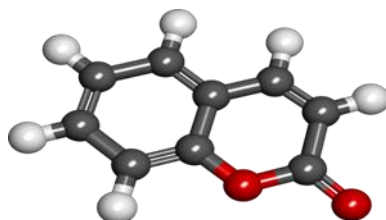




ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
Τομέας (I) Χημικών Επιστημών
Εργαστήριο Οργανικής Χημείας

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Σχεδιασμός και σύνθεση
νέων υδροξυ κουμαρινικών αναλόγων
με πιθανή αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη
και αντικαρκινική δράση**



ΚΑΒΕΤΣΟΥ ΕΛΕΝΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ:

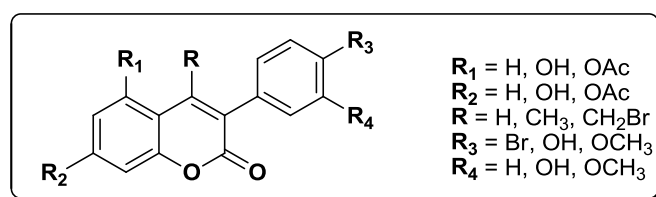
Αναστασία Δέτση,
Επικ. Καθηγήτρια ΕΜΠ

Αθήνα 2013

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της διεξαγόμενης εργασίας είναι η σύνθεση νέων υδροξυ κουμαρινικών αναλόγων και η μελέτη της πιθανής αντιοξειδωτικής, αντιφλεγμονώδους και αντικαρκινικής δράσης αυτών.

Ειδικότερα, κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας αυτής, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν ανάλογα των 5 και 7-υδροξυ-κουμαρινών που περιέχουν φαινυλο- και αλκυλο-υποκαταστάτες στις θέσεις 3 και 4 του βενζοπυρανικού δακτυλίου. Τα νέα παράγωγα, παρασκευάστηκαν μέσω αντιδράσεων συμπύκνωσης ενός φαινυλοξικού οξέος με μια κατάλληλα υποκατεστημένη 2-υδροξυ-ακετοφαινόνη σε βασικό περιβάλλον. Οι αντιδράσεις συμπύκνωσης περιελάμβαναν είτε ενεργοποίηση του φαινυλοξικού οξέος μέσω αντίδρασης χλωρίωσης του εκάστοτε οξέος, είτε σύνθεση κουμαρινών με ακετυλοξυ-υποκαταστάτη στη θέση 7 ή 5. Παρασκευάστηκαν συνολικά δεκαεννέα κουμαρινικά ανάλογα εκ των οποίων τα δώδεκα είναι νέες ενώσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν ομάδες Br ή OCH₃ σε διάφορες θέσεις του δακτυλίου της θέσης 3.

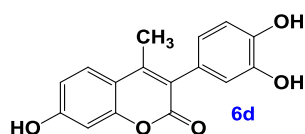


Προκειμένου, εν συνεχεία, να μελετηθούν εκτενέστερα οι σχέσεις δομής-δράσης, σχεδιάστηκαν δομικές τροποποιήσεις των νέων αναλόγων. Πραγματοποιήθηκαν αρχικά αντιδράσεις βρωμίωσης του μεθυλίου της θέσης 4 του βενζοπυρανικού δακτυλίου μέσω μηχανισμού ελευθέρων ριζών καθώς και αντιδράσεις αποπροστασίας των ακέτυλο και μεθόξυ ομάδων με κατάλληλα δομικά χαρακτηριστικά με ενδεχόμενη βιολογική δραστηριότητα.

Τα νέα αυτά παράγωγα στη συνέχεια, ελέγχθησαν ως προς την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση τους παρουσιάζοντας αξιόλογα και ενθαρρυντικά αποτελέσματα για περαιτέρω μελέτη της σχέσης δομής – βιολογικής δράσης.

Η ταυτοποίηση της δομής των νέων αυτών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπικές μεθόδους (Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού NMR και Φασματοσκοπία Μάζας ESI – MS). Τα σημαντικότερα συμπεράσματα που προέκυψαν κατά την ολοκλήρωση της ερευνητικής διαδικασίας είναι :

- Οι καλύτερες αποδόσεις και η απλή συνθετική πορεία παραγωγής των 5 και 7 υδροξυ κουμαρινών, μέσω της σύνθεσης των ακετυλοξυ-υποκαταστατών, σε σχέση με την μέθοδο σύνθεσης με τα χλωρίδια των φαινολοξικών οξέων.
- Το νέο παράγωγο **6d** εμφάνισε την καλύτερη συνδυασμένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, συγκρίσιμη ή και καλύτερη με αυτή των αντίστοιχων ενώσεων αναφοράς.



- Η αξιολόγηση της αντικαρκινικής δράσης βρίσκεται υπό εξέλιξη.

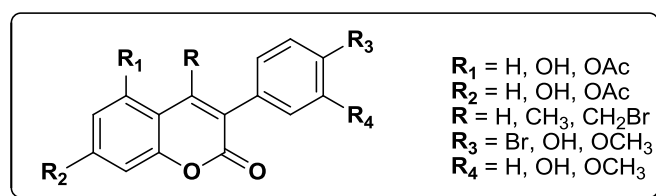
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Οργανική σύνθεση βιοδραστικών αναλόγων φυσικών προϊόντων.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: κουμαρίνες, αντιδράσεις συμπύκνωσης, αντιοξειδωτική δράση, αντιφλεγμονώδης δράση, αντικαρκινική δράση

Abstract

The aim of the current work is the synthesis of novel hydroxy coumarin analogues and study their possible antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activity.

In particular, 5 and 7-hydroxy-coumarin analogues containing phenyl and alkyl substituents at positions 3 and 4 of the benzopyran ring were designed and synthesized. The novel derivatives were prepared by condensation reactions of a phenylacetic acid or with an appropriately substituted 2-hydroxyacetophenone in a basic environment. Nineteen coumarin analogues were prepared in total among which twelve are new compounds which contain Br or OCH₃ groups in various positions of the aromatic moiety of position 3.



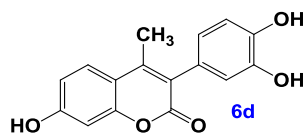
In order to obtain a better insight in the structure-activity relationships of the new compounds, structural modifications of new analogues were designed. Originally we performed bromination reactions on the methyl group on position 4 of the benzopyran ring via free radical mechanism and deprotection reactions of the methoxy and acetyl groups.

The new derivatives were then tested for their antioxidant and anti-inflammatory activity. The results indicate that a number of the studied molecules possess promising combined activity.

The identification of the structure of the novel compounds was performed by spectroscopic methods (NMR spectroscopy and Mass spectroscopy ESI - MS). The major conclusions can be summarized as:

- The best yields and simple synthetic route output 5 and 7 hydroxy coumarins, were succeeded via the acetyloxy-substituents, compared with the method of the synthesis of phenylacetic acid chlorides.

- Compound **6d** was found to possess the best combined antioxidant and anti-inflammatory activity, comparable with the activity of the reference drugs respectively.



- The study of anticancer activity of the compounds is currently underway.

SCIENTIFIC AREA: Organic synthesis of bioactive analogs of natural products.

KEYWORDS coumarins, condensation reactions, antioxidant, anti-inflammatory activity, anticancer activity

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου κατά το ακαδημαϊκό έτος 2012-2013, υπό την επίβλεψη της Επίκουρου Καθηγήτριας Αναστασίας Δέτση.

Για την ολοκλήρωση της παρούσας ερευνητικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Την υπεύθυνη καθηγήτρια κα Α. Δέτση για την εμπιστοσύνη της και την ουσιαστική βοήθεια της στην συγγραφή της εργασίας, τις συμβουλές και την καθοδήγησή της σε εργαστηριακό και γνωστικό επίπεδο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτωρα στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Μαρίνα Ρουσσάκη, για την συνεχή βοήθεια σε κάθε προκύπτον ζήτημα, για την λήψη και αποτίμηση των φασμάτων NMR και για την ουσιαστική συνεισφορά της στην συγγραφή της διπλωματικής εργασίας. Η συμβολή της ήταν καθοριστική και προσοδοφόρα. Την Ανδρομάχη Τζάνη, υποψήφια διδάκτωρα στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας, για την άψογη συνεργασία.

Τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, την Αναπληρώτρια καθηγήτρια κα Ε.Παυλάτου και τον Λέκτορα κ. Ε.Τόπακα για την τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν στην εξεταστική επιτροπή καθώς και για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Την Καθηγήτρια Δήμητρα Χατζηπαύλου – Λίτινα, στον Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτέλειου Πανεπιστήμιου Θεσσαλονίκης, για την διεξαγωγή των *in vitro* βιοδοκιμασιών για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσεις των νέων παραγώγων.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την στήριξή τους όλη αυτή την χρονική περίοδο.

Πίνακας Περιεχομένων

	Κεφάλαιο 1^ο	
	Φυσικά και συνθετικά προϊόντα με αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση:κουμαρίνες	
1.1	Φυσικά προϊόντα	14
1.2	Κουμαρίνες (2 <i>H</i> -chromen-2-one)	15
	1.2.1 Ορισμός-Ονομασία	15
	1.2.2 Χημειο-ταξινόμηση	16
	1.2.3 Βιοσύνθεση της κουμαρίνης	18
	1.2.4 Ταξινόμηση Φυσικών Κουμαρινών	20
1.3	Βιολογική δράση φυσικών και συνθετικών κουμαρινών	22
	1.3.1 Αντικαρκινική Δράση	22
	1.3.2 Αντιοξειδωτική Δράση	26
	1.3.3. Αντιφλεγμονώδης-Αναλγητική Δράση	27
	1.3.4 Αντιθρομβωτική-Καρδιαγγειακή Δράση	29
	1.3.5 Αντι-HIV Δράση	30
1.4	Κυριότερες μέθοδοι σύνθεσης κουμαρινών	31
	1.4.1 Αντίδραση Perkin	32
	1.4.2 Μέθοδος Pechmann	33
	1.4.3 Μέθοδος Knoevenagel	34
	1.4.4 Αντίδραση Witting	34
	1.4.5 Αντίδραση Reformatsky	35
	1.4.6 Προσθήκη Michael	36
	1.4.7 Αντίδραση Vilsmeier-Haack	36
1.5	Ανάλογα 7-υδροξυ κουμαρινών: σύνθεση και βιοδραστικότητα	37
	1.5.1 Η σύνθεση της 7 υδροξυ-4-μεθοξυ-κουμαρίνη με την μέθοδο Pechmann.	37
	Κεφάλαιο 2^ο	
	Σχεδιασμός, σύνθεση, ταυτοποίηση και αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των νέων ενώσεων	
2.1	Σχεδιασμός των νέων παραγώγων	39
2.2	Σύνθεση και χαρακτηρισμός των νέων μορίων	43
	2.2.1 Γενική Μέθοδος A - Σύνθεση 3-αρυλο-7-υδροξυ και 3-αρυλο-5-υδροξυ κουμαρινών 4a-4g	43
	2.2.2 Βελτιστοποίηση συνθηκών αντίδρασης συμπύκνωσης	45
	2.2.3 Γενική Μέθοδος B – Σύνθεση 3-αρυλο-7-υδροξυ και 3-αρυλο-5-υδροξυ κουμαρινών 4a-4g μέσω των αντίστοιχων ακετυλιωμένων αναλόγων	45
	2.2.4 Σύνθεση 7-υδροξυ-και 5-υδροξυ-3-αρυλο- κουμαρινών	46
2.3	Δομικές τροποποιήσεις	47
	2.3.1 Σύνθεση υδροξυλιωμένων 3-αρυλο-κουμαρινών	47
	2.3.2 Αντιδράσεις βρωμίωσης	48
2.4	Φασματοσκοπική Μελέτη	49
2.5	Αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των νέων ενώσεων	56
	2.5.1 Μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης μέσω του προσδιορισμού της ικανότητας αναστολής της δράσης του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια.	56

	2.5.1.1 Ταξινόμηση των αναστολέων της 5-LO.	57
	2.5.1.2 Παραδείγματα μορίων με αντιφλεγμονώδη δράση.	58
	2.5.2 Αντιοξειδωτική Δράση των νέων ενώσεων.	60
	2.5.2.1 Ικανότητα δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH.	60
	2.5.2.2 Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης.	61
	Κεφάλαιο 3^ο	
3.1	Πειραματικό Μέρος	65
	3.1.1 Όργανα και συσκευές	65
	3.1.2 Συνθετική Πορεία των νέων ενώσεων	66
3.2	Προσδιορισμός της ικανότητας αναστολής του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια	79
3.3	Προσδιορισμός της ικανότητας δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH.	79
3.4	Υπολογισμός της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH).	79
	Κεφάλαιο 4^ο	
4.1	Αποτελέσματα και Συζήτηση	81
4.2	Συμπεράσματα	84
4.3	Προτάσεις για μελλοντική έρευνα	86
	Βιβλιογραφία	87
	Παράρτημα Φασμάτων	91

Ευρετήριο σημάτων

Σχήμα 1: Γενική δομή κουμαρινών	σελ. 15
Σχήμα 2: Κουμαρίνη 1, η μητρική ένωση των κουμαρινών.....	σελ. 20
Σχήμα 3: Το ψωραλλένιο, η αγγελικίνη και ο φουρανικός δακτύλιος.....	σελ.20
Σχήμα 4: Οι δύο χαρακτηριστικές πυρανοκουμαρίνες.....	σελ.21
Σχήμα 5: Υποκατεστημένες στον πυρονικό δακτύλιο κουμαρίνες.....	σελ. 21
Σχήμα 6: Γενική δομή φλαβονειδών και κουμαρινών.....	σελ. 22
Σχήμα 7: Η δομή της 6,7-διμέθυλοκουμαρίνης.....	σελ. 23
Σχήμα 8: Φθορίζοντα κουμαρινικά παράγωγα με αντικαρκινική δράση.....	σελ. 23
Σχήμα 9: Κουμαρινο-3-(N-αρυλο)-σουλφοναμίδια με αντικαρκινική δράση....	σελ.24
Σχήμα 10: Κουμαρινικά παράγωγα με αντιοξειδωτική δράση.....	σελ. 26
Σχήμα 11α: Παραδείγματα κουμαρινών με αντιφλεγμονώδη δράση.....	σελ. 28
Σχήμα 11β: Κουμαρινικά παράγωγα με αντιφλεγμονώδη δράση.....	σελ. 28
Σχήμα 11γ: Κουμαρινικά παράγωγα που αναστέλλουν το οίδημα της καραγεννίνης..	σελ. 29
Σχήμα 12: Η δομή της δικουμαρόλης.....	σελ. 30
Σχήμα 13: Δομή βαρφαρίνης.....	σελ. 30
Σχήμα 14: Διάφορα κουμαρινικά παράγωγα, αναστολείς της HIV-πρωτεάσης.....	σελ. 31
Σχήμα 15: Στάδια της αντίδρασης Perkin.....	σελ. 32
Σχήμα 16: Στάδια της αντίδρασης Pechmann.....	σελ. 33
Σχήμα 17: Αντίδραση Knoevenagel.....	σελ. 34
Σχήμα 18: Αντίδραση Wittig.....	σελ. 35
Σχήμα 19: Αντίδραση Reformatsky.....	σελ. 35
Σχήμα 20: Εναλλακτική συμπύκνωση με προσθήκη Michael.....	σελ. 36
Σχήμα 21: Σύνθεση 3,4-υποκατεστημένων κουμαρινών.....	σελ. 37
Σχήμα 22: Η δομή της 7-υδροξυ-6-μεθοξυκουμαρίνης.....	σελ. 37

Σχήμα 23: Υδροξυ υποκατεστημένες κουμαρίνες.....	σελ. 38
Σχήμα 24: Κουμαρινικά ανάλογα με αξιολογη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.....	σελ. 39
Σχήμα 25: 7-υδροξυ-κουμαρινικά παράγωγα της σειράς Α.....	σελ. 40
Σχήμα 26: 5-υδροξυ-κουμαρινικά παράγωγα της σειράς Β.....	σελ. 41
Σχήμα 27: 7-ακετυλοξυ-3-αρυλο- και 5-ακετυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρίνες της σειράς Γ.....	σελ. 42
Σχήμα 28: Υδροξυλιωμένες 3-αρυλο-κουμαρίνες της σειράς Δ.....	σελ. 42
Σχήμα 29: Βρωμιωμένα παράγωγα της σειράς Ε.....	σελ. 43
Σχήμα 30: Συνθετική πορεία 3-αρυλο-7-υδροξυ και 3-αρυλο-5-υδροξυ κουμαρινών 4a-4g	σελ. 43
Σχήμα 31: Χλωρίωση φαινυλοξικών οξέων.....	σελ. 44
Σχήμα 32: Αναλυτικός μηχανισμός της αντίδρασης συμπύκνωσης	σελ. 44
Σχήμα 33: Αντίδραση σύνθεσης 7-ακετυλοξυ-3-αρυλο- και 5-ακετυλοξυ-3-αρυλο κουμαρινών 5a-5e	σελ. 46
Σχήμα 34: Αντίδραση σύνθεσης απακετυλιωμένων κουμαρινών.....	σελ. 46
Σχήμα 35: Αντίδραση αποπροστασίας κουμαρινών.....	σελ. 47
Σχήμα 36: Μηχανισμός αντίδρασης αποπροστασίας.....	σελ. 48
Σχήμα 37: Αντίδραση βρωμίωσης των κουμαρινών (Σειρά Ε).....	σελ. 48
Σχήμα 38: Κατάλυση του αραχιδονικού οξέος προς σχηματισμό λευκοτριενίων με τη βοήθεια της 5-λιποξυγονάσης 5-LO.....	σελ. 56
Σχήμα 39: Οξειδοαναγωγικοί αναστολείς της 5-LO.....	σελ. 59
Σχήμα 40: Αναστολείς της 5-LO που συμπλοκοποιούν το σίδηρο.....	σελ. 59
Σχήμα 41: Αναστολείς μη οξειδοαναγωγικού τύπου.....	σελ. 60

Σχήμα 42: Δομή Λικοφελόνης.....	σελ. 60
Σχήμα 43: Ουσία που αναστέλλει την πρωτεΐνη FLAP.....	σελ. 60
Σχήμα 44: DPPH (πάνω) και η δράση του, R:ρίζα, A:αντιοξειδωτικό.....	σελ. 61
Σχήμα 45: Μηχανισμός λιπιδικής υπεροξειδωσης.....	σελ. 62
Σχήμα 46: Εκκινητής ελευθέρων ριζών.....	σελ. 63
Σχήμα 47: Δόμη NDGA.....	σελ. 63
Σχήμα 48: Δομή Trolox.....	σελ. 63
Σχήμα 49: Η δομή της κουμαρίνης με την καλύτερη συνδυασμένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.....	σελ. 85

Ευρετήριο εικόνων

Εικόνα 1: Φυτά από τα οποία απομονώνονται κουμαρινικά ανάλογα.....	σελ. 16
Εικόνα 2: Οικογένειες φυτών που περιέχουν κουμαρίνη.....	σελ. 17
Εικόνα 3: Διάφορα βότανα που περιέχουν κουμαρίνες.....	σελ. 18
Εικόνα 4: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 4b	σελ. 49
Εικόνα 5: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 4b	σελ. 50
Εικόνα 6: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 4f	σελ. 51
Εικόνα 7: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 4f	σελ. 51
Εικόνα 8: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 5c	σελ. 52
Εικόνα 9: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 5c	σελ. 53
Εικόνα 10: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 6d	σελ. 53

Εικόνα 11: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 6d	σελ. 54
Εικόνα 12: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) της κουμαρίνης 7b	σελ. 55
Εικόνα 13: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (300MHz, CDCl_3) της κουμαρίνης 7b	σελ. 55
Εικόνες παραρτήματος	
Εικόνα 14: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 4b	σελ. 91
Εικόνα 15: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 4b	σελ. 91
Εικόνα 16: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 4f	σελ. 92
Εικόνα 17: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 4f	σελ. 92
Εικόνα 18: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 4a	σελ. 93
Εικόνα 19: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 4a	σελ. 93
Εικόνα 20: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 4e	σελ. 94
Εικόνα 21: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 4e	σελ. 94
Εικόνα 22: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 4c	σελ. 95
Εικόνα 23: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 4c	σελ. 95

Εικόνα 24: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 4g	σελ. 96
Εικόνα 25: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 4g	σελ. 96
Εικόνα 26: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 6d	σελ. 97
Εικόνα 27: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 6d	σελ. 97
Εικόνα 28: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 6a	σελ. 98
Εικόνα 29: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 6a	σελ. 98
Εικόνα 30: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) της κουμαρίνης 5e	σελ. 99
Εικόνα 31: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) της κουμαρίνης 5e	σελ. 99
Εικόνα 32: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 5d	σελ. 100
Εικόνα 33: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης 5d	σελ. 100
Εικόνα 34: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) της κουμαρίνης 5b	σελ. 101
Εικόνα 35: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) της κουμαρίνης 5b	σελ. 101
Εικόνα 36: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) της κουμαρίνης 5a	σελ. 102

Εικόνα 37: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) της κουμαρίνης	
5a	σελ. 102
Εικόνα 38: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης	
5c	σελ. 103
Εικόνα 39: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης	
5c	σελ. 103
Εικόνα 40: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης	
4d	σελ. 104
Εικόνα 41: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης	
4d	σελ. 104
Εικόνα 42: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) της κουμαρίνης	
7b	σελ. 105
Εικόνα 43: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (300MHz, CDCl_3) της κουμαρίνης	
7b	σελ. 105
Εικόνα 44: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης	
6e	σελ. 106
Εικόνα 45: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης	
6e	σελ. 106
Εικόνα 46: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, CD_3OD) της κουμαρίνης	
6c	σελ. 107
Εικόνα 47: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) της κουμαρίνης	
7a	σελ. 108

Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 1. Μελέτη συνθηκών αντίδρασης συμπύκνωσης..... σελ. 45

Πίνακας 2. Αποτελέσματα της *in vitro* αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης των νέων μορίων.....σελ. 80

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

Φυσικά και συνθετικά προϊόντα με αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση: κουμαρίνες

1.1. Φυσικά Προϊόντα

Η φύση ως μια πλούσια πηγή φυσικών προϊόντων, έχει προκαλέσει το ζωηρό ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας εδώ και δεκαετίες, για το άνοιγμα νέων δρόμων στην παραγωγή φαρμάκων μέσω της έρευνας των φαρμακολογικών ιδιοτήτων των φυτών. Είναι ιστορικά αλλά και επιστημονικά επιβεβαιωμένο πως εδώ και αιώνες η ανθρωπότητα κατέφευγε στην παραδοσιακή ιατρική προκειμένου να αντιμετωπίσει προβλήματα υγείας, με ένα σημαντικό ποσοστό του παγκόσμιου πληθυσμού να εκμεταλλεύεται ακόμα και σήμερα τα οφέλη της.

Ως φυσικά προϊόντα αναφέρονται οι ενώσεις που παράγονται από φυτικούς ή ζωικούς οργανισμούς. Από άποψη δομής, καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα οργανικών ενώσεων και κατατάσσονται σε κατηγορίες με βάση ορισμένα δομικά χαρακτηριστικά τους (στεροειδή, αλκαλοειδή), τη φυσιολογική τους δράση (αντιβιοτικά, βιταμίνες, ορμόνες), την πηγή από την οποία προκύπτουν καθώς και τη βιοσυνθετική τους πορεία. Τα φυσικά προϊόντα συντίθενται από τη φύση με σκοπό να επιτελέσουν συγκεκριμένες διαδικασίες με επιλεκτικό αλλά και ιδιαίτερα αποτελεσματικό τρόπο, αποτελώντας σημαντικότερη πηγή για την εύρεση και ανάπτυξη νέων φαρμάκων.

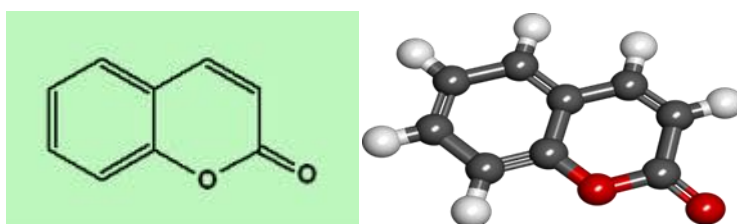
Κατά τη διάρκεια του 20^{ου} αιώνα ξεκίνησε ως πρώτο βήμα της έρευνας, η συστηματοποίηση της εμπειρικής γνώσης για τις φαρμακολογικές ιδιότητες των φυσικών ενώσεων με την εισαγωγή τεχνικών διαχωρισμού, καθαρισμού και ανάλυσης να καθιστά εφικτές αυτές τις μελέτες. Η αποτελεσματικότητα των φυτικών φαρμάκων τροφοδοτεί ακόμα και σήμερα το ενδιαφέρον των ερευνητών για τη σύνθεση νέων σκευασμάτων, πραγματοποιώντας σημαντική και εντατική έρευνα τις τελευταίες δεκαετίες στον τομέα αυτό.

Από τον συνολικό αριθμό των φυσικών προϊόντων που μελετώνται ετήσια και τα οποία επιδεικνύουν κάποια αξιοσημείωτη βιολογική δραστηριότητα, ένα ελάχιστο ποσοστό (περίπου το 5% του συνόλου του φυτικού βασιλείου) είναι αυτό που θα χρησιμοποιηθεί τελικά για φαρμακευτικούς σκοπούς. Η εξέλιξη επομένως της χημείας έχει δώσει μεγάλη ώθηση στην φαρμακολογική έρευνα, με την ανάπτυξη

νέων συνθετικών μεθοδολογιών και τη βελτιστοποίηση των ήδη υπάρχουσών, καθιστώντας δυνατή τη σύνθεση ολοένα μεγαλύτερου αριθμού φαρμακευτικών προϊόντων.

1.2 Κουμαρίνες (2H-chromen-2-one)

Οι κουμαρίνες ή αλλιώς βενζο-α-πυρόνες είναι ετεροκυκλικές οργανικές ενώσεις με δυο εξαμελείς δακτυλίους, ένα άτομο οξυγόνου και ένα γειτονικό σε αυτό καρβονύλιο στην κύρια αλυσίδα (Σχήμα 1).



Σχήμα 1: Γενική δομή κουμαρινών.

1.2.1 Ορισμός-Ονομασία

Με το όνομα κουμαρίνη, χαρακτηρίζεται η ένωση η οποία προκύπτει από τη συμπύκνωση ενός βενζολικού δακτυλίου με την [e] πλευρά μιας α-πυρόνης. Επίσης, είναι γνωστή με διάφορες ονομασίες όπως 2-οξο-1,2-βενζοπυράνιο, 5,6-βενζο-α-πυρόνη, 5,6-βενζο-2-πυρόνη, 1,2-βενζοπυρόνη, 2H-1-βενζοπυραν-2-όνη, λακτόνη του *cis,cis,cis*-ο-κουμαρινικού οξέος, 2H-βενζο[b]-πυραν-2-όνη, κουμαρινικός ανυδρίτης και 2H-χρωμεν-2-όνη.

Κουμαρινικά παράγωγα απαντούν ευρύτατα στο φυτικό βασίλειο, τόσο σε ελεύθερη κατάσταση όσο και ως δευτερογενείς μεταβολίτες. Αφθονούν κυρίως στα χόρτα (προσδίδουν τη χαρακτηριστική οσμή στο κομμένο γρασίδι) και ιδιαίτερα στο λευκό τριφύλλι, στις ορχιδέες, στα όσπρια και στα φύλλα των εσπεριδοειδών.

