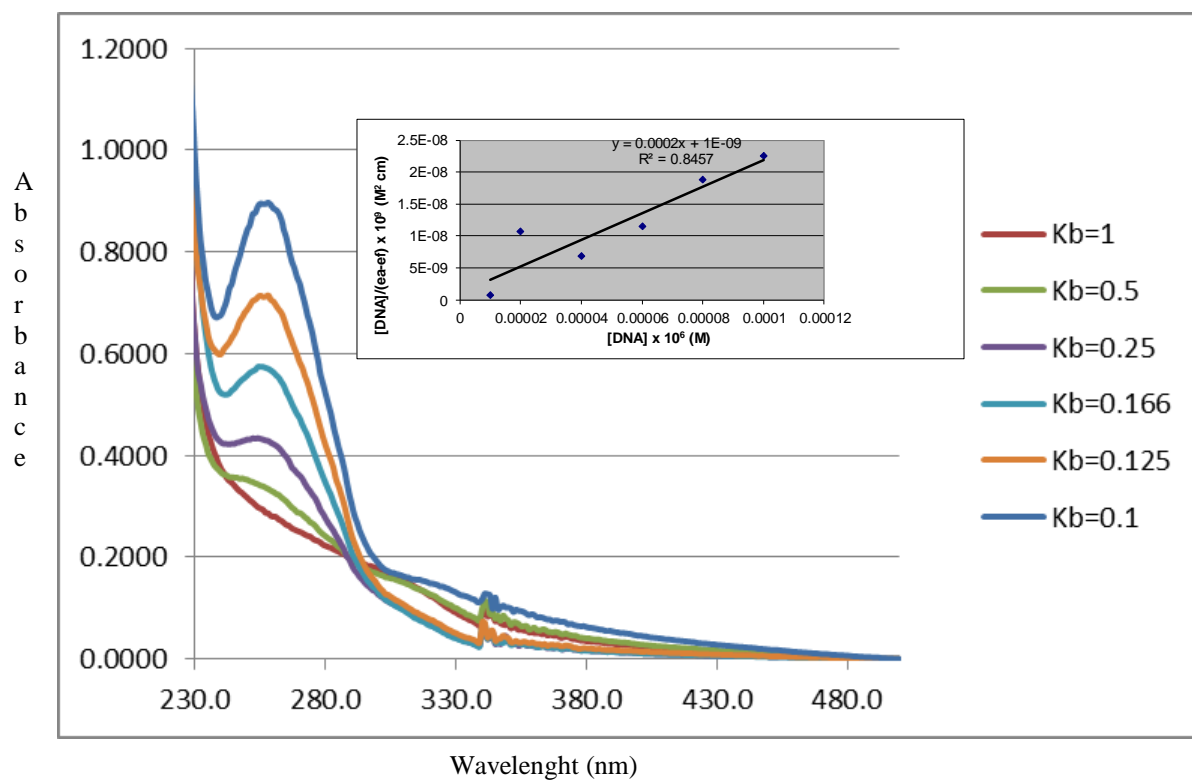
Η τιμή  $K_b$  που υπολογίσθηκε με βάση την εξίσωση Wolf-Shimer είναι  $1.41 (\pm 0.52) \times 10^4 \text{M}^{-1}$ .



Σύμπλοκη ένωση  $[\text{Cu}_2(\text{Cl}_2)(\text{TPP}_3)]$ 

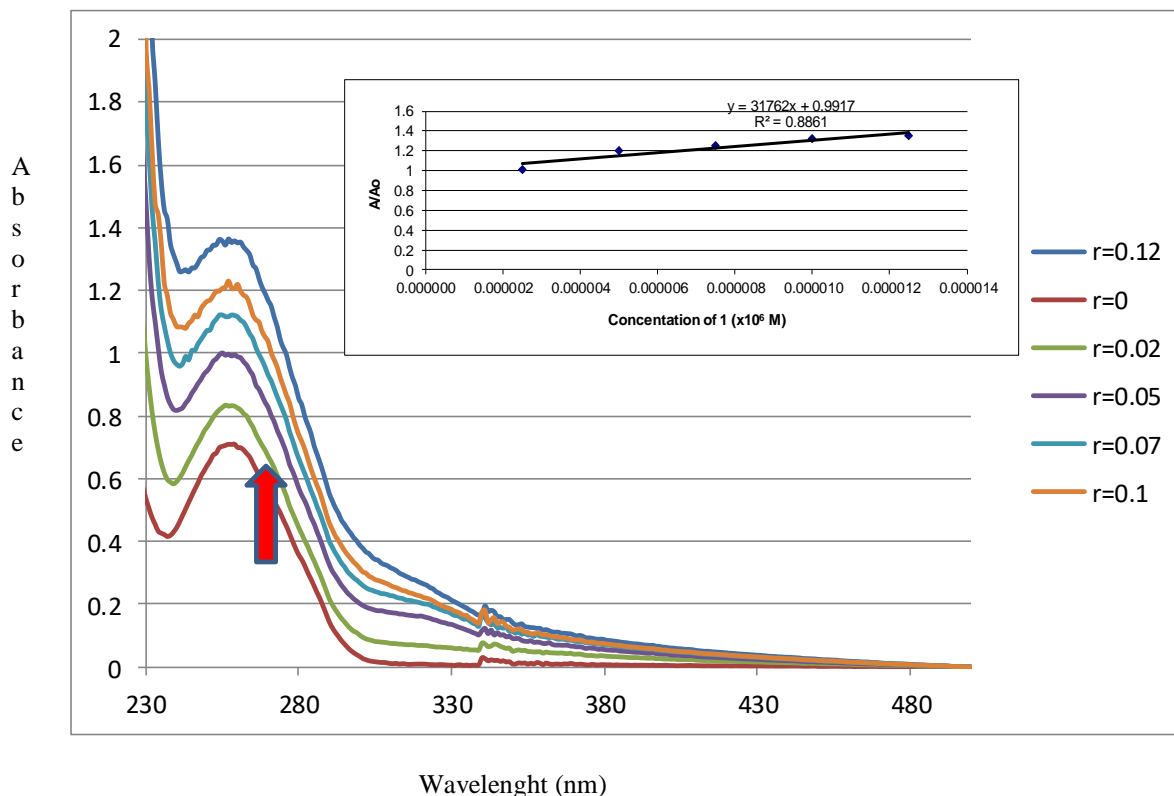
Εικόνα 39 : (A) Φάσμα UV του CT-DNA σε διάλυμα buffer απουσία και παρουσία συμπλόκου για  $r=0, 0.02, 0.07, 0.1$  και  $0.12$  ( $r = [\text{complex}]/[\text{DNA}]$ ,  $[\text{DNA}] = 5 \times 10^{-5}$  M), (B) Διάγραμμα  $A/A_0$  με  $[\text{complex}]$ , στο  $\lambda_{\text{max}} = 258$  nm.

