



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και**  
**Βιοτεχνολογίας**  
**«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**



**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

«Σχεδιασμός , σύνθεση και φασματοσκοπικός προσδιορισμός παραγώγων κινάζολίνης ως εν δυνάμει αντικαρκινικών παραγόντων »

**ΑΘΗΝΑ ΠΟΛΥΜΕΡΟΥ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2020**

«Σχεδιασμός , σύνθεση και φασματοσκοπικός προσδιορισμός παραγώγων  
κιναζολίνης ως εν δυνάμει αντικαρκινικών παραγόντων»

«Design, synthesis and spectroscopic determination of quinazoline derivatives  
as potential anticancer agents»

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Κομιώτης Δημήτριος** : Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση στην  
Σύνθεση Βιοδραστικών μορίων , Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας ,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Μήτσος Χρήστος** : Μέλος Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού ( Ε.ΔΙ.Π)  
, Εργαστήριο Βιο-Οργανικής Χημείας , Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

**Μαρκουλάτος Παναγιώτης** : Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με  
έμφαση στην Βιοτεχνολογία , Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας ,  
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ABSTRACT.....	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	2
1.1.....	2
1.2.....	3
1.3.....	7
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	8
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	8
3.1 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ.....	8
3.2 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΤΗΛΗΣ.....	9
3.3 ΣΗΜΕΙΟ ΤΗΣΗΣ.....	10
3.4 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΙΜΙΣΜΟΥ	12
3.5 ΣΥΣΚΕΥΗ ΜΥΚΡΟΚΥΜΜΑΤΩΝ .....	13
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	13
4.1 ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ.....	13
4.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	14
4.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ .....	16
5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΕΛΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ .....	23
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	29
7. ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ .....	31

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κιναζολίνη είναι μια οργανική , ετεροκυκλική και αρωματική ένωση. Είναι αποτέλεσμα της συμπύκνωσης ενός βενζολίου και μιας πυριμιδίνης .Αρκετά παράγωγα της κιναζολίνης χρησιμοποιούνται ευρέως ως φάρμακα τα οποία έχουν διάφορων ειδών δράσεις.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι μια ομάδα κινασών - τυροσινών γνωστές ως EGFR .Έχει αποδειχθεί ότι οι μεταλλάξεις των συγκεκριμένων συνδέονται με τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κύτταρων , μετάσταση αυτών καθώς αγγειογένεση και αποτροπή της απόπτωσης .

Κάποια παράγωγα της κιναζολίνης τα οποία έχουν υποκατάστατη μια ανιλίνη στη θέση 4 και μια πλευρική αλυσίδα στην θέση 6 ή και 7, αποτελούν αναστολείς των EGFR και χρησιμοποιούνται ως αντικαρκινικοί παράγοντες . Κατά την διάρκεια του συγκεκριμένου εργαστηρίου πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας σειράς ενώσεων με βάση την κιναζολίνη τα οποία έχουν παρόμοιες ιδιότητες με τους παρά πάνω αντικαρκινικούς παράγοντες , και η ταυτοποίησή τους με φασματοσκοπικές τεχνικές , με στόχο την βιολογική τους αποτίμηση ως προς τις αντικαρκινικές ιδιότητες τους .

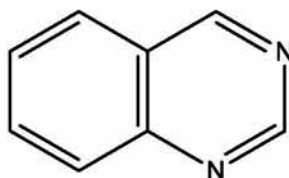
## ABSTRACT

Quinazoline is an organic, heterocyclic and aromatic compound. It is the result of the condensation of a benzene and a pyrimidine. Many derivatives of quinazoline are widely used as drugs which have various kinds of effects. A typical example is a group of kinases - tyrosine known as EGFRs. These mutations have been shown to be associated with cancer cell proliferation, metastasis as well as angiogenesis and apoptosis prevention. Some quinazoline derivatives which have an aniline substituted at position 4 and a side chain at position 6 or 7 are EGFR inhibitors and are used as anticancer agents. During this workshop, a new set of quinazoline-based compounds with similar properties to the above anti-cancer agents were synthesized, and identified by spectroscopic techniques, with the aim of biological evaluation of their anti-cancer properties.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Το ετεροκυκλικό σύστημα της κιναζολίνης

Η κιναζολίνη είναι μια αρωματική ετεροκυκλική ένωση με μοριακό τύπο  $C_8H_6N_2$ . Ο βενζολικός δακτύλιος της κιναζολίνης επηρεάζει τις ιδιότητες του δακτύλιου της πυριμιδίνης. Τα άτομα του αζώτου τα οποία υπάρχουν στον δακτύλιο της πυριμιδίνης δεν είναι ισοδύναμα. Άλλο χαρακτηριστικό της κιναζολίνης είναι η στερεή μορφή της και το κίτρινο χρώμα της, με κρυσταλλική φύση. Επίσης είναι ευδιάλυτη στο νερό.



quinazoline

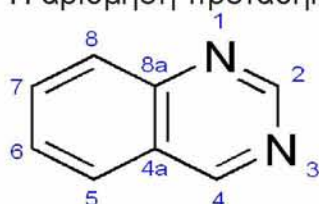
Εικόνα 1 : Δομή κιναζολίνης

Η πρώτη γνωστή σύνθεση της κιναζολίνης αναφέρθηκε το 1895 από τους August Bischler και Lang μέσω της αποκαρβοξυλίωσης του 2- κάρβοξυ παραγώγου (κιναζολίνο -2- καρβοξυλικού οξέος). (1) Το 1903 ο Siegmund Gabriel ανέφερε την σύνθεση της μητρικής κιναζολίνης από την ο-νιτροβενζυλαμίνη η οποία είχε αναχθεί με ιωδιούχο υδρογόνο και ευθρό φώσφορο προς 2 αμινοβενζυλαμίνη. Το ανηγμένο ενδιάμεσο συμπυκνώνεται με μυρμηκικό οξύ για να δώσει διυδροκιναζολίνη, η οποία οξειδώνεται προς κιναζολίνη. (2)

### Χαρακτηριστικά :

#### Αρίθμηση

Η αρίθμηση προτάθηκε από τους Paal και Busch



## Αντιδράσεις

Η κιναζολίνη συμμετέχει σε διάφορες αντιδράσεις όπως οξείδωσης , αναγωγής , αμίνωσης , νίτρωσης . Επίσης σε ψυχρά διαλύματα οξέων και αλκαλίων παραμένει σταθερή , ενώ , όταν βράζονται με HCl σχηματίζεται αμμωνία , ο-αμιννοβενζαλδευήδη και μυρμηκικό οξύ .

## Άλλα ονόματα

Υπάρχουν και άλλα ονόματα για την κιναζολίνη τα οποία είναι η φαινιμζίνη , βενζυλεναμιδίνη , βενζο -1,3- διαζίνη , 5,6-βενζοπυριμιδίνη και 1,3 διαζαναφθαλίνη . (Chemical characteristics, synthetic methods, and biological potential of quinazoline and quinazolinone derivatives).(3)

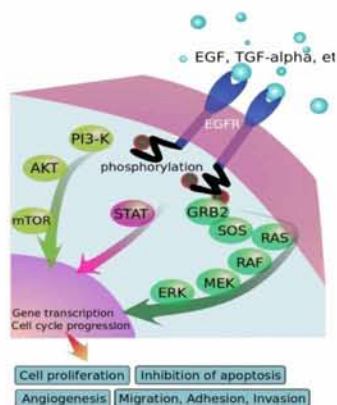
### **1.2 Αντικαρκινικά παράγωγα κιναζολίνης αναστολείς του EGFR**

Ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που είναι υποδοχέας για τα στελέχη του συμπλέγματος των επιδερμικών αυξητικών παραγόντων (EGFR family) , εξωκυτταρικών πρωτεϊνικών προσδεμάτων . Το EGFR είναι μέλος της οικογένειας υποδοχέων ErbB , μια υπό – οικογένεια τεσσάρων κοντά συγγενών υποδοχέων κινάσης τυροσίνης : EGFR (ErbB-1), HER2 / neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3) 4 (ErbB-4). Οι μεταλλάξεις που επηρεάζουν την έκφραση ή τη δραστηριότητα του EGFR μπορεί να οδηγήσουν σε καρκίνο καθώς και (4 η ανεπαρκής σηματοδότηση του EGFR και άλλων υποδοχέων κινάσης τυροσίνης . (5)

Η κυτταρική διαίρεση και ο πολλαπλασιασμός μπορούν να θεωρηθούν ως μια ακολουθία συμβάντων που ελέγχονται από μια σειρά πρωτεϊνικών κινάσεων ενζύμων. Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι οι σημαντικότερες κατηγορίες ανθρώπινων ενζύμων. Αυτά τα ένζυμα είναι υπεύθυνα για τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών καταλύοντας τη μεταφορά της τάξης του φωσφορυλίου από ένα τριφωσφορικό νουκλεοζίτη, συνήθως ATP, στην πλευρική άλυσο ενός υπολείμματος αμινοξέων στην πρωτεΐνη υποστρώματος , που ρυθμίζει πολλούς φυσιολογικούς μηχανισμούς , συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής διαφοροποίησης, της μετανάστευσης και του μεταβολισμού.(6)(7)

Ο ρόλος των πρωτεϊνικών κινάσεων στην ογκογένεση είναι εμφανής στην ικανότητά τους να μετασχηματίζουν κανονικά κύτταρα σε καρκινογόνους φαινοτύπους όταν εκφράζονται σε μεταλλαγμένες, μη ρυθμισμένες μορφές ή όταν παράγονται σε ανώμαλα υψηλά επίπεδα . Οι πρωτεϊνικές κινάσες όχι μόνο ελέγχουν την κυτταρική διαίρεση αλλά επίσης βοηθούν στην αγγειογένεση που απαιτείται για την ανάπτυξη όγκου και μετάσταση έτσι η ανάπτυξη μη τοξικών και εκλεκτικών αναστολέων πρωτεϊνικών κινάσεων σε καρκινικά κύτταρα αντιπροσωπεύει έναν συναρπαστικό στόχο για θεραπεία καρκίνου . ( 8)(9)





**Εικόνα 3 : Δράση του EGFR**

Τα παράγωγα κιναζολίνης είναι ετεροκυκλικά συστήματα δακτυλίων τα οποία έχει αποδειχθεί ότι έχουν αντικαρκινική δράση ως αναστολείς πρωτεϊνικής κινάσης EGFR .