Πολλά παράγωγα της οικογένειας των κουμαρινών έχουν απομονωθεί από εκατοντάδες είδη φυτών και μικροοργανισμών και έχουν ονόματα που προέρχονται από το λατινικό όνομα ή την κοινή ονομασία του φυτού από το οποίο ανακαλύφθηκαν ή από το μέρος που ευδοκίμει το φυτό αυτό. Ανάλογα κουμαρινών έχουν απομονωθεί μεταξύ άλλων, από τα φυτά *Anthoxanthum odoratum*(a), *Melilotus officinalis*(b), *Dipterix oppositifolia* και *Dipterix oppositifoli*(c) (Εικόνα 1). Τα

παράγωγα αυτά παρουσιάζουν ποικίλες εφαρμογές καθώς χρησιμοποιούνται ως χρωστικές ουσίες σε λάμπες φθορισμού, ως αισθητήρες φθορισμού, ως λέιζερ, αλλά και σε διάφορα είδη βαφών.



a

b



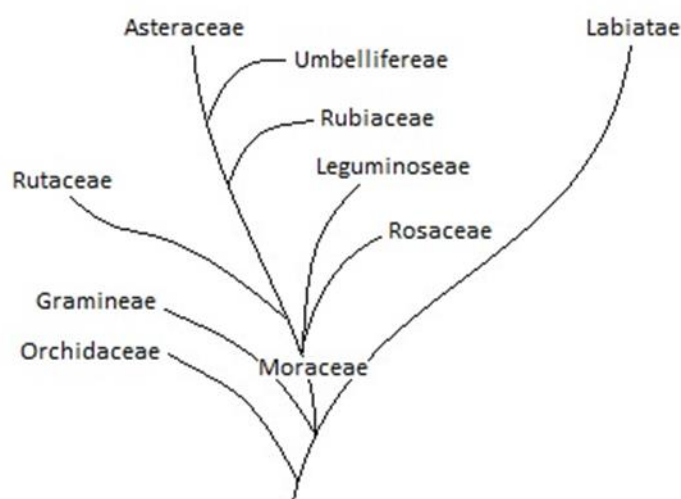
c

Εικόνα 1: Φυτά από τα οποία απομονώνονται κουμαρινικά ανάλογα.

1.2.2 Χημειο-ταξινόμηση

Τις τελευταίες δεκαετίες έγιναν προσπάθειες για να συντεθεί ένα "γεναιολογικό δέντρο" των φυτών και των ειδών που θεωρείται ότι περιέχουν κουμαρίνη και κουμαρινικά παράγωγα, ως δευτερογενή προϊόντα τους (Εικόνα 2). Στην εικόνα 2 παρουσιάζεται μια απλοποιημένη εκδοχή του "οικογενειακού δέντρου" των φυτών αυτών. Η κουμαρίνη μπορεί να βρίσκεται στα φυτά ελεύθερη ή σε γλυκοζιτική μορφή. Τα τελευταία ευρήματα επιβεβαίωσαν την περιγραφή αυτή του δέντρου για την κουμαρίνη και τα κουμαρινικά παράγωγα. Σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει από διάφορους ερευνητές σχετικά με την χημειο ταξινόμηση των φυτών, δημιουργήθηκε εξελιγμένο πρόγραμμα. Μέσω αυτού του προγράμματος

επιτυγχάνεται η κατηγοριοποίηση των φυσικών ενώσεων οι οποίες ταξινομούνται με βάση την οικογένεια, το είδος καθώς και το γένος του φυτού. Μέχρι σήμερα, έχουν φυσικώς απαντώμενα κουμαρίνες έχουν απομονωθεί από πάνω από 800 είδη φυτών και μικροοργανισμών, και πάνω από 1.000 παράγωγα κουμαρίνης έχουν περιγραφεί.



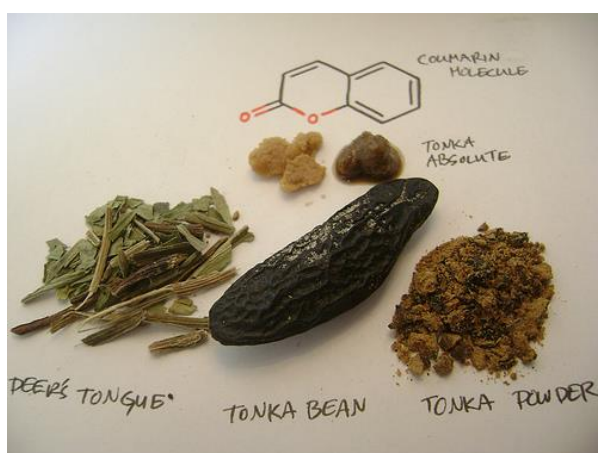
Εικόνα 2: Οικογένειες φυτών που περιέχουν κουμαρίνη.

Οι κουμαρίνες έχουν βρεθεί ελεύθερες ή ως ετεροζίτες σε πολλές οικογένειες δικοτυλήδων. Χαρακτηριστικά αναφέρονται οι οικογένειες των Apiaceae (*Ammi majus*), Asteraceae (*Trilisa odoratissima*), Fabiaceae (*Melilotus officinalis*), Rosaceae (*Prunus mahaleb* L., που είναι γνωστή ως εργοστάσιο κουμαρίνης), Rubiaceae (*Asperula odorata*), Rutaceae (*Ruta graveolens*). Πολλά μονοκοτυλήδονα φυτά, ειδικά το Gramineae και ορχιδέες, περιέχουν επίσης μεγάλες ποσότητες κουμαρινών. Όσο αφορά την απομόνωση τους υπάρχουν διάφορες μέθοδοι. Συγκεκριμένα, οι ενώσεις που βρίσκονται στα διάφορα μέρη των φυτών συμπεριλαμβανομένων του κορμού, των βλαστών, των φύλλων, των ανθών, των καρπών και των σπόρων, μπορούν να απομονωθούν με εκχύλιση, με χρήση κατάλληλων διαλυτών. Η κουμαρίνη και η διυδροκουμαρίνη συχνά απομονώνονται με την διαδικασία της απόσταξης με ατμό.

Τα διάφορα είδη των βιολογικών κουμαρινών όπως αποδείχτηκε κατηγοριοποιούνται σε κατηγορίες φυτών ανάλογα και με την δράση τους. Συγκεκριμένα η κατηγοριοποίηση σχετίζεται με την ικανότητα που έχουν τα φυτά να αναστέλλουν

την ανάπτυξη και την sporίωση των φυτικών παθογόνων μυκήτων καθώς και άλλων ασθενειών. Η συσσώρευση των κουμαρινών στα χόρτα και στις ορχιδέες αποτρέπει διάφορες λοιμώξεις. Ενώ η ασθένεια *Melilotus Infesta* αποφεύγεται λόγω της παρουσίας υψηλών συγκεντρώσεων κουμαρίνης και κουμαρινικών παραγώγων. Οι κουμαρίνη και τα κουμαρινικά παράγωγα που βρίσκονται συνήθως στο χορτάρι, στο καλαμπόκι και σε κτηνοτροφικά φυτά, φαίνεται πως δρουν ως απωθητικά κατά των σκαθαριών και άλλων χερσαίων ασπόνδυλων. Οι κουμαρίνες μπορούν επίσης να δράσουν απέναντι σε τραυματικές βλάβες που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας του μαρασμού. Η αυξημένη παραγωγή φαινυλαλανίνης είναι αυτή που εμπλέκεται άμεσα στην υπερευαισθησία των φυτών σε ιούς. (1)

Βότανα που περιέχουν κουμαρίνες είναι ο Μελιλότος (*Melilotus officinalis*), η Φλαμουριά (*Fraxinus excelsior*), το Αγριοράδικο (*Taraxacum officinalis*) και άλλα.



Εικόνα 3: Διάφορα βότανα που περιέχουν κουμαρίνες.

1.2.3 Βιοσύνθεση της κουμαρίνης

Η βιοσύνθεση του κουμαρινικού δακτυλίου, ως αρχικό στάδιο έχει τον σχηματισμό του ετεροκυκλικού δακτυλίου από ένα ο-υδροξυλιωμένο κινναμωμικό οξύ. Το υδροξυλιωμένο κινναμωμικό οξύ παράγεται από την shikimic-φαινυλαλανίνη που αποτελεί το κοινό ενδιάμεσο με την βιοσύνθεση της κουμαρίνης στα ανώτερα φυτά. Επίσης μπορεί να παραχθεί και από πολυκετίδιο στους μικροοργανισμούς. Έτσι η βιοσύνθεση της κουμαρίνης μέσω του υδρόξυ κινναμωμικού οξέος περιγράφεται ως η μεταβολική αλληλουχία που οδηγεί από τον αρωματικό αμινοξύ L-φαινυλαλανίνη σε διάφορα κινναμικά οξέα με υποκατεστημένους δακτυλίους. Τα οξέα αυτά χαρακτηρίζονται από μια ελεύθερη φαινολική ομάδα υδροξυλίου στην *πάρα* θέση.

Στην βιοσύνθεση των πολυάριθμων 7-υδροξυλιωμένων κουμαρινών το πρώτο βήμα είναι η μετατροπή του *trans*-κινναμωμικού οξέος σε *trans-p*-κουμαρικό οξύ. Οι 7-υδροξυ-κουμαρίνες παράγονται από το *p*-κουμαρικό οξύ. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι οι περισσότερες βιολογικά δραστικές κουμαρίνες διαθέτουν ένα 7 υδροξύ κουμαρινικό τμήμα.

Χορηγώντας κινναμωμικό οξύ σε καλλιέργειες *Melilotus alba*, που περιέχουν κουμαρίνη, σχηματίζεται *cis-trans* ισομερές από την δράση του κινναμωμικού οξέος. Αρχικά, το *o*-κουμαρικό οξύ οδηγεί σε **γλυκοζίτη κουμαρικού οξέος**. Εν συνεχεία αυτό υδρολύεται σε *cis-o*-κουμαρικό οξύ και αυτό με την σειρά του κυκλοποιείται αυθόρμητα σε κουμαρίνη. Τα κινναμωμικά οξέα που παράγονται με αυτό τον τρόπο αποτελούν σημαντικά ενδιάμεσα για την βιοσύνθεση μιας πληθώρας φαινολικών φυσικών προϊόντων όχι μόνο ως τελικά προϊόντα του γενικού φαινυλοπροπανοειδούς μεταβολισμού, αλλά και ως τα πιο κεντρικά ενδιάμεσα ολόκληρου του μεταβολισμού των φυτών.

Έχει αποδειχθεί ότι τα παράγωγα της κουμαρίνης αποτελούν ίχνη του μεταβολισμού της φαινυλανανίνης. Από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί αποδείχτηκε η παρουσία σε ανθρώπινα φυσιολογικά ούρα, ιχνών ουμπελλιφερόνης, aesculetin, φερουλικό οξύ, καφεϊκού οξέος, *π*-υδροξυφαινολυκού οξέος και κυνουρενίνης. Εν αντιθέσει με παθολογικά ούρα, όπως ούρα ατόμων που πάσχουν από καρκίνο ή λευχαιμία, τα οποία μετά από επεξεργασία με πρεδνιζόνη, έδειξαν εκπληκτικά υψηλό περιεχόμενο ουμπελλιφερόνης - aesculetin. Επιπλέον ασθενείς που πάσχουν από φαινυλκετονουρία παρουσίασαν αύξηση έξι έως επτά φορές πάνω από τα κανονικά επίπεδα.

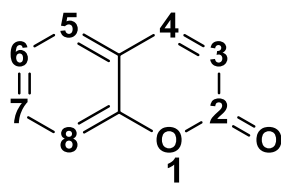
Έγιναν προσπάθειες βελτίωσης της ευαισθησίας της μεθόδου δοκιμής της κουμαρίνης στο αίμα και στο πλάσμα στην περιοχή του picogram. Παρατηρήθηκαν κανονικά επίπεδα κουμαρίνης (περίπου 2 ng / ml) παρά την υποβολή σε δίαιτα από κουμαρίνη κατά την διάρκεια της μελέτης. Συμπερασματικά διατυπώθηκε πως η βιοσύνθεση της κουμαρίνης μέσω φαινυλαλανίνης δεν είναι αδύνατη. (1)

1.2.4 Ταξινόμηση Φυσικών Κουμαρινών

Οι κουμαρίνες που βρίσκονται στη φύση, θα μπορούσαν να ταξινομηθούν στις ακόλουθες πολύ γενικές κατηγορίες:

α. Απλές Κουμαρίνες

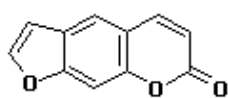
Μέλη της κατηγορίας αυτής αποτελούν η κουμαρίνη 1 (Σχήμα 2) , τα υδροξυ-, αλκοξυ- και αλκυλο-υποκατεστημένα (στο βενζολικό δακτύλιο) παράγωγά της, καθώς και οι αντίστοιχοι γλυκοζίτες τους. (1)



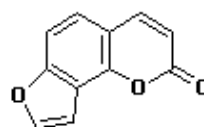
Σχήμα 2: Κουμαρίνη 1, η μητρική ένωση των κουμαρινών.

β. Φουρονοκουμαρίνες

Οι ενώσεις της κατηγορίας αυτής περιέχουν ένα φουρανικό δακτύλιο συμπυκνωμένο στο βενζολικό δακτύλιο. Τα περισσότερα μέλη αυτής της ομάδας είναι παράγωγα της κουμαρίνης γραμμικού τύπου ψωραλλένιο ή της πιο σταθερής ισομερούς ένωσής της, γωνιακού τύπου αγγελικίνη. Οι όροι γραμμικός και γωνιακός αναφέρονται στον προσανατολισμό του φουρανικού δακτυλίου σε σχέση με το μόριο της κουμαρίνης (Σχήμα 3). (1)



ψωραλλένιο



αγγελικίνη

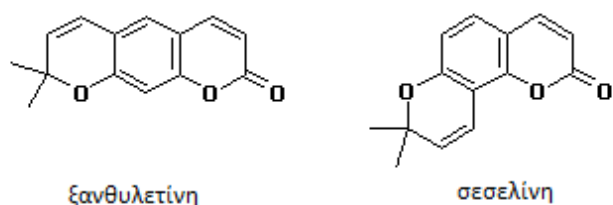


φουρανικός δακτύλιος

Σχήμα 3: Το ψωραλλένιο, η αγγελικίνη και ο φουρανικός δακτύλιος

γ. Πυρανοκουμαρίνες

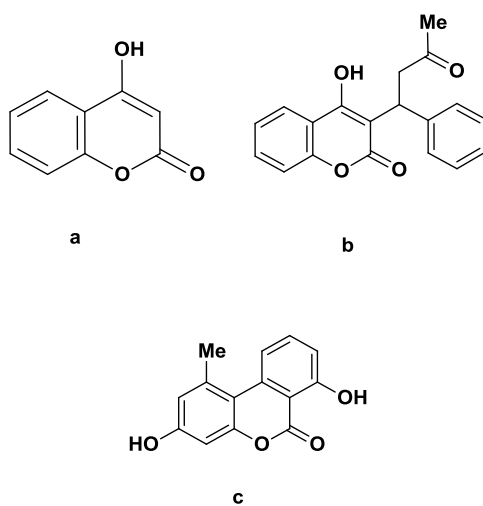
Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται ενώσεις ανάλογες των φουροκουμαρινών, που περιέχουν όμως εξαμελή δακτύλιο (πυρανικό) συμπυκνωμένο στον κουμαρινικό πυρήνα. Όπως και στις φουρο-κουμαρίνες έτσι κι εδώ, υπάρχουν ενώσεις γραμμικού τύπου, όπως η ξανθυλετίνη και γωνιακού τύπου, όπως η σεσελίνη (Σχήμα 4). (1)



Σχήμα 4: Οι δύο χαρακτηριστικές πυρανοκουμαρίνες

δ. Κουμαρίνες υποκατεστημένες στον πυρονικό δακτύλιο

Εδώ περιλαμβάνονται οι υποκατεστημένες κουμαρίνες στην 3- ή στην 4-θέση ή και στις δύο θέσεις, καθώς και 3,4-συμπυκνωμένες κουμαρίνες. Ορισμένα χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων κουμαρινών είναι η 4-υδροξυκουμαρίνη (a), η βαρφαρίνη (b) και οτομναριόλη (c) (Σχήμα 5). (1)

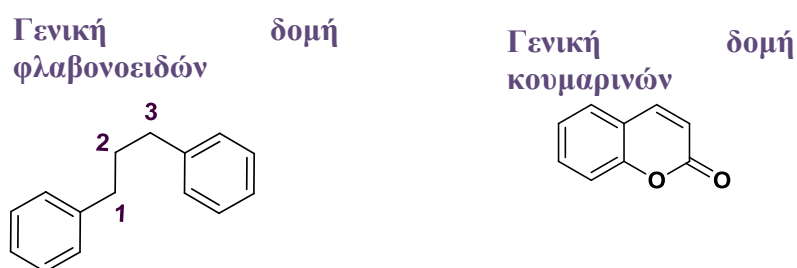


Σχήμα 5: Κουμαρίνες υποκατεστημένες στον πυρονικό δακτύλιο.

1.3 Βιολογική δράση φυσικών και συνθετικών κουμαρινών

Ο διαφορετικός δομικός τύπος των συνθετικών ή φυσικών κουμαρινικών αναλόγων, προσδίδει σε αυτά ποικίλες βιολογικές δράσεις.

Οι κουμαρίνες (2*H*-chromen-2-one) ή αλλιώς βενζοπυρόνες, είναι μια μεγάλη οικογένεια ενώσεων φυσικής και συνθετικής προελεύσεως που ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών κατέχοντας πληθώρα βιολογικών ιδιοτήτων. Στην πρόσφατη βιβλιογραφία, οι κουμαρίνες αναφέρονται ως βιοδραστικές ενώσεις με αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική, αντιμολυσματική, αντικαρκινική αντιφλεγμονώδη δράση.



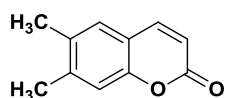
Σχήμα 6: Γενική δομή φλαβονοειδών και κουμαρινών.

Στην πρόσφατη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί κουμαρινικά παράγωγα με αντιβιοτική δράση, όπως τα σκευάσματα ponobicin και coumerymycin.

Επιπλέον αναφορές σχετικά με τη βιοδραστικότητα των κουμαρινών, αφορούν αντιπηκτική, αντι-φλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση. Παράγωγα των ακετοξυκουμαρινών (acetoxycoumarins) και πολυκυκλικά ανάλογα των 7-υδροξυκουμαρινών εμφανίζουν αντικαρκινικές ιδιότητες. Αναφορά επιπλέον, έχει γίνει στην αντιαιμοπεταλική δράση που παρουσιάζουν τρικυκλικά ή δικυκλικά κουμαρινικά παράγωγα με αμινομάδες. (1)

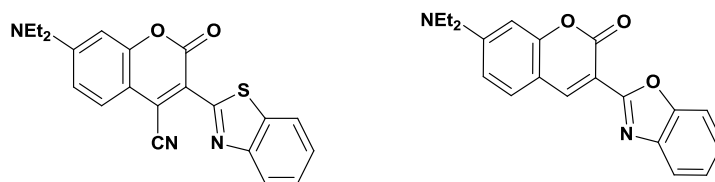
1.3.1 Αντικαρκινική Δράση

Η αγγειογένεση κατέχει σημαντικό ρόλο σε πολλές θανατηφόρες ασθένειες (2) και θεωρείται ο πιο σημαντικός παράγοντας για την ανάπτυξη των στερεών όγκων (3), καθώς επίσης για την εισβολή και την μετάσταση αυτών (4). Έχει βρεθεί ότι πολλά παράγωγα της 6,7-διμεθυλοκουμαρίνης (Σχήμα 7) αποτελούν αναστολείς της αγγειογένεσης (5).



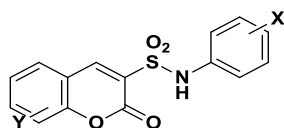
Σχήμα 7: Η δομή της 6,7-διμεθυλοκουμαρίνης.

Έχει αποδειχθεί ότι ορισμένα φθορίζοντα 7-διαλκυλαμινο-3,4-υποκατεστημένα κουμαρινικά παράγωγα εμφανίζουν αντιπολλαπλασιαστική δράση έναντι ορισμένων σειρών καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, από μια σειρά 7-διαλκυλαμινο-3,4-υποκατεστημένων κουμαρινών, οι ενώσεις (a) και (b) (Σχήμα 8), κατέδειξαν ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι με την εισαγωγή βενζοθειαζολυλο-ομάδας και ανάλογων τέτοιων ομάδων στη θέση-3 του κουμαρινικού δακτυλίου, βελτιώνεται η συνολική ανασταλτική δράση των κουμαρινικών παραγώγων. Επιπρόσθετα, η εισαγωγή κυανο-ομάδας στη θέση-4, προσδίδει επιλεκτικότητα σε ορισμένα είδη καρκινικών κυττάρων. Οι ενώσεις αυτές ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν ως βάσεις για την ανάπτυξη μη τοξικών αγγειογενετικών αναστολέων. (6)



Σχήμα 8: Φθορίζοντα κουμαρινικά παράγωγα με αντικαρκινική δράση.

Επίσης, έρευνες που έγιναν, έδειξαν πως τα κουμαρινο-3-σουλφοναμίδια (a-e) (Σχήμα 9) αναστέλλουν σημαντικά την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Ειδικότερα, τα παράγωγα αυτά, ενεργοποιούν την πρωτεΐνη c-Jun NH₂ (JNK1), η οποία είναι μέλος των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται με το στρες και οι οποίες εμπλέκονται στην κυτταρική απόπτωση. (7)



a: X=4-OMe; Y=8-Br

b: X=4-OMe; Y=6-Br

c: X=4-Br; Y=6-OMe

d: X=4-Br; Y=8-OEt

e: X=4-Br; Y=8-Cl

Σχήμα 9: Κουμαρινο-3-(N-αρυλο)-σουλφοναμίδια με αντικαρκινική δράση

Παρόμοια, ορισμένα κουμαρινο-3-καρβοξαμίδια παρουσίασαν υψηλή επιλεκτικότητα και αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών όγκων, σε σειρές καρκινικών κυττάρων του μαστού. (8) Η δράση τους αυτή εκτιμήθηκε μέσω της ικανότητας τους να αναστέλλουν την φωσφορυλίωση της ErbB-2, που σχετίζεται με την μείωση της ενεργοποίησης της ERK1 MAP κινάσης, η οποία εμπλέκεται στην πολλαπλασιαστική πορεία. Έτσι λοιπόν, αναστέλλοντας την ErbB-2 σε σειρές καρκινικών κυττάρων που περιέχουν σε μεγάλο βαθμό τον υποδοχέα, επιτυγχάνεται αναστολή της ανάπτυξης και κυτταρικός θάνατος. (9)

Επίσης, τέσσερις φυσικές κουμαρίνες της οικογένειας *Callophyllumdispar* (*Clusiaceae*), παρουσιάζουν σημαντική αντικαρκινική δράση. Η δράση τους αυτή εκτιμήθηκε μέσω της ικανότητας τους να αναστέλλουν την P-γλυκοπρωτεΐνη (P-gp), σε ανθρώπινα λευχαιμικά κύτταρα (K562/R7).

Η ανάπτυξη αντίστασης και αντοχής του νεοπλασματικού κυττάρου στα κυτταροστατικά φάρμακα (Multidrugresistance, MDR), είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα της θεραπείας του καρκίνου (10) και προσδιορίζεται γενετικά με την ενεργοποίηση ειδικών για την αντίσταση γονιδίων, που κωδικοποιούν την P-γλυκοπρωτεΐνη. Οι μηχανισμοί ανάπτυξης αντίστασης στα κυτταροστατικά φάρμακα είναι διάφοροι και περιλαμβάνουν είτε αυξημένη αποβολή του φαρμάκου από το κύτταρο ενεργητικά είτε ελάττωση της σύνδεσης και πρόσληψης του από το κύτταρο. Επίσης είναι δυνατή η αναστολή της δράσης ενζύμων που είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση των κυτταροστατικών φαρμάκων ή περιλαμβάνουν αύξηση της δραστηριότητας των μηχανισμών του κυττάρου που επανορθώνουν τις βλάβες του γενετικού υλικού. (11)

Ακόμα, η κουμαρίνη και η 7-υδροξυκουμαρίνη, παρουσιάζουν αντικαρκινικές και αντιμεταστατικές ιδιότητες. (12) Έρευνες που έγιναν σε δύο σειρές ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα, αδενοκαρκίνωμα (A427) και επιδερμικό καρκίνωμα (Calu-1), κατέδειξαν ότι οι ουσίες αυτές μειώνουν την έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 καθώς και την λειτουργία επιβίωσής της. Η πρωτεΐνη αυτή ευθύνεται για ογκογενετικές μεταλλάξεις, που η συσσώρευσή τους στο φυσιολογικό κύτταρο μπορεί να οδηγήσει στην καρκινογένεση. Επίσης, υπερβολικά επίπεδα αυτής της πρωτεΐνης μπορούν να καθυστερήσουν την ανταπόκριση των καρκινικών κυττάρων στην φαρμακευτική αγωγή. (13)

Επιπλέον, οι έρευνες έδειξαν ότι τα A427 κύτταρα είναι πιο ευαίσθητα στις δυο ουσίες από ότι τα Calu-1 κύτταρα και η 7-υδροξυκουμαρίνη είναι πιο ενεργή από την κουμαρίνη, μάλλον εξαιτίας της ομάδας του υδροξυλίου στον C-7 του κουμαρινικού δακτυλίου. Και οι δυο ουσίες παρουσίασαν χαμηλή τοξικότητα στα φυσιολογικά κύτταρα και η επίδρασή τους στα καρκινικά κύτταρα συνιστά αυτές για χημειοπροληπτική θεραπεία αλλά και για την θεραπεία των όγκων με τη συνδυασμένη χρήση τους. (14)

Ορισμένα κουμαρινικά παράγωγα που απομονώθηκαν από τον φλοιό του δέντρου *Kayeaassamica*(*Clusiaceae*), παρουσιάζουν ισχυρή κυτταροτοξική δράση έναντι καρκινικών κυττάρων του παχέως εντέρου (Col2), του δέρματος (KB) και του προστάτη (LNCaP). (15) Η παρουσία της 7-υδροξυ-ομάδας θεωρείται σημαντική για την κυτταροστατικότητα και βρίσκεται σε συμφωνία με την αναφορά ότι η 7-υδροξυ-κουμαρίνη, που είναι και ο κύριος ανθρώπινος μεταβολίτης της κουμαρίνης, έχει ανασταλτικές ιδιότητες στην ανάπτυξη κακοηθών όγκων σε *invitro* έρευνες. (16)

Άλλα πάλι κουμαρινικά παράγωγα που απαντώνται στη φύση, όπως οι γραμμικές φουροκουμαρίνες, ιμπερατορίνη και ισοπιμπινελίνη, έχουν αντικαρκινική δράση. Η δράση τους αυτή εκτιμήθηκε με βάση την ικανότητά τους να αναστέλλουν το σχηματισμό όγκων σε μαστικό αδένιο ποντικού που προκαλούνται από το σχηματισμό δεσμών του 7,12-διμεθυλοβενζο[α]-ανθρακενίου (DMBA) με το DNA. Το DMBA ανήκει στους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs) που σχετίζονται με τον καρκίνο του στήθους. (17) Επίσης, η ιμπερατορίνη και μια άλλη κουμαρίνη, η ιμπεργαμοτίνη, εμποδίζουν το σχηματισμό PAHόγκων στο δέρμα

ποντικίων, αναστέλλοντας συγκεκριμένο κυτόχρωμα στη μεταβολική ενεργοποίηση των PAH. (18), (19)

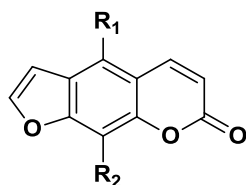
Παράγωγα της 4-μεθυλοκουμαρίνης που απομονώθηκαν από τα φύλλα του δέντρου *Marilapluricostata*, παρουσιάζουν κυτταροστατικότητα έναντι τριών ειδών ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων. Τα κύτταρα προέρχονται από το στήθος (MCF-7), από τους πνεύμονες (H-460) και από το κεντρικό νευρικό σύστημα (SF-268). (20)

Τέλος, πολλά 8-υποκατεστημένα 7-μεθοξυ-κουμαρινικά παράγωγα που απομονώθηκαν από το φυτό *Murraya* (21) αλλά και 4-υποκατεστημένα κουμαρινικά παράγωγα από το φυτό *Calophyllumbrasiliense*, (22) παρουσιάζουν δράση κατά των καρκινικών όγκων. Επιπρόσθετα, πολλά σύμπλοκα των κουμαρινών με δημήτριο, (23) ζιρκόνιο, (24) και λανθάνιο, (25) παρουσιάζουν κυτταροστατική δράση.

1.3.2 Αντιοξειδωτική Δράση

Τα αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται ευρέως ως πρόσθετα στα τρόφιμα, αφού παρέχουν προστασία από τη χημική αποικοδόμηση των τροφίμων. Επίσης, παίζουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία πολλών εκφυλιστικών ή χρόνιων ασθενειών, όπως η αθηροσκλήρωση, η εγκεφαλική δυσλειτουργία, η εξασθένιση του ανοσοποιητικού συστήματος και ο καρκίνος. (26) Πολλά στοιχεία που συγκεντρώθηκαν από μελέτες, συνδέουν την παραγωγή των ελεύθερων ριζών με την έναρξη ή/και την πρόοδο αυτών των παθολογιών. (27)

Ορισμένες φουροκουμαρίνες (σχήμα 10) παρουσιάζουν καλή αντιοξειδωτική δράση, αφού ασκούν προστατευτική επίδραση έναντι της λιπιδικής υπεροξειδωσης, σε πειράματα που έγιναν σε εγκέφαλο αρουραίου. Η λιπιδική υπεροξειδωση είναι μια αυτοκαταλυόμενη αλληλεπίδραση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) με μοριακό οξυγόνο. (28)



Σχήμα 10: Κουμαρινικά παράγωγα με αντιοξειδωτική δράση.