Κατά την αλληλεπίδραση της ένωσης με το CT-DNA παρατηρήθηκε αύξηση της απορρόφησης (υπερχρωμισμός) με ταυτόχρονη μετατόπιση της απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (υψιχρωμία-blueshift). Άρα συμπεραίνουμε ότι η ένωση αυτή αλληλεπιδρά με το DNA, καταστρέφοντας τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων του DNA, αφού παρατηρείται υπερχρωμισμός (+ 26%). Τέλος η σύμπλοκη αυτή ένωση αποσταθεροποιεί την δευτεροταγή δομή του DNA, αφού παρατηρείται υψιχρωμία [42-46].



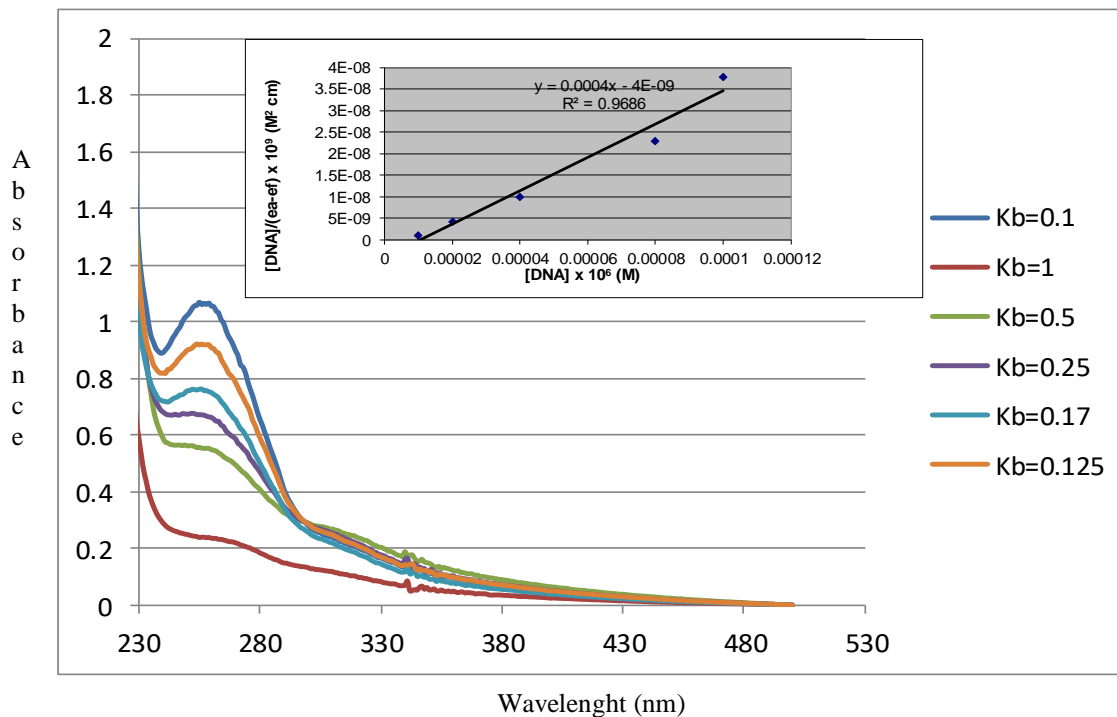
Εικόνα 40 : (Α) Φάσμα UV του συμπλόκου απουσία και παρουσία CT-DNA για  $r=1, 0.5, 0.25, 0.7, 0.125$  και  $0.1$  ( $r = [\text{complex}]/[\text{DNA}]$ ,  $[\text{complex}] = 10 \mu\text{M}$ ,  $[\text{CT-DNA}] = 10 - 100 \mu\text{M}$ ). (Β) Γραφική παράσταση  $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  με το DNA.

Η τιμή  $K_b$  που υπολογίσθηκε με τη βοήθεια της εξίσωσης Wolf-Shimer είναι  $33.33 (\pm 15.27) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$

Σύμπλοκη ένωση  $[\text{Cu}_2(\text{HDPa})(\text{TPP}_2)] \cdot \text{H}_2\text{O}$ 