Η **Γεφτινίμπη** εγκρίθηκε από τον FDA τον Μάιο του 2003 ως μονοθεραπεία για τη θεραπεία ασθενών με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) μετά από αποτυχία χημειοθεραπειών .

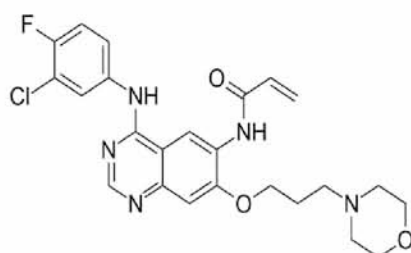
Η **Ερλοτινίμπη** εγκρίθηκε από το FDA το 2004 για τη θεραπεία του NSCLC. Τον Νοέμβριο του 2005, η FDA ενέκρινε την ερλοτινίμπη σε συνδυασμό με τη γεμισιταβίνη ( 12) για τη θεραπεία του τοπικά προχωρημένου, ανυπόστατου ή μεταστατικού καρκίνου του παγκρέατος .Είναι ένας αναστρέψιμος αναστολέας κινάσης τυροσίνης

Η **Λαπατινίμπη** εγκρίθηκε από το FDA το 2010 για θεραπεία καρκίνου του μαστού. Αναστέλλει τη δράση και των δύο οδών HER2 / neu και EGFR. Χρησιμοποιείται σε θεραπεία συνδυασμού για θετικό για HER2 καρκίνο του μαστού. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ασθενών με προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο του μαστού των οποίων οι όγκοι υπερεκφράζουν HER2 (ErbB2)

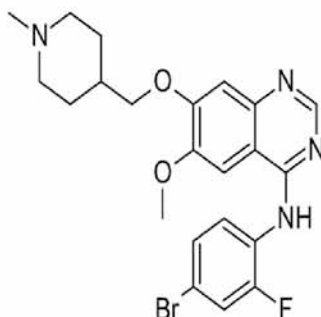
Η **Ικοτινίμπη (Icotinib-Conmana)** Αποδείχθηκε ότι συμμετείχε στην θεραπεία του NSCLC (Non-small- cell lung carcinoma ) στην Κίνα τον Ιούλιο του 2011. Είναι ένας υψηλής επιλεκτικότητας, πρώτης γενιάς αναστολέας κινάσης υποδοχέα αυξητικού παράγοντα τυροσίνης (EGFR-TKI). Η ικοτινίμπη εγκρίθηκε για χρήση ως μονοθεραπεία σε ασθενείς με NSCLC .

Η **Βανδετανίμπη (Vandetanib –Caprelsa )** Χρησιμοποιείται για την θεραπεία του μεταστατικού μυελικού θυροειδούς καρκίνου . Εγκρίθηκε από τον FDA τον Απρίλιο του 2011 .Δρά ως αναστολέας κινάσης ενός αριθμού κυτταρικών υποδοχέων , κυρίως του υποδοχέα αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα ( VEGFR ) , του υποδοχέα επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR ) και της κινάσης RET – τυροσίνης . (13)(14)

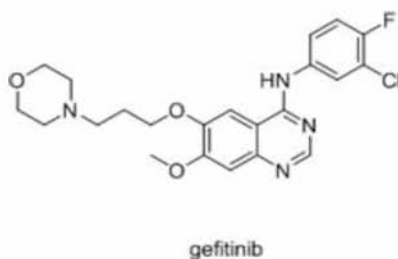
Η **Καρνετινίμπη (Carnetinib)** Η καρνετινίμπη είναι ένα πειραματικό φάρμακο για την θεραπεία του καρκίνου. Είναι ένας μη αναστρέψιμος αναστολέας κινάσης - τυροσίνης με δραστηριότητα έναντι του EGFR , HER -2 και ErbB-4 . (15) Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση του οισοφαγικού καρκίνου (16)



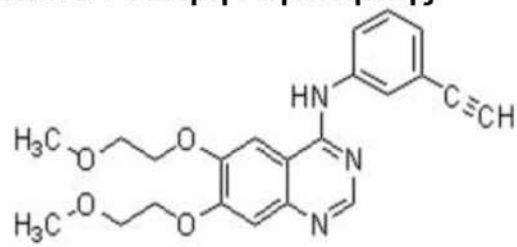
**Εικόνα 5 : Δομή Καρνετινίμπης**



**Εικόνα 6 : Δομή Βανδετανίμπης**

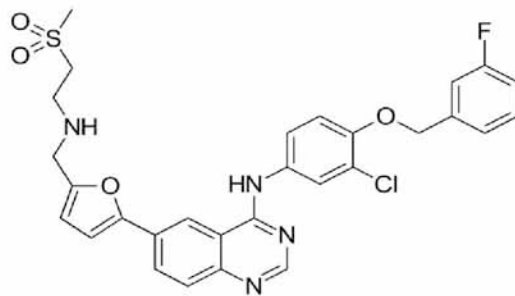


**Εικόνα 7 : Δομή Γεφτινίμπης**

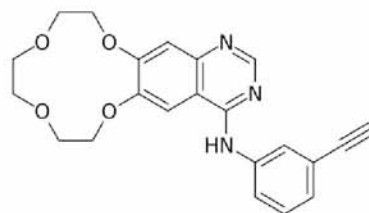


erlotinib

**Εικόνα 8 : Δομή Ερλοτινίμπης**



**Εικόνα 9 : Δομή Λαπατινίμπης**



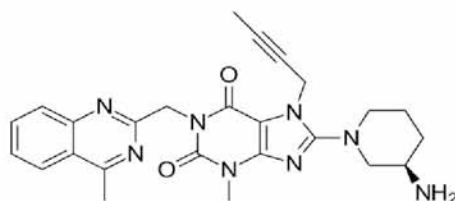
**10 : Δομή Ικοτινίμπης**

### 1.3 Παράγωγα κιναζολίνης ως εγκεκριμένα φάρμακα

Τα παράγωγα κιναζολίνης έχουν πολλές διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες όπως οι υπνωτικές, ηρεμιστικές, αναλγητικές, αντιβηχικές, βρογχοδιασταλτικές, αντιυπερτασικές, αντισπασμωδικές, αντιφλεγμονώδεις .(19)

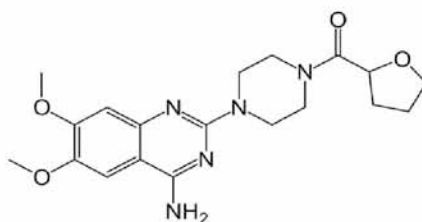
Παραδείγματα τέτοιων φαρμάκων είναι :

Η **Λιναγλιπτίνη**, που πωλείται με το εμπορικό σήμα Tradjenta, είναι ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2. Χρησιμοποιείται μαζί με την άσκηση και τη διατροφή. Δεν συνιστάται στον διαβήτη τύπου 1. (20)



**Εικόνα 11 : Δομή Λιναγλιπτίνης**

Η **Τερασοζίνη** , είναι ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία συμπτωμάτων ενός διευρυμένου προστάτη και υψηλής αρτηριακής πίεσης. Για την υψηλή αρτηριακή πίεση, είναι μια λιγότερο προτιμώμενη επιλογή. (21)



**Εικόνα 12 : Δομή Τερασοζίνης**

## **2. ΣΚΟΠΟΣ**

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η δημιουργία νέων παραγώγων κινολίνης τα οποία θα έχουν αλογόνα στον δακτύλιο της ανιλίνης και ένα αλκίνιο στην θέση 6 της και θα είναι ανάλογα των αντικαρκινικών φαρμάκων τα οποία αναφέρθηκαν προηγουμένως . Οι ενώσεις αυτές θα μελετηθούν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) <sup>1</sup>H και <sup>13</sup>C . Στην συνέχεια στόχος είναι η βιολογική αποτίμηση τους για την εύρεση κάποιας πιθανής κυτταροτοξικής ιδιότητας και η μελέτη της επιλεκτικότητας τους έναντι καρκινικών κυττάρων .Αυτά ως αποτέλεσμα θα έχουν να κρίνουν αν η ένωση έχει την δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ως αντικαρκινικό φάρμακο .

## **3. ΠΕΙΡΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ**

Παρακάτω θα αναλύσουμε τις τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στην διάρκεια του πειράματος .Οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό , την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό των ενώσεων που συντέθηκαν .