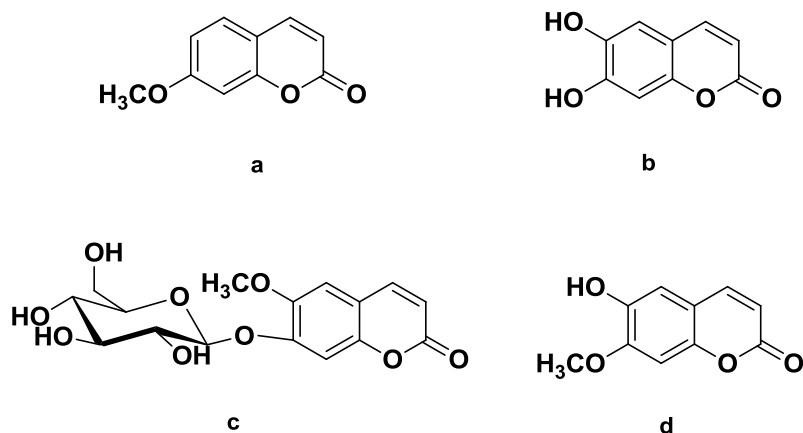
Οι 3,6- και 3,7-διυδροξυκουμαρίνες βρέθηκε ότι παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση παρόμοια με πρότυπες ενώσεις. Η δράση τους αυτή εκτιμήθηκε μέσω της ικανότητάς τους να λειτουργούν ως σαρωτές των υπεροξειδικών ριζών και ορισμένων ελεύθερων ριζών, καθώς και ως αναστολείς της λιπιδικής υπεροξειδωσης. (26)

Επιπρόσθετα, πολλές διυδροξυ και διακετοξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνες, προκαλούν δραματική αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Συγκεκριμένα, η 5,7-διακετοξυ-4-μεθυλοκουμαρίνη, (29) η 7,8-διακετοξυ-4-μεθυλοκουμαρίνη και η 7,8-διυδροξυ-4-μεθυλοκουμαρίνη, βρέθηκε ότι παρουσιάζουν πολύ καλή αντιοξειδωτική δράση. (30) Η αμινομάδα είναι ένας σημαντικός αντικαταστάτης της υδροξυλικής όσον αφορά στην αντιοξειδωτική δράση. Έτσι λοιπόν, και οι ο-υδροξυ-αμινο-4-μεθυλο-κουμαρίνες κατέχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. (31)

Τέλος, πολλά κουμαρινικά παράγωγα που λειτουργούν ως σαρωτές των ελευθέρων ριζών αλλά και ως αναστολείς της λιπιδικής υπεροξειδωσης, κατέχουν και αντιφλεγμονώδη δράση. (32) Έτσι λοιπόν, πολλά αντιοξειδωτικά εμφανίζουν και αντιφλεγμονώδη δράση παράλληλα. (33)

1.3.3. Αντιφλεγμονώδης-Αναλγητική Δράση

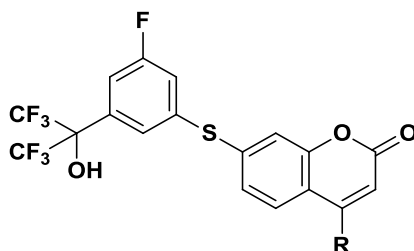
Η αντιφλεγμονώδης δράση των κουμαρινών έχει μελετηθεί τόσο στα φυσικά προϊόντα όσο και στα συνθετικά. Μελέτες έδειξαν ότι η κουμαρίνη, το 7-υδροξυ-παράγωγό της αλλά και άλλα παράγωγα αυτής, αναστέλλουν την βιοσύνθεση των προσταγλανδινών και των λευκοτριενίων κατά αναλογία με το σαλικυλικό οξύ. (1) Παρόμοια δράση επέδειξαν και τέσσερα παράγωγα που απομονώθηκαν από τα άνθη του φυτού *Santolinaoblongifoliaboiss.* Συγκεκριμένα, η 7-μεθοξυ-κουμαρίνη (χερνιαρίνη) (a), η 6,7-διυδροξυκουμαρίνη (εσκουλετίνη) (b), η 6-μεθοξυ-7-γλυκοσιδυλο-κουμαρίνη (σκοπολίνη) (c) και η 6-υδροξυ-7-μεθοξυκουμαρίνη (σκοπολετίνη) (d) (Σχήμα 11a), σε πειράματα που έγιναν σε περιτονιακά φαγοκύτταρα ποντικών, παρουσίασαν αξιοσημείωτη δράση παρόμοια με αυτή των πρότυπων φαρμάκων. (34)



Σχήμα 11α: Παραδείγματα κουμαρινών με αντιφλεγμονώδη δράση.

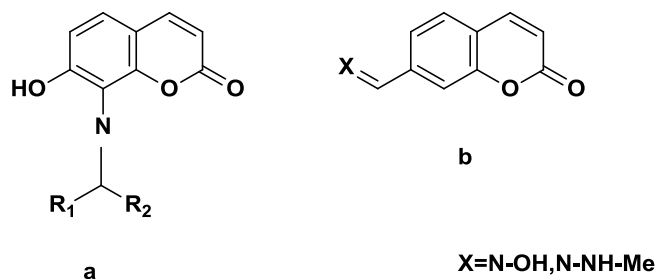
Οι προσταγλανδίνες PGs και τα λευκοτριένια LT είναι δυο κατηγορίες λιπιδικών μεσολαβητών, που προέρχονται από το αραχιδονικό οξύ και οι οποίοι εμπλέκονται στην έναρξη και διατήρηση μιας μεγάλης ποικιλίας φλεγμονωδών ασθενειών. (34) Από την οικογένεια των προσταγλανδινών, όπου η κυκλοξυγενάση αποτελεί το ένζυμο κλειδί στη βιοσύνθεσή τους, ο PGE₂ είναι ένας ισχυρός αγγειοδιασταλτικός παράγοντας που ευθύνεται για την παραγωγή πόνου και οιδήματος στην φλεγμονώδη περιοχή. (35) Από την οικογένεια των λευκοτριενίων, όπου η 5-λιποξυγονάση (5-LO) είναι το ένζυμο κλειδί στη βιοσύνθεσή τους, ο LTC₄ αποτελεί σημαντικό μεσολαβητή του βρογχικού άσθματος και της οξείας φλεγμονής. (36)

Πρόσφατες μελέτες, εμπλέκουν την δράση της 5-λιποξυγονάσης (37) και σε άλλες ασθένειες όπως ο καρκίνος, η οστεοπόρωση και η αθηροσκλήρωση και πολλές αναφορές υπερτονίζουν τις θεραπευτικές ικανότητες της αναστολής της. (38) Ορισμένα παράγωγα της κουμαρίνης (σχήμα 11β), παρουσιάζουν *in vitro* αντιφλεγμονώδη δράση και δράση κατά του άσθματος, λόγω της ικανότητάς τους να εμποδίζουν το σχηματισμό των λευκοτριενίων αναστέλλοντας το ανθρώπινο ένζυμο 5-LO. (39)



Σχήμα 11β: Κουμαρινικά παράγωγα με αντιφλεγμονώδη δράση.

Επίσης, εκτενής μελέτη για την αντιφλεγμονώδη δράση διάφορων κουμαρινικών παραγώγων πραγματοποιήθηκε με το πείραμα της καραγεννίνης. Έτσι λοιπόν, πολλά παράγωγα (a) και (40) (b) (Σχήμα 11γ), (41) ορισμένα παράγωγα συμπυκνωμένων πυριδινο βενζοφουρανοκουμαρινών, (42) αλλά και πολλά άλλα, (43) παρουσίασαν αναστολή του οιδήματος (σε αρουραίους), που προκαλείται από την παροχή καραγεννίνης. Το οίδημα αυτό είναι μια μη-διευκρινισμένη φλεγμονή και είναι αποτέλεσμα διαφόρων χημικών μεσολαβητών. (44)



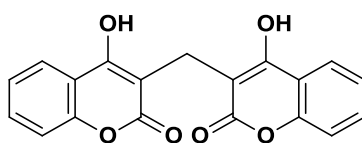
Σχήμα 11γ: Κουμαρινικά παράγωγα που αναστέλλουν το οίδημα της καραγεννίνης.

Οι κουμαρίνες εκτός των προαναφερθέντων δράσεων εμφανίζουν και άλλες δράσεις. Τα πρώτα ερευνητικά στοιχεία δημιουργούν πρόσφορο έδαφος για μελλοντικές έρευνες προς αυτήν την κατεύθυνση. Αναφέρονται η αντιθρομβωτική-Καρδιαγγειακή δράση καθώς και η δράση κατά του ιού HIV.

1.3.4 Αντιθρομβωτική-Καρδιαγγειακή Δράση

Υπάρχουν δύο τάξεις αντιθρομβωτικών παραγόντων, οι αντιπηκτικοί (που εμποδίζουν τη δημιουργία θρομβίνης και το σχηματισμό θρόμβων) και οι αντιαμοπεταλιακοί παράγοντες (που σταματούν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων). (45)

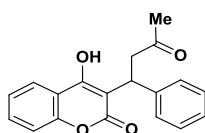
Η δικουμαρόλη (Σχήμα 12), η οποία παρασκευάζεται κατά την συμπύκνωση της 4-υδροξυ-κουμαρίνης με φορμαλδεΰδη, εμφανίζει ισχυρή αντιθρομβωτική δράση (ανταγωνιστική της βιταμίνης K) και χρησιμοποιείται στη θεραπευτική επί εμφραγμάτων και μετεγχειρητικών θρομβώσεων. Το κουμαρινικό αυτό παράγωγο (dicoumarol) είναι ένα προϊόν μεταβολισμού της κουμαρίνης (κάτι που συμβαίνει και στην φύση, σε κάποια είδη μυκήτων) το οποίο απαντάται στο γλυκό τριφύλλι.



Σχήμα 12: Η δομή της δικουμαρόλης

Η δικουμαρίνη αυτή ως ισχυρή αντιπηκτική ένωση αποτελεί επίσης τη βάση ποντικοφάρμακων με κύριο μηχανισμό δράσης την πρόκληση αιμορραγίας στα τρωκτικά. Κλινικά έγινε διαθέσιμη το 1940-1941, με ευρεία χρήση στην σύγχρονη ιατρική ως αντιπηκτικό φάρμακο.

Η φαρμακευτική βιομηχανία στηρίχτηκε στη δικουμαρόλη για την σύνθεση επιπλέον αντιπηκτικών φαρμάκων όπως η βαρφαρίνη (κουμαδίνη) (Σχήμα 13) αλλά και κάποιων πιο ισχυρών ποντικοφαρμάκων που βασίζονται στην ίδια αντιπηκτική λειτουργία.



Σχήμα 13: Δομή βαρφαρίνης.

Επιπλέον, οι σημαντικές ομοιότητες στη δομή της δικουμαρόλης με την βιταμίνη Κ, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η ένωση δρα ενάντια στην προθρομβίνη, στην οποία οφείλεται η πήξη του αίματος, γεγονός που κατατάσσει τη δικουμαρόλη στους ανταγωνιστές της βιταμίνης Κ. Το σύνολο των ενώσεων αυτών ανακαλύφθηκε ιστορικά κατά την ανάλυση μίας αιμορραγικής πάθησης βοοειδών που έτρωγαν γλυκό τριφύλλι (sweet clover disease).

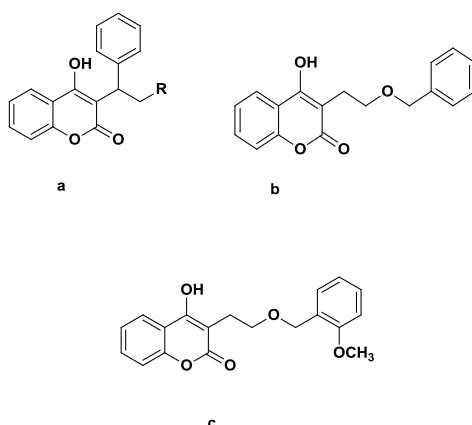
1.3.5 Αντι-HIV Δράση

Το σύνδρομο επίκτητης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (AIDS), προκαλείται από τον ιό ανθρώπινης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (HIV). Ο ιός αυτός οδηγεί στη λειτουργική βλάβη του ανοσοποιητικού συστήματος και τελικά στην καταστροφή του, καταστρέφοντας διαδοχικά την ικανότητα του οργανισμού να αμύνεται έναντι των μολυσματικών ασθενειών. (46)

Κουμαρίνες που απαντώνται στο φυτικό βασίλειο βρέθηκε ότι αναστέλλουν διάφορα στάδια του κύκλου αναπαραγωγής του HIV. Οι κουμαρίνες αυτές μπορεί να

παρεμποδίζουν την προσβολή από τον ιό είτε να παρεμποδίζουν την αντιγραφή του είτε να αναστέλλουν ένζυμα όπως οι πρωτεάσες, ιντεγκράσες και οι αντίστροφες μεταγραφάσες που καταλύουν ζωτικές για τον ιό ενζυμικές αντιδράσεις. Έτσι λοιπόν, πολλές πυρανοκουμαρίνες, τετρακυκλικές κουμαρίνες αλλά και άλλες κουμαρίνες με αντι-HIVδράση εμφανίζουν ικανοποιητική αντικη δράση. (47)

Ημι-συνθετικά αντιπηκτικά φάρμακα όπως η βαρφαρίνη (warfarin) (Σχήμα 8) και η ένωση (rhenprocoumon) (a, όπου R=OH) (Σχήμα 14), βρέθηκε ότι είναι αναστολείς της HIV-πρωτεάσης. Η HIV-πρωτεάση, αποτελεί ένα σημαντικό ένζυμο-στόχο στην έρευνα του AIDS. Προκαταρτικές έρευνες υποδεικνύουν ότι η ομάδα 4-υδροξυ και η υποκατάσταση στην θέση-3 της κουμαρίνης, είναι απαραίτητες για την δραστηριότητα. Παρόμοια δράση παρουσιάζει και η ένωση (b) (Σχήμα 14) και πολλά παράγωγά της αποδείχθηκαν πιο δραστικά. Το δραστικότερο παράγωγο της σειράς αυτής είναι η ένωση (c) (Σχήμα 30). (48)



Σχήμα 14: Διάφορα κουμαρινικά παράγωγα, αναστολείς της HIV-πρωτεάσης.

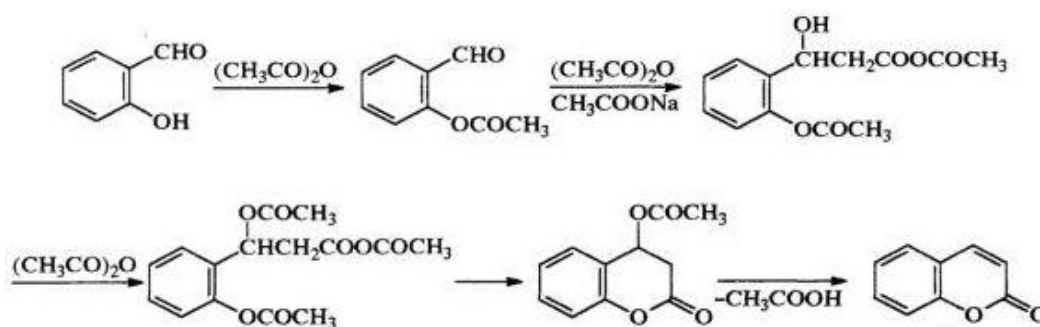
1.4 Κυριότερες μέθοδοι σύνθεσης κουμαρινών

Στο υποκεφάλαιο αυτό μελετούνται και καταγράφονται οι μέθοδοι σύνθεσης των κουμαρινικών παραγώγων. Η πολλά υποσχόμενη δράση των κουμαρινικών παραγώγων σε πολλούς τομείς, οδήγησε στην εύρεση και ανάπτυξη μεθόδων σύνθεσής τους. Οι μέθοδοι αυτοί στοχεύουν στην ακριβή και αποτελεσματική παραγωγή τους και έχουν προέλθει από μελέτες πολλών ετών. Οι ποικίλοι μηχανισμοί που προέκυψαν βασίζονται σε δεδομένα κριτήρια και μπορεί να υποστούν τροποποιήσεις ανάλογα με το ζητηθέν προϊόν. Κάθε μέθοδος παρουσιάζει

πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Ενδεικτικά αναφέρονται οι βασικότερες μέθοδοι παραγωγής κουμαρινών, όπως η αντίδραση Perkin, η συμπύκνωση Pechmann, οι αντιδράσεις Knoevenagel, Reformatsky και Wittig. Εν συνεχεία αναλύονται οι βασικές αυτές μέθοδοι.

1.4.1 Αντίδραση Perkin

Μία κλασική μέθοδος παρασκευής κουμαρινών είναι η αντίδραση Perkin, η οποία πραγματοποιείται με θερμική αντίδραση σαλικυλικής αλδεϋδης με οξικό ανυδρίτη παρουσία οξικού νατρίου (Σχήμα 15).



Σχήμα 15: Στάδια της αντίδρασης Perkin.

Από την πρώτη εφαρμογή της μεθόδου για την παραγωγή κουμαρίνης το 1868, έχουν συντεθεί χημικά πολλές από τις φυσικές κουμαρίνες. Η σύνθεση κουμαρινών με μεθόξυ- ή υδρόξυ- ομάδες ακόμα συνηθίζεται να γίνεται με την αντίδραση Perkin, παρ' όλες τις χαμηλές αποδόσεις.

Δεδομένου ότι ο σχηματισμός της πυρόνης είναι το σημαντικότερο βήμα σε πολλές από τις συνθέσεις κουμαρινών, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για την εισαγωγή χαρακτηριστικών ομάδων σε αυτή την δομή. Μία προσέγγιση είναι η προετοιμασία φαινόλης με τους επιθυμητούς υποκαταστάτες της κουμαρίνης. Διαφορετικά, μπορεί να προηγηθεί ο σχηματισμός του δομικού πυρήνα της κουμαρίνης και στην συνέχεια να προστεθούν οι κατάλληλοι υποκαταστάτες με αλκυλίωση άνθρακα ή οξυγόνου. (1)

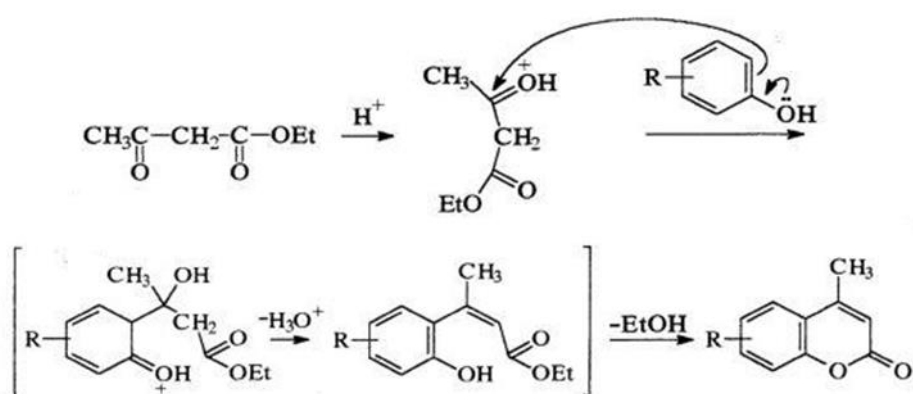
Από την άλλη, κάποια μειονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι η δυσκολία παρασκευής των απαραίτητων πρώτων υλών (υποκατεστημένες ο-υδροξυ-βενζαλδεϋδες) και οι χαμηλές αποδόσεις που οφείλονται στο γεγονός ότι οι δραστικές συνθήκες που απαιτούνται (παρατεταμένη θέρμανση στους 150-200°C) οδηγούν στο

σχηματισμό ρητινωδών προϊόντων. Η μέθοδος εμφανίζεται στη σύγχρονη βιβλιογραφία, [Worden et al. 1970; Marx et al. 1975; Cotterill et al. 1994] και με παραλλαγές, π.χ. με χρήση 1,8-διαζαδικυ-κλω[5.4.0]ενδεκ-7-ενίου, DBU [Kawase et al. 1978] αντί οξικού νατρίου. Τέτοιες παραλλαγές ενδεχομένως άρουν τα παραπάνω μειονεκτήματα.

Το φανερό **πλεονέκτημα** είναι ότι δεν υπάρχει αμφιβολία για τη δομή του προϊόντος αφού δεν είναι δυνατός ο σχηματισμός ισομερών προϊόντων λόγω της παρουσίας σε συγκεκριμένες θέσεις του αρωματικού δακτυλίου, των υποκαταστατών που συμμετέχουν στο σχηματισμό του λακτονικού δακτυλίου.

1.4.2 Μέθοδος Pechmann

Με συμπύκνωση των φαινολών με β -κετοεστέρες υπό την επίδραση ισχυρών οξέων, προκύπτουν υποκατεστημένες κουμαρίνες στην 4- ή 3,4-διυποκατεστημένες. Η αντίδραση ξεκινάει με ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση στη φαινόλη και συγκεκριμένα σε *o*-θέση ως προς το υδροξύλιο, από τον άνθρακα της καρβονυλικής ομάδας του β -κετοεστέρα, προς σχηματισμό των ενδιάμεσων. Ακολουθεί λακτονοποίηση με απόσπαση νερού και αιθανόλης, για τον σχηματισμό του κουμαρινικού συστήματος (Σχήμα 16). (49)



Σχήμα 16: Στάδια της αντίδρασης Pechmann.

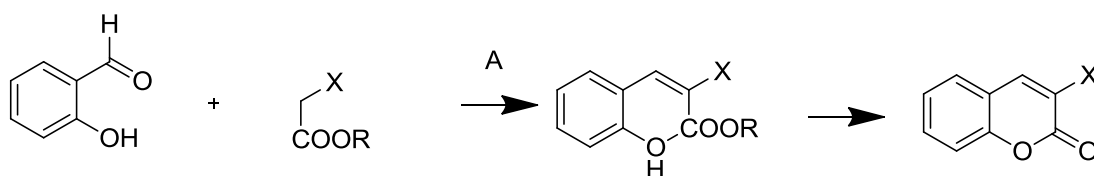
Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου εξαρτάται από τον καταλύτη, τους υποκαταστάτες της φαινόλης καθώς και από το είδος του β -κετοεστέρα. Η συμπύκνωση των φαινολών που περιέχουν υποκαταστάτες δότες ηλεκτρονίων σε *m*-

θέση ως προς το υδροξύλιο ευνοείται, ενώ όταν βρίσκονται σε *o*- και *p*-θέσεις δεν επηρεάζουν τη δραστηριότητα των φαινολών. (49)

Η αντίδραση Rechmann χρησιμοποιείται ευρέως με απλές πρώτες ύλες και έχει πολύ καλές αποδόσεις. Επίσης, έχουν χρησιμοποιηθεί πολλοί όξινοι καταλύτες, εκτός του θειικού οξέος που αναφέρθηκε, όπως τριχλωριούχο αργίλιο, πεντοξείδιο του φωσφόρου, τριφθοροξικό οξύ και άλλοι. Σήμερα, χρησιμοποιούνται καταλύτες όπως το χλωριούχο ίνδιο(III), το χλωριούχο τιτάνιο(IV) και άλλοι οι οποίοι επιτρέπουν ακόμα ηπιότερες συνθήκες, μεγαλύτερη ποικιλία υποκαταστατών στα αντιδρώντα και καλύτερες αποδόσεις. (50)

1.4.3 Μέθοδος Knoevenagel

Κατά την κυκλοσυμπύκνωση *o*-υδροξυβενζαλδευδών με δραστικές μεθυλενικές ενώσεις (μηλονικούς εστέρες, κυανοξικούς εστέρες, μηλονονιτρίλια), παρουσία πυριδίνης, πιπεριδίνης και άλλων βάσεων, παράγονται κουμαρινικά-3-καρβοξυλικά οξέα. Η συνθετική αυτή μέθοδος έχει το πλεονέκτημα ότι λαμβάνει χώρα κάτω από ηπιότερες συνθήκες αντίδρασης σε σχέση με τη μέθοδο Perkin (Σχήμα 17). (51)

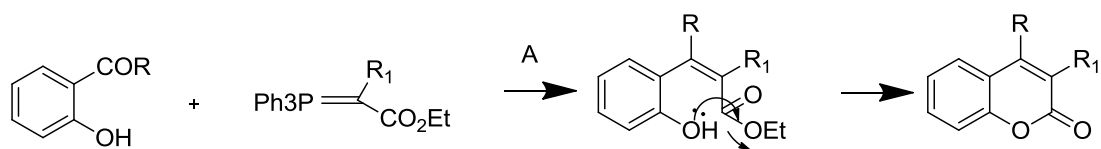


A: Ακτινοβολία

Σχήμα 17: Αντίδραση Knoevenagel

1.4.4 Αντίδραση Wittig

Οι *o*-υδροξυβενζαλδεΐδες ή *o*-υδροξυ-αρυλοκετόνες αντιδρούν με εστέρες του φωσφορανίου προς σχηματισμό κουμαρινικών παραγώγων. Αρχικά σχηματίζεται ο *trans*-*o*-υδροξυκινναμμοικός εστέρας και στη συνέχεια ισομερίζεται θερμικά ή φωτοχημικά προς *cis*-ισομερές για να λακτονοποιηθεί τέλος προς κουμαρίνη. Η λακτονοποίηση ευνοείται από υποκαταστάτες (του βενζολικού δακτυλίου) δότες ηλεκτρονίων στην 4-θέση (Σχήμα 18). (52)



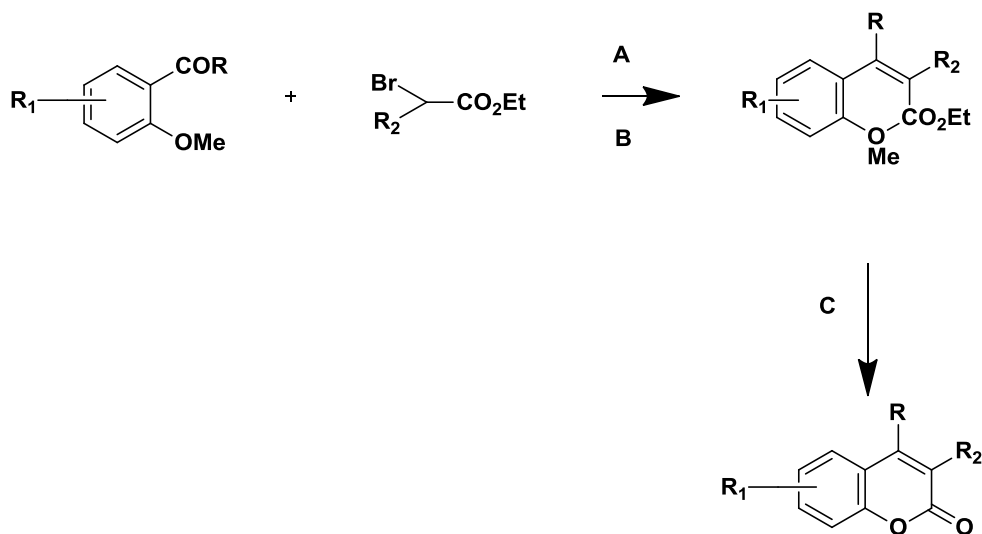
A: Ακτινοβολία

Σχήμα 18: Αντίδραση Witting

Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι οι ήπιες συνθήκες αντίδρασης, η απλή κατεργασία, οι πολύ υψηλές αποδόσεις και η έλλειψη παραπροϊόντων. Ως μειονέκτημα θεωρείται η δυσκολία παρασκευής των υποκατεστημένων *ο*-υδροξυβενζαλδεϋδών.