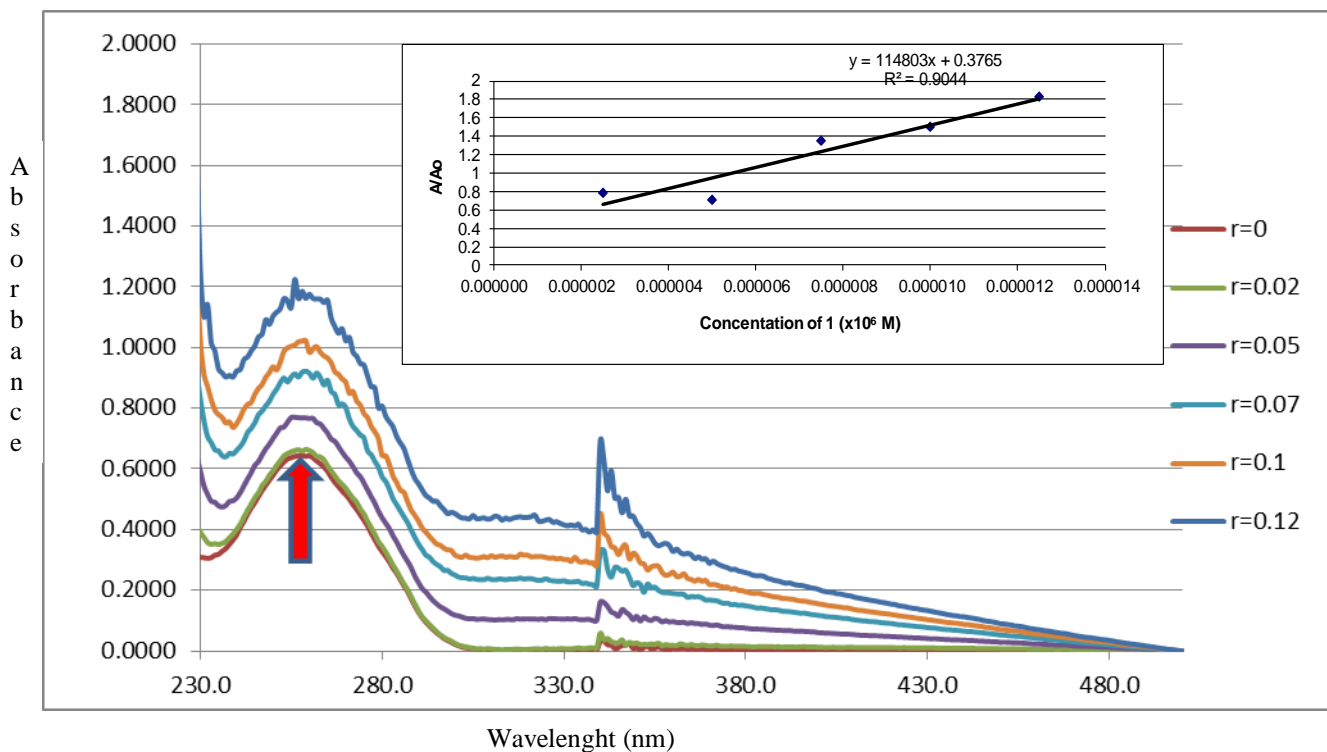
Εικόνα 41 : (A) Φάσμα UV του CT-DNA σε διάλυμα buffer απουσία και παρουσία συμπλόκου για  $r=0, 0.02, 0.07, 0.1$  και  $0.12$  ( $r = [\text{complex}]/[\text{DNA}]$ ,  $[\text{DNA}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ), (B) Διάγραμμα  $A/A_0$  με  $[\text{complex}]$ , στο  $\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ nm}$ .

Κατά την αλληλεπίδραση της ένωσης με το CT-DNA παρατηρήθηκε αύξηση της απορρόφησης (υπερχρωμισμός) με ταυτόχρονη μετατόπιση της απορρόφησης σε μικρότερα μήκη κύματος (υψιχρωμία-blueshift). Άρα συμπεραίνουμε ότι η ένωση αυτή αλληλεπιδρά με το DNA, καταστρέφοντας τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων του DNA, αφού παρατηρείται υπερχρωμισμός (+25%). Τέλος η σύμπλοκη αυτή ένωση αποσταθεροποιεί την δευτεροταγή δομή του DNA, αφού παρατηρείται υψιχρωμία [42-46].



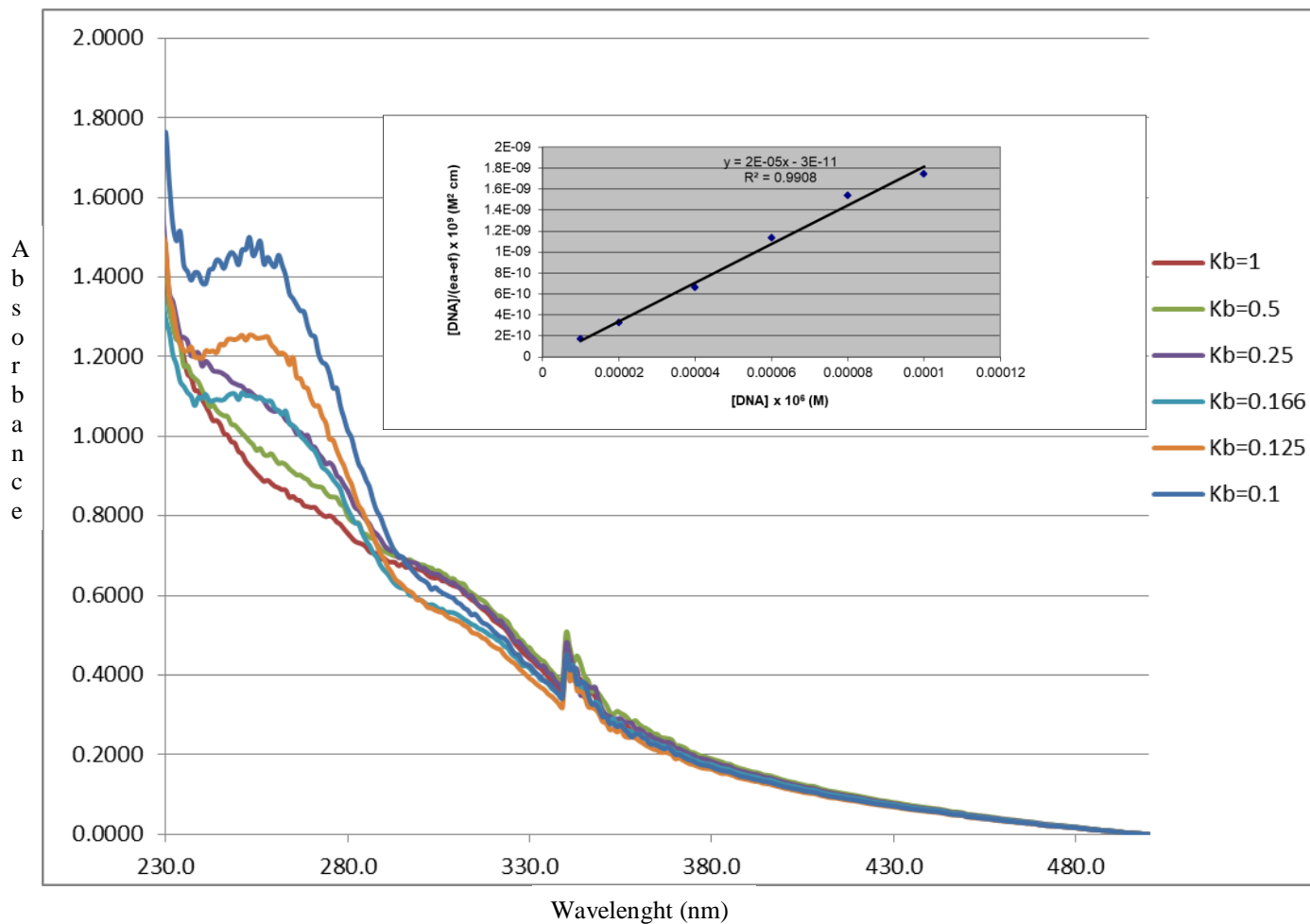
Εικόνα 42 : (Α) Φάσμα UV του συμπλόκου απουσία και παρουσία CT-DNA για  $r=1, 0.5, 0.25, 0.7, 0.125$  και  $0.1$  ( $r = [\text{complex}]/[\text{DNA}]$ ,  $[\text{complex}] = 10 \mu\text{M}$ ,  $[\text{CT-DNA}] = 10 - 100 \mu\text{M}$ ). (Β) Γραφική παράσταση  $[\text{DNA}]/(\epsilon a - \epsilon f)$  με το DNA.