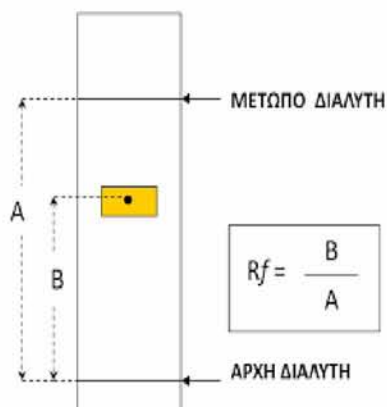
### **3.1 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας**

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας είναι η τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μη πτητικών μιγμάτων . (22) Έχουμε την ύπαρξη δύο φάσεων , της στατικής και της κινητής μέσω των οποίων έχουμε τον διαχωρισμό των μιγμάτων με βάση την πολικότητα τους .Η στατική φάση εκτελείται σε μια πλάκα από γυαλί, πλαστικό, ή φύλλο αργιλίου, που επικαλύπτεται με μια λεπτή στρώση από προσροφητικό υλικό, συνήθως διοξειδίου του πυριτίου (silica gel), τριοξειδίου του αργιλίου, ή κυτταρίνης . Το μίγμα εφαρμόζεται στην πλάκα και στην συνέχεια τοποθετείται σε μίγμα διαλυτών ή ενός διαλύτη , κινητή φάση , και όπου διαχωρίζεται. (23)

### **Στάδια**

Σε ένα πλακίδιο κάνουμε μια γραμμή σε απόσταση 2 εκατοστών από την βάση , στην οποία πάνω δημιουργούμε τελείες σε απόσταση η μια από την άλλη μισό εκατοστό περίπου . Πάνω σε αυτές τις κουκίδες με την χρήση τριχοειδούς σωλήνα τοποθετούμε κηλίδες των ως προς διαχωρισμό ουσιών . Όταν οι κουκίδες στεγνώσουν το πλακίδιο τοποθετείται σε κυλινδρικό δοχείο (θάλαμος ανάπτυξης ) ο οποίος περιέχει τον κατάλληλο διαλύτη , το οποίο και πωματίζουμε για να εξασφαλίσουμε την κατάλληλη σταθερότητα των ατμών . Παρατηρούμε τον διαλύτη μνα ανεβαίνει κατά μήκος του πλακιδίου παρασύροντας τα συστατικά . Όταν ο διαλύτης φτάσει σε απόσταση ενός εκατοστού από την άκρη του πλακιδίου το βγάζουμε από τον θάλαμο ανάπτυξης και το αφήνουμε να στεγνώσει .Ο προσδιορισμός των κηλίδων γίνεται με την χρήση λάμπας UV καθώς οι κηλίδες παρουσιάζουν φθορισμό .

Με αυτόν τον τρόπο γίνεται έλεγχος της πορείας των αντιδράσεων αλλά και της καθαρότητας των προϊόντων . Όσο πιο πολική είναι μια ένωση τόσο πιο πολύ προσροφάται στην στατική άρα εμφανίζεται πιο χαμηλά . Έτσι μπορούμε να βρούμε την σταθερά επιβράδυνσης  $R_f$  κάθε ουσίας , που ορίζεται ως ο λόγος της απόστασης που διένυσε η ουσία ως προς την απόσταση που διένυσε ο διαλύτης .



**Εικόνα 13: Υπολογισμός  $R_f$**

### **3.2 Χρωματογραφία στήλης**

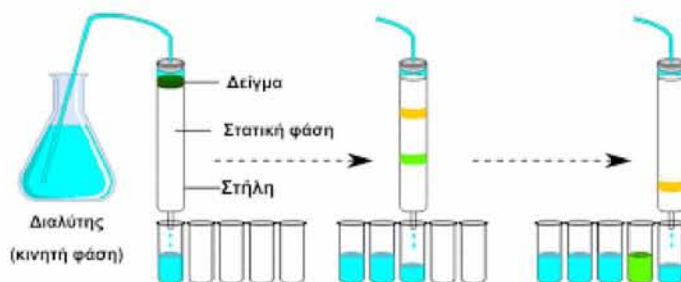
Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό των μιγμάτων , μοιάζει με αυτήν της λεπτής στιβάδας μόνο που γίνεται σε μεγαλύτερη κλίμακα .

Ως στατική φάση χρησιμοποιείται silica gel ένα προσροφητικό υλικό με μεγάλη πολικότητα και ως οργανική ένα μίγμα διαλυτών .

- **Στάδια :**

Σε αυτήν την μέθοδο παίρνουμε μια γυάλινη στήλη με ύψος και διάμετρο ανάλογα της μάζας της ως προς διαχωρισμό ουσίας . Δημιουργούμε προσροφητικό υλικό και το τοποθετούμε προσεκτικά στην στήλη . Χρησιμοποιούμε αέρα για να πιέσουμε τον διαλύτη στην στήλη τόσο ώστε να

μείνουν 2 εκατοστά στην επιφάνεια της silica για να μην στεγνώσει . Διαλύουμε την ουσία σε κατάλληλο μίγμα διαλυτών και το τοποθετούμε στην στήλη . Τα μίγματα τα οποία εξέρχονται από την στήλη τα συλλέγουμε σε δοκιμαστικούς σωλήνες και στην συνέχεια τα κάνουμε TLC για να γίνει η ταυτοποίηση της ουσίας και αναλόγως συλλέγουμε τους κατάλληλους δοκιμαστικούς σωλήνες .



**Εικόνα 14 : Χρωματογραφία στήλης**

### **3.3 Σημείο τήξης**

Για τον χαρακτηρισμό μιας ένωσης απαραίτητο είναι το σημείο τήξης το οποίο είναι διαφορετικό σε κάθε ένωση . ονομάζεται η θερμοκρασία στην οποία αλλάζει φάση μια καθαρή ουσία (χημικό στοιχείο ή χημική ένωση), μεταβαίνοντας από την στερεή στην υγρή κατάσταση , φαινόμενο που ονομάζεται τήξη. Ουσιαστικά πρόκειται για τη θερμοκρασία εκείνη στην οποία συνυπάρχουν σε ισορροπία τόσο η στερεά όσο και η υγρή κατάσταση μιας ουσίας (καθαρής).

Η θερμοκρασία στην οποία συμβαίνει η τήξη εξαρτάται από την πίεση . Συνήθως, αναφερόμαστε στη "θερμοκρασία τήξης" ενός υλικού σε κανονικές συνθήκες πίεσης. Οι προσμείξεις μεταβάλλουν τη θερμοκρασία τήξης, γι' αυτό και αναφερόμαστε σε καθαρές ουσίες . (24 )

Δειγματοληψία :



**Εικόνα 15**



**Εικόνα 16**



**Εικόνα 17**

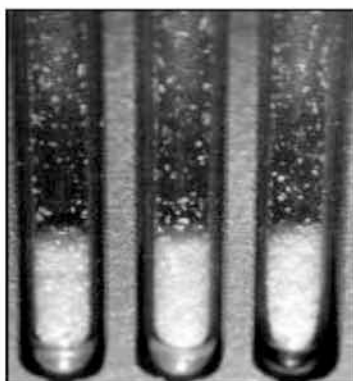
Τοποθέτηση στην συσκευή :



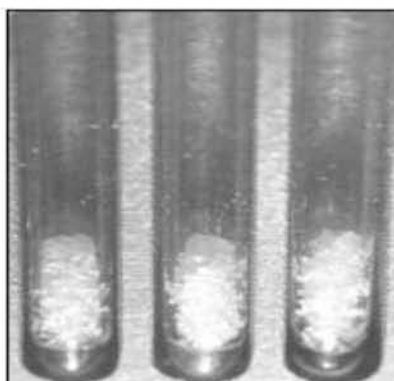
**Εικόνα 18**



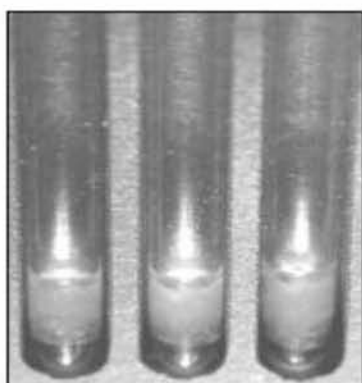
Ανάγνωση αποτελεσμάτων :



Εικόνα 19



Εικόνα 20



Εικόνα 21



Εικόνα 22

### **3.4 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού**

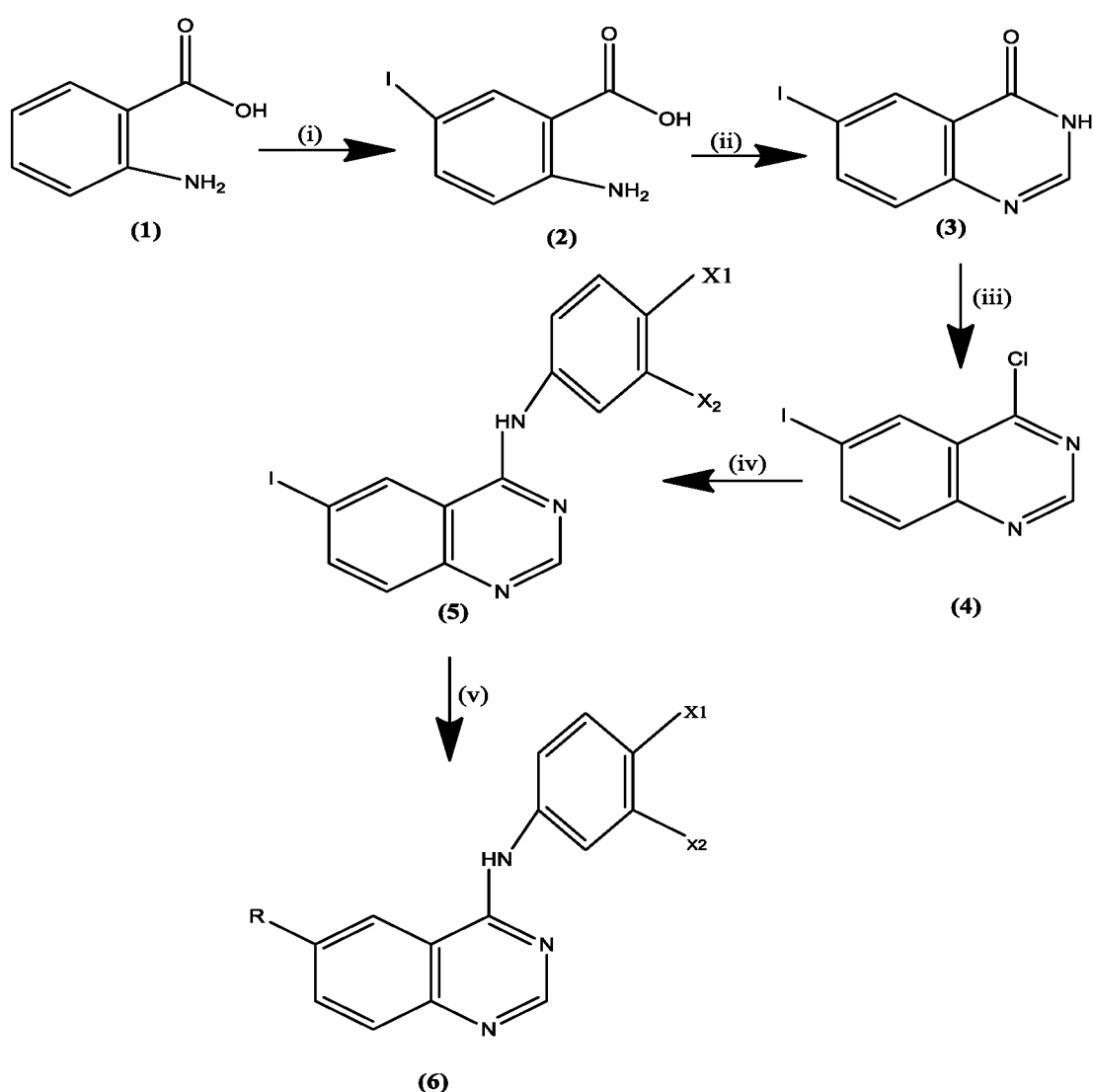
Είναι η πιο χρήσιμη τεχνική ταυτοποίησης μορίου στην οργανική χημεία καθώς γίνεται ο προσδιορισμός του αριθμού και το είδος ατόμων σε ένα μόριο καθώς και ο τρόπος σύνδεσης των ατόμων. Υπάρχει μεγάλη ποικιλία στην χρήση των πυρήνων όπως  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ . Επίσης είναι η ακτινοβολία ραδιοσυχνότητας που χρησιμοποιείται για την μετάβαση μεταξύ των ενεργειακών καταστάσεων (πυρηνικό σπιν). Κυρίως μελετάμε φάσματα υδρογόνου και άνθρακα καθώς αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στην ταυτοποίηση της ένωσης. (25)