1.4.5 Αντίδραση Reformatsky

Οι *ο*-μεθοξυ-αρυλοκετόνες υφίστανται αντίδραση *Reformatsky* με α -βρωμο-εστέρες, ακολουθούμενη από αφυδρογόνωση, δίνοντας ακόρεστους κινναμωμικούς εστέρες, οι οποίοι μετασχηματίζονται σε υποκατεστημένες κουμαρίνες, όταν κατεργάζονται με οξύ (Σχήμα 19). (53)



A: Zn/Βενζόλιο

B: $\frac{\text{SOCl}_2}{\text{Et}_2\text{O}}$ /πυριδίνη

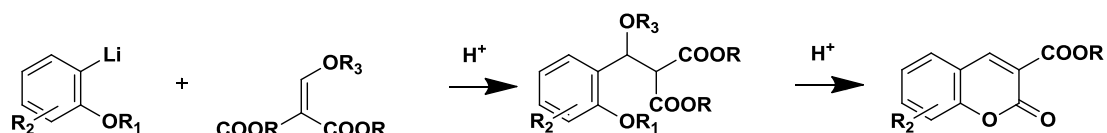
C: HI ή H_2SO_4

Σχήμα 19: Αντίδραση Reformatsky.

Υπάρχουν όμως και δευτερεύοντες μέθοδοι παρασκευής κουμαρινών. Σαν δευτερεύοντες μέθοδοι σύνθεσης κουμαρινών αναφέρονται η προσθήκη Michael και η αντίδραση Vilsmeier-Haack.

1.4.6 Προσθήκη Michael

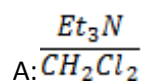
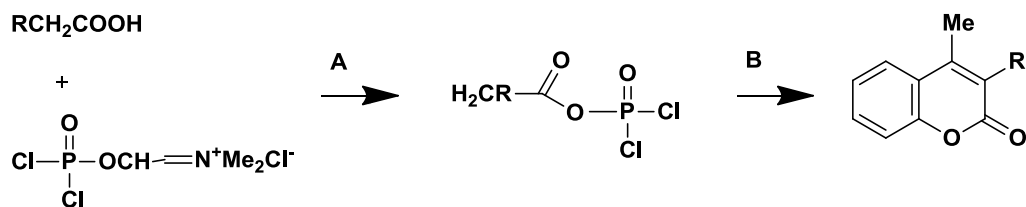
Μια εναλλακτική μέθοδος, συμπληρωματική της μεθόδου *Pechmann*, είναι η προσθήκη ο-λιθιο-φαινολικού αιθέρα σε αλκοξυμεθυλενικό μηλονικό εστέρα ή αλκοξυ-μεθυλενοακετοξικό εστέρα (προσθήκη *Michael*). Περαιτέρω κατεργασία με οξύ προκαλεί απομάκρυνση της φαινολικής προστατευτικής ομάδας, λακτονοποίηση και απόσπαση μορίου αλκοόλης προς σχηματισμό οξυγονωμένων κουμαρινών. Αυτή η τροποποίηση επιτρέπει την επιλεκτική προσβολή των 1,3-διηλεκτρονιόφιλων αντιδραστηρίων σε υποκατεστημένες φαινόλες (Σχήμα 20). (51)



Σχήμα 20: Εναλλακτική συμπύκνωση με προσθήκη Michael

1.4.7 Αντίδραση Vilsmeier-Haack

Το άλας του *Vilsmeier*, είναι ένα εναλλακτικό αντιδραστήριο του φωσφόρου, το οποίο αντιδρά με την ο-υδροξυακετοφαινόνη για την παρασκευή 3,4-υποκατεστημένων κουμαρινών σε αποδόσεις 86-90%. Η αντίδραση διεξάγεται μέσω εστεροποίησης του καρβοξυλικού οξέος, όπου σχηματίζεται ο ανυδρίτης του φωσφορικού οξέος, ως ενεργό ενδιάμεσο. Στη συνέχεια, αντίδραση του ενδιάμεσου με την ο-υδροξυακετοφαινόνη, έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό των κουμαρινικών παραγώγων (Σχήμα21). (54)

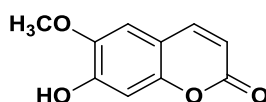


B: ο-υδροξυακετοφαινόνη

Σχήμα 21: Σύνθεση 3,4-υποκατεστημένων κουμαρινών

1.5 Ανάλογα 7-υδροξυ κουμαρινών: σύνθεση και βιοδραστικότητα

Έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες προς την κατεύθυνση της παραγωγής υδροξυ κουμαρινών με το υδροξύλιο να βρίσκεται σε διάφορες θέσεις του δακτυλίου. Συγκεκριμένα, έχουν παρασκευασθεί 7 υδροξυ-κουμαρίνες από τις οποίες έχουν ληφθεί θετικά αποτελέσματα ως προς τις δράσεις τους. Η 7-υδροξυκουμαρίνη που είναι γνωστή ως ουμπελιφερόνη αφού απαντάται σε φυτά του γένους *Scopoletin*. Επιπλέον η φυσική βιοδραστική 7-υδροξυ-6-μεθοξυκουμαρίνη (HMC), απομονώθηκε από το μεθανολικό εκχύλισμα *Sempervirens Gelsemium* και αποδείχτηκε να κατέχει ισχυρές αντικαρκινικές δυνατότητες ύστερα από *in vitro* μελέτες. (55)



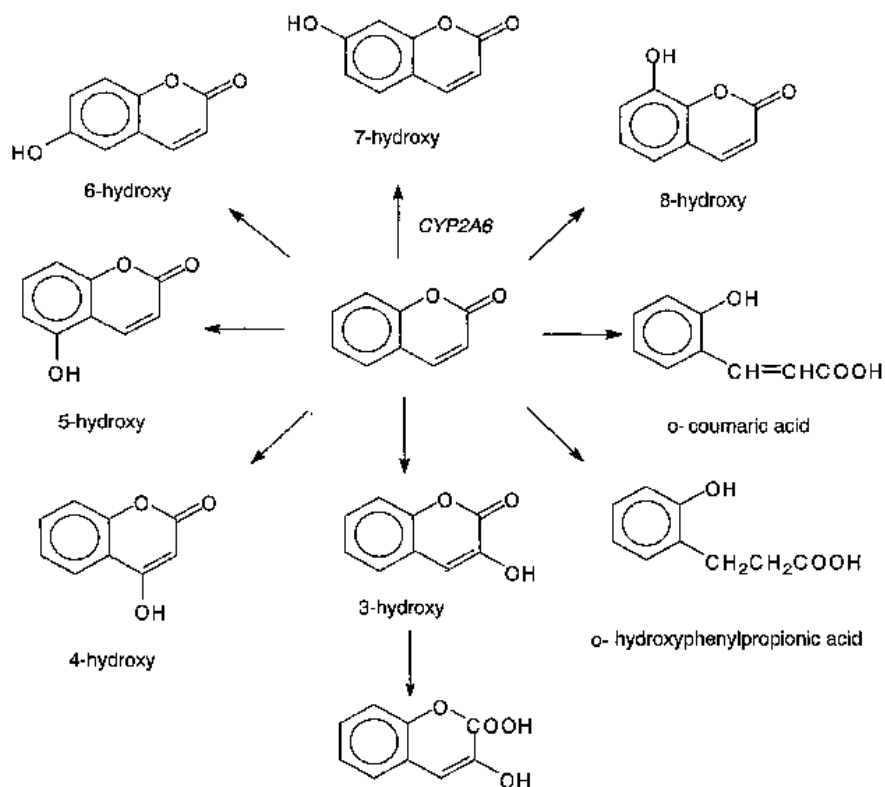
Σχήμα 22: Η δομή της 7-υδροξυ-6-μεθοξυκουμαρίνης.

1.5.1 Η σύνθεση της 7 υδροξυ-4-μεθοξυ-κουμαρίνη με την μέθοδο Pechmann.

Η αντίδραση Pechmann είναι απλή και συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την σύνθεση κουμαρινών από ενεργοποιημένες φαινόλες. Ως επί το πλείστον αναφέρονται οι m-υποκατεστημένες φαινόλες δότες ηλεκτρονίων που έχουν υποκαταστάτη στη θέση m κετο-εστέρα ή καρβοξυλικό οξύ. Η αντίδραση Pechmann διεξάγεται παρουσία καταλύτη, ο οποίος μπορεί να είναι είτε πυκνό θειικό οξύ, είτε πεντοξείδιο του φωσφόρου, είτε και τριφθοροοξικό οξύ.

Αυτά τα οξέα είναι διαβρωτικά και που απαιτούνται σε περίσσεια ποσότητα. Για παράδειγμα, σχεδόν ένα λίτρο συμπυκνωμένου H₂SO₄ είναι που απαιτείται για τη σύνθεση 1 mol της 7-υδροξυ 4-μεθυλ κουμαρίνης. Η αντίδραση απαιτεί 12-24 ώρες και μπορεί επίσης να έχει σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό ανεπιθύμητων παραπροϊόντων. Επίσης, ομοιογενή χλωρίδια μετάλλων όπως ZnCl₄, TiCl₄, InCl₃, GaI₃, τριφλικά, σουλφονικό οξύ και ιοντικά υγρά έχουν αναφερθεί για την παραγωγή 7-υδροξυ κουμαρινικών παραγώγων σε υψηλή απόδοση και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Λόγω, όμως της μη δυνατότητας επαναχρησιμοποίησης αυτών των ομοιογενών καταλυτών, χρησιμοποιούνται διάφοροι στερεοί και όξινοι καταλύτες,

όπως οι ρητίνες Amberlyst ανταλλαγής ιόντων, ζεόλιθοι, μοντοριλλονίτης K-10, θειικό άλας Πολυανιλίνης, ετεροπολυοξέα και η ρητίνη Nafion / πυριτίου νανοςύνθετων, για τη σύνθεση της 7-υδροξυ-4-μεθυλο κουμαρίνης. (56)



Σχήμα 23: Υδροξυ υποκατεστημένες κουμαρίνες.

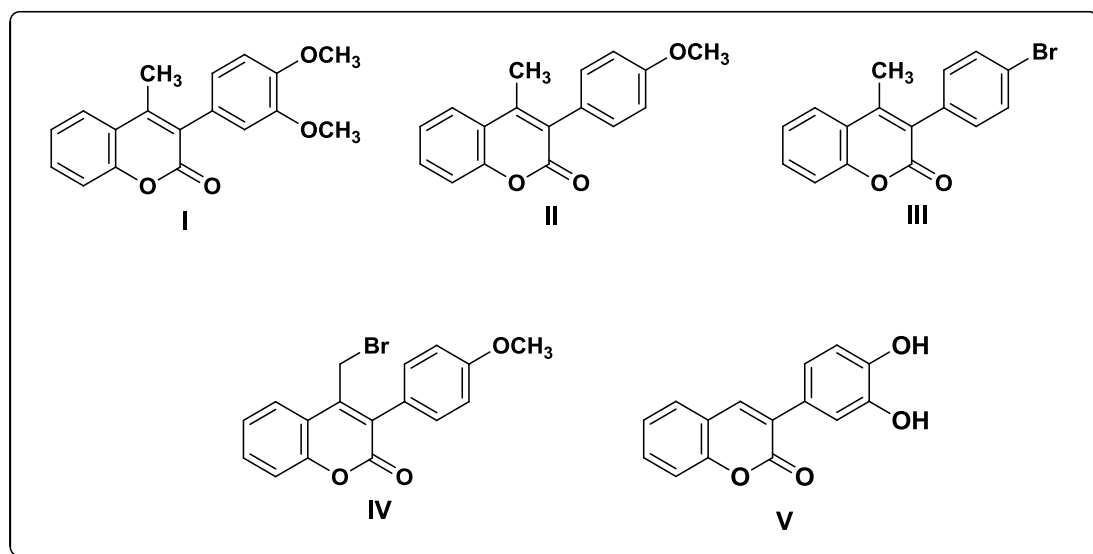
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

Σχεδιασμός, σύνθεση, ταυτοποίηση και αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των νέων ενώσεων

2.1 Σχεδιασμός των νέων παραγώγων

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η παραγωγή μιας νέας σειράς υποκατεστημένων κουμαρινών οι οποίες θα εξεταστούν για πιθανή αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων κουμαρινικών αναλόγων, χρησιμοποιώντας τις ενώσεις **I-V** (Σχήμα 24) ως ενώσεις-οδηγούς. Οι ενώσεις αυτές αποτελούν μέρος της τρέχουσας ερευνητικής δραστηριότητας του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ΕΜΠ, και εμφανίζουν αξιόλογη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, όπως αυτή εκφράζεται με την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια. (56)



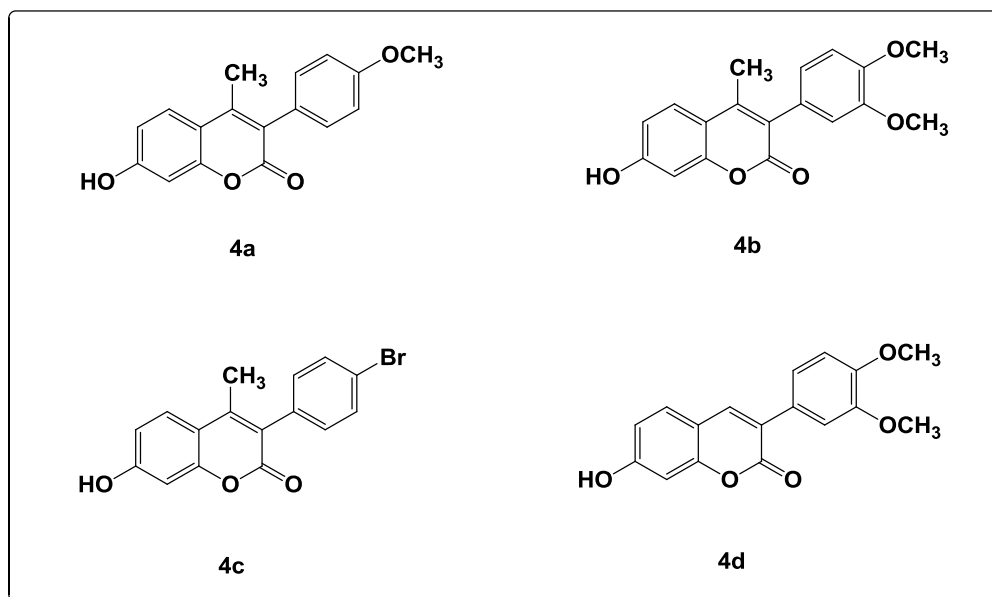
Σχήμα 24: Κουμαρινικά ανάλογα με αξιόλογη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, οι κουμαρίνες που περιέχουν ομάδα υδροξυλίου στη θέση 7 του αρωματικού δακτυλίου, παρουσιάζουν ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες. Με βάση αυτά τα δεδομένα, η σύνθεση των

νέων μορίων στη παρούσα εργασία εστιάστηκε στο σχεδιασμό αναλόγων των μορίων I-V τα οποία θα διαθέτουν μια υδροξύ ομάδα στη θέση 7 του αρωματικού δακτυλίου. Προκειμένου να μελετηθεί η σχέση δομής-βιολογικής δράσης, παρασκευάστηκαν επίσης ανάλογα στα οποία η υδροξύ-ομάδα βρίσκεται στη θέση 5 του αρωματικού δακτυλίου. Αναλυτικότερα, οι σειρές κουμαρινών που εξετάστηκαν είναι οι ακόλουθες:

ΣΕΙΡΑ A: 3-αρυλο-7-υδροξύ-κουμαρίνες

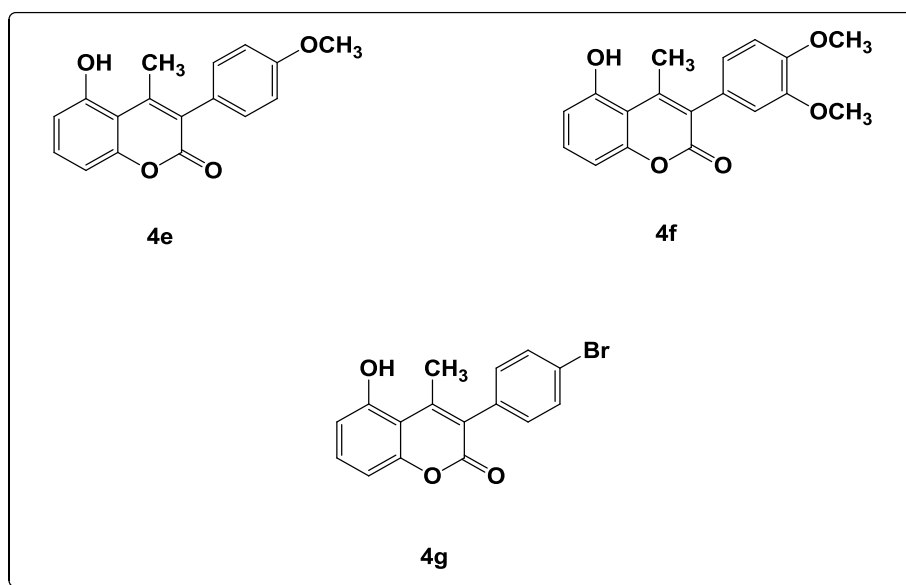
Η σειρά A των κουμαρινικών αναλόγων αφορά στη σύνθεση 7-υδροξύ-3-αρυλο-κουμαρινών. Αποτελείται συνολικά από τέσσερα παράγωγα τα οποία διαθέτουν υποκαταστάτες Br ή OCH₃ σε θέσεις *meta* και *para* του αρωματικού δακτυλίου της θέσης 3, εφόσον οι αντίστοιχοι υποκαταστάτες είχαν οδηγήσει σε δραστηκότερα μόρια στην προηγούμενη εργασία. Τα μόρια που προέκυψαν είναι η 7-υδροξύ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**4a**), η 7-υδροξύ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**4b**), η 7-υδροξύ-3-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**4c**) και η 7-υδροξύ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**4d**) (Σχήμα 25).



Σχήμα 25: 7-υδροξύ-κουμαρινικά παράγωγα της σειράς A.

ΣΕΙΡΑ B: 3-αρυλο-5-υδροξύ-κουμαρίνες

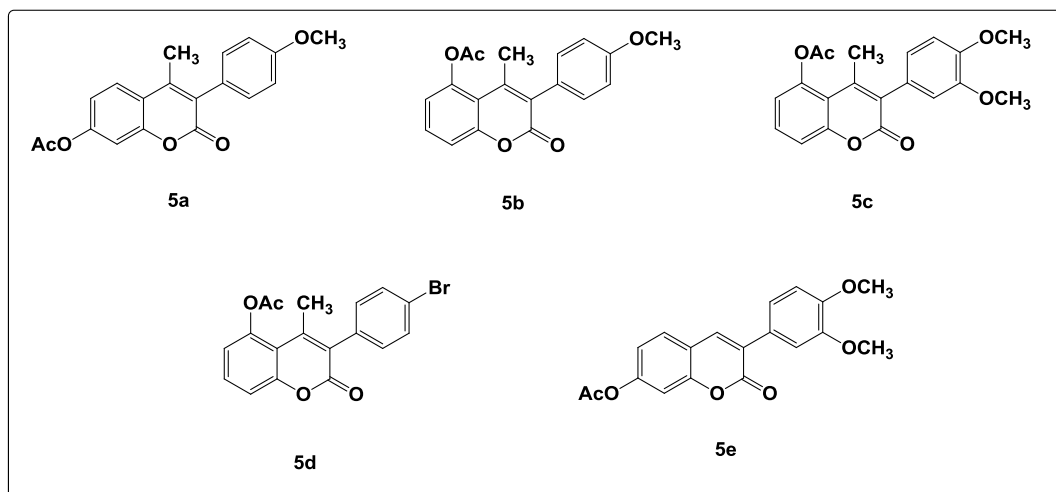
Η σειρά Β των κουμαρινικών αναλόγων αφορά στη σύνθεση 5-υδροξυ-3-αρυλο-κουμαρινών με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση της θέσης του υδροξυλίου στη βιοδραστικότητα των μορίων σε σύγκριση με την 7 θέση. Αποτελείται συνολικά από τρία νέα παράγωγα τα οποία διαθέτουν υποκαταστάτες Br ή OCH₃ σε θέσεις *μετα και παρα* του αρωματικού δακτυλίου της θέσης 3. Τα μόρια που προέκυψαν είναι η 5-υδροξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**4e**), η 5-υδροξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**4f**) και η 5-υδροξυ-3-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**4g**) (Σχήμα 26).



Σχήμα 26: 5-υδροξυ-κουμαρινικά παράγωγα της σειράς Β.

ΣΕΙΡΑ Γ: 7-ακετυλοξυ-3-αρυλο- και 5-ακετυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρίνες

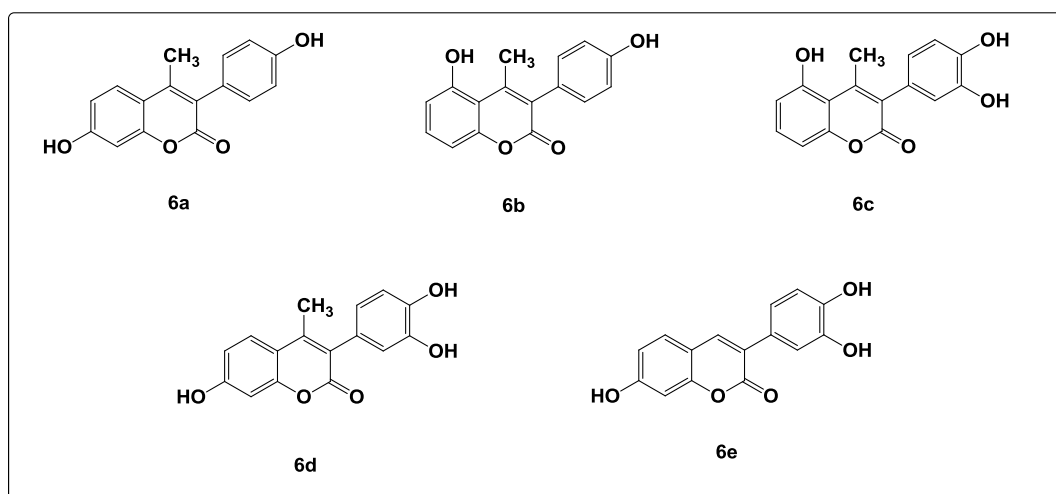
Η σειρά Γ των κουμαρινικών αναλόγων αφορά στη σύνθεση αναλόγων των σειρών Α και Β, τα οποία περιέχουν ακετυλοξυ-υποκαταστάτη στη θέση 7 ή 5 του αρωματικού δακτυλίου της κουμαρίνης. Αποτελείται συνολικά από πέντε νέα παράγωγα τα οποία διαθέτουν υποκαταστάτες Br ή OCH₃ σε θέσεις *μετα και παρα* του αρωματικού δακτυλίου της θέσης 3. Τα μόρια που προέκυψαν είναι η 7-ακετυλοξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**5a**), η 5-ακετυλοξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**5b**), η 5-ακετυλοξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**5c**), η 5-ακετυλοξυ-3-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**5d**) και η 7-ακετυλοξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**5e**) (Σχήμα 27).



Σχήμα 27: 7-ακετυλοξυ-3-αρυλο- και 5-ακετυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρίνες της σειράς Γ.

ΣΕΙΡΑ Δ: Υδροξυλιωμένες 3-αρυλο-κουμαρίνες

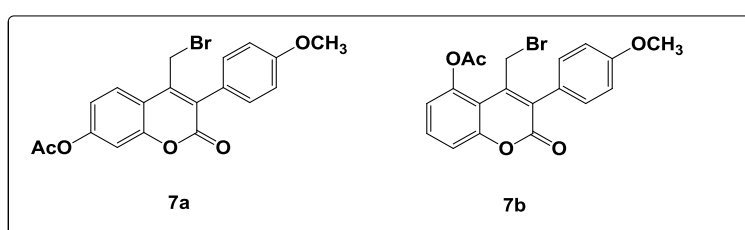
Η σειρά Δ των κουμαρινικών αναλόγων αφορά στη σύνθεση κουμαρινών που περιέχουν υδροξυ-ομάδες ως υποκαταστάτες σε διάφορες θέσεις των αρωματικών δακτυλίων. Οι ενώσεις αυτές παρασκευάστηκαν μέσω αντιδράσεων αποπροστασίας των αναλόγων των σειρών Α, Β και Γ. Αποτελείται συνολικά από πέντε νέα παράγωγα. Τα μόρια που προέκυψαν είναι η 7-υδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2Η-χρωμεν-2-όνη (**6a**), η 5-υδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2Η-χρωμεν-2-όνη (**6b**), η 5-υδροξυ-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2Η-χρωμεν-2-όνη (**6c**), η 7-υδροξυ-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2Η-χρωμεν-2-όνη (**6d**) και η 7-υδροξυ-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-2Η-χρωμεν-2-όνη (**6e**) (Σχήμα 28).



Σχήμα 28: Υδροξυλιωμένες 3-αρυλο-κουμαρίνες της σειράς Δ.

ΣΕΙΡΑ E: 3-αρυλο-4-βρωμομεθυλο-κουμαρίνες

Η σειρά E των κουμαρινικών αναλόγων αφορά στη σύνθεση **3-αρυλο-4-βρωμομεθυλο-κουμαρινών**. Αποτελείται από δύο νέα παράγωγα τα οποία διαθέτουν μια βρωμομεθυλο-ομάδα στη θέση 4 του βενζοπυρανικού δακτυλίου. Τα μόρια που προέκυψαν είναι η 7-ακετυλοξυ-4-βρωμομεθυλο-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (**7a**) και η 5-ακετυλοξυ-4-βρωμομεθυλο-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (**7b**) (Σχήμα 29).

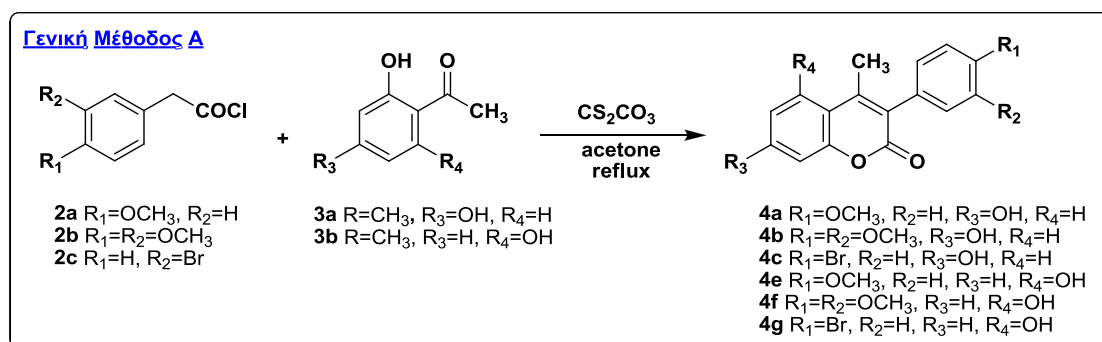


Σχήμα 29: Βρωμιωμένα παράγωγα της σειράς E.

2.2 Σύνθεση και χαρακτηρισμός των νέων μορίων

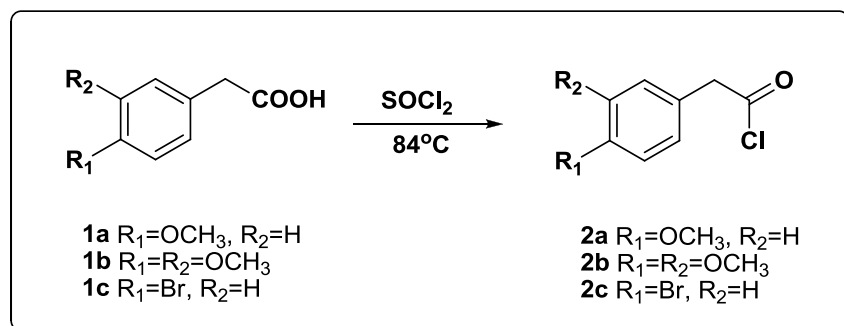
2.2.1 Γενική Μέθοδος A - Σύνθεση 3-αρυλο-7-υδροξυ και 3-αρυλο-5-υδροξυ κουμαρινών 4a-4g

Η σύνθεση των κουμαρινικών παραγώγων των σειρών A και B πραγματοποιήθηκε μέσω αντίδρασης συμπύκνωσης μεταξύ κατάλληλα υποκατεστημένων 2-υδροξυ-ακετοφαινονών και χλωριδίων φαινυλοξικών οξέων (Σχήμα 30).