Η τιμή  $K_b$  που υπολογίσθηκε είναι  $7.16 (\pm 0.87) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ .

Σύμπλοκη ένωση  $[\text{Cu}_3(\text{DPA})(\text{H}_2\text{DPA})(\text{TPP})_6] \cdot 11\text{H}_2\text{O} \cdot 4\text{DMSO}$ 

Εικόνα 43 : (A) Φάσμα UV του CT-DNA σε διάλυμα buffer απουσία και παρουσία συμπλόκου για  $r=0, 0.02, 0.07, 0.1$  και  $0.12$  ( $r = [\text{complex}]/[\text{DNA}]$ ,  $[\text{DNA}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ), (B) Διάγραμμα  $A/A_0$  με  $[\text{complex}]$ , στο  $\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ nm}$ .

Κατά την αλληλεπίδραση της ένωσης με το CT-DNA παρατηρήθηκε αύξηση της απορρόφησης (υπερχρωμισμός) με ταυτόχρονη (μικρή) μετατόπιση της απορρόφησης σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (υψιχρωμία-blueshift). Άρα συμπεραίνουμε ότι η ένωση αυτή αλληλεπιδρά με το DNA, καταστρέφοντας τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων του DNA, αφού παρατηρείται υπερχρωμισμός (+ 33%). Τέλος η σύμπλοκη αυτή ένωση αποσταθεροποιεί την δευτεροταγή δομή του DNA, αφού παρατηρείται υψιχρωμία [42-46].



Εικόνα 44 : (A) Φάσμα UV του CT-DNA σε διάλυμα buffer απουσία και παρουσία συμπλόκου για  $r=0, 0.02, 0.07, 0.1$  και  $0.12$  ( $r = [\text{complex}]/[\text{DNA}]$ ,  $[\text{DNA}]=5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ), (B) Διάγραμμα  $A/A_0$  με  $[\text{complex}]$ , στο  $\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ nm}$ .

Η τιμή  $K_b$  που υπολογίσθηκε με τη βοήθεια της εξίσωσης Wolf-Simer είναι  $62.22 (\pm 4.35) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ .

Ακολουθεί συγκεντρωτικός πίνακας με τις σταθερές πρόσδεσης στο DNA όλων των σύμπλοκων ενώσεων :

Πίνακας 17 : Οι σταθερές σύνδεσης  $K_b$  των σύμπλοκων ενώσεων με το DNA.

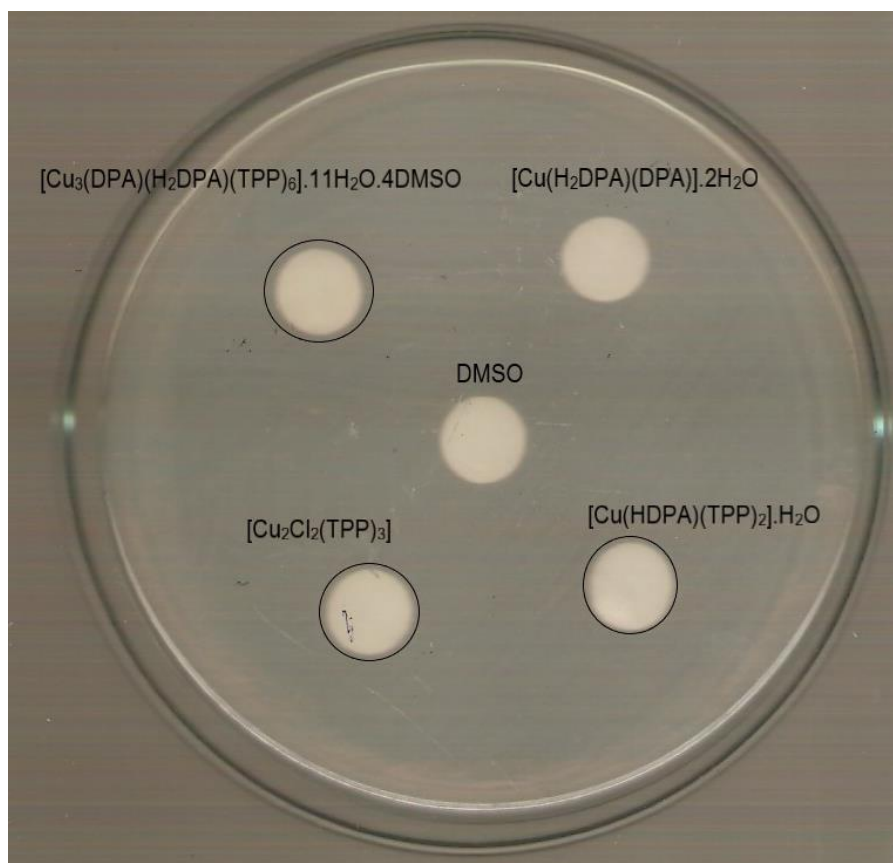
Σύμπλοκη ένωση	Σταθερά σύνδεσης ( $K_b$ ) ( $M^{-1}$ )
$[Cu(H_2DPA)(DPA)] \cdot 2H_2O$	$1.41 (\pm 0.52) \times 10^4 M^{-1}$
$[Cu_2Cl_2(TPP)_3]$	$33.33 (\pm 15.27) \times 10^4 M^{-1}$
$[Cu_2(HDPA)(TPP)_2] \cdot H_2O$	$7.16 (\pm 0.87) \times 10^4 M^{-1}$
$[Cu_3(DPA)(H_2DPA)(TPP)_6] \cdot 11H_2O \cdot 4DMSO$	$62.22 (\pm 4.35) \times 10^4 M^{-1}$