### 3.5 Συσσκευή μικροκυμάτων

Οι αντιδράσεις έγιναν σε μικροκύματα στην συσκευή CEM Discover σε συχνότητα 2,45 GHz με συνεχή δύναμη ακτινοβολίας από 0 έως 300 Watt και μέση επιτρεπτή πίεση 250 PSI .

## 4 . ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 4.1 Επισκόπηση συνθετικής πορείας



- (i) : KI (ιωδιούχο κάλιο) , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (υπεροξειδίο του υδρογόνου) , CH<sub>3</sub>COOH (οξικό οξύ)
- (ii) : KCONH<sub>2</sub> (φορμαμίδιο)
- (iii) : SOCl<sub>2</sub> θειόνυλο χλωρίδιο , DMF (N,N – διμέθυλοφορμαμίδιο)
- (iv) : αλογόνο –δισ – υποκατεστημένη ανιλίνη , i-PrOH (ισοπροπανόλη)
- (v) : Pd (PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> , CuI (ιωδιούχος χαλκός) , Et<sub>3</sub>N (τριαιθυλαμίνη) , DMF , R (υποκαταστάτες)

## 4.2 Μεθοδολογία

Στο πρώτο μέρος των αντιδράσεων ( i , ii , iii , iv ) πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της N - (3 χλώροφαινυλο) – 6 –ιωδοκινναζολιν -4- αμίνης **(5)** η οποία αποτέλεσε την πρώτη ύλη .

Στην αντίδραση (i) χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη το 2-άμινο βενζοϊκό οξύ **(1)** στο οποίο έγινε υποκατάσταση με ιώδιο στην θέση 5 ώστε να προκύψει το 2-άμινο – 5 – ιωδο - βενζοϊκό οξύ **(2)** με την χρήση KI , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και CH<sub>3</sub>COOH .

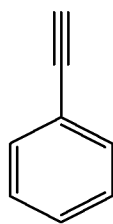
Η αντίδραση ( ii ) είναι η κυκλοποίηση του προϊόντος **(2)** ώστε να προκύψει η 6 –ιωδο κινναζολιν-4-(3 H )-ονη **(3)** χρησιμοποιώντας φορμαμίδιο .

Στην αντίδραση (iii) χρησιμοποιήθηκε SOCl<sub>2</sub> ώστε να γίνει η χλωρίωση του προϊόντος **(3)** προς την 6-ιωδο-4-χλωροκινναζολίνη **(4)** . Έγινε με DMF με reflux .

Οι αντιδράσεις (iv) και (v) είναι η πυρηνόφιλη αντικατάσταση του Cl της ένωσης **(4)** με 3-χλωρο - 4 - φθόρο ανιλίνη , με ισοπροπανόλη ως διαλύτη ώστε να προκύψει η N- (3-χλωρο-4-φθοροφαινυλο) -6-ιωδοκινναζολιν-4-αμίνη **(5)** . Στο δεύτερο μέρος έγιναν 3 αντιδράσεις Sonogashira χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη **(5)** , και προέκυψαν 3 προϊόντα **(6a)** , **(6b)** , **(6c)** . Η Sonogashira είναι μια διασταυρούμενη σύζευξη ενός αλογονιδίου με ένα αλκίνιο παρουσία Et<sub>3</sub>N και καταλύτη το Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> και συγκαταλύτη το CuI σε DMF .

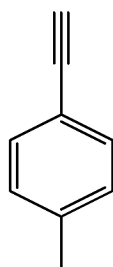
Τα αλκίνια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως υποκαταστάτες είναι :

(a) : ethynylbenzene



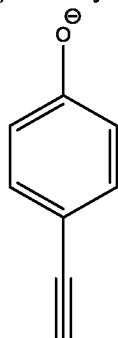
**(a)**

(b) 1-ethynyl-4-methylbenzene



**(b)**

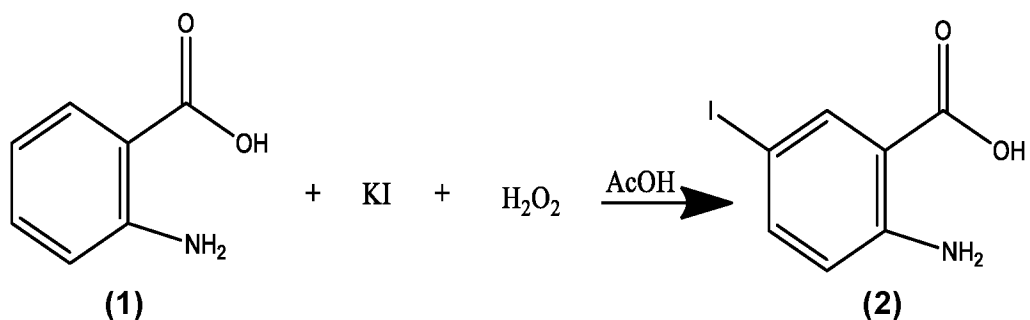
(c) 4-ethynylphenolate



**(c)**

### 4.3 Αντιδράσεις

#### Αντίδραση (i) : Σύνθεση του 2 – άμινο -5- ιωδοβενζοϊκού οξέος (2)



#### Πειραματική πορεία για την σύνθεση της (i) :

Σε διάλυμα 2-αμινο-βενζοϊκού οξέος ( m = 5.49 , n = 40 mmol ) ,σε οξικό οξύ (AcOH , V = 50 ml ) , προστέθηκε το KI ( m = 6.65 , n = 40 mmol ) , στην συνέχεια αφέθηκε να κρυώσει σε υδρόλουτρο 5°C και έπειτα έγινε προσθήκη διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου 30 % . Στην συνέχεια αφαιρέθηκε από το υδρόλουτρο και τοποθετήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση .

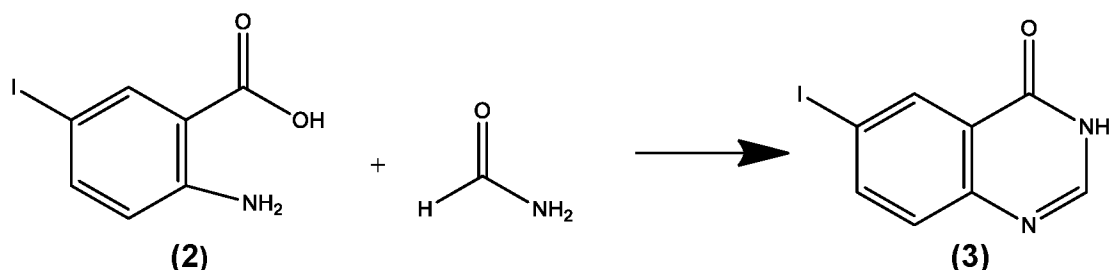
Η πορεία της αντίδρασης μπορούμε και την ελέγχουμε με TLC (1:1 hex – AcOEt) .

Σε κάποια χρονική στιγμή παρατηρείται όλη η κατανάλωση του (1) (σχεδόν μετά από 2 ώρες ) . Τότε προστέθηκε νερό και το μίγμα ψύχθηκε στους 0-4 °C για μισή ώρα . Έπειτα έγινε διήθηση υπό κενό , το στερεό ξεπλύθηκε 4-5 φορές με κρύο νερό και αφέθηκε να ξεραθεί προστατευμένο από το φώς , αρχικά σε ρεύμα αέρα και μετά σε ξηραντήρα .