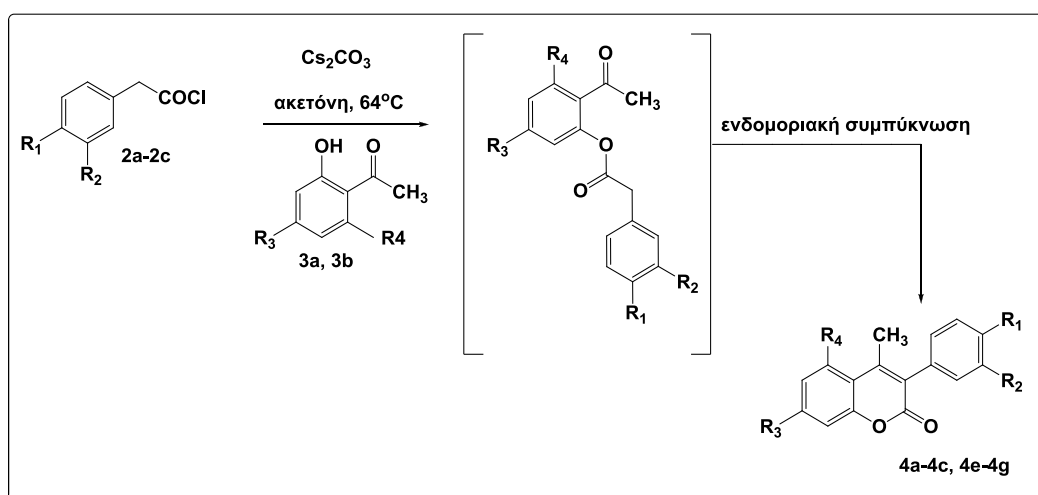
Σχήμα 30: Συνθετική πορεία 3-αρυλο-7-υδροξυ και 3-αρυλο-5-υδροξυ κουμαρινών 4a-4g

Τα παραγόμενα χλωρίδια (**2a-2c**), συντέθηκαν μέσω αντίδρασης χλωρίωσης των παραπάνω οξέων με περίσσεια θειονυλοχλωριδίου SOCl_2 (Σχήμα 31) και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς καθαρισμό στα περαιτέρω στάδια.



Σχήμα 31: Χλωρίωση φαινυλοξικών οξέων.

Η σύνθεση των κουμαρινών **4a-4g** επιτυγχάνεται μέσω διαμοριακής αντίδρασης συμπύκνωσης της 2,4-διυδροξυ-ακετοφαινόνης (**3a**) ή της 2,6-διυδροξυ-ακετοφαινόνης (**3b**), με χλωρίδια φαινυλοξικών οξέων σε βασικό περιβάλλον. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει μία πυρηνόφιλη προσβολή από το μη δεσμικό ζεύγος ηλεκτρονίων του υδροξυλίου της θέσης 2 της ακετοφαινόνης στο καρβονύλιο του χλωριδίου του οξέος οπότε σχηματίζονται οι αντίστοιχοι ενδιάμεσοι εστέρες οι οποίοι στις συνθήκες της αντίδρασης δεν απομονώνονται αλλά υφίστανται ενδομοριακή αντίδραση συμπύκνωσης προς τις επιθυμητές κουμαρίνες. Ο μηχανισμός της αντίδρασης παρουσιάζεται στο Σχήμα 32.

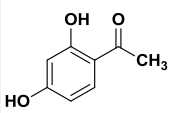
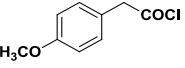


Σχήμα 32: Αναλυτικός μηχανισμός της αντίδρασης συμπύκνωσης

2.2.2 Βελτιστοποίηση συνθηκών αντίδρασης συμπύκνωσης

Προκειμένου να μελετηθούν οι βέλτιστες συνθήκες της αντίδρασης συμπύκνωσης για την παρασκευή των νέων κουμαρινών, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με πρώτες ύλες την 2,4-διυδροξυ-ακετοφαινόνη και το χλωρίδιο του *para* μεθοξυ-φαινυλοξικού οξέος σε διάφορες συνθήκες βασικού περιβάλλοντος και σύνθεσης του χλωρίδιου του οξέος. Ως βάση χρησιμοποιήθηκε είτε το ανθρακικό κάλιο (K_2CO_3), είτε το ανθρακικό καίσιο (CS_2CO_3) σε στοιχειομετρική ποσότητα και σε διαλύτη ακετόνη (Πίνακας 1). Η χλωρίωση του φαινυλοξικού οξέος πραγματοποιήθηκε μέσω θειονυλοχλωριδίου ($SOCl_2$) παρουσία ή απουσία διαλύτη (διχλωρομεθανίου).

Πίνακας 1. Μελέτη συνθηκών αντίδρασης συμπύκνωσης

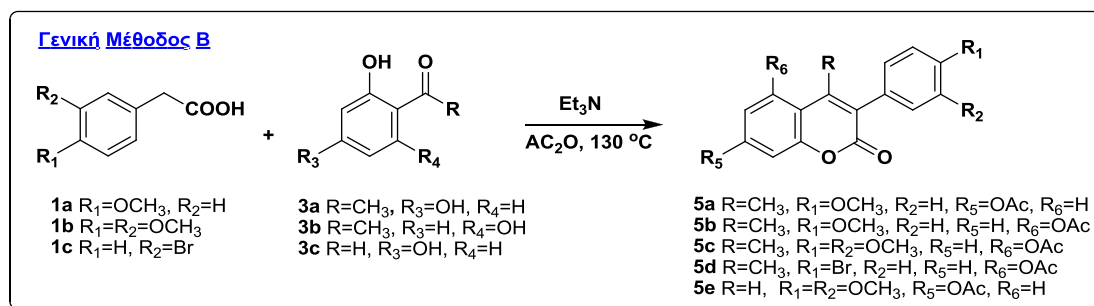
		Βάση	Διαλύτης	Απόδοση
1eq	3eq	K_2CO_3 (5eq)	Ακετόνη	ίχνη
1eq	3eq	K_2CO_3 (3eq)	Ακετόνη	<5%
1eq	3eq	CS_2CO_3 (5eq)	Ακετόνη	<13%
1eq	4eq	CS_2CO_3 (5eq)	Ακετόνη	20%

Από τη διερεύνηση αυτή προέκυψε ότι οι καλύτερες αποδόσεις λαμβάνονται κατά την αντίδραση της 2,4-διυδροξυ-ακετοφαινόνης και του χλωριδίου του *para* μεθοξυ-φαινυλοξικού οξέος σε διαλύτη ακετόνη, παρουσία στοιχειομετρικής ποσότητας ανθρακικού καυσίου, σε θερμοκρασία βρασμού της ακετόνης ($62^\circ C$). Η σύνθεση του χλωριδίου του οξέος πραγματοποιήθηκε απουσία διαλύτη.

2.2.3 Γενική Μέθοδος Β – Σύνθεση 3-αρυλο-7-υδροξυ και 3-αρυλο-5-υδροξυ κουμαρινών 4a-4g μέσω των αντίστοιχων ακετυλιωμένων αναλόγων

Η μεθοδολογία για την σύνθεση των ενώσεων των Σειρών Α και Β, η οποία ακολουθήθηκε αρχικά υστερούσε λόγω χαμηλών αποδόσεων (< 20%). Στα πλαίσια επομένως βελτιστοποίησης των αποδόσεων σύνθεσης των κουμαρινικών αναλόγων, η

σύνθεση μέρους των παραγώγων πραγματοποιήθηκε μέσω μιας διαφορετικής συνθετικής πορείας η οποία περιλάμβανε τις ακετυλιωμένες κουμαρίνες της σειράς Γ (Σχήμα 33).

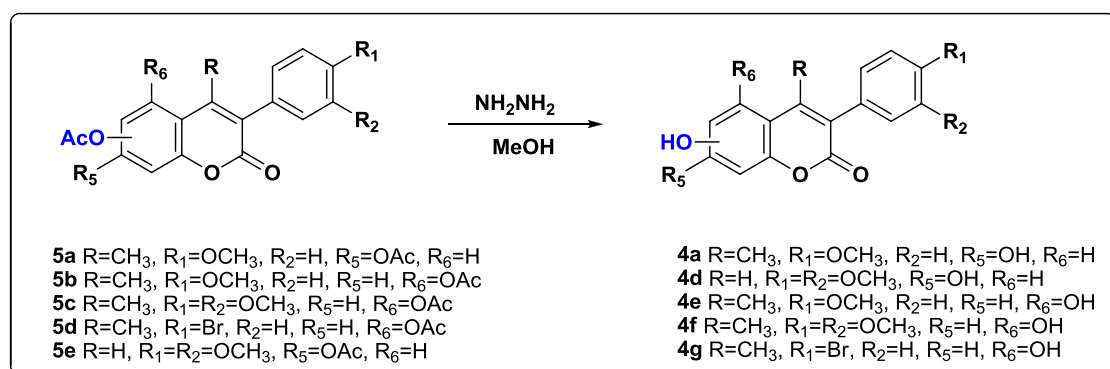


Σχήμα 33: Αντίδραση σύνθεσης 7-ακετυλοξυ-3-αρυλο- και 5-ακετυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρινών **5a-5e**.

Η αντίδραση συμπύκνωσης πραγματοποιήθηκε παρουσία τριαιθυλαμίνης (Et₃N) και οξικού ανυδρίτη (Ac₂O) και πλεονεκτεί σημαντικά καθώς τα προϊόντα ελήφθησαν σε σημαντικά ικανοποιητικότερες αποδόσεις (>70%) χωρίς να απαιτούνται περαιτέρω διεργασίες καθαρισμού.

2.2.4 Σύνθεση 7-υδροξυ-και 5-υδροξυ-3-αρυλο- κουμαρινών

Τα τελικά προϊόντα των υδροξυ-κουμαρινών, ελήφθησαν ύστερα από αντίδραση απακετυλίωσης των αρχικών μορίων παρουσία υδραζίνης σε διαλύτη μεθανόλη με πολύ ικανοποιητικές αποδόσεις (>80%) (Σχήμα 34).



Σχήμα 34: Αντίδραση σύνθεσης απακετυλιωμένων κουμαρινών

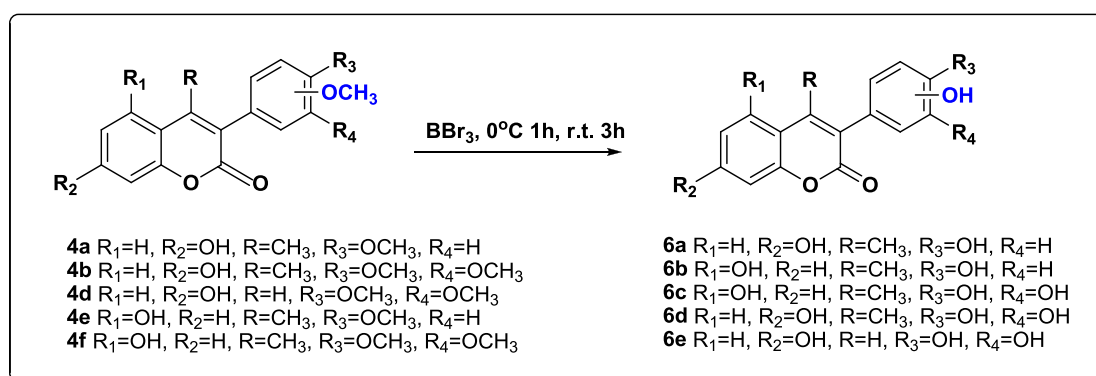
2.3 Δομικές τροποποιήσεις

2.3.1 Σύνθεση υδροξυλιωμένων 3-αρυλο-κουμαρινών

Για την περαιτέρω διερεύνηση του τρόπου που επηρεάζει η δομή την βιολογική δράση, πραγματοποιήθηκαν τροποποιήσεις στις κουμαρίνες **4a**, **4b**, **4d**, **4e** και **4f** με αποτέλεσμα 5 νέα παράγωγα, τα οποία προέκυψαν κατόπιν αποπροστασίας των μεθοξυ-ομάδων των αρχικών παραγώγων (Σχήμα 35).

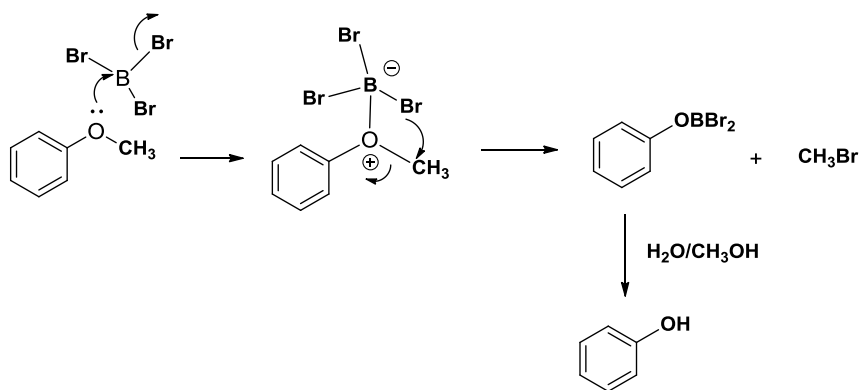
Η αποπροστασία των μεθοξυ-ομάδων του αρωματικού δακτυλίου της θέσης 3 των κουμαρινικών αναλόγων, οδήγησε στα προϊόντα **6a**, **6b**, **6c**, **6d** και **6e** μέσω των οποίων διερευνήθηκε επιπλέον και η επίδραση της παρουσίας κατεχολικού συστήματος (**6c**, **6d**, **6e**) στη βιολογική δράση των μορίων.

Συγκεκριμένα, για την αποπροστασία της μεθοξυ-ομάδας, τα κατάλληλα παράγωγα, κατεργάστηκαν με διάλυμα BBr_3 σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο και προέκυψαν τα νέα μόρια **6a-6e** (Σχήμα 35).



Σχήμα 35: Αντίδραση αποπροστασίας κουμαρινών.

Παρακάτω παρατίθεται ο μηχανισμός της αποπροστασίας των ομάδων $-\text{OCH}_3$ που είναι ο εξής:

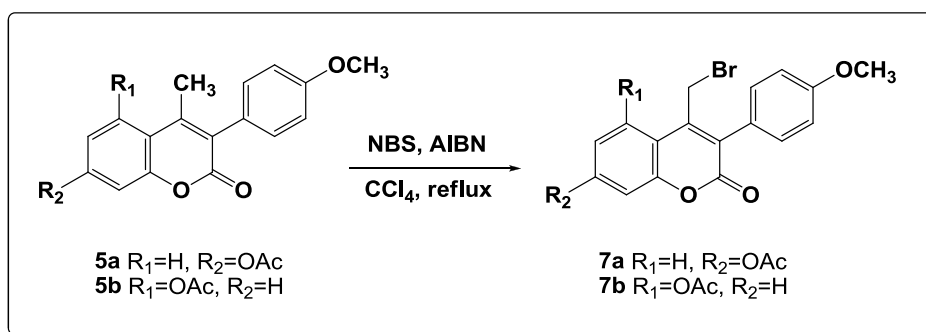


Σχήμα 36: Μηχανισμός αντίδρασης αποπροστασίας

2.3.2 Αντιδράσεις βρωμίωσης

ΣΕΙΡΑ Ε: Σύνθεση 3-αρυλο-4-βρωμομεθυλο-κουμαρινών 7a και 7b

Η δεύτερη προσέγγιση δομικής τροποποίησης των κουμαρινών επικεντρώθηκε στο σχεδιασμό αντιδράσεων βρωμίωσης του μεθυλίου της θέσης 4 του βενζοπυρανικού δακτυλίου, μέσω μηχανισμού ελευθέρων ριζών, με χρήση του αζω-δις-ισοβουτυρονιτριλίου (azobis-isobutyronitrile, AIBN) και του Ν-βρωμο-ηλεκτριμιδίου (N-Bromosuccinimide, NBS), όπως περιγράφεται στο Σχήμα , η οποία οδήγησε με αρκετά ικανοποιητικές αποδόσεις (50-60%) στα παράγωγα **7a** και **7b** της Σειράς Ε.



Σχήμα 37: Αντίδραση βρωμίωσης των κουμαρινών (Σειρά Ε).

Πειράματα βελτιστοποίησης των συνθηκών των αντιδράσεων βρωμίωσης πραγματοποιήθηκαν αρχικά, χρησιμοποιώντας 1.2eq του (NBS) και καταλυτική ποσότητα της ρίζας (AIBN). Τα τελικά προϊόντα, έδειξαν μέσω φασματοσκοπίας NMR, μίγμα του επιθυμητού αλογονοπαράγωγου και του σχηματιζόμενου από την βρωμίωση ηλεκτριμιδίου. Οι τελικές ικανοποιητικές αποδόσεις σε καθαρά προϊόντα,

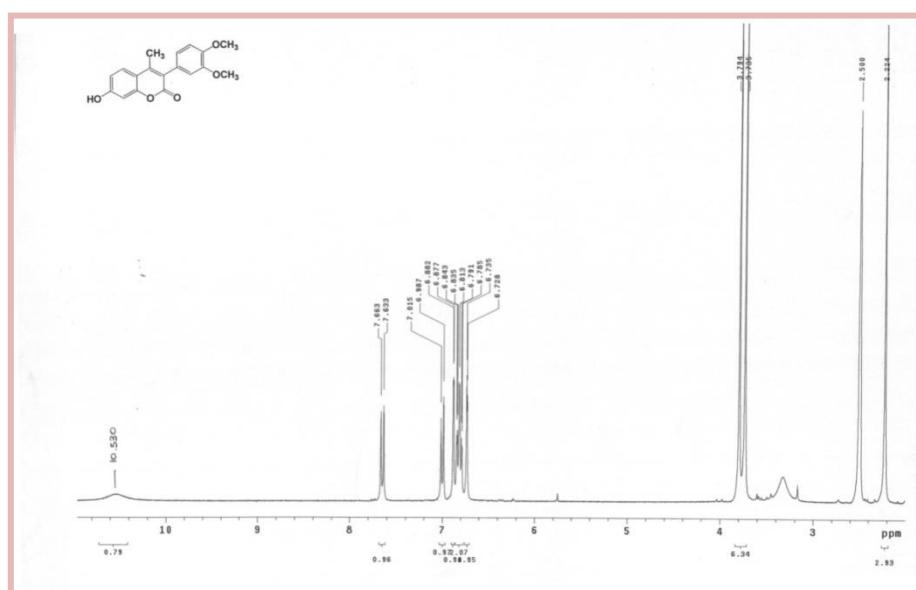
ελήφθησαν ύστερα από αντίδραση ισομοριακών ποσοτήτων κουμαρίνης και N-βρωμο- ηλεκτριμιδίου, με 0.10eq αζω-δισ-ισοβουτρονιτριλίου.

2.4 Φασματοσκοπική Μελέτη

Η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός της δομής όλων των νέων μορίων πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία NMR (^1H NMR και ^{13}C NMR), τα οποία ελήφθησαν στο Φασματογράφο NMR Varian Gemini 300 του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ. Στο υποκεφάλαιο αυτό περιγράφεται ο τρόπος ταυτοποίησης των νέων κουμαρινικών παραγώγων από τα προκύπτοντα φάσματα NMR για κάποια αντιπροσωπευτικά από κάθε κατηγορία μόρια.

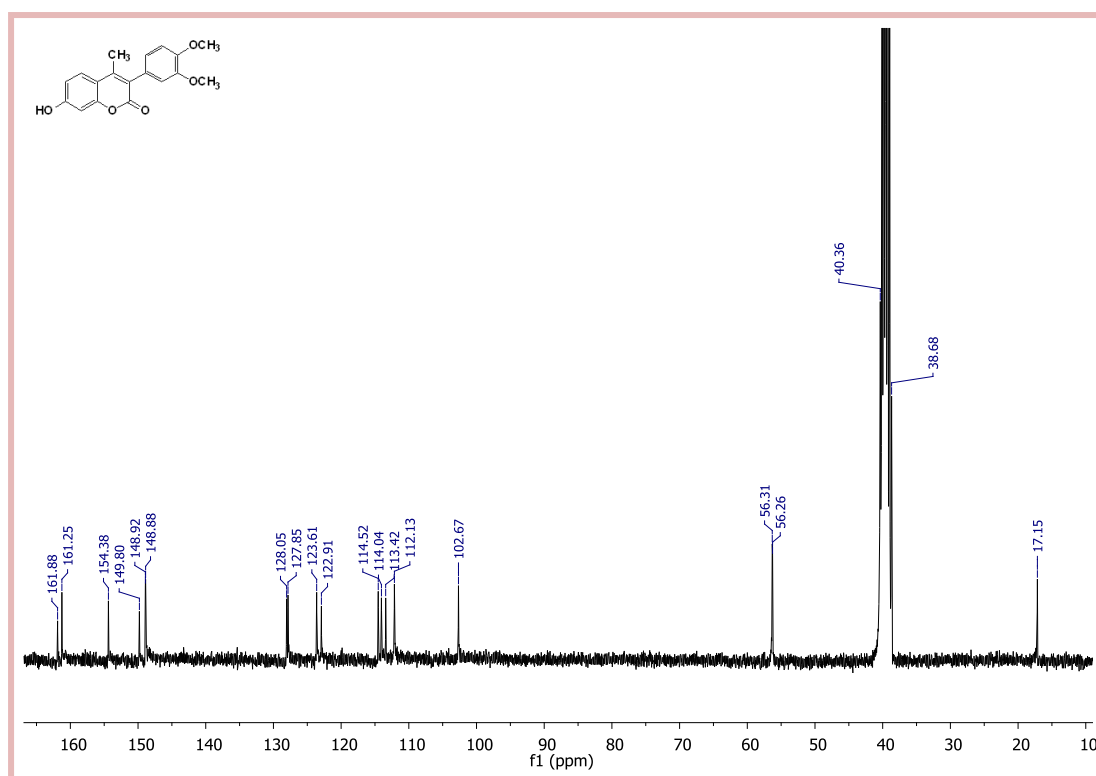
Σειρά Α: 3-αρυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνες

Στην Εικόνα 4 παρουσιάζεται το φάσμα ^1H NMR της κουμαρίνης **4b** σε διαλύτη δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO – d_6). Το φάσμα αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας απλής κορυφής στα 2.22 ppm που οφείλεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της μεθυλο ομάδας της θέσης 4 του βενζοπυρανικού δακτυλίου. Χαρακτηριστικές επίσης είναι οι δύο απλές κορυφές στα 3.79 και 3.73 ppm, που οφείλονται στα πρωτόνια των δύο μεθόξυ ομάδων στην *para* και *meta* θέση του δακτυλίου της θέσης 3, καθώς και η ευρεία (broad) κορυφή στα 10.53 ppm που οφείλεται στην ομάδα του υδροξυλίου της 7 θέσης του αναλόγου.



Εικόνα 4: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης **4b**

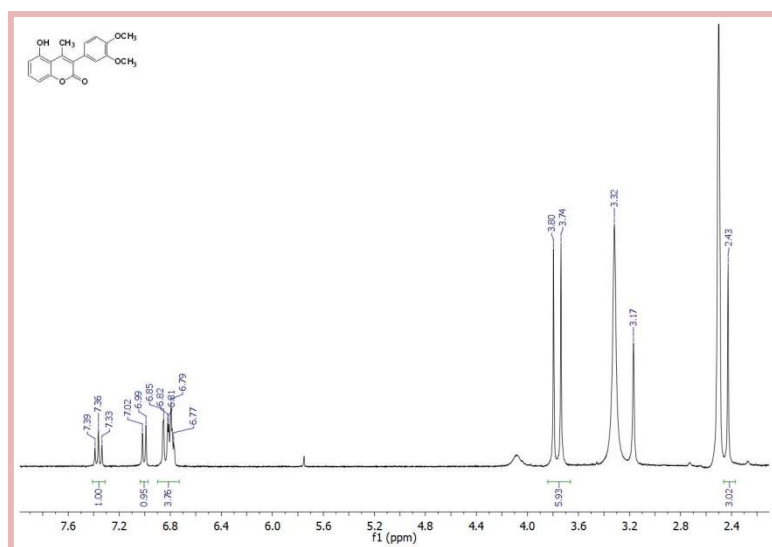
Στο φάσμα ^{13}C NMR της ίδιας ένωσης (Εικόνα 5) παρατηρούμε μία κορυφή σε χαμηλό μαγνητικό πεδίο, στα 161.88 ppm, η οποία αποδίδεται στον στον καρβονυλικό άνθρακα της θέσης 2 του ετεροκυκλικού δακτυλίου. Οι κορυφές που εμφανίζονται στα 56.26 και 56.31 ppm, αποδίδονται στους άνθρακες των μεθόξυ ομάδων και στα 17.15 ppm στην πιο προστατευμένη ομάδα του άνθρακα της μεθυλομάδας τη 4 θέσης.



Εικόνα5: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO- d_6) της κουμαρίνης **4b**

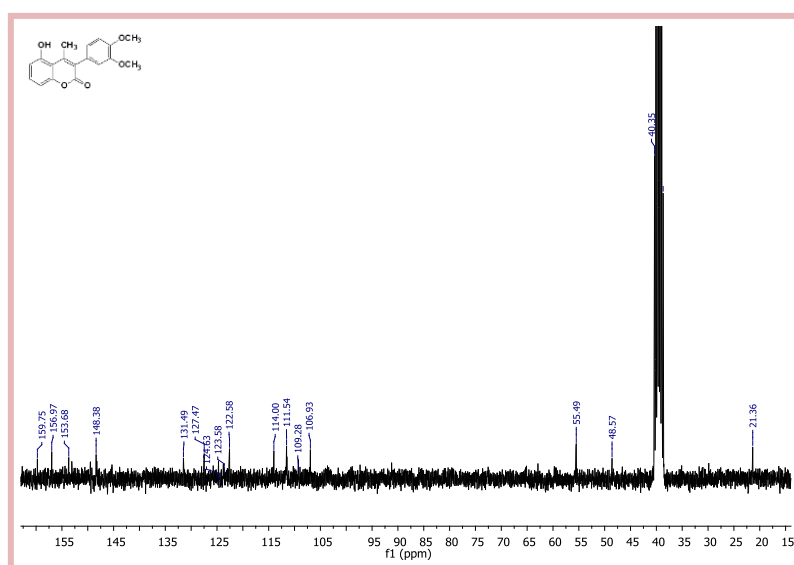
Σειρά Β : 3-αρυλο-5-υδροξυ-κουμαρίνες

Στην Εικόνα 6 παρουσιάζεται το φάσμα ^1H NMR της κουμαρίνης **4f** σε διαλύτη δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO – d_6). Το φάσμα αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας απλής κορυφής στα 2.43 ppm που οφείλεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της μέθυλο ομάδας της θέσης 4 του βενζοπυρανικού δακτυλίου. Χαρακτηριστικές επίσης είναι οι δύο απλές κορυφές στα 3.74 και 3.80 ppm, που οφείλονται στα πρωτόνια των δύο μεθόξυ ομάδων στην *παρα* και *μετα* θέση του δακτυλίου της θέσης 3.



Εικόνα 6: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **4f**

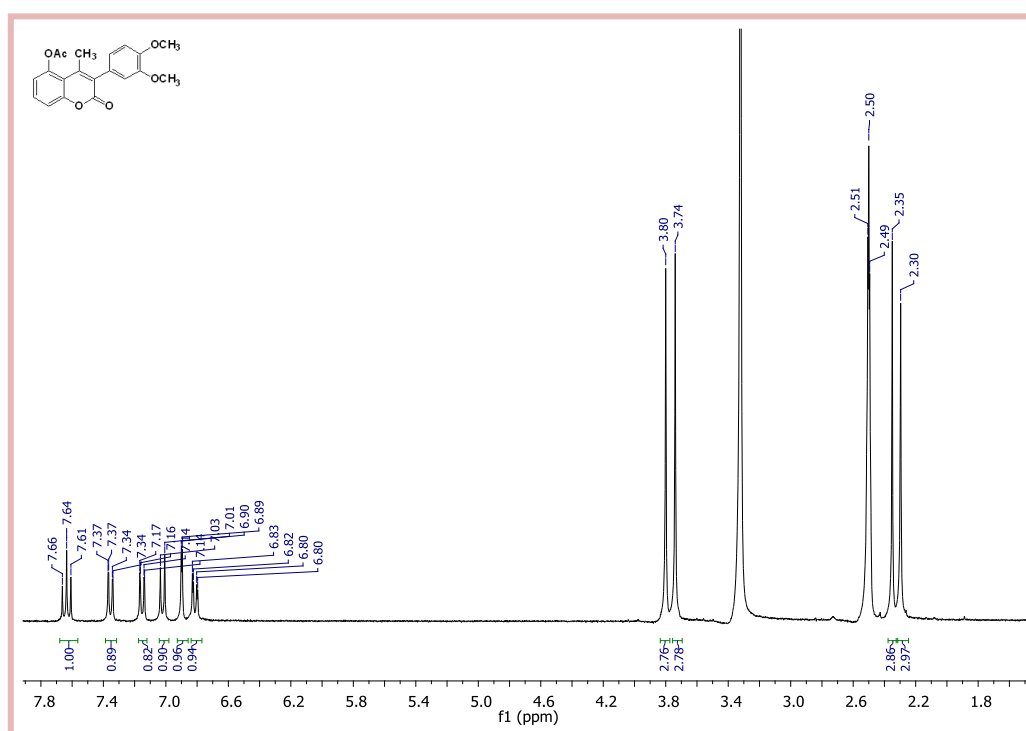
Στο φάσμα ^{13}C NMR της ίδιας ένωσης (Εικόνα 7) παρατηρούμε μία κορυφή σε χαμηλό μαγνητικό πεδίο, στα 159.75 ppm, η οποία αποδίδεται στον καρβονυλικό άνθρακα της θέσης 2 του ετεροκυκλικού δακτυλίου. Οι κορυφές που εμφανίζονται στα 55.49 και 48.57 ppm, αποδίδονται στους άνθρακες των μεθόξυ ομάδων. Η κορυφή που αποδίδεται στην πιο προστατευμένη ομάδα του άνθρακα της μεθυλομάδας τη 4 θέση, παρατηρούμε ότι εμφανίζεται σε χαμηλότερο πεδίο (21.36 ppm) συγκριτικά με την αντίστοιχη κορυφή της κουμαρίνης **4a**, λόγω ύπαρξης της ομάδας του υδροξυλίου στη 5 θέση, καθιστώντας έτσι το εν λόγω μεθύλιο περισσότερο αποπροστατευμένο.