### 7.3 Ζώνες αναστολής

Οι ζώνες αναστολής των συμπλόκων σε καλλιέργειες βακτηρίων του γένους *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) φαίνονται παρακάτω. Έγιναν διαλύματα των σύμπλοκων ενώσεων σε συγκεντρώσεις  $10^{-3}$  M σε διαλύτη διμεθυσουλφοξειδίο (DMSO). Δισκία 9 mm εμποτισμένα με κάθε τρυβλίο όπου μετρήθηκε η ζώνη αναστολής έγινε και control χρησιμοποιώντας δισκία εμποτισμένα με το διαλύτη DMSO. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 18 : Οι ζώνες αναστολής των συμπλόκων σε καλλιέργεια του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* :

Σύμπλοκη ένωση	Ζώνη αναστολής (mm)
$[Cu(H_2DPA)(DPA)] \cdot 2H_2O$	-
$[Cu_2Cl_2(TPP)_3]$	$10.4 \pm 0.48$
$[Cu_2(HDPA)(TPP)_2] \cdot H_2O$	$11 \pm 0.71$
$[Cu_3(DPA)(H_2DPA)(TPP)_6] \cdot 11H_2O \cdot 4DMSO$	$12.4 \pm 1.3$



Εικόνα 45 : Ζώνες αναστολής των συμπλόκων σε καλλιέργεια του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*

#### 7.4 Προσδιορισμός του $\text{IC}_{50}$

Έγιναν πειράματα για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης που προκαλεί 50% αναστολή της ανάπτυξης βακτηρίων *Pseudomonas aeruginosa* ( $\text{IC}_{50}$  – inhibitory concentration). Χρησιμοποιήθηκε η σύμπλοκη ένωση  $[\text{Cu}_2(\text{HDPA})(\text{TPP})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Μετά από επώαση 20 h με του συμπλόκου με  $10^8$  cfu/ml βακτηρίων σε δοκιμαστικούς σωλήνες, τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 620 nm. Το κάθε πείραμα έγινε από δύο φορές και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των μετρήσεων.





Εικόνα 46 : Προσδιορισμός του IC<sub>50</sub> της σύμπλοκης ένωσης [Cu<sub>2</sub>(HDPA)(TPP<sub>2</sub>)]·H<sub>2</sub>O σε βακτήρια *Pseudomonas aeruginosa*.

Πίνακας 19 : Οπτικές απορροφήσεις διαλυμάτων σύμπλοκης ένωσης με βακτήρια

Complex-Bacteria	Abs (A)	Abs (B)	Abs (Average)
+ Control	1.282	1.208	1.245
0.5 μM	0.946	0.928	0.937
5μM	0.712	0.900	0.806
50μM	0.689	0.776	0.732
200μM	0.582	0.629	0.605
300μM	0.485	0.545	0.515

Πίνακας 20 : Οπτικές απορροφήσεις της σύμπλοκης ένωσης

C <sub>Complex</sub> (μM)	Abs
0.5 μM	0
5 μM	0
50 μM	0.112
200 μM	0.286
300 μM	0.303

Πίνακας 21 : Οπτικές απορροφήσεις διαλυμάτων διαλύτη (DMSO) με βακτήρια

DMSO-Bacteria (μL)	Abs (A)	Abs (B)	Abs (Average)
+ Control	1.128	1.088	1.108
1 μL	0.958	0.961	0.959
10μL	0.818	0.868	0.843
100μL	0.692	0.753	0.722
300μL	0.580	0.681	0.630
400μL	0.504	0.495	0.499

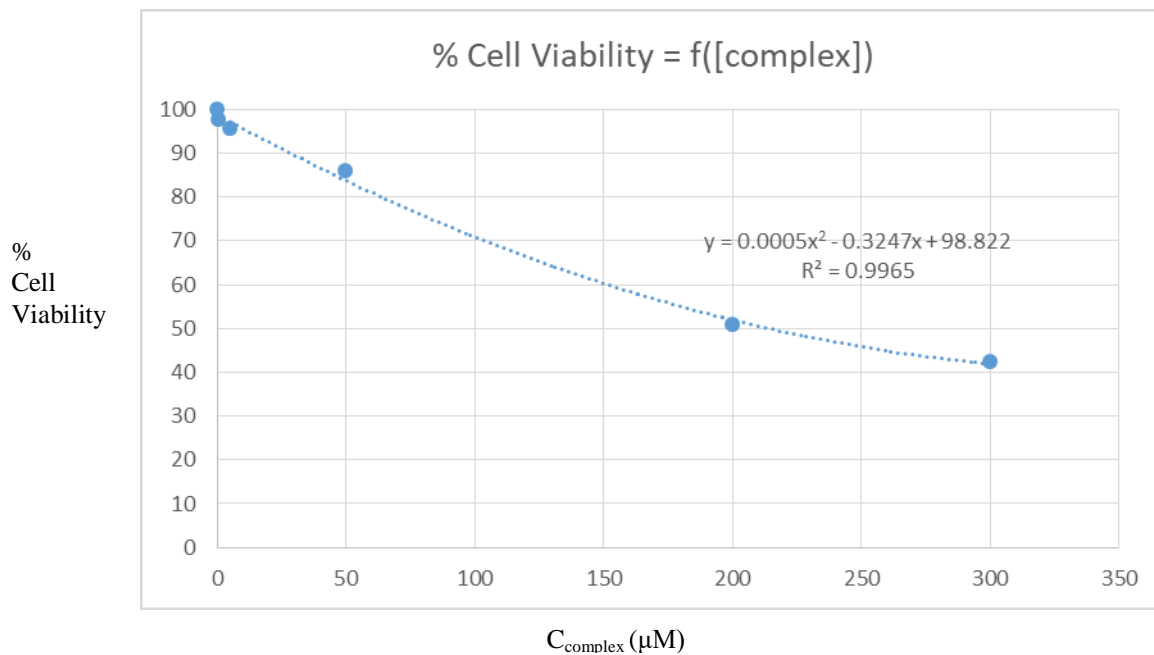
Από τους παραπάνω πίνακες υπολογίστηκε η % cell viability σύμφωνα με την εξίσωση :