#### Χαρακτηριστικά της ένωσης (2) :

Μοριακό Βάρος	263,03 g / mol
Σημείο Τήξης	217-219 °C
Σταθερά Επιβράδυνσης (Rf)	0,44
Απόδοση	94%

### Αντίδραση (ii) : Σύνθεση της 6 – ιωδοκιναζολιν -4(3H) – όνης (3)



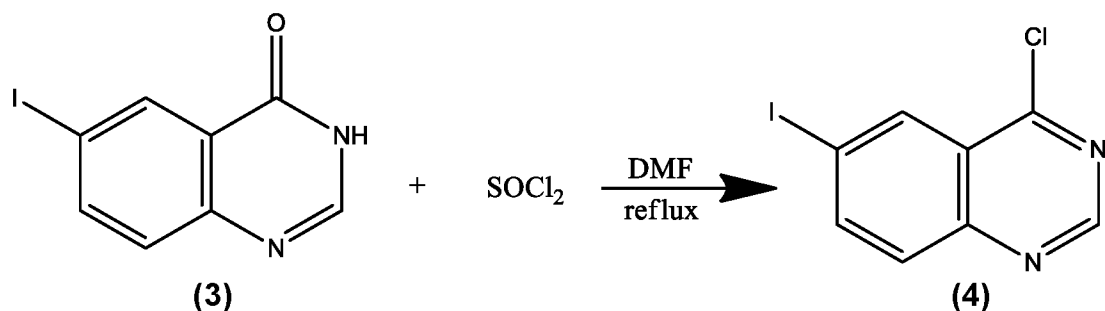
### Πειραματική πορεία για την σύνθεση της (ii) :

Μίγμα της ένωσης (2) (  $m = 2.63\text{g}$  ,  $n = 10\text{ mmol}$  ) και φορμαμιδίου (  $V = 3.2\text{ ml}$  ,  $n = 81\text{ mmol}$  ) θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους  $130 - 140^\circ\text{C}$  υπό ανάδευση . Κατά την θέρμανση δημιουργήθηκε διάλυμα και στην συνέχεια στερεό . Μετά από TLC παρατηρήθηκε ότι έγινε όλη η κατανάλωση του (2) . Έπειτα το μίγμα αφέθηκε να ψυχθεί και έγινε προσθήκη μίγματος πάγου-νερού . Έγινε ανάδευση για λίγη ώρα και έγινε διήθηση . Το στερεό ξεπλύθηκε 4-5 φορές με κρύο νερό και αφέθηκε να ξεραθεί προστατευμένο από το φώς , αρχικά σε ρεύμα αέρα και μετά σε ξηραντήρα .

### Χαρακτηριστικά της ένωσης (3) :

Μοριακό Βάρος	272,05 g /mol
Σημείο Τήξης	274-276 °C
Σταθερά Επιβράδυνσης (Rf)	0,13
Απόδοση	86 %

### Αντίδραση (iii) : σύνθεση της 6-ιωδο-4- χλωροκιναζολινόνης (4)



### Πειραματική πορεία για την σύνθεση της (iii)

Μίγμα της (3) ( $m=2,194 \text{ g}$  ,  $n= 10 \text{ mmol}$ ) με DMF(7-8 σταγόνες ) και SOCl<sub>2</sub> (8ml) θερμάνθηκε με reflux σε ελαιόλουτρο (αρχική θερμοκρασία 55 °C , τελική θερμοκρασία 85 °C ) . Μετά από μία ώρα δημιουργήθηκε διάλυμα καφέ χρώματος .Ελέγχθηκε η πορεία της αντίδρασης με TLC (1:4 hexane –AcOEt ) . Γενικά το προϊόν είχε θολή όψη άρα δεν καταναλώθηκε όλο το προϊόν ή υπήρχανε προσμίξεις . Μετά το μίγμα αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και απομακρύνθηκε το SOCl<sub>2</sub> υπό κενό και το στερεό υπόλειμμα διαλύθηκε σε CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50ml) . Το διάλυμα ξεπλύθηκε με κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaHCO<sub>3</sub>(2x30ml) και κορεσμένο αλατόνερο (1x30ml) , ξηράθηκε με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> , τοποθετήθηκε στην συσκευή για την απομάκρυνση υπολείμματος CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> . Το τελικό προϊόν είχε πράσινο χρώμα (βάρους περίπου 2,395 g ) και καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης .

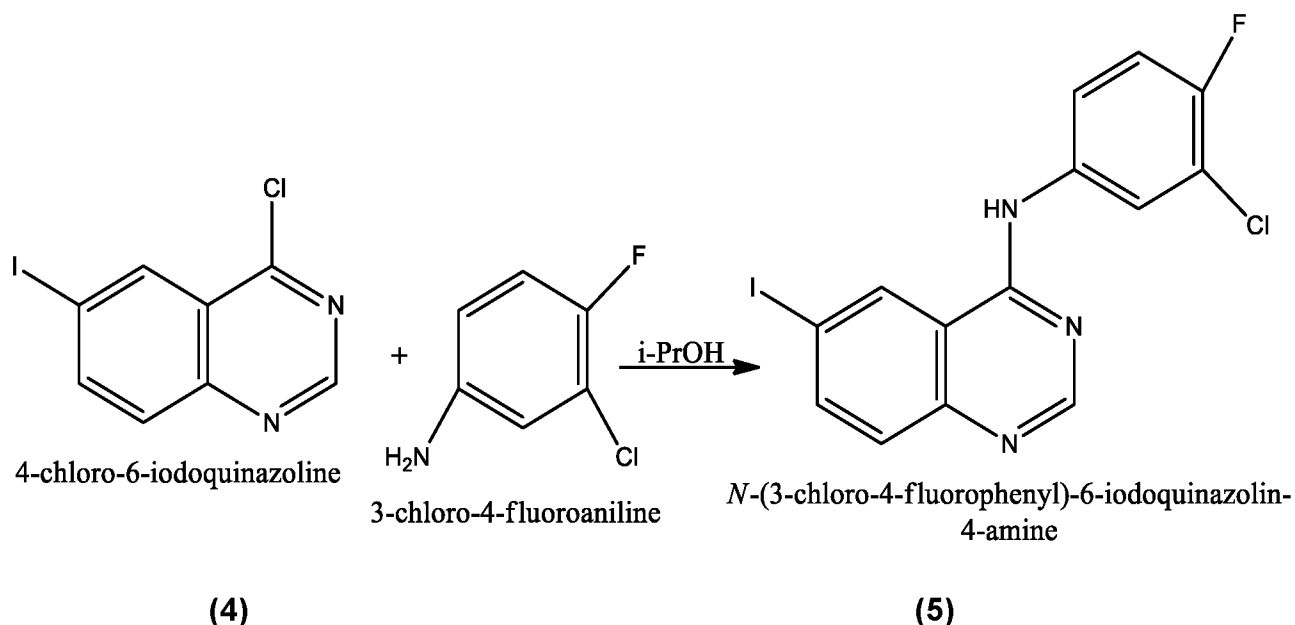
\*Γενικά οι αντιδράσεις έγιναν υπό άζωτο για την αποφυγή του ατμοσφαιρικού αέρα , για τυχόν οξειδώσεις .

\*Έγινε επιπλέον προσθήκη SOCl<sub>2</sub> (+4ml) καθώς δεν έγινε το προϊόν λεπτόρρευστο με την πρώτη προσθήκη .

Χαρακτηριστικά της ένωσης (4):

Μοριακό Βάρος	290,49 g /mol
Σημείο Τήξης	177-179 °C
Σταθερά Επιβράδυνσης (Rf)	0,8
Απόδοση	85 %

**Αντίδραση (iv) : αντίδραση της N-(3-χλωροφαινυλο) -6- ιωδικινάζολιν-4-αμίνης (5)**



**Πειραματική πορεία για την σύνθεση της (iv) :**

Η (4) (m=581mg , 2.00 mmol) με ισοπροπανόλη , προστέθηκε διάλυμα 3 χλωρο-4-φθοροανιλίνη (145,56 MB – 306 mg )σε ισοπροπανόλη(10 ml ) και το μίγμα θερμάνθηκε με reflux σε θερμοκρασία 55- 60°C . Αρχικά πρέπει να φτάσει στους 50 °C . Έγινε επιπλέον προσθήκη ισοπροπανόλης 5 ml γιατί έγινε πολύ πηχτό το προϊόν ,δημιουργία κάποιου προϊόντος . Στην 1 ώρα αντίδρασης έγινε TLC (4 Hex : 2 AcOEt) . Έγιναν 3 διαφορετικά TLC , αιθανόλη –προϊόν , αιθανόλη –ανιλίνη , αιθανόλη –πρώτη ύλη . Δεν εμφανίστηκε κουκίδα στην πρώτη ύλη άρα έγινε η αντίδραση . Έπειτα έγινε έκπλυση σε Buchner , αφού αφέθηκε να κρυώσει . Στην συνέχεια έγιναν εκπλύσεις με ισοπροπανόλη και τοποθετήθηκε στην αντλία κενού και μετά σε ξηραντήρα .

\*Οι αντιδράσεις έγιναν υπό άζωτο

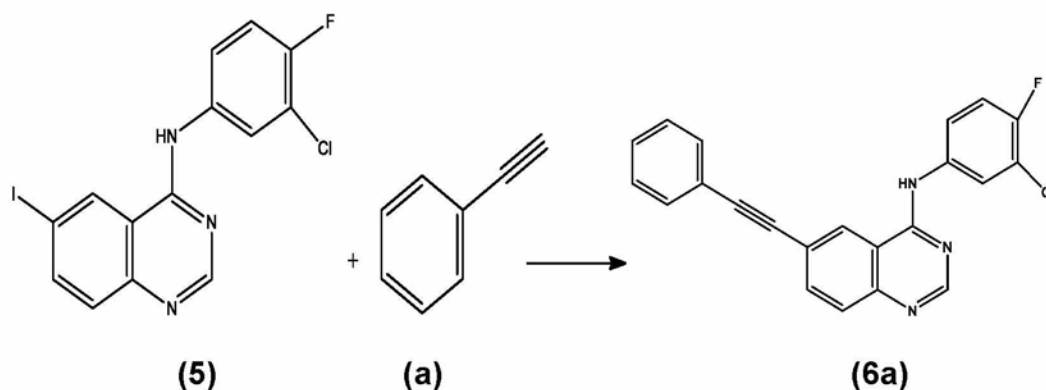
Χαρακτηριστικά της ένωση (5) :

Μοριακό Βάρος	399,59 g/mol
Σημείο Τήξης	275-278 °C
Σταθερά Επιβράδυνσης (Rf)	0.50
Απόδοση	76%



### Αντιδράσεις για την σύνθεση των τελικών προϊόντων :

- Αντίδραση για την σύνθεση της N- (3-χλωρο-4-φθοροφαινυλ) -6-(φαινυλαιθυνυλ) κιναζολιν-4-αμίνη



Όπου (6a) : N-(3-chloro-4-fluorophenyl)-6-(phenylethynyl)quinazolin-4-amine και (α) ethynylbenzene

### **Πειραματική πορεία για την (6a) :**

Από την ένωση (5) ζυγίστηκαν 42 mg - 0,10 mmol – MB : 399.59 g/mol – 1 eq , προστέθηκαν καταλύτης Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> 12 mg – MB : 1155.58 g/mol – 0.0103mmol – 0.1 eq και CuI 2mg - MB : 190,45 g/mol - 0.010mmol – 0,1 eq . Στην συνέχεια προστέθηκε η ένωση (a) 23 mg – MB :102.14 g/mol – 0.20 mmol , DMF 0,5 ml και τέλος η Et<sub>3</sub>N 42μl – MB : 101.19 g/mol – 3 eq – 0.30 mmol . Στην αρχή τοποθετούμε όλα τα στερεά και μετά τον διαλύτη και τέλος την Et<sub>3</sub>N γιατί με αυτήν ξεκινάει η αντίδραση . Η αντίδραση έλαβε χώρα στα MW στα 200 W για 30-35 λεπτά .