Εικόνα 7: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **4f**

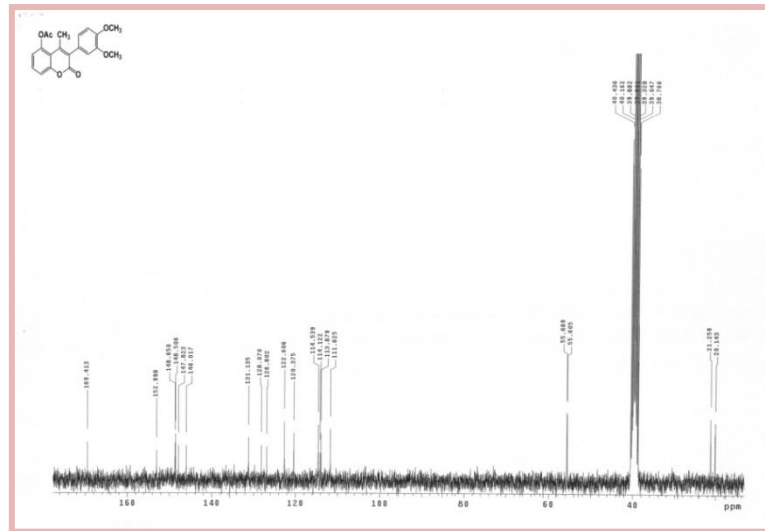
Σειρά Γ : 7-ακετυλοξυ- και 5-ακετυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρίνες

Στην Εικόνα 8 παρουσιάζεται το φάσμα ^1H NMR της κουμαρίνης **5c** σε διαλύτη δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο ($\text{DMSO} - d_6$). Το φάσμα αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας απλής κορυφής στα 2.30 ppm που οφείλεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της μεθυλο ομάδας της θέσης 4 του βενζοπυρανικού δακτυλίου. Χαρακτηριστικές επίσης είναι οι δύο απλές κορυφές στα 3.74 και 3.80 ppm, που οφείλονται στα πρωτόνια των δύο μεθοξυ ομάδων στην *para* και *meta* θέση του δακτυλίου της θέσης 3, καθώς και η κορυφή στα 2.35 ppm που οφείλεται στα ισοδύναμα πρωτόνια της ακετυλο ομάδας της θέσης 5 του αναλόγου.



Εικόνα 8: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, $\text{DMSO}-d_6$) της κουμαρίνης **5c**

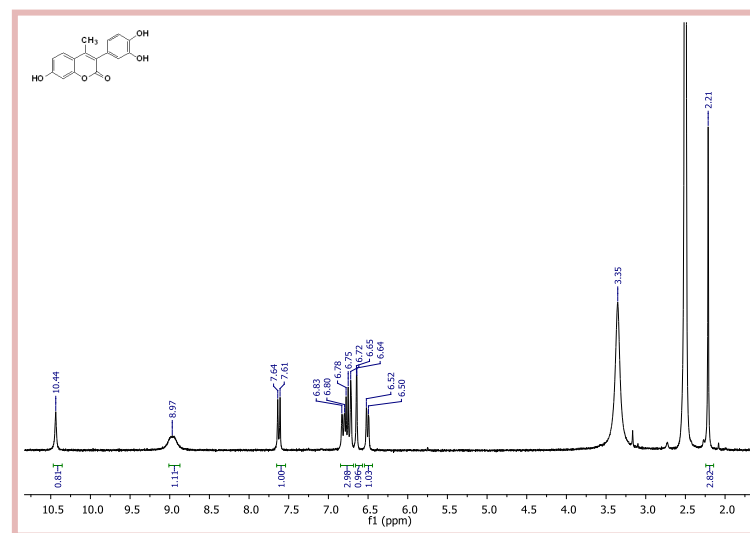
Στο φάσμα ^{13}C NMR της ίδιας ένωσης (Εικόνα 9) παρατηρούμε μία κορυφή σε χαμηλό μαγνητικό πεδίο, στα 169.41ppm, η οποία αποδίδεται στον αποπροστατευμένο καρβοξυλικό άνθρακα του μορίου. Οι κορυφές που εμφανίζονται στα 55.68 και 55.60 ppm, αποδίδονται στους άνθρακες των μεθοξυ ομάδων. Η κορυφή που αποδίδεται στην πιο προστατευμένη ομάδα του άνθρακα της μεθυλο-ομάδας τη 4 θέσης, εμφανίζεται στα 20.14 ppm. Ο άνθρακας της ακετυλο ομάδας συντονίζεται στα 21.25 ppm.



Εικόνα 9: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **5c**

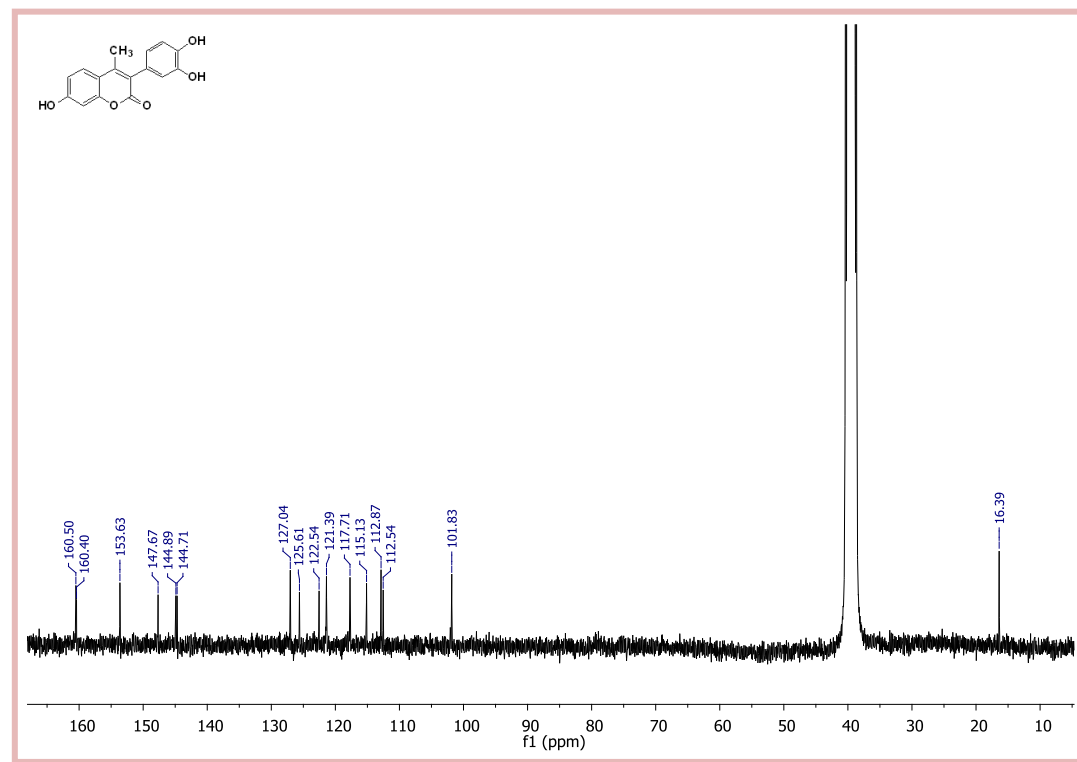
Σειρά Δ : Υδροξυλιωμένες 3-αρυλο-κουμαρίνες

Για όλα τα φάσματα των αποπροστατευμένων παραγώγων της Σειράς Δ, είναι φανερή η απουσία των απλών κορυφών, που οφείλονται στα πρωτόνια των μεθόξυ ομάδων του δακτυλίου της θέσης 3 των κουμαρινικών παραγώγων. Στην Εικόνα 10 παρουσιάζεται το φάσμα ^1H NMR της κουμαρίνης **6d** σε διαλύτη δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο ($\text{DMSO} - \text{d}_6$). Το φάσμα αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας απλής κορυφής στα 2.21 ppm που οφείλεται στα πρωτόνια του μεθυλίου της 4 θέσης, καθώς από τις κορυφές στα 10.44 και 8.97 ppm των υδροξυλικών ομάδων.



Εικόνα 10: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **6d**

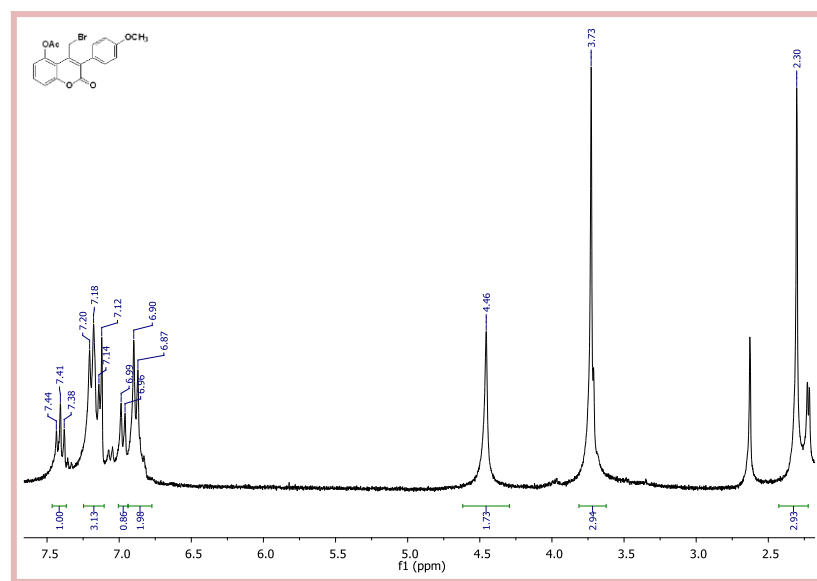
Στο φάσμα ^{13}C NMR της ίδιας ένωσης (Εικόνα 11) παρατηρούμε μία κορυφή σε χαμηλό μαγνητικό πεδίο, στα 160.50 ppm, η οποία αποδίδεται στον αποπροστατευμένο καρβοξυλικό άνθρακα του μορίου. Η κορυφή που αποδίδεται στην ομάδα του άνθρακα της μεθυλομάδας τη 4 θέσης, εμφανίζεται στα 16.39 ppm.



Εικόνα 11: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **6d**

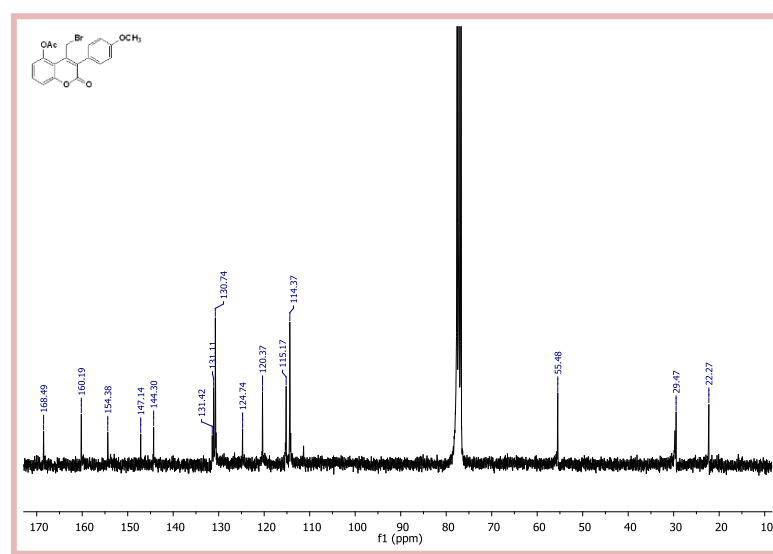
Σειρά E : 3-αρυλο-4-βρωμομεθυλο-κουμαρίνες

Στην Εικόνα 12 παρουσιάζεται το φάσμα ^1H NMR της κουμαρίνης **7b** σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3). Το φάσμα αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας απλής κορυφής στα 2.30 ppm που οφείλεται στα ισοδύναμα πρωτόνια της ακέτυλο ομάδας της θέσης 5 του αναλόγου, από μία απλή κορυφή στα 3.73 ppm που αντιστοιχεί στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της μεθόξυ ομάδας στην *para* θέση του δακτυλίου της θέσης 3, καθώς και από μια απλή κορυφή στα 4.46 ppm που οφείλεται στα δύο ισοδύναμα πρωτόνια του μεθυλενίου της 4 θέσης του βενζοπυρανικού δακτυλίου. Τα πρωτόνια αυτά είναι ιδιαίτερα αποπροστατευμένα αφού είναι άμεσα συνδεδεμένα με το Br.



Εικόνα 12: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) της κουμαρίνης **7b**

Στο φάσμα ^{13}C NMR της ίδιας ένωσης (Εικόνα 13) παρατηρούμε μία κορυφή σε χαμηλό μαγνητικό πεδίο, στα 166.49 ppm, η οποία αποδίδεται στον αποπροστατευμένο καρβοξυλικό άνθρακα του μορίου. Η κορυφή που αποδίδεται στην ομάδα του άνθρακα της βρωμομεθυλο-ομάδας στη θέση 4, εμφανίζεται στα 29.47 ppm. Η κορυφή της ακέτυλο ομάδας εμφανίζεται στα 22.27 ppm και η κορυφή του άνθρακα που αντιστοιχεί στη μεθύξυ ομάδα τη *para* θέσης, εμφανίζεται στα 55.48 ppm.

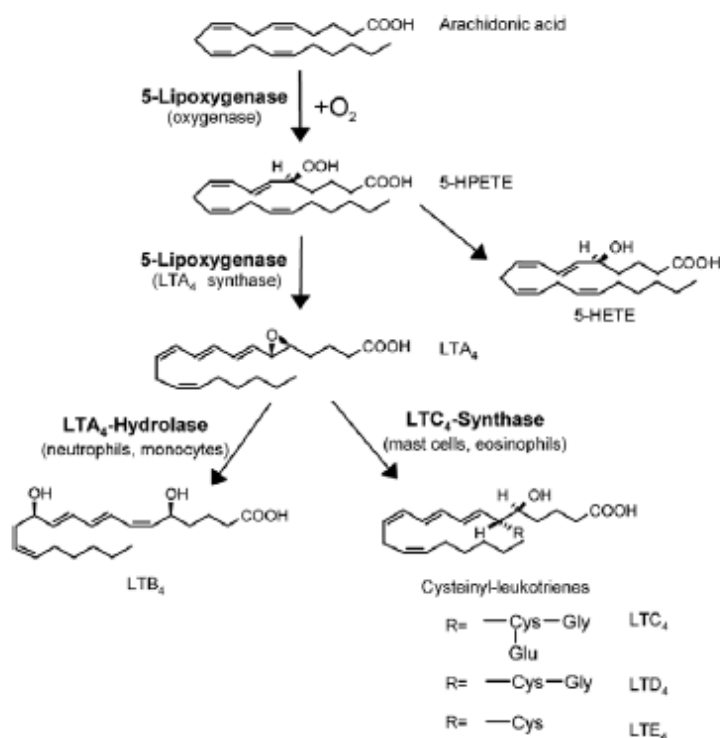


Εικόνα 13: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (300MHz, CDCl_3) της κουμαρίνης **7b**

2.5 Αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των νέων ενώσεων

2.5.1 Μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης μέσω του προσδιορισμού της ικανότητας αναστολής της δράσης του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια

Οι λιποξυγενάσες (LO) είναι ένζυμα που περιέχουν σίδηρο τα οποία απαντώνται ευρέως στα φυτά και στα ζώα. Καταλύουν την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων όπως το λινολεϊκό οξύ (στα φυτά) και το αραχιδονικό οξύ (στα θηλαστικά), σε συγκεκριμένες θέσεις σε υδροϋπεροξειδία. (57) Το αραχιδονικό οξύ μέσω του ενζύμου της 5-λιποξυγονάσης μετατρέπεται σε LTA₄. Το LTA₄ είναι ένα ασταθές ενδιάμεσο που μετά από μια διαδικασία συνεχών μετατροπών καταλήγει στο σχηματισμό λευκοτριενίων LT's. (Σχήμα 38).



Σχήμα 38: Κατάλυση του αραχιδονικού οξέος προς σχηματισμό λευκοτριενίων με τη βοήθεια της 5-λιποξυγονάσης 5-LO.

Οι αναστολείς της λιποξυγονάσης προκαλούν το ενδιαφέρον εξαιτίας της σχέσης του ενζύμου με διάφορες παθολογικές καταστάσεις καθώς επίσης και με έναν αριθμό διατροφικών διαδικασιών. Συγκεκριμένα, στον άνθρωπο, η λιποξυγονάση παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη βιοσύνθεση των λευκοτριενίων, δηλαδή των φλεγμονωδών πρόδρομων ενώσεων που ελευθερώνονται από κύτταρα μυελού των οστών. Έτσι, οι

αναστολείς της λιποξυγονάσης εξετάζονται αρχικά σαν πιθανές ουσίες στη θεραπεία φλεγμονών και αλλεργιών (57). Επιπλέον, ο τρόπος που δρα η 5-LO συνδέεται με την αθηροσκλήρυνση (58), την οστεοπόρωση (59), καθώς επίσης και με διάφορες μορφές καρκίνου, όπως το νευροβλάστωμα και ο καρκίνος του προστάτη (60). Έτσι, το ενδιαφέρον στην σύνθεση αναστολέων λευκοτριενίων παραμένει υψηλό.

Πολλά φλαβονοειδή και άλλα φαινολικά όπως επίσης και κουμαρινικά παράγωγα αναστέλουν την λιποξυγονάση από σόγια. Αυτή η αναστολή σχετίζεται με την ικανότητά τους να ανάγουν τα ιόντα Fe^{3+} του ενεργού κέντρου στην καταλυτικά ανενεργή μορφή Fe^{2+} . Οι λιποξυγενάσες οξειδώνουν συγκεκριμένα λιπαρά οξέα σε συγκεκριμένες θέσεις προς υδροϋπεροξειδία που αποτελούν τις πρόδρομες ουσίες των λευκοτριενίων, οι οποίες περιέχουν μία συζευγμένη δομή τριενίων. Οι περισσότεροι από τους LO αναστολείς είναι αντιοξειδωτικά ή καθαριστές ελευθέρων ριζών, δεδομένου ότι η αντίδραση συμβαίνει μέσω ελεύθερης ρίζας άνθρακα. Είναι γνωστό ότι η λιποξυγονάση σόγιας αναστέλλεται από τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (Non-Steroidal AntiInflammatory Drugs, NSAID) σε ποιοτικά παρόμοιο τρόπο με αυτόν της λιποξυγονάσης σιτευτικού κυττάρου αρουραίων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μία αξιόπιστη επισκόπηση για τέτοια δραστηριότητα.

Παρ'όλο που η λιποφιλία αναφέρεται ως μία σημαντική φυσικοχημική ιδιότητα των καταστολέων LO, δεν ακολουθούν όλα τα εξεταζόμενα παράγωγα αυτή την λογική (61).

2.5.1.1 Ταξινόμηση των αναστολέων της 5-LO

Οι αναστολείς της λιποξυγονάσης μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες. Τις ενώσεις που δρουν οξειδοαναγωγικά, τις ενώσεις που περιέχουν δεσμεύουν σίδηρο με ελάχιστες οξειδοαναγωγικές ιδιότητες, και τους αναστολείς χωρίς καθόλου οξειδοαναγωγικές ιδιότητες.

Η πλειοψηφία των αναστολέων LO είναι αντιοξειδωτικά ή σαρωτές ελευθέρων ριζών καθώς η δράση της λιποξυγονάσης δημιουργεί ελεύθερες ρίζες άνθρακα οπότε τα αντιοξειδωτικά μπορούν να αναστείλουν τη δημιουργία της ρίζας ή να την παγιδεύσουν μόλις σχηματιστεί. (57)

Στα πειράματα που εξετάζονται ενώσεις ως πιθανοί αναστολείς της 5-LO το δείγμα της πρωτεΐνης που χρησιμοποιείται είναι από το φυτό της σόγιας. Οι λόγοι που γίνεται αυτή η αντικατάσταση είναι οι εξής:

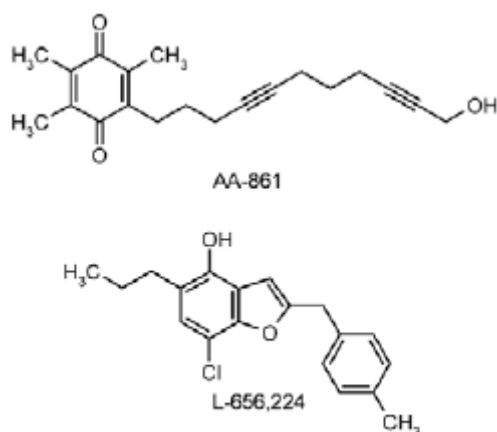
Η ακολουθία των αμινοξέων στις δύο πρωτεΐνες υποδεικνύει δύο περιοχές όπου παραμένει ίδια η σειρά των αμινοξέων και στην ανθρώπινη και στη φυτική λιποξυγονάση. [Applewhite 1989] Ακόμη, είναι σαφώς δυσκολότερο να επιχειρούνται εργαστηριακά πειράματα ρουτίνας με πρωτεΐνη η οποία πρέπει να απομονωθεί από θηλαστικά.

2.5.1.2 Παραδείγματα μορίων με αντιφλεγμονώδη δράση

Γνωρίζοντας λοιπόν τη δράση της 5-LO και την αναγκαιότητα μιας αντιφλεγμονώδους θεραπείας κατά των λευκοτριενίων έχουν γίνει πολλές προσπάθειες σύνθεσης φαρμακολογικών ουσιών που δρουν εναντίον των λευκοτριενίων. Ο τρόπος επίτευξης της αναστολής δημιουργίας των LTs είναι (i) η αναστολή της βιοσύνθεσης τους, και (ii) η αναστολή της δράσης τους.

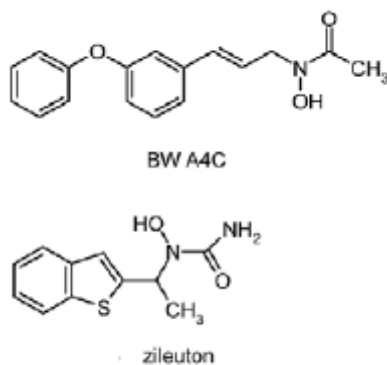
Συνθετικά παράγωγα των λευκοτριενίων, οι προσταγλαδίνες, είχαν αρχικά αναφερθεί σαν αναστολείς της LT βιοσύνθεσης. Για να επιτευχθεί μείωση του σχηματισμού λευκοτριενίων, πιθανούς στόχους αποτελούν τα ένζυμα PLA₂, η 5-LO, η LTA₄ υδρολάση και η LTC₄ συνθάση (Σχήμα 38). Η δέσμευση αυτών των ενζύμων αποσκοπεί στην τελική αναστολή της 5-LO και κατά συνέπεια της εμφάνισης φλεγμονής.

Οι αναστολείς της 5-LO που δρουν οξειδοαναγωγικά περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων ενώσεις κυρίως προερχόμενες από φυτά όπως φλαβονοειδή, κουμαρίνες, κινόνες, λιγνάνες και άλλα πολυφαινολικά παράγωγα. Οι πρώτες απόπειρες συνθετικών αναστολέων της κατηγορίας των οξειδοαναγωγικών περιλαμβάνουν τις ενώσεις που φαίνονται στο Σχήμα 39. Ωστόσο, μειονέκτημα αυτών αποτελεί η έλλειψη βιοδιαθεσιμότητάς τους από το στόμα, η παρουσία μικρής εκλεκτικότητας στην 5-LO με διάφορες παράπλευρες επιπτώσεις εξαιτίας της εμπλοκής με άλλες βιολογικές οξειδοαναγωγικές διαδικασίες ή με την παραγωγή ριζών. Έτσι οι ουσίες αυτές δεν έχουν ακόμα εισαχθεί στην αγορά. (62)



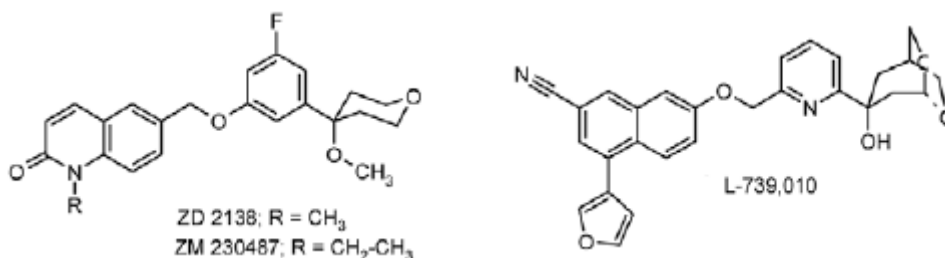
Σχήμα 39: Οξειδοαναγωγικοί αναστολείς της 5-LO.

Στην κατηγορία των αναστολέων που συμπλοκοποιούν το σίδηρο ανήκουν οι ενώσεις της δομής που φαίνεται στο Σχήμα 40. Η ένωση zileuton ήταν και διαθέσιμη στην αγορά πριν αποσυρθεί το 2003 μετά από περαιτέρω κλινικές δοκιμές. (63)



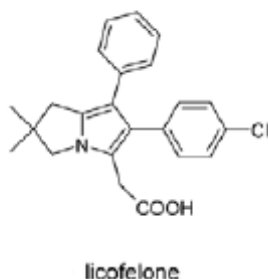
Σχήμα 40: Αναστολείς της 5-LO που συμπλοκοποιούν το σίδηρο.

Οι αναστολείς μη οξειδοαναγωγικού τύπου ανταγωνίζονται με το αραχιδονικό οξύ και το λιπιδικόδρουπεροξειδίο (LOOH) για τη δέσμευση της 5-LO χωρίς οξειδοαναγωγικές ιδιότητες και περιλαμβάνουν δομικά διαφορετικά μόρια. (Σχήμα 41)



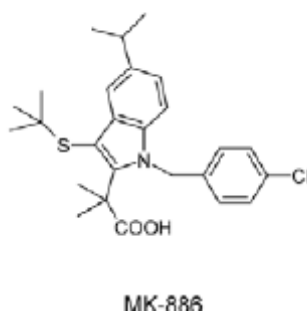
Σχήμα 41: Αναστολείς μη οξειδοαναγωγικού τύπου.

Μια άλλη ουσία η οποία αναστέλλει την δημιουργία της 5-LO σε υπομικρομοριακή κλίμακα είναι η λικοφελόνη (Σχήμα 42).



Σχήμα 42: Δομή Λικοφελόνης.

Τέλος, ένας άλλος έμμεσος τρόπος μείωσης στη δημιουργία λευκοτριενίων είναι η αναστολή της πρωτεΐνης FLAP της 5-LO. (Σχήμα 33) (64)



Σχήμα 43: Ουσία που αναστέλλει την πρωτεΐνη FLAP.