$$\% \text{ cell viability} = (\text{Abs}_{\text{Complex-bacteria}} - \text{Abs}_{\text{Complex}} / \text{Abs}_{\text{DMSO-bacteria}}) * 100 \%$$

Πίνακας 22 : Αυξανόμενες συγκεντρώσεις σύμπλοκης ένωσης και διαθεσιμότητας κυττάρων

[complex] (μM)	cell viability %
0 (μM)	100 %
0.5 (μM)	97.65 %
5 (μM)	95.61 %
50 (μM)	85.88 %
200 (μM)	50.67 %
300 (μM)	42.44 %

Από τον παραπάνω πίνακα προέκυψε το διάγραμμα παρακάτω :



Εικόνα 45 : Διάγραμμα  $f([complex]) = \% \text{ cell viability}$

Από το διάγραμμα αυτό υπολογίσθηκε η  $IC_{50}$ , σαν τη συγκέντρωση που προκαλεί την 50% διαθεσιμότητα κυττάρων, σε αυτή την περίπτωση είναι 236.5  $\mu\text{M}$ .

## 8. Συμπεράσματα-προτάσεις :

Στην εργασία αυτή έγινε σύνθεση και χαρακτηρισμός σύμπλοκων ενώσεων του Cu(I), Cu(II) με διπικολινικό οξύ και τριφαίνυλοφωσφίνη, με αρχικό στόχο την ανάπτυξη μιας νέας φθορισμομετρικής μεθόδου για την ανίχνευση των ενδοσπορίων των βακτηρίων. Οι σύμπλοκες ενώσεις που συντέθηκαν ήταν  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{DPA})(\text{DPA})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1),  $[\text{Cu}_2\text{Cl}_2(\text{TPP})_3]$  (2),  $[\text{Cu}_2(\text{HDPA})(\text{TPP}_2)] \cdot \text{H}_2\text{O}$  (3) και  $[\text{Cu}_3(\text{DPA})(\text{H}_2\text{DPA})(\text{TPP})_6] \cdot 11\text{H}_2\text{O} \cdot 4\text{DMSO}$  (4). Τα σύμπλοκα αυτά χαρακτηρίστηκαν πλήρως με σημείο τήξης, κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ, φασματοσκοπία υπερύθρου, φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και μετρήθηκε ο φθορισμός τους. Επιπλέον έγινε μία μελέτη της βιολογικής δράσης των συμπλόκων αυτών.

Ο αρχικός στόχος επιτεύχθη και τα φάσματα ορατού και φθορισμού που λήφθηκαν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό των σπορίων που δημιουργούν βακτήρια των γενών *Bacillus spp.* και *Clostridium spp.* Τα φάσματα φθορισμού των συμπλοκων ενώσεων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό του συγκεκριμένου βιοδείκτη (διπικολινικό οξύ) *in situ* σε αεροδρόμια, δημόσιες υπηρεσίες κ.α. Για τον ποσοτικό χαρακτηρισμό μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ευθεία αναφοράς της σύμπλοκης ένωσης. Η σύμπλοκη ένωση που προτείνεται να χρησιμοποιηθεί για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό είναι η απλούστερη δηλαδή η  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{DPA})(\text{DPA})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  καθώς απαιτεί ένα στάδιο για την σύνθεσή της. Για την βελτίωση των ορίων ανίχνευσης μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τις σύμπλοκες ενώσεις 3 και 4.

Μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των συμπλόκων αυτών με το DNA (CT-DNA). Βρέθηκε ότι όλες οι σύμπλοκες ενώσεις αλληλεπιδρούν με το DNA. Όλες οι σύμπλοκες ενώσεις εμφάνισαν υπερχρωμία, άρα αλληλεπιδρούν καταστρέφοντας τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων του DNA. Επιπλέον η σύμπλοκη ένωση 1 σταθεροποιεί τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των δύο κλώνων του DNA, ενώ οι σύμπλοκες ενώσεις 2,3,4 αποσταθεροποιούν την διπλή έλικα του DNA. Οι σταθερές πρόσδεσης στο DNA είναι με αυξανόμενη σειρά  $1 < 3 < 2 < 4$ . Παρατηρείται αύξηση της σταθεράς πρόσδεσης στο DNA, καθώς αυξάνεται ο αριθμός των μορίων τριφαίνυλοφωσφίνης στην δομή της σύμπλοκης ένωσης. Επίσης ο υποκαταστάτης διπικολινικό οξύ φαίνεται να προστατεύει το DNA ενώ ο υποκαταστάτης τριφαίνυλοφωσφίνη να οδηγεί στην αποσταθεροποίησή του. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην μελέτη της αλληλεπίδρασης τους με μικρόβια. Αυτό συνδέεται και με τις ζώνες αναστολής που είχαν τα σύμπλοκα σε καλλιέργειες βακτηρίων *Pseudomonas aeruginosa*. Το σύμπλοκο 1 δεν εμφάνισε ζώνη αναστολής ενώ τα σύμπλοκα 2-4, είναι με αυξανόμενη σειρά ζώνης αναστολής  $2 < 3 < 4$ . Τέλος η  $IC_{50}$  του συμπλόκου (2), για βακτήρια των γενών *Pseudomonas aeruginosa* βρέθηκε στα 236.5  $\mu\text{M}$ , ενώ για το σύμπλοκο 1 δεν μπόρεσε να βρεθεί  $IC_{50}$  μέχρι τα 300  $\mu\text{M}$  καθώς δεν έδειξε μείωση της απορρόφησης μέχρι και αυτή την συγκέντρωση.