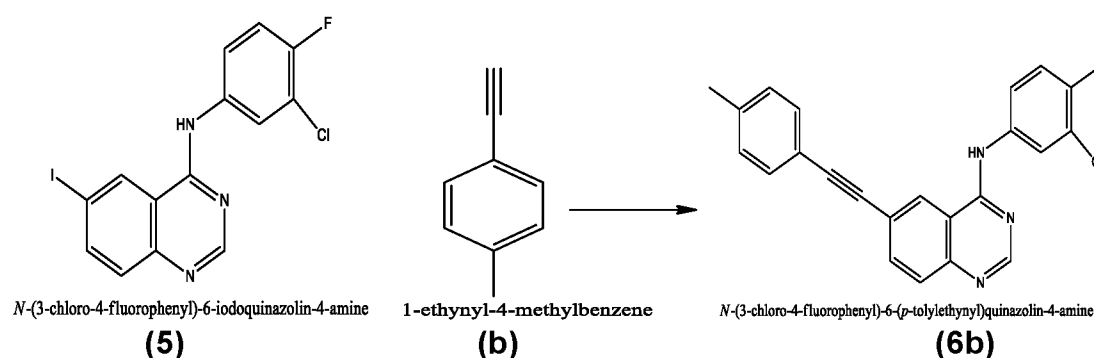
Στο τέλος της αντίδρασης έγινε TLC (3Hex : 1 AcOEt )

Το προϊόν κατεργάστηκε με 10 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και 10 ml H<sub>2</sub>O για 5 φορές , ξηράνθηκε με NaSO<sub>4</sub> , απομακρύνθηκε ο διαλύτης και στην συνέχεια έγινε καθαρισμός της ουσίας με χρωματογραφία στήλης , σε σύστημα διαλυτών εξάνιο-οξικός αιθυλεστέρας , (9:1) , και silica gel έκλουση με το ίδιο σύστημα διαλυτών .

Χαρακτηριστικά της ένωσης (6a) :

Μοριακό Βάρος	373.81 g/mol
Σημείο Τήξης	237 ° C
Σταθερά Επιβράδυνσης (Rf)	0.20
Απόδοση	78%

- Αντίδραση για την σύνθεση της **N-(3-χλωρο-4-φθοροφαινυλ) -6-(p-τολυλαιθυνυλ) κιναζολιν-4-αμίνη**



**Πειραματική πορεία για την σύνθεση της (6b) :**

Από τη ένωση (5) ζυγίστηκαν 40 mg – MB : 399,59 g/mol – 0,1 mmol , προστέθηκαν καταλύτης Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> 12 mg – MB : 1155.58 g/mol – 0.0103mmol – 0.1 eq και CuI 2mg - MB : 190,45 g/mol - 0.010mmol – 0,1 eq .και 0,5 ml DMF . Τέλος η Et<sub>3</sub>N 42μl – MB : 101.19 g/mol – 3 eq – 0.30 mmol . Στην αρχή τοποθετούμε όλα τα στερεά και μετά τον διαλύτη και τέλος την Et<sub>3</sub>N γιατί με αυτήν ξεκινάει η αντίδραση . Η αντίδραση έλαβε χώρα στα MW στα 200 W για 30-35 λεπτά . Έγινε TLC(3Hex:1AcOEt) και εμφανίστηκε σημείο στην πρώτη ύλη , και ξαναμπήκε για άλλα μισή ώρα αντίδρασης . Το προϊόν κατεργάστηκε με 10 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και 10 ml H<sub>2</sub>O για 5 φορές , ξηράνθηκε με NaSO<sub>4</sub> , απομακρύνθηκε ο διαλύτης και στην συνέχεια έγινε καθαρισμός της ουσίας με χρωματογραφία στήλης , σε σύστημα διαλυτών εξάνιο-οξικός αιθυλεστέρας , (9:1) , και silica gel έκλουση με το ίδιο σύστημα διαλυτών . Στο τελικό TLC εμφανίστηκε ουρά το οποίο δείχνει την πιθανή ύπαρξη παραπροϊόντων .



Το προϊόν κατεργάστηκε με 10 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και 10 ml H<sub>2</sub>O για 5 φορές , μία φορά με NaCl , ξηράθηκε με NaSO<sub>4</sub> , απομακρύνθηκε ο διαλύτης και στην συνέχεια έγινε καθαρισμός της ουσίας με χρωματογραφία στήλης , σε σύστημα διαλυτών εξάνιο-οξικός αιθυλεστέρας , (9:1) , και silica gel έκλουση με το ίδιο σύστημα διαλυτών .

\*Παρατηρήθηκε κάτι αδιάλυτο στο προϊόν και προστέθηκε χλωριούχο αμμώνιο .Δεν έγινε διαυγές άρα γίνονται υποθέσεις για μη καθαρή πρώτη ύλη.

Χαρακτηριστικά της ένωσης (6c) :

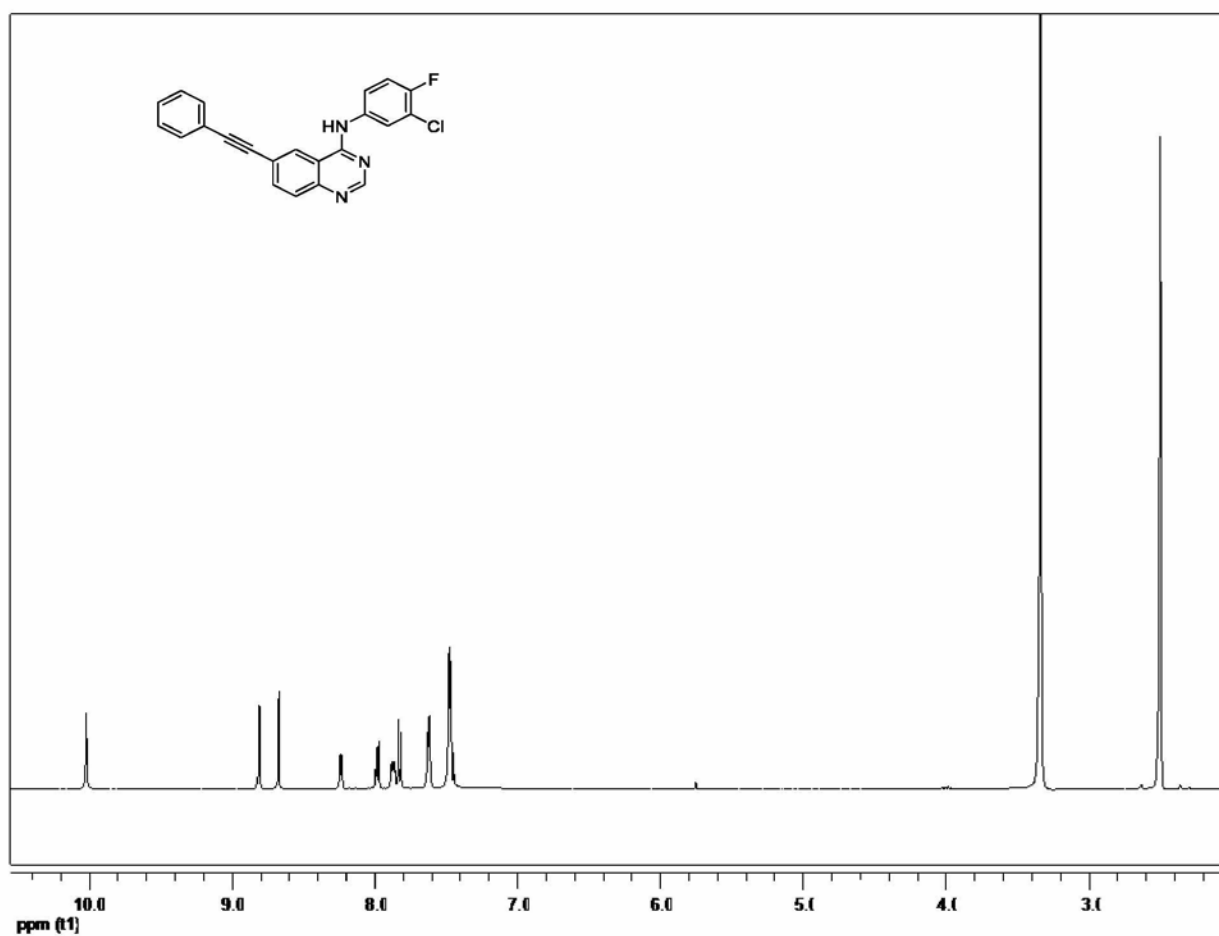
Μοριακό Βάρος	390.82 g/mol
Σημείο Τήξης	223 ° C
Σταθερά Επιβράδυνσης (Rf)	0.4
Απόδοση	84%