2.5.2 Αντιοξειδωτική Δράση των νέων ενώσεων

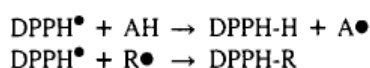
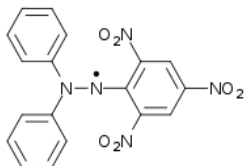
Η αντιοξειδωτική δράση των νέων ενώσεων αξιολογήθηκε μέσω δύο διαφορετικών πειραμάτων: (α) ικανότητα δέσμησης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH και (β) αναστολή της λιπιδικής υπεροξείδωσης του λινολεϊκού οξέος που επάγεται από τη ρίζα AAPH.

2.5.2.1 Ικανότητα δέσμησης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH

Ως DPPH ορίζεται η σταθερή ελεύθερη ρίζα της 2,2- διφαινυλ-1-πικρυλυδραζιλής. Η DPPH δεν αποσυντίθεται και δεν διμερίζεται ούτε αντιδρά με οξυγόνο είναι ιδιαίτερη

χρήσιμη σε ενέργειες όπως η αναστολή του πολυμερισμού ή η χημεία ριζών, στον προσδιορισμό αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων αμινών φαινολών ή άλλων φυσικών ενώσεων (βιταμινών, εκχυλίσματα φυτών, ιατρικών φαρμάκων).

Η ελεύθερη ρίζα DPPH είναι γνωστό ότι μπορεί και αποσπά υδρογόνο δίνοντας το DPPH-H σαν παραπροϊόν (Σχήμα 44).



Σχήμα 44: DPPH (πάνω) και η δράση του, R:ρίζα, A:αντιοξειδωτικό.

Σε άλλες περιπτώσεις, η προσθήκη του DPPH μπορεί να δώσει R-DPPH-H-υποκατεστημένα παράγωγα. Όπως επίσης το ανιόν DPPH, DPPH⁻ μπορεί να οξειδωθεί δίνοντας την ελεύθερη ρίζα.

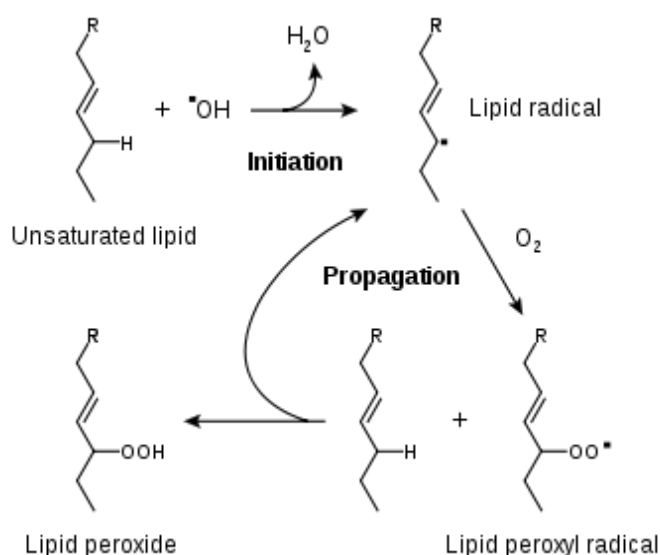
Δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), όπως το υπεροξειδίου του υδρογόνου, η ρίζα υδροξυλίου, και το ανιόν του υπεροξειδίου δημιουργούνται στα κύτταρα μέσω των μεταβολικών διαδικασιών της αναπνοής, της επαναιμάτωσης και της οξείδωσης των λιπαρών οξέων. Μπορεί να αποβούν ιδιαίτερα επιβλαβείς για τα κύτταρα καταστρέφοντας μόρια όπως το DNA, τα λιπίδια και τα ένζυμα. Τα κύτταρα μπορεί να πάθουν ζημιά ή ακόμα και να πάνε να λειτουργούν όταν η ποσότητα του ενεργού οξυγόνου υπερβεί την αντιοξειδωτική χωρητικότητα του κυττάρου. Έτσι η DPPH χρησιμοποιήθηκε σαν δείκτης αντιοξειδωτικής ικανότητας του ανθρώπινου πλάσματος.

Η ρίζα αυτή έχει χρησιμοποιηθεί σαν σαρωτής πολλών ριζών εξαιτίας της ιδιότητας της βιολετί ρίζας DPPH να μεταπίπτει στην κίτρινη DPPH-H απορροφώντας στην περιοχή του ορατού φάσματος στα 520-330 nm.

2.5.2.2 Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης

Τα υδροϋπεροξειδία των λιπιδίων είναι ενδιάμεσα προϊόντα που δεν έχουν τη μορφή ριζών και προέρχονται από ακόρεστα λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια, εστέρες χοληστερόλης, και από την ίδια τη χοληστερόλη. Ο σχηματισμός τους συμβαίνει σε ενζυματικές ή μη αντιδράσεις, που περιλαμβάνουν δραστικές μορφές

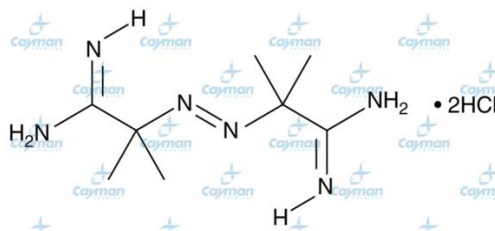
οξυγόνου (ROS). (Σχήμα 45). Οι τελευταίες είναι υπεύθυνες για τις τοξικές επιδράσεις στο σώμα μέσω της βλάβης στους ιστούς. Οι ενώσεις ROS περιλαμβάνουν ρίζες υδροξυλίου, ρίζες οξυ- ή υπεροξυ-λιπιδίων, μονοατομικό οξυγόνο και υπεροξυνιτρικό ανιόν που σχηματίζεται από το μονοξείδιο του αζώτου. Όλα τα παραπάνω ενεργούν σαν μονάδα που ονομάζεται **ελεύθερη ρίζα**. Οι χημικές μορφές αυτές ορίζονται σαν ενώσεις ικανές να δρουν ανεξάρτητα περιέχουν ένα ή περισσότερα μη δεσμικά ηλεκτρόνια (αυτά που καταλαμβάνουν ατομικό ή μοριακό τροχιακό από μόνα τους). Σχηματίζονται είτε από την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από μία μη-ρίζα, είτε από την πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου από μία μη-ρίζα. Μπορούν εύκολα να σχηματιστούν όταν σπάσει ένας ομοιοπολικός δεσμός, όταν ένα ηλεκτρόνιο παραμείνει με κάθε άτομο, ο μηχανισμός ονομάζεται ομολυτική σχάση. Στο νερό, σχηματίζεται η πιο δραστική ρίζα του υδροξυλίου.



Σχήμα 45: Μηχανισμός λιπιδικής υπεροξειδωσης.

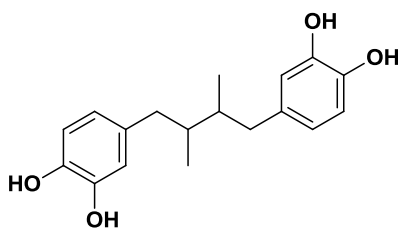
Το 2,2 αζοδις-(2-αμιδινοπροπανο)υδροχλωρίδιο (AAPH) είναι ένας ‘εκκινητής ελευθέρων ριζών’ (Σχήμα 46) που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες στο διάλυμα οι οποίες προκαλούν την οξείδωση του λινολεϊκού οξέος. Η μέθοδος μέτρησης της αντιοξειδωτικής δράσης με AAPH είναι μία γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος που χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης πρώτων υλών βοτάνων και μύρας. Βασίζεται στην αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης του λινολεϊκού οξέος, και είναι ένα μέτρο του πόσο αποδοτικά τα αντιοξειδωτικά προστατεύουν ενάντια στην λιπιδική υπεροξειδωση *in vitro*. Η οξείδωση του

εξωγενούς λινολεϊκού οξέος από ένα θερμικό παραγωγό ελευθέρων ριζών (AAPH) ακολουθείται από φασματοσκοπία UV σε πολύ διαλυτοποιημένο δείγμα. (57)



Σχήμα 46: Εκκινητής ελευθέρων ριζών.

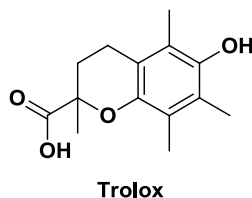
Ως ένωση αναφοράς για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο του DPPH και τη μελέτη της αντιφλεγμονώδους δράσης μέσω της αναστολής της δράσης του ενζύμου λιποξυγονάση (LOX), χρησιμοποιήθηκε η αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης ένωση NDGA (Nordihydroguaiaretic acid).



NDGA
4,4'-(2,3-dimethylbutane-1,4-diyl)dibenzene-1,2-diol

Σχήμα 47: Δόμη NDGA.

Για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο του AAPH, χρησιμοποιήθηκε ως ένωση αναφοράς το Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), ένα ικανό αντιοξειδωτικό ανάλογο της βιταμίνης E.



Σχήμα 48: Δομή Trolox.

Κεφάλαιο 3ο

3.1 Πειραματικό Μέρος

3.1.1 Όργανα και συσκευές

Στο παρόν υποκεφάλαιο παρατίθενται τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των παραχθέντων προϊόντων καθώς και για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών τους ιδιοτήτων, όπως είναι το σημείο ζέσεως.

Για τον **χαρακτηρισμό** των προϊόντων χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητισμού συντονισμού NMR. Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου και άνθρακα (^1H και ^{13}C NMR) έχουν καταγραφεί με το εξής όργανο:

VarianGemini 300MHz

Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων, δίνονται σε ppm. Η πολλαπλότητα των σημάτων στα φάσματα ^1H NMR αναφέρονται ως :

s (singlet, απλό)

d (doublet, διπλό)

t (triplet, τριπλό)

q (quartet, τετραπλό)

m (multiplet, πολλαπλό)

br (broad, ευρύ).

Οι σταθερές συζεύξεως J δίνονται σε Hz.

Για τον προσδιορισμό των **σημείων τήξεως** των εκάστοτε προϊόντων χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Gallenkamp.

3.1.2 Συνθετική Πορεία των νέων ενώσεων

Γενική μέθοδος Α :

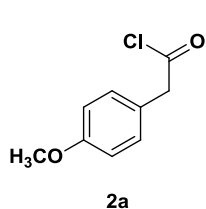
➤ Γενική μέθοδος παρασκευής χλωριδίων φαινυλοξικών οξέων

Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται ποσότητα του κατάλληλου φαινυλοξικού οξέος (1eq) και περίσσεια θειονυλοχλωριδίου (7,6eq) (SOCl_2), που λειτουργεί και ως διαλύτης. Η αντίδραση θερμαίνεται στους 84°C , για 1 ώρα, παρουσία κάθετου ψυκτήρα. Με το πέρας της αντίδρασης πραγματοποιείται απομάκρυνση της περίσσειας του θειονυλοχλωριδίου με απόσταξη υπό ελαττωμένη πίεση. Τα παραγόμενα χλωρίδια (**2a-2c**) χρησιμοποιούνται χωρίς καθαρισμό στα περαιτέρω στάδια.

Τα φαινυλοξικά οξέα που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των χλωριδίων είναι τα εξής:

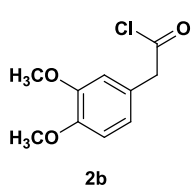
- 4-μεθοξυ-φαινυλοξικό οξύ (**1a**)
- 3,4-διμεθοξυ-φαινυλοξικό οξύ (**1b**)
- 4-βρωμο-φαινυλοξικό οξύ (**1c**)

Χλωρίδιο 4-μεθοξυ-φαινυλοξικού οξέος (2a)



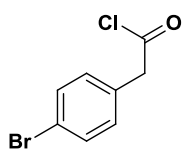
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής χλωριδίων φαινυλοξικού οξέος, σε 1,8mmol (300mg) του 4-μεθοξυ-φαινυλοξικού οξέος (**1a**) προστίθενται 1ml (13.68 mmol) θειονυλοχλωριδίου .

Χλωρίδιο 3,4 διμεθοξυ-φαινυλοξικού οξέος (2b)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής χλωριδίων φαινυλοξικού οξέος, σε 1,529mmol (300mg) του 3,4-διμεθοξυ-φαινυλοξικού οξέος (**1b**) προστίθενται 0,8 ml(11.55mmol) θειονυλοχλωριδίου .

Χλωρίδιο 4-βρωμο-φαινυλοξικού οξέος (2c)



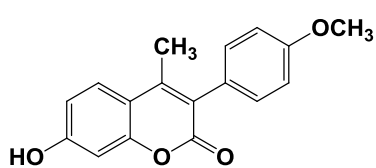
2c

Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής χλωριδίων φαινυλοξικού οξέος, σε 1,3mmol (300mg) του 4-βρωμο-φαινυλοξικού οξέος (**1c**) προστίθενται 0,72ml(9.88mmol) θειονυλοχλωριδίου .

➤ Γενική μέθοδος σύνθεσης 3-αρυλο-7-υδροξυ- και 3-αρυλο-5-υδροξυ-κουμαρινών

Σε κατάλληλη ποσότητα ακετόνης, προστίθενται ισομοριακές ποσότητες (3eq) του κατάλληλου χλωριδίου φαινυλοξικού οξέος (**2a-2c**), ανθρακικού καισίου (CS₂CO₃) και 1eq της κατάλληλης 2-υδροξυ-ακετοφαινόνης (**3a,3b**). Στην σφαιρική φιάλη προσαρμόζεται κάθετος ψυκτήρας και το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 24-48 ώρες στους 62°C, υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα διηθείται και το διήθημα συμπυκνώνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Το προϊόν λαμβάνεται ύστερα από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης, συστήματος διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα-οξικού αιθυλεστέρα (PE/EtOAc). Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ¹H NMR.

7-υδροξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη(4a)⁶⁵



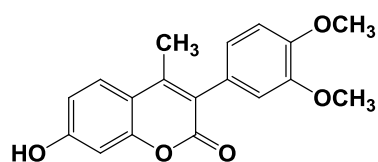
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης 5 και 7-υδροξυ-κουμαρινικών αναλόγων, σε 2ml ακετόνης, προστίθενται 0.9 mmol (166 mg) του χλωριδίου του 4-μεθοξυ-φαινυλοξικού οξέος (**2a**), 0.9 mmol (293 mg) ανθρακικού καισίου και 0.3 mmol (45.6mg) της 2,4-διυδροξυ-ακετοφαινόνης (**3a**). Ο καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιείται με χρωματογραφία στήλης, με σύστημα διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα-οξικού αιθυλεστέρα (PE/EtOAc) σε αναλογία 7:3. Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή ανοιχτού πορτοκαλί στερεού.

[απόδοση : 10%, σημείο τήξεως : 221-224 °C, σ.τ. βιβλιογραφίας: 216-222 °C]

¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ 10.57 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.21 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.99 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.82 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.73 (s, 1H), 3.79 (s, 3H), 2.21 (s, 3H)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.74, 153.75, 149.23, 147.34, 146.26, 131.60, 128.68, 127.13, 126.88, 123.90, 122.39, 113.47, 101.91, 55.11, 16.41

7-υδροξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (4b)



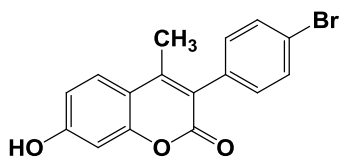
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης 5 και 7-υδροξυ-κουμαρινικών αναλόγων, σε 7,3ml ακετόνης, προστίθενται 3,4mmol (734,4mg) του χλωριδίου του 3,4-διμεθοξυ-φαινυλοξικού οξέος (**2b**), 3,4 mmol (1123,1 mg) ανθρακικού καυσίου και 1,13mmol (172,2mg) της 2,4-διυδροξυ-ακετοφαινόνης (**3a**). Ο καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιείται με χρωματογραφία στήλης, με σύστημα διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα-οξικού αιθυλεστέρα (PE/EtOAc) σε αναλογία 7:3. Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή ανοιχτού καφέ στερεού.

[απόδοση: 13%, σημείο τήξεως: 246°C (dec.), σ.τ. βιβλιογραφίας:]

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.53 (br, 1H), 7.64 (d, $J=9$ Hz, 1H), 7.00 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.78-6.84 (m, 2H), 6.3 (s, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 2.22 (s, 3H)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 161.90, 161.26, 154.39, 149.81, 148.93, 148.89, 128.06, 127.86, 123.62, 122.92, 114.52, 114.05, 113.42, 112.13, 102.67, 56.31, 56.26, 17.14

7-υδροξυ-3-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (4c)⁶⁶



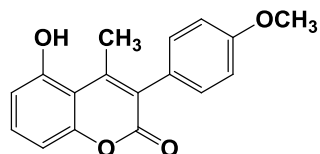
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης 5 και 7-υδροξυ-κουμαρινικών αναλόγων, σε 4 ml ακετόνης, προστίθενται 508.60 mg (2.18mmol) του χλωριδίου του 4-βρωμοφαινυλοξικού οξέος (**2c**) και 709.71 mg (2.18mmol) ανθρακικού καυσίου (CS_2CO_3) και 10.46 mg (0.73mmol) της 2,4-διυδροξυ-ακετοφαινόνης (**3a**). Ο καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιείται με χρωματογραφία στήλης, με σύστημα διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα-οξικού αιθυλεστέρα (PE/EtOAc) σε αναλογία 6:4. Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή ανοιχτού κίτρινου στερεού.

[απόδοση: 11%, σημείο τήξεως: 257-259°C, σ.τ. βιβλιογραφίας: 256-259 °C]

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.54 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H), 3.10 (s, 3H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 172.60, 161.60, 156.42, 149.36, 139.86, 133.26, 131.53, 130.79, 130.29, 125.89, 119.98, 117.77, 102.70, 45.97, 16.22

5-υδροξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (4e)



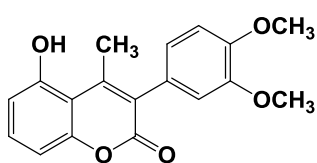
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης 5 και 7-υδροξυ-κουμαρινικών αναλόγων, σε 4ml ακετόνης, προστίθενται 2,16 mmol (399,7mg) του χλωριδίου του 4-μεθοξυφαινυλοξικού οξέος (**2a**), 1,62 mmol (527,8mg) ανθρακικού καυσίου και 0,54 mmol (82,3mg) της 2,6-διυδροξυ-ακετοφαινόνης (**3b**). Ο καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιείται με χρωματογραφία στήλης, με σύστημα διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα-οξικού αιθυλεστέρα (PE/EtOAc) σε αναλογία 6:4. Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή ανοιχτού κίτρινου στερεού.

[απόδοση: 20%, σημείο τήξεως: 221-222°C]

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.36 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 9 Hz, 2H), 6.98 (d, *J* = 9 Hz, 2H), 6.79 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 2.41 (s, 3H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 161.64, 158.65, 156.90, 153.66, 149.35, 134.47, 131.51, 127.11, 124.51, 113.60, 111.51, 109.29, 107.02, 55.10, 21.33

5-υδροξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (4f)



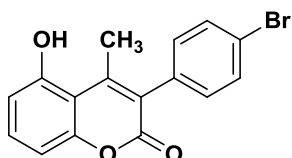
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης 5 και 7-υδροξυ-κουμαρινικών αναλόγων, σε 4,1ml ακετόνης, προστίθενται 1,72 mmol (417,5mg) του χλωριδίου του 3,4-διμεθοξυφαινυλοξικού οξέος (**2b**) και 1,73 mmol (567,69mg) ανθρακικού καυσίου και 0,57 mmol (87,6mg) της 2,6-διυδροξυ-ακετοφαινόνης (**3b**). Ο καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιείται με χρωματογραφία στήλης, με σύστημα διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα-οξικού αιθυλεστέρα (PE/EtOAc) σε αναλογία 6:4. Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή υπόλευκου στερεού.

[απόδοση: 18 %, σημείο τήξεως: 200°C (decomp.)]

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.36 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.00 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.80 (dd, *J* = 9.9, 4.4 Hz, 3H), 3.77 (d, *J* = 17.5 Hz, 6H), 2.43 (s, 3H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.75, 156.97, 153.68, 148.38, 134.45, 131.49, 127.47, 124.63, 122.58, 114.00, 111.54, 109.20, 106.93, 55.49, 48.57, 21.36

5-υδροξυ-3-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (4g)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης 5 και 7-υδροξυ-κουμαρινικών αναλόγων, σε 4,1ml ακετόνης, προστίθενται 1,72 mmol (417,5mg) του χλωριδίου του 4-βρωμοφαινυλοξικού οξέος (**2c**), 1,73 mmol (567,69 mg) ανθρακικού καυσίου και 0,57mmol (87,6 mg) της 2,6-διυδροξυ-ακετοφαινόνης(**3b**). Ο καθαρισμός του προϊόντος πραγματοποιείται με χρωματογραφία στήλης, με σύστημα διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα-οξικού αιθυλεστέρα (PE/EtOAc) σε αναλογία 6:4. Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή καφέ ανοιχτό στερεού.

[απόδοση: 19 %, σημείο τήξεως: 228 °C (decomp.)]

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.54 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H), 3.10 (s, 3H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 172.60, 161.60, 156.42, 149.36, 139.86, 133.26, 131.53, 130.79, 130.29, 125.89, 119.98, 117.77, 102.70, 45.97, 16.22

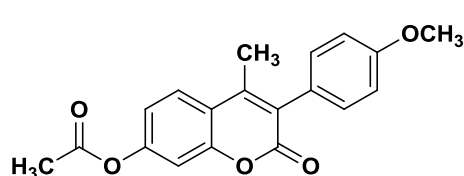
Γενική μέθοδος B :

➤ Γενική μέθοδος σύνθεσης 7-ακετυλοξυ-3-αρυλο- και 5-ακετυλοξυ-3-αρυλο-κουμαρινών.

Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται κατάλληλη ποσότητα οξικού ανυδρίτη [(CH₃CO)₂O] και τριεθυλαμίνης, 1eq του κατάλληλου φαινυλοξικού οξέος και 1,05eq της κατάλληλης 2-υδροξυ-ακετοφαινόνης. Ακολουθεί ανάδευση του μίγματος για 3 ώρες σε θερμοκρασία 130 °C παρουσία κάθετου ψυκτήρα. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Μετά το πέρας της αντίδρασης γίνεται προσθήκη κατάλληλης ποσότητας νερού και ακολουθεί εκχύλιση του μίγματος με διχλωρομεθάνιο (DCM). Ακολουθεί ξήρανση της οργανικής φάσης που προκύπτει από την εκχύλιση με ξηραντικό μέσο το θειικό νάτριο (Na₂SO₄) και ο

διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση οπότε προκύπτει στερεό υπόλειμμα. Το τελικό καθαρό προϊόν παραλαμβάνεται κατόπιν προσθήκης διαλύτη μεθανόλης και διήθησης του σχηματιζόμενου στερεού.

7-ακετυλοξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (5a)⁶⁷

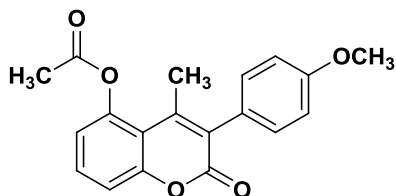


Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης ακετυλιωμένων κουμαρινών, σε 2ml οξικού ανυδρίτη και 0,77ml (56,64mg) τριεθυλαμίνης, προστίθενται 1,8mmol (300mg) του 4-μεθοξυφαινυλοξικού οξέος (**1a**) και 1,89mmol (287,56mg) της 2,4-διυδροξυ-ακετοφαινόνης (**3a**). Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή λευκού στερεού.

[απόδοση: 60 %, σημείο τήξεως: 203-205°C]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.66 (d, J=9 Hz, 1H), 7.25-7.22 (m, 2H), 7.13 (d, J=2.7 Hz, 1H), 7.09 (d, J= 8.7 Hz, 1H), 6.98 (d, J=6.6 Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 2.32 (s, 3H)

5-ακετυλοξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (5b)



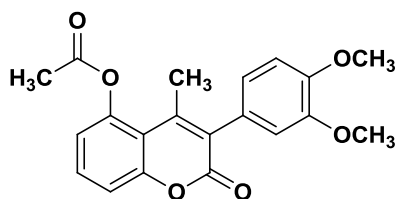
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης ακετυλιωμένων κουμαρινών, σε 2ml οξικού ανυδρίτη και 0,77ml (56,64mg) τριεθυλαμίνης, προστίθενται 1,8mmol (300mg) του 4-μεθοξυφαινυλοξικού οξέος (**1a**) και 1,89 mmol (287,56 mg) της 2,6-διυδροξυ-ακετοφαινόνης (**3b**). Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή λευκού στερεού.

[απόδοση: 70 %, σημείο τήξεως: 153-155°C]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.49 (t, J= 8.4 Hz, 1H), 7.28 (d, J=8.4 Hz, 1H), 7.19 (d, J= 8.4 Hz, 2H), 6.99-6.96 (m, 3H), 3.85 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.35 (s, 3H)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 169.35, 160.45, 159.67, 153.75, 147.95, 146.13, 131.41, 130.71, 128.82, 126.51, 119.86, 115.33, 114.82, 114.16, 55.44, 21.55, 20.43

5-ακετυλοξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (5c)

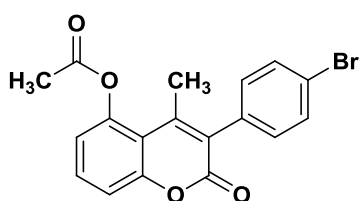


Σύμφωνα με τη σύνθεσης ακετυλιωμένων κουμαρινών, σε 2ml οξικού ανυδρίτη [(CH₃CO)₂O] και 0,66 ml (479,9mg) τριεθυλαμίνης, προστίθενται 1,53 mmol (300 mg) του 3,4-διμεθοξυ-φαινυλοξικού οξέως (**1b**) και 1,60 mmol (243,4 mg) της 2,6-διυδροξυ-ακετοφαινόνης (**3b**). Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή λευκού στερεού.

[απόδοση: 68 %, σημείο τήξεως: 148-150°C]

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.64 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 7.35 (dd, J = 8.3, 1.2 Hz, 1H), 7.15 (dd, J = 8.1, 1.2 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 6.81 (dd, J = 8.2, 2.0 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 2.35 (s, 3H), 2.30 (s, 3H)

5-ακετυλοξυ-3-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (5d)



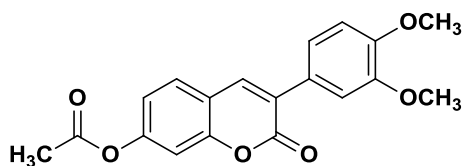
Σύμφωνα με τη σύνθεσης ακετυλιωμένων κουμαρινών, σε 2ml οξικού ανυδρίτη και 0,6ml (436mg) τριεθυλαμίνης, προστίθενται 1,39mmol (300mg) του 4-βρωμο-φαινυλοξικού οξέως (**1c**) και 1,46mmol (222,1mg) της 2,6-διυδροξυ-ακετοφαινόνης (**3b**). Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή λευκού στερεού.

[απόδοση: 65 %, σημείο τήξεως: 173-175 °C]

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.68-7.63 (m, 3H), 7.37 (d, J=8.1 HZ, 1H), 7.27 (d, J= 8.1 Hz, 2H), 7.17 (d, J=8.1 Hz, 1H), 2.34 (s, 3H), 2.26 (s, 3H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 169.25, 158.83, 152.98, 147.84, 146.39, 133.78, 132.33, 131.35, 131.22, 126.98, 121.47, 120.39, 114.54, 113.85, 21.15, 20.01

7-ακετυλοξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (5e)⁶⁸



Σύμφωνα με τη σύνθεσης ακετυλιωμένων κουμαρινών, σε 2ml οξικού ανυδρίτη και 0,66ml (564,64mg) τριεθυλαμίνης, προστίθενται 1,53mmol (300mg) του 3,4-διμεθοξυ-φαινυλοξικού οξέως (**1b**) και 1,60mmol (221,9mg) της 2,4-διυδροξυ-βενζαλδεΐδης (**3c**). Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή ωχρού στερεού.