Ελέγχθηκε η ομοιότητα στη χημική δράση των συμπλόκων ενώσεων του δισθενούς χαλκού, σχετικά με το ένζυμο υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα του κυττάρου ενάντια στο οξειδωτικό στρες. Τα δισθενή σύμπλοκα (1 και 4) βρέθηκε ότι έχουν καταλυτική δράση. Το σύμπλοκο 4 έχει μεγαλύτερη καταλυτική δράση από το 1

καθώς και σχετικά με αυτά της βιβλιογραφίας με σαλικυλικό οξύ και μεθιμιδαζόλιο. Αυτό οφείλεται ίσως στο γεγονός ότι είναι μικτού σθένους Cu(I)-Cu(II). Άρα οι μπορούμε να προτείνουμε πιθανές εναλλακτικές χρήσεις των συμπλόκων εκτός από ανιχνευτές για την ύπαρξη βακτηριοσπορίων. Για το σύμπλοκο  $[Cu(H_2DPA)(DPA)].2H_2O$  και  $[Cu_3(DPA)(H_2DPA)(TPP)_6].11H_2O.4DMSO$  θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν ενώσεις με αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση μιμούμενα την δράση της υπεροξειδικής δισμουτάσης, τα οποία θα ενισχύουν την άμυνα των κυττάρων ενάντια στο οξειδωτικό στρες. Η αντιμικροβιακή δράση των συμπλόκων ήταν σχετικά μικρή παρόλο που τα 2 και 4 εμφάνισαν ισχυρή αλληλεπίδραση με το DNA. Τέλος θα είχε ενδιαφέρον για μελλοντική έρευνα να μελετηθεί η αντιμικροβιακή δράση των συμπλόκων αυτών σε βακτήρια *Bacillus* ή *Clostridium* καθώς αυτοί οι μικροοργανισμοί μπορούν να σχηματίσουν ανθεκτικές δομές, τα ενδοσπόρια στα οποία εντοπίζεται η ένωση διπικολινικό οξύ. Έτσι ο υποκαταστάτης διπικολινικό οξύ θα μπορούσε να αναγνωρισθεί από τα συγκεκριμένα βακτήρια σαν οικείος και να λειτουργήσει σαν <<Δούρειος Ίππος>> ο οποίος θα βοηθήσει την εισαγωγή του συμπλόκου στο βακτήριο μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και εκεί το σύμπλοκο να προκαλέσει το θάνατο του μικροβίου αλληλεπιδρώντας με διάφορες ενδοκυτταρικές περιοχές.

## **Αναφορές**

1. G. B. Kaufman, R. P. Pinnell, *Inorganic Synthesis*, 1960
2. R. N. Keller, H. D. Wycoff, *Inorganic Synthesis*, 1946
3. Richard A. Festa, Dennis J. Thiele Copper: An essential metal in biology, *Current Biology* Volume 21, Issue 21, 8 November 2011, Pages R877-R883
4. Muriel Bost, Sabine Houdart, Marion Oberli, Esther Kalonji, Jean-François Huneauc, Irène Margaritis Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*.
5. Godze Eskici, Paul H. Axelsen Copper and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, *Biochemistry*, 2012, 51 (32), pp 6289–6311
6. Mohit Kumar Gangania, Jyoti Batra, Suman Kushwaha, Rachna Agarwal, Role of Iron and Copper in the Pathogenesis of Parkinson's Disease, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, July 2017, Volume 32, Issue 3, pp 353–356
7. Rosanna Squitti, Roberta Ghidoni, Ilaria Simonelli, Irena D. Ivanova Copper dyshomeostasis in Wilson disease and Alzheimer's disease as shown by serum and urine copper indicators, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 45 (2018) 181-188.
8. Matthew T. Lorincz, Wilson disease and related copper disorders, *Handbook of Clinical Neurology* Vol.147 Chapter 18.
9. Vincent, Marin, Hartemann, Philippe, Engels-Deutsch, Marc Antimicrobial applications of copper, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*.

10. Humberto Palza, Mauricio Nuñez, Roberto Bastías, Katherine Delgado In situ antimicrobial behavior of materials with copper-based additives in a hospital environment *International Journal of Antimicrobial Agents*, Volume 51, Issue 6, June 2018, Pages 912-917.
11. The antimicrobial and antibiofilm activities of copper(II) complexes *Journal of Inorganic Biochemistry* Volume 140, November 2014, Pages 167-172
12. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (June 1990). "Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87 (12): 4576–79.
13. C. Michael Hogan. 2010. Bacteria. *Encyclopedia of Earth*. eds. Sidney Draggan and C.J. Cleveland, National Council for Science and the Environment, Washington, DC May 2011.
14. Di Giulio M (December 2003). "The universal ancestor and the ancestor of bacteria were hyperthermophiles". *Journal of Molecular Evolution*. 57 (6): 721–30.
15. Slonczewski JL, Foster JW (2013). *Microbiology : an Evolving Science* (Third ed.). New York: W W Norton. p. 82.
16. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, Amon A, Scott MP (2013). *Molecular Cell Biology* (7th ed.). WH Freeman. p. 13.
17. Spore Resistance Properties, Peter Setlow, *Microbiology Spectrum* (2014).
18. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals, Peter Setlow *Journal of Applied Microbiology* (2005).