## 5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΕΛΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

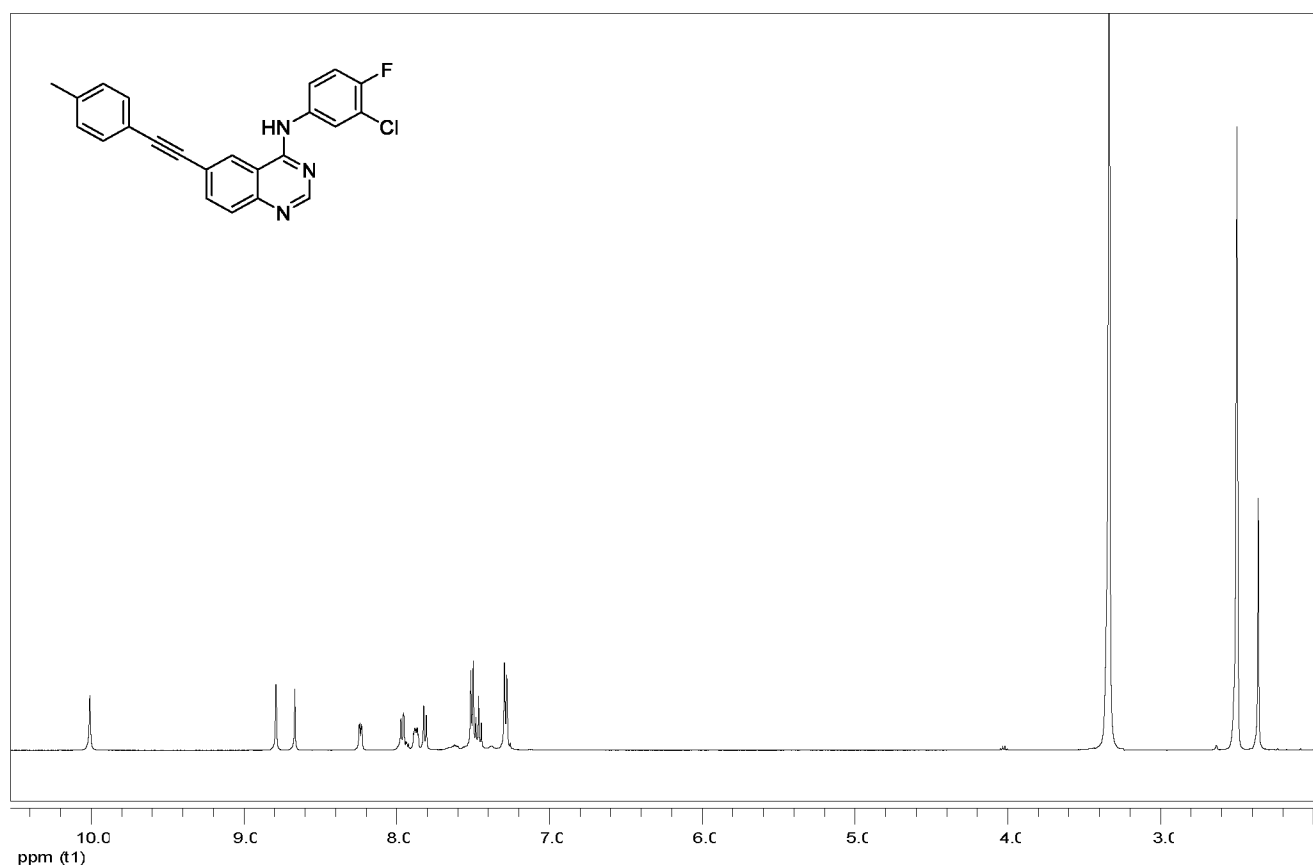
Τα τελικά προϊόντα ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού - NMR άνθρακα 13 και πρωτονίου. Από τα διαγράμματα αυτά βγήκαν συμπεράσματα τα οποία αφορούν την καθαρότητα και την δομή των ενώσεων. Διαλύτης για τις τεχνικές αυτές χρησιμοποιήθηκε DMSO-d<sub>6</sub>.

Φάσματα H-NMR

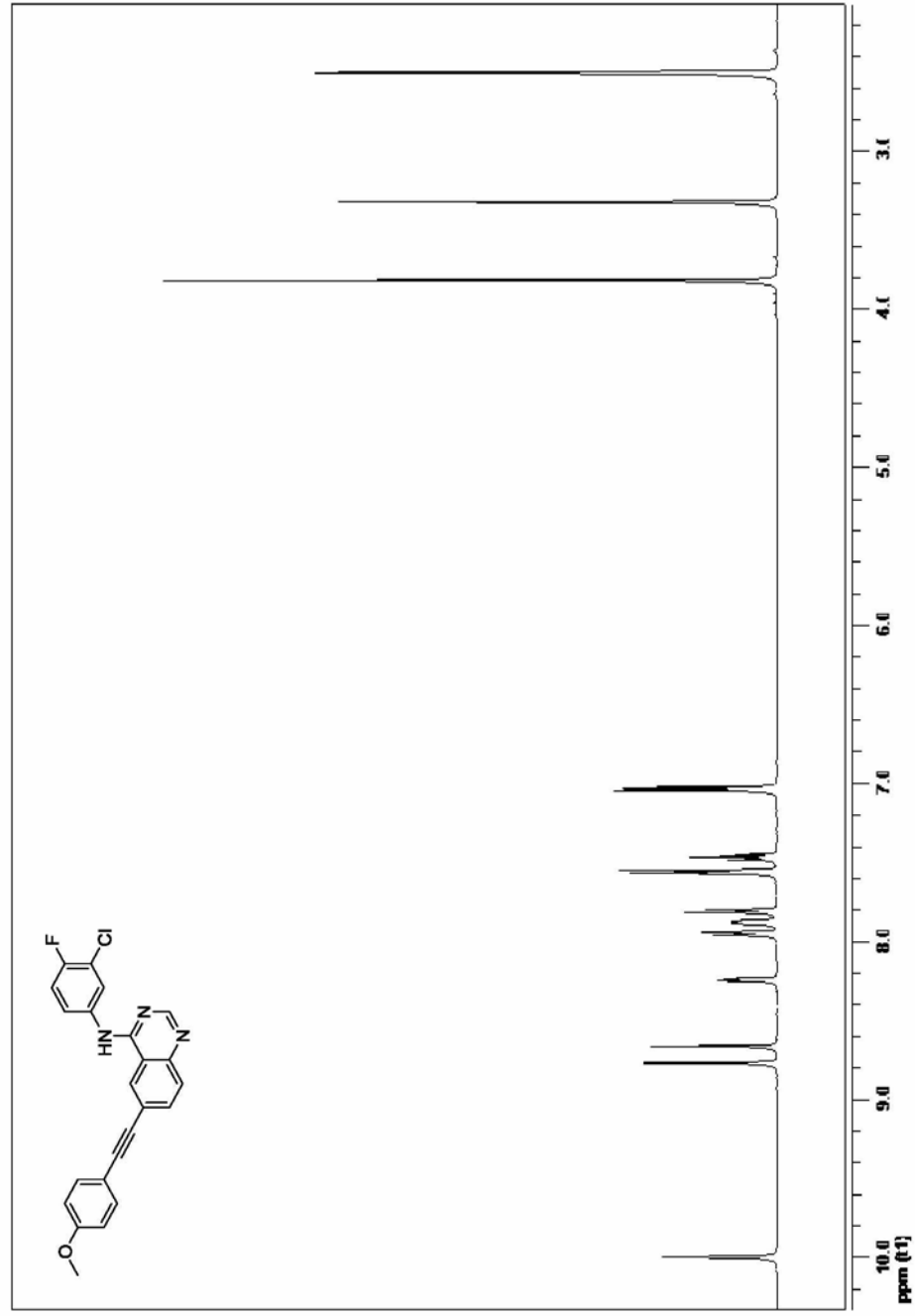
**(6a)**



**(6b)**

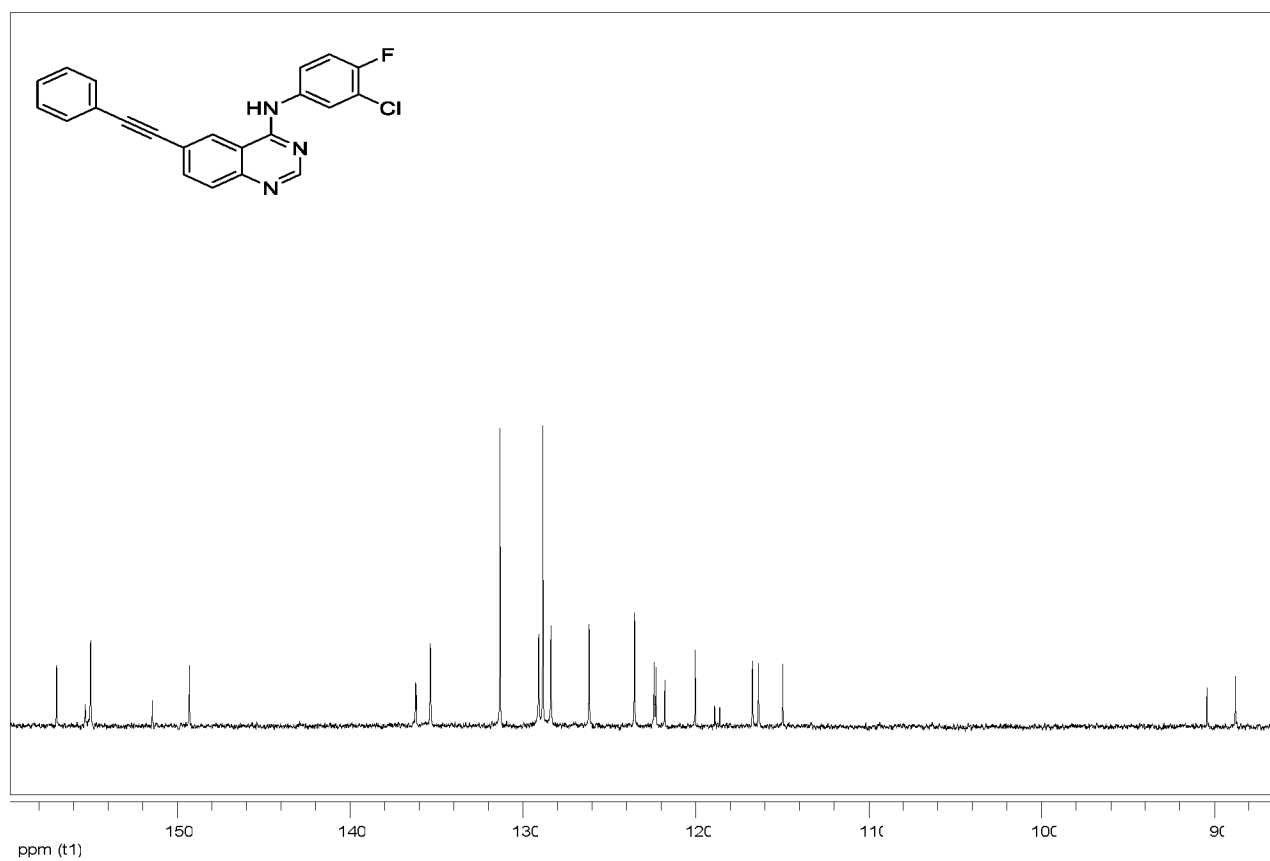


(6c)



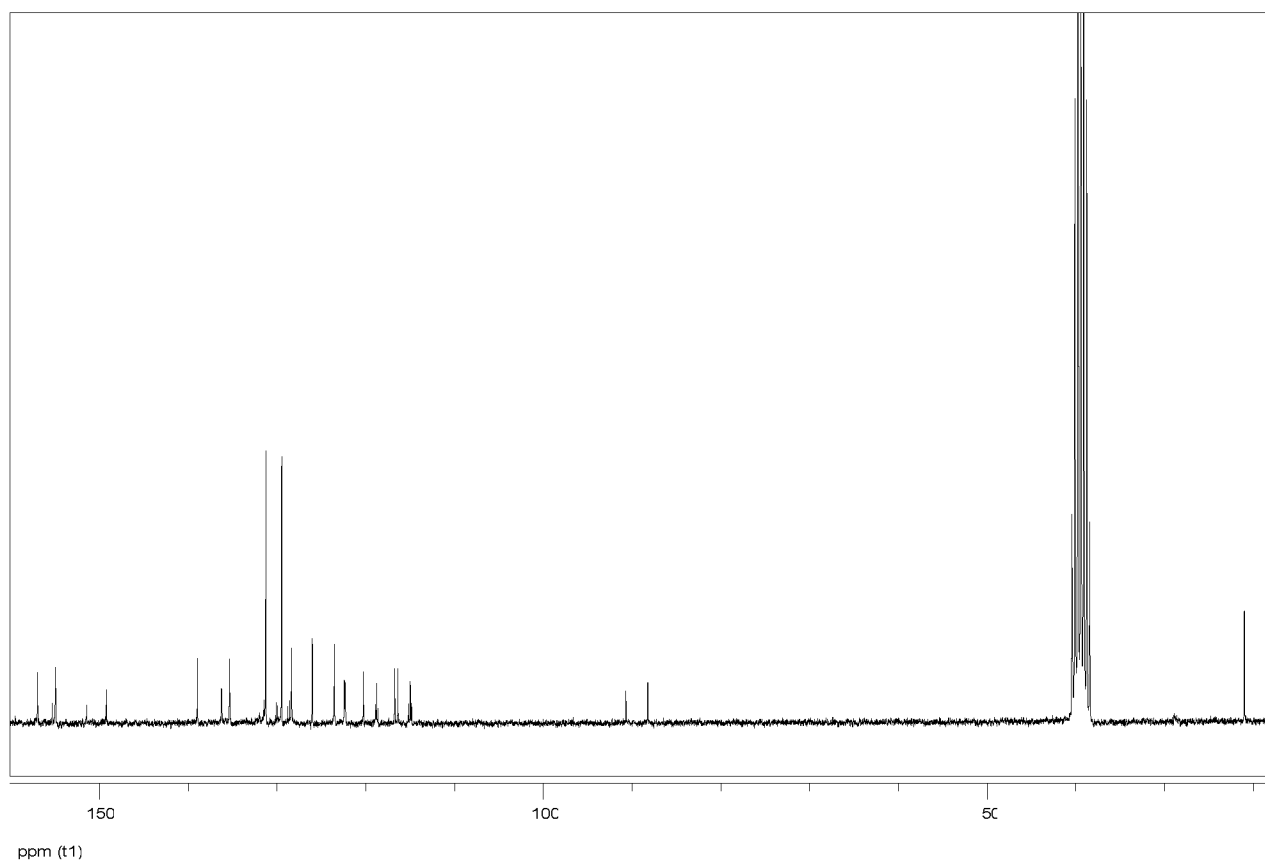
Φάσματα 13-C

**(6a)**





(6b)



## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρά πάνω πειραματική πορεία είναι μια απλή διαδικασία για την παραγωγή αυτών των ενώσεων .Σημαντική είναι η αντίδραση Sonogashira με την βοήθεια της οποίας έγιναν οι αντιδράσεις μέσα σε μικρά χρονικά διαστήματα (30-35 λεπτά). Επίσης ένα άλλο πλεονέκτημα είναι τα απλά και σύντομα στάδια τα οποία ακολουθήθηκαν και ήτανε ίδια για όλα τα προϊόντα.

Σημαντική ήτανε η συμβολή του Πανεπιστημίου Leuven του Βελγίου καθώς εκεί στάλθηκαν τα προϊόντα για να γίνει η μελέτη τους όσον αφορά την βιολογική τους αποτίμηση. Έτσι έγινε μελέτη για τις κυτταροτοξικές και αντικαρκινικές δράσεις των ενώσεων .

### Ανάλυση αποτελεσμάτων :

Compound	Concentration unit	LN-229	Capan-1	HCT-116	NCI-H460	DND-41	HL-60	K-562	Z-138
		<i>glioblastoma</i>	<i>Pancreatic adenocarcinoma</i>	<i>colorectal carcinoma</i>	<i>lung carcinoma</i>	<i>acute lymphoblastic leukemia</i>	<i>acute myeloid leukemia</i>	<i>chronic myeloid leukemia</i>	<i>non-Hodgkin lymphoma</i>
6a μM	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	μM
6b μM	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	μM
6c μM	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	μM

		Cytotoxicity		Antiviral EC50 <sub>c</sub>					
Compound	C	CC50a	Minimum cytotoxic C	Herpes simplex virus-1 (KOS)		Herpes simplex virus-2 (G)		Human Coronavirus (229E)	
				MTS	Visual CPE score	MTS	Visual CPE score	MTS	Visual CPE score
6a	μM	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-
6b	μM	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-
6c	μM	>100	-	>100	-	>100	-	>100	-

## 7. BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. (Asif, M. Chemical Characteristics, Synthetic Methods, and Biological Potential of Quinazoline and Quinazolinone Derivatives, International Journal of Medicinal Chemistry, Article ID 395637, 2014) .
2. (Morgan, G.T., ed. Abstract of Papers. Journal of the Chemical Society. London: Gurney & Jackson, 1904. Print.)
3. Asif M1. Author information Department of Pharmacy, GRD (PG) Institute of Management and Technology, Dehradun, Uttarakhand 248009, India.)
4. Herbst RS (2004). "Review of epidermal growth factor receptor biology". International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics.
5. 2 Suppl): 21–6. doi:10.1016/j.ijrobp.2003.11.041. PMID 15142631. )  
, (Zhang H, Berezov A, Wang Q, Zhang G, Drebin J, Murali R, Greene MI (August 2007). "ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer treatment". The Journal of Clinical Investigation. 117
6. Recent advances in 4-aminoquinazoline based scaffold derivatives targeting EGFR kinases as anticancer agents
7. Author links open overlay panel Rania S.M. Ismaila Nasser S.M. Ismailb Sahar Abuseriid Dalal A. Abou El Ellac
8. <https://doi.org/10.1016/j.fjps.2016.02.001>)
9. (Recent advances in 4-aminoquinazoline based scaffold derivatives targeting EGFR kinases as anticancer agents
10. Author links open overlay panel Rania S.M. Ismaila Nasser S.M. Ismailb Sahar Abuseriid Dalal A. Abou El Ellac
11. Show more <https://doi.org/10.1016/j.fjps.2016.02.001>
12. <https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%93%CE%B5%C2%B5%CF%83%CE%B9%CF%84%CE%B1%CE%B2%CE%AF%CE%BD%CE%B7> )
13. Vandetanib". AdisInsight. Retrieved 27 February 2017.
14. Definition of vandetanib". NCI Drug Dictionary. National Cancer Institute. 2011-02-02. ) , ("Vandetanib Monograph". Drugs.com. Retrieved 29 August 2012. )
15. <http://adisinsight.springer.com/drugs/800012072>
16. Source: DrugBank  
Record Name: Canertinib  
URL: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB05424>
17. Description: The DrugBank database is a unique bioinformatics and cheminformatics resource that combines detailed drug (i.e. chemical, pharmacological and pharmaceutical) data with

- comprehensive drug target (i.e. sequence, structure, and pathway information.)
18. (Recent advances in 4-aminoquinazoline based scaffold derivatives targeting EGFR kinases as anticancer agents
  19. Author links open overlay panelRania S.M. IsmailaNasser S.M. IsmailbSaharAbuseriidDalal A.Abou El Ellac )
  20. 1"Linagliptin Monograph for Professionals". Drugs.com. American Society of Health-System Pharmacists. Retrieved 6 April 2019.
  21. "Terazosin Hydrochloride Monograph for Professionals". Drugs.com. American Society of Health-System Pharmacists. Retrieved 17 March 2019.
  22. )(Harry W. Lewis and Christopher J. Moody (13 Ιουτίου 1989). Experimental Organic Chemistry: Principles and Practice (Illustrated έκδοση). WileyBlackwell. σελίδες 159–173. ISBN 978-0-632-02017-1. )
  23. A.I. Vogel, A.R. Tatchell, B.S. Furnis, A.J. Hannaford, and P.W.G. Smith. Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry (5th έκδοση). ISBN 0-582-46236-3.CS1 maint: Πολλαπλές ονομασίες: authors list (link )
  24. Βικιπαίδεια
  25. Βικιπαίδεια