19. Relation of Dipicolinic Acid to Heat Resistance of Bacterial Spores, N. Grecz, T. Tangy, Journal of General Microbiology (1970), 63, 303-3.
20. Characterization of Spores of *Bacillus subtilis* Which Lack Dipicolinic Acid, Madan Paidhungat, Barbara Setlow, Adam Driks and Peter Setlow, Journal of Bacteriology, Oct. 2000, p. 5505–5512
21. Role of Dipicolinic Acid in Resistance and Stability of Spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-Protective  $\alpha/\beta$ -Type Small Acid-Soluble Proteins, Barbara Setlow, Swaroopa Atluri, Ryan Kitchel, Kasia Koziol-Dube, and Peter Setlow, Journal of Bacteriology, June 2006, p. 3740–3747.
22. Fluorescent europium-modified polymer nanoparticles for rapid and sensitive anthrax sensors, Wan-Kyu Oh, Yoon Seon Jeong, Jooyoung Song, Jyongsik Jang, Biosensors and Bioelectronics 29 (2011) 172– 177.
23. Bacterial Spore Detection and Determination by Use of Terbium Dipicolinate Photoluminescence, David L. Rosen, Charles Sharpless and Linda B. McGown, Anal. Chem. 1997, 69, 1082-1085.
24. Anthrax: an update Kamal SM, Rashid AKM, Bakar MA, Ahad MA, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine (2011) 496-501
25. Paolo Aureli, Giovanna Franciosa, Lucia Fenicia, volume 1, pp. 329–337
26. Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food. John Wiley & Sons, Inc. 2012. pp. 1–60.
27. Godfrey S. Bbosa, Norah Mwebaza, John Odda, David B. Kyegombe, Muhammad Ntale Antibiotics / antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance, Health Vol.6, N,5, 410-425 (2014)

28. Joseph Lakowicz (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy Third Edition University of Maryland.
29. Oldham PB, McCarroll ME, Mc Grown LB, Warner IM (2000), Molecular Fluorescence, Phosphorescence and Chemiluminescence spectrometry. Anal. Chem, 72: 197R-209R.
30. Haugland RP (2002), Handbook of fluorescent probes and research chemicals (9<sup>th</sup> edition), Molecular Probes, Eugene, OR.
31. Mathematics of DNA structure, Function and Interactions (2009), Craig John Berham, Stephen Harvey, Wilma K. Olson, De Witt Summers, David Swigon.
32. Nucleic Acids and Molecular Biology Volume 2 (1986), Fritz Eckstein, David M. J. Lilley.
33. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. Culotta VC1, Yang M, O'Halloran TV, Biochim Biophys Acta. 2006 Jul;1763(7):747-58.
34. Imai, N., Suzuki, N., Sakai, F., & Kanda, T. (2000). Serum superoxide dismutase (SOD) activity in acute phase of embolic stroke: Different kinetics of Mn SOD and Cu-Zn SOD. Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases, 9(2 SUPPL.), 207-208.
35. Therapeutic potentials of superoxide dismutase, H. Younus, Int J Health Sci (Qassim). 2018 May-Jun; 12(3): 88–93
36. Imai, N., Suzuki, N., Sakai, F., & Kanda, T. (2000). Serum superoxide dismutase (SOD) activity in acute phase of embolic stroke: Different kinetics of Mn SOD and Cu-Zn SOD.
37. Proposed modification of the disc diffusion assay protocol to include internal controls, *The Single Plate Protocol*, Alderman & Smith (2001)

- 38.** Irith Wiegand, Kai Hilpert, Robert E W Hancock, Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances, *Nature Protocols*, Vol.3, No.2, 2008, pp.163-175
- 39.** Mounyr Balouiri, Moulay Sadiki, Saad Koraichi Ibsouda, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, Vol. 6, 2016, pp. 71–79.
- 40.** A. Latif Abuhijleh, Mononuclear copper(II) aspirinate or salicylate complexes with methylimidazoles as biomimetic catalysts for oxidative dealkylation of a hindered phenol, oxidation of catechol and their superoxide scavenging activities (2011).
- 41.** Christophe N. N'soukpoe-Kossi, Caroline Descoteaux, Eric Asselin, Heidar-Ali Tajmir-Riahi and Gervais Berube : DNA Interaction with Novel Antitumor Estradiol–Platinum(II) Hybrid Molecule: A Comparative Study with Cisplatin Drug, *DNA AND CELL BIOLOGY* Volume 27, Number 2, 2008.
- 42.** I.Sainis, C.N.Banti, A.M.Owczarzak, L.Kyros, N.Kourkoumelis, M.Kubicki, S.K.Hadjikakou, New antibacterial, non-genotoxic materials, derived from the functionalization of the anti-thyroid drug methimazole with silver ions, *Journal of Inorganic Biochemistry*, Volume 160, July 2016, Pages 114-124
- 43.** Zianna, A., Geromichalos, G.D., Hatzidimitriou, A.G., Coutouli-Argyropoulou, E., Lalia-Kantouri, M., Psomas, G. Palladium(II) complexes with salicylaldehyde ligands: Synthesis, characterization, structure, in vitro and in silico study of the interaction with calf-thymus DNA and albumins *Journal of Inorganic Biochemistry* Volume 194, May 2019, Pages 85-96

- 44.** Despoina Varna, Dini Iflakhah Zainuddin, Antonios G. Hatzidimitriou, George Psomas, Anastasia A. Pantazaki, Rigini Papi, Panagiotis Angaridis, Paraskevas Aslanidis Homoleptic and heteroleptic silver(I) complexes bearing diphosphane and thioamide ligands: Synthesis, structures, DNA interactions and antibacterial activity studies *Materials Science and Engineering: C* Volume 99, June 2019, Pages 450-459
- 45.** Varna, D., Zainuddin, D.I., Hatzidimitriou, A.G., Psomas, G., Pantazaki, A.A., Papi, R., Angaridis P., Email Author, Aslanidis P. Homoleptic and heteroleptic silver(I) complexes bearing diphosphane and thioamide ligands: Synthesis, structures, DNA interactions and antibacterial activity studies *Materials Science and Engineering C*, Volume 99, June 2019, Pages 450-459.
- 46.** George K. Latsis, Christina N. Banti, Nikolaos Kourkoumelis, Constantina Papatriantafyllopoulou, Nikos Panagiotou, Anastasios Tasiopoulos, Alexios Douvalis, Angelos G. Kalampounias, Thomas Bakas and Sotiris K. Hadjikakou, New metallo-therapeutics of NSAIDs against human breast cancer cells, *European Journal of Medicinal Chemistry* (2017) 1-15.