[απόδοση: 68%, σημείο τήξεως: 171-173 °C, σ.τ. βιβλιογραφίας: 219-220 °C]

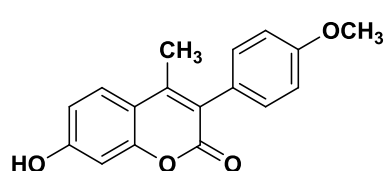
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.73-6.91 (m, 7H), 3.91 (s, 6H), 2.32 (s, 3H)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 168.81, 160.41, 153.82, 152.64, 149.86, 148.80, 138.14, 128.46, 127.30, 121.31, 118.49, 117.66, 111.87, 111.12, 109.94, 56.10, 56.04, 21.18

Γενική μέθοδος απακετυλίωσης κουμαρινών

Ποσότητα από το στερεό που πρόκειται να απακετυλιωθεί (1eq) αντιδρά με την μονοένυδρη υδραζίνη (5eq) NH₂NH₂·H₂O, παρουσία διαλύτη μεθανόλης. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα για 1,5 με 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Μετά το πέρας της αντίδρασης στο διάλυμα προστίθεται νερό και εν συνεχεία πραγματοποιείται εκχύλιση με διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc). Το διάλυμα συμπυκνώνεται και λαμβάνεται το τελικό ξηρό στερεό χωρίς να απαιτούνται περαιτέρω διεργασίες καθαρισμού.

7-υδροξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (4a)



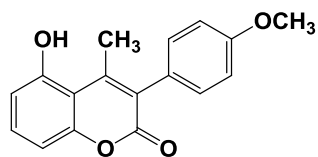
Σύμφωνα με την γενική μέθοδο απακετυλίωσης των κουμαρινών, σε 2ml μεθανόλης και 0,016ml (17,73mg) μονοένυδρης υδραζίνης, προστίθενται 0,154 mmol (50 mg) της 7-ακετυλο-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (5a). Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή ωχρού στερεού.

[απόδοση: 95%, σημείο τήξεως: 230 °C (decomp.)]

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.57 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.21 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.99 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.82 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.73 (s, 1H), 3.79 (s, 3H), 2.21 (s, 3H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.74, 153.75, 149.23, 147.34, 146.26, 131.60, 128.68, 127.13, 126.88, 123.90, 122.39, 113.47, 101.91, 55.11, 16.41

5-υδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2Η-χρωμεν-2-όνη (4e)



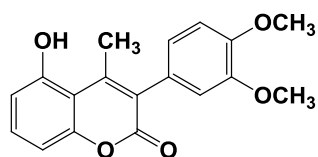
Σύμφωνα με την γενική μέθοδο απακετυλίωσης των κουμαρινών, σε 2ml μεθανόλης MeOH και 0,03 ml (30,86mg) μονοένυδρης υδραζίνης, προστίθενται 0,12 mmol (40 mg) της 5-ακετυλο-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2Η-χρωμεν-2-όνη (**5b**). Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή κίτρινου στερεού.

[απόδοση: 90 %, σημείο τήξεως: 220-222°C]

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.36 (t, J= 8.2Hz, 1H), 7.18 (d, J=9 Hz, 2H), 6.98 (d, J=9 Hz, 2H), 6.79 (d, J=8.4 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 2.41 (s, 3H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 161.64, 158.65, 156.90, 153.66, 149.35, 134.47, 131.51, 127.11, 124.51, 113.60, 111.51, 109.29, 107.02, 55.10, 21.33

5-υδροξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2Η-χρωμεν-2-όνη (4f)



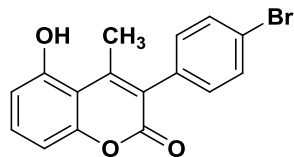
Σύμφωνα με την γενική μέθοδο απακετυλίωσης των κουμαρινών, σε 4ml μεθανόλης MeOH και 0,06ml (67 mg) μονοένυδρης υδραζίνης, προστίθενται 0,26 mmol (100 mg) της 5-ακετυλο-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2Η-χρωμεν-2-όνη (**5c**). Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή καφέ ανοιχτού στερεού.

[απόδοση: 94 %, σημείο τήξεως: 200°C (decomp.)]

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.36 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 7.00 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.80 (dd, J = 9.9, 4.4 Hz, 3H), 3.77 (d, J = 17.5 Hz, 6H), 2.43 (s, 3H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.75, 156.97, 153.68, 148.38, 134.45, 131.49, 127.47, 124.63, 122.58, 114.00, 111.54, 109.20, 106.93, 55.49, 48.57, 21.36

5-υδροξυ-3-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-2Η-χρωμεν-2-όνη (4g)

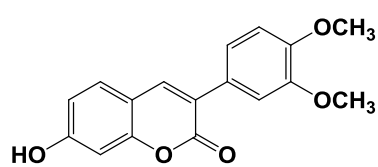


Σύμφωνα με την γενική μέθοδο απακετυλίωσης των κουμαρινών, σε 4ml μεθανόλης MeOH και 0,06ml (67 mg) μονοένυδρης υδραζίνης, προστίθενται 0,26 mmol (100 mg) της 5-ακετυλο-3-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-2Η-χρωμεν-2-όνη (**5d**). Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή καφέ ανοιχτού στερεού.

[απόδοση: 92 %, σημείο τήξεως: 228°C (decomp.)]

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 7.64 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.38 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.81 (dd, $J = 8.1, 2.6$ Hz, 2H), 2.40 (s, 3H)

7-υδροξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη(4d)



Σύμφωνα με την γενική μέθοδο απακετυλίωσης των κουμαρινών, σε 4ml μεθανόλης MeOH και 0,07ml (73,54mg) μονοένυδρης υδραζίνης, προστίθενται 0,29 mmol (100 mg) της 7-ακετυλο-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνης (**5e**). Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή κίτρινου στερεού.

[απόδοση: 91 %, σημείωσήξεως: 100-103°C, (ΦΘΟΡΙΖΕΙ)]

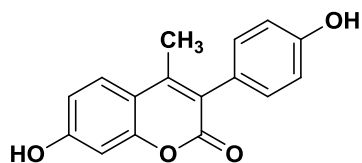
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 8.10 (s, 1H), 7.55 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.00 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.78 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 3.79 (d, $J = 3.0$ Hz, 6H)

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO) δ 161.90, 160.20, 154.78, 148.79, 148.26, 139.99, 129.64, 127.64, 121.33, 120.85, 113.65, 112.04, 111.64, 111.44, 101.69, 55.59, 55.55

Γενική μέθοδος σύνθεσης υδροξυλιωμένων 3-αρυλο-κουμαρινών.

Η κατάλληλη ποσότητα κουμαρίνης (1eq) που πρόκειται να αποπραστατευθεί, αντιδρά εντός σφαιρικής φιάλης, με κατάλληλη ποσότητα τριβρωμιούχου βορίου BBr_3 (8eq για κάθε μεθοξυ ομάδα ($-\text{OCH}_3$)) παρουσία διαλύτη ξηρού διχλωρομεθανίου). Το BBr_3 είναι διάλυμα σε επτάνιο συγκέντρωσης 1M. Αρχικά κατά την προσθήκη του τριβρωμιούχου βορίου η θερμοκρασία διατηρείται στους 0 °C, κάτι το οποίο επιτυγχάνεται με την χρήση παγόλουτρου. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολουθεί παραλαβή του προϊόντος μέσω εκχύλισης με διχλωρομεθάνιο (DCM), ξήρανση με το κατάλληλο ξηραντικό μέσο (Na_2SO_4) και εξάτμιση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Με βάση την Γενική μέθοδο που περιγράφηκε πραγματοποιήθηκε η παραγωγή πέντε νέων αποπραστατευμένων κουμαρινών.

7-υδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2Η-χρωμεν-2-όνη (6a)⁶⁹

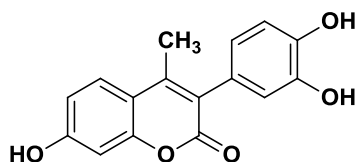


Σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας κουμαρινικών αναλόγων, σε 2ml διχλωρομεθάνιου και 1,37ml (345,22mg) τριβρωμιούχου βορίου, προστίθενται 0,14 mmol (38,90mg) της 7-υδροξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλ-2Η-χρωμεν-2-όνης (4a). Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή ωχρού στερεού.

[απόδοση: 74 %, σημείο τήξεως: 230 °C (decomp.)]

¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ 10.45 (s, 1H), 9.53 (s, 1H), 7.64 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.08 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.85 – 6.77 (m, 3H), 6.72 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 2.21 (s, 3H).

7-υδροξυ-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2Η-χρωμεν-2-όνη (6d)



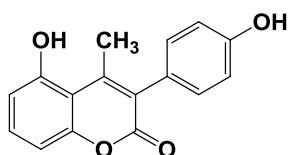
Σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας κουμαρινικών αναλόγων, σε 2,75ml διχλωρομεθάνιου και 2,6ml (653,3mg) τριβρωμιούχου βορίου, προστίθενται 0,16mmol (46mg) της 7-υδροξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2Η-χρωμεν-2-όνης (4b). Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή μπεζ στερεού.

[απόδοση: 78 %, σημείο τήξεως: 230°C]

¹HNMR (300 MHz, DMSO) δ 10.43 (s, 1H), 8.96 (s, 2H), 7.62 (d, *J*=8.7 Hz, 1H), 6.82-6.71 (m, 3H), 6.64 (s, 1H), 6.51 (d, *J*=8.1 Hz, 1H), 2.21 (s, 3H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.52, 160.41, 153.64, 147.68, 144.90, 144.72, 127.04, 125.62, 122.55, 121.39, 117.72, 115.14, 112.88, 112.54, 101.83, 16.39

5-υδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2Η-χρωμεν-2-όνη (6b)



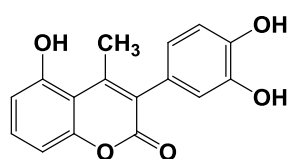
Σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας κουμαρινικών αναλόγων, σε 1ml διχλωρομεθάνιου και 1ml (266,23mg) τριβρωμιούχου βορίου, προστίθενται 0,106 mmol (30mg) της 5-υδροξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2Η-χρωμεν-2-όνης (4e). Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή ανοιχτού καφέ στερεού.

[απόδοση: 73 %,]

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.43 (s, 1H), 8.96 (s, 2H), 7.62 (d, J=8.7 Hz, 1H), 6.82-6.71 (m, 3H), 6.64 (s, 1H), 6.51 (d, J=8.1 Hz, 1H), 2.21 (s, 3H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.52, 160.41, 153.64, 147.68, 144.90, 144.72, 127.04, 125.62, 122.55, 121.39, 117.72, 115.14, 112.88, 112.54, 101.83, 16.39

5-υδροξυ-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (6c)



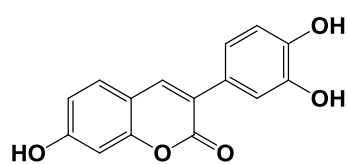
Σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας κουμαρινικών αναλόγων, σε 2ml διχλωρομεθάνιου και 2ml (481,27mg) τριβρωμιούχου βορίου, προστίθενται 0,09mmol (30mg) της 5-υδροξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (4f) . Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή ωχρού στερεού.

[απόδοση: 74 %, σημείο τήξεως: 300°C (decomp.)]

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.43 (s, 1H), 8.96 (s, 2H), 7.62 (d, J=8.7 Hz, 1H), 6.82-6.71 (m, 3H), 6.64 (s, 1H), 6.51 (d, J=8.1 Hz, 1H), 2.21 (s, 3H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.52, 160.41, 153.64, 147.68, 144.90, 144.72, 127.04, 125.62, 122.55, 121.39, 117.72, 115.14, 112.88, 112.54, 101.83, 16.3

7-υδροξυ-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (6e)⁷⁰



Σύμφωνα με την γενική μέθοδο αποπροστασίας κουμαρινικών αναλόγων, σε 2ml διχλωρομεθάνιου και 2,1 ml (536,11mg) τριβρωμιούχου βορίου, προστίθενται 0,10 mmol (32mg) της 7-υδροξυ-3-(3,4-

διμεθοξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνης (4d) . Το προϊόν λαμβάνεται υπό τη μορφή καφέ στερεού.

[απόδοση: 77 %, σημείο τήξεως: 150-155°C]

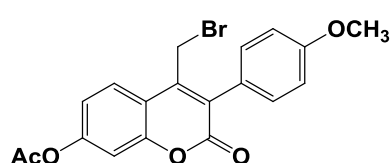
¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.43 (s, 1H), 8.96 (s, 2H), 7.62 (d, J=8.7 Hz, 1H), 6.82-6.71 (m, 3H), 6.64 (s, 1H), 6.51 (d, J=8.1 Hz, 1H), 2.21 (s, 3H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.52, 160.41, 153.64, 147.68, 144.90, 144.72, 127.04, 125.62, 122.55, 121.39, 117.72, 115.14, 112.88, 112.54, 101.83, 16.3

Γενική μέθοδος παραγωγής 3-αρυλο-4-βρωμομεθυλο-κουμαρινών.

Σε κατάλληλη ποσότητα διάλυτη τετραχλωράνθρακα CCl_4 προστίθεται η ποσότητα της κουμαρίνης που πρόκειται να βρωμιωθεί (1eq) , ποσότητα N-βρωμοηλεκτριμιδίου (N-Bromosuccinimide, NBS) (1eq) καθώς και 0,10eq αζω-δι-ισοβουτυρονιτριλίου (azobis-isobutyronitrile, AIBN). Το προκύπτον μίγμα αναδεύεται μέχρι 3,5 ώρες στους 77°C , με την βοήθεια κάθετου ψυκτήρα. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρήση της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας. Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση γίνεται διήθηση του μίγματος και συμπύκνωση του διηθήματος υπό ελαττωμένη πίεση. Η λήψη του καθαρού προϊόντος γίνεται χωρίς περαιτέρω διεργασία καθαρισμού. Σύμφωνα με την παραπάνω Γενική μέθοδο παράγονται δυο νέα βρωμιωμένα κουμαρινικά παράγωγα.

7-ακετυλοξυ-4-(βρωμομεθυλο)- 3-(4-μεθοξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (7a)



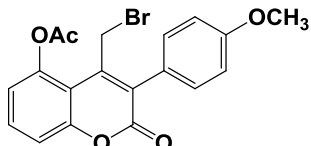
Σύμφωνα με την γενική μέθοδο παραγωγής βρωμιωμένων κουμαρινικών παραγώγων, σε 1ml τετραχλωράνθρακα, προστίθενται 0,114 mmol (37mg) 7-ακετυλο-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (5a), 0,114 mmol (20,3mg) NBS και 0,0114 mmol (1,87mg) από την βάση AIBN. Το προϊόν λαμβάνεται υπό μορφή κίτρινου στερεού.

[απόδοση: 55 %]

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 2.32 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 6.84 (d, J = 10.2 Hz, 2H), 6.96 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.24–7.27 (m, 1H), 7.62 (dd, J = 8.7 Hz, J = 2.4 Hz, 1H), 7.78 (s, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 16.83, 56.09, 56.14, 111.28, 113.26, 117.16, 118.68, 122.52, 122.76, 126.54, 127.91, 128.27, 134.09, 146.51, 149.05, 149.35, 151.64, 160.65

5-ακετυλοξυ-4-(βρωμομεθυλο)-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-2H-χρωμεν-2-όνη (7b)



Σύμφωνα με την γενική μέθοδο παραγωγής βρωμιωμένων κουμαρινικών παραγώγων, σε 2ml τετραχλωράνθρακα,

προστίθενται 0,15mmol (50mg) της 5-ακετυλο-3-(4-μεθοξυφαινυλ)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (5b) και 0,15mmol (27,43mg) NBS και 0,015 mmol (2,5mg) από την βάση AIBN. Το προϊόν υπό μορφή λευκού στερεού.

[απόδοση: 58 %, σημείο τήξεως: 139-142°C]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.43 (t, 1H), 7.19 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.13 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 4.46 (s, 2H), 3.71 (s, 3H), 2.30 (s, 3H)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 168.49, 160.19, 154.38, 147.14, 144.30, 131.42, 131.11, 130.74, 124.74, 120.37, 115.17, 114.37, 55.48, 29.47, 22.27

3.2 Προσδιορισμός της ικανότητας αναστολής του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια. (71)

Οι υπό εξέταση ουσίες διαλύονται σε DMSO και αφήνονται να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου με λινολεϊκό νάτριο (0.1 mL) και 0.2 mL ενζυμικού διαλύματος ($1/9 \times 10^{-4}$ w/v σε φυσιολογικό ορό) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH= 9. Η μετατροπή του sodium λινολεϊκού νατρίου σε 13-υδροπεροξυλινολεϊκό οξύ στα 234 nm καταγράφεται και συγκρίνεται με το κατάλληλο πρότυπο αναστολέα. (71)

3.3 Προσδιορισμός της ικανότητας δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH.

Οι ουσίες διαλύονται σε DMSO, και στη συνέχεια προστίθενται σε αιθανολικό διάλυμα DPPH (0.05 mM) απόλυτης αιθανόλης μέχρι τελικής συγκέντρωσης 0.1 mM. Το μείγμα αναδεύεται έντονα και αφήνεται σε ηρεμία 20 ή 60 λεπτά. Καταγράφεται η απορρόφηση στα 517 nm και υπολογίζεται μέσω αυτής το ποσοστό της αντιοξειδωτικής δράσης. Όλα τα τεστ γίνονται τρεις φορές και τα αποτελέσματα του προκύπτουν μετά από τον υπολογισμό του μέσου όρου. (71)

3.4 Υπολογισμός της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH).

Η αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης από τις ενώσεις που παρασκευάστηκαν υπολογίζεται από την οξειδωση του λινολεϊκού οξέος σε υδατικό αιώρημα, κάτι που παρατηρείται στα 234 nm. Το 2,2,- αζοδις- (2-αμιδινοπροπανο) διυδροχλωρίδιο (AAPH) χρησιμοποιείται σαν εκκινητής των ελευθέρων ριζών. (72)

Συγκεκριμένα , δέκα μικρόλιτρα από το αιώρημα των 16 mM του λινολεϊκού οξέος προστίθενται στην UV κυψελίδα που περιέχει 0.93 mL από το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 0.05 M με pH= 7.4 το οποίο έχει προθερμανθεί στους 37 °C. Η αντίδραση οξείδωσης ξεκινά στους 37 °C υπό ατμοσφαιρική πίεση με την προσθήκη 50 μL του διαλύματος AAPH των 40 mM. Η οξείδωση πραγματοποιείται παρουσία δόσεων 10 μL της υπό εξέταση ένωσης. Στην δοκιμασία χωρίς προσθήκη του αντιοξειδωτικού, η λιπιδική οξείδωση μετράται με την παρουσία ίδιας ποσότητας DMSO. Ο ρυθμός οξείδωσης στους 37 °C παρακολουθείται καταγράφοντας την αύξηση της απορρόφησης στα 234 nm που προκαλείται από τα συζευγμένα διενικά υδροϋπεροξειδία.

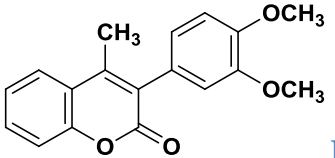
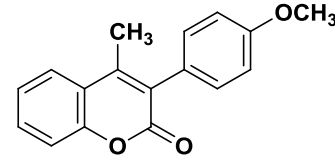
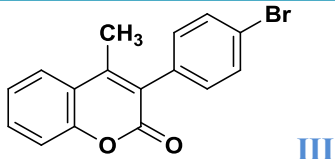
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο

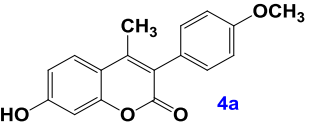
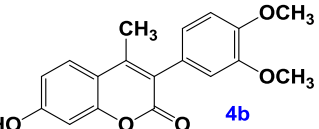
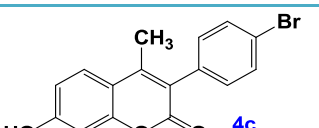
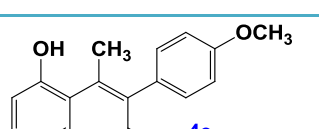
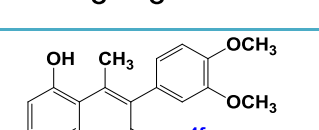
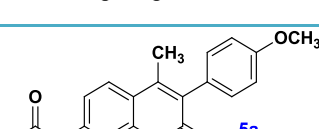
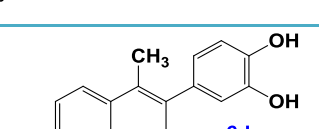
4.1 Αποτελέσματα και Συζήτηση

Τα νέα παράγωγα **4(a,b,c,e,f)**, **5a** και **6d**, αξιολογήθηκαν για την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση τους στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΑΠΘ (Καθ. Δ. Χατζηπαύλου-Λίτινα). Τα αποτελέσματα των *in vitro* βιολογικών δοκιμασιών των νέων μορίων καθώς και των αρχικών ενώσεων I-III παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Η αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των ενώσεων **4(d,g)**, **5(b,c,d,e)**, **6(a,b,c,e)** και **7(a,b)** είναι υπό εξέλιξη.

Πίνακας 2. Αποτελέσματα της *in vitro* αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης των νέων μορίων και των ενώσεων-οδηγών I-III.

Προϊόν	Αλληλεπίδραση με την ελεύθερη ρίζα DPPH(%) 0.1mM 20/60 min	Αναστολή της υπεροξειδωσης του λινελαϊκού οξέος (% 0.1mM)	Ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης από σόγια (% 0.1mM)
 I	8.3/10.0 (50 μM)	35.7	30.9
 II	4.8/2.1 (50 μM)	23.9	62
 III	3.1/4.2 (50 μM)	70	No

	No/No	59,6	18,5
	No/2,52	88,4	43,6
	No/14,29	12,8	7,4
	8,86/3,52	60,0	5,2
	1,78/87,3	60,20	28,3
	16,2/65,27	64,10	28,4
	84,87/88,80	99,3	96,5 50
NDGA	81/82,6	-	83,7
Trolox	-	63	-

Ως ένωση αναφοράς για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο του DPPH και τη μελέτη της αντιφλεγμονώδης δράσης μέσω της αναστολής της δράσης του ενζύμου λιποξυγονάση (LOX), χρησιμοποιήθηκε η αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης ένωση NDGA (Nordihydroguaiaretic acid). Για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο του AAPH, χρησιμοποιήθηκε ως ένωση αναφοράς το Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), ένα ικανό αντιοξειδωτικό ανάλογο της βιταμίνης E.

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα των βιολογικών δοκιμασιών οδήγησαν σε χρήσιμα συμπεράσματα για τη σχέση δομής-βιολογικής δράσης των νέων μορίων. Από τη

μελέτη αυτή προσδιορίστηκαν τα απαραίτητα δομικά χαρακτηριστικά των νέων παραγώγων με συνδυασμένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, ώστε να χρησιμεύσουν ως μόρια-οδηγοί για την ανάπτυξη νέων πιο αποτελεσματικών βιοδραστικών μορίων.

Μεταξύ των κουμαρινικών παραγώγων **4(a,b,c,e,f)**, **5a** και **6d** που αξιολογήθηκαν για την αντιφλεγμονώδη δράση τους, τη μέγιστη ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης από σόγια, παρουσίασε το παράγωγο **6d** (96.5%) δράση συγκρίσιμη με αυτή του NDGA (83.7%). Η ύπαρξη του κατεχολικού συστήματος του παραγώγου **6d**, φάνηκε να επιδρά καθοριστικά στην αντιφλεγμονώδη δράση του μορίου, καθώς το αντίστοιχο προστατευμένο παράγωγο **4b**, δεν εμφάνισε εξίσου αξιόλογη δράση (43.6%).

Η παρουσία της υδροξυλομάδας στην 5 ή 7 θέση του αρωματικού δακτυλίου των κουμαρινικών παραγώγων δείχνει να επηρεάζει τη δράση των αναλόγων, καθώς το 7 υδροξύ παράγωγο **4b** εμφάνισε ικανοποιητικότερη δράση (43.6%) έναντι του αντίστοιχου μη υδροξυλιωμένου παραγώγου **I** (30.9%). Επιπλέον, η θέση του υδροξυλίου διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη δράση, καθώς το αντίστοιχο 5-υδροξύ παράγωγο **4f** δεν εμφάνισε σημαντική ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης (28.3%) και είναι λιγότερο δραστικό σε σχέση με το 7-υδροξύ ανάλογο **4b**.

Η ύπαρξη μιας επιπλέον μεθόξυ ομάδας στον αρωματικό δακτύλιο της 3 θέσης του βενζοπυρανικού δακτυλίου, διαπιστώθηκε ότι βελτίωσε σημαντικά την αντιφλεγμονώδη δράση, καθώς τα παράγωγα **4b** και **4f** έδειξαν σαφώς ικανοποιητικότερη αναστολή του ενζύμου (43.6% και 28.3% αντίστοιχα) έναντι των παραγώγων **4a** και **4e** (18.5% και 5.2% αντίστοιχα). Στην περίπτωση των παραπάνω μορίων με μια μεθόξυ ομάδα (**4a**, **4e**), η ύπαρξη της υδροξυλομάδας είτε στη 5 είτε στη 7 θέση, φάνηκε να μειώνει σημαντικά τη δράση σε σχέση με το αντίστοιχο μη υδροξυλιωμένο μόριο **II** (62%).

Η παρουσία της ακετυλόξυ ομάδας στην 7 θέση του αναλόγου **5a**, φάνηκε να βελτιώνει σχετικά τη δράση του μορίου (28.4%) σε σύγκριση με το παράγωγο **4a** (18.5%), αλλά να μειώνει ελάχιστα τη δράση σε σχέση με το μη υποκατεστημένο παράγωγο **II** (62%).

Αναφορικά με το μόριο **4c**, η παρουσία του υδροξυλίου στην 7 θέση βελτίωσε σε μικρό βαθμό (7.4%) τη δράση του αναλόγου συγκριτικά με το μόριο **III** που δεν είχε καθόλου δράση.

Η πλειοψηφία των μορίων που εξετάστηκαν δεν εμφάνισαν αξιόλογη ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, με εξαίρεση το προϊόν (**6d**) το οποίο χαρακτηρίζεται από την παρουσία κατεχολικού συστήματος στο δακτύλιο της θέσης 3. Για τα παράγωγα **4b** και **4f**, που διαθέτουν δύο μεθοξυ-ομάδες στον αρωματικό δακτύλιο της θέσης 3, η θέση του υδροξυλίου στον αρωματικό δακτύλιο της κουμαρίνης φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την αντιοξειδωτική δράση. Συγκεκριμένα, το προϊόν **4f** που έχει την υδροξυλομάδα στη θέση 5 εμφανίζει σαφώς βελτιωμένη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με το 7-υδροξυ-ανάλογο **4b**. Αξιόλογη είναι επίσης η παρατήρηση ότι η παρουσία ακετυλοξυ-ομάδας στη θέση 7 του συστήματος της κουμαρίνης **5a** βελτιώνει σημαντικά την αντιοξειδωτική δράση τόσο σε σχέση με την παρουσία ελεύθερου υδροξυλίου στην ίδια θέση (παράγωγο **4a**) όσο και με την απουσία υποκαταστάτη σε αυτή τη θέση (παράγωγο **II**).

Όσον αφορά στην αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης, η πλειοψηφία των ενώσεων που εξετάστηκαν εμφανίζει αξιόλογη δράση, μεγαλύτερη από 60%. Η βέλτιστη δράση εμφανίζεται από το μόριο **6d** (99.3%). Η παρουσία υδροξυλομάδας στη θέση 5 ή 7 του αρωματικού δακτυλίου της κουμαρίνης βελτιώνει σημαντικά (κατά περίπου 30%) τη δράση των ενώσεων έναντι της λιπιδικής υπεροξειδωσης, με μόνη εξαίρεση το ανάλογο **4c** στο οποίο η δράση ελαττώθηκε σημαντικά σε σχέση με την ένωση-οδηγό **III**.

4.2 Συμπεράσματα

Στην παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός δεκαεννέα κουμαρινικών αναλόγων, και μελετήθηκε η πιθανή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράση τους.

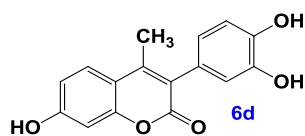
Ως αρχική μέθοδος σύνθεσης των υποκατεστημένων 5 και 7 υδροξυ-κουμαρινών επιλέχθηκε η αντίδραση συμπύκνωσης ενός χλωριδίου φαινυλοξικού οξέος με μια κατάλληλα υποκατεστημένη 2-υδροξυ-ακετοφαινόνη σε βασικό περιβάλλον (μέθοδος Pechmann). Πραγματοποιήθηκαν πειράματα βελτιστοποίησης των συνθηκών της αντίδρασης και συγκεκριμένα μελετήθηκε η σύνθεση του χλωριδίου του οξέος

απουσία ή παρουσία διαλύτη καθώς και η επίδραση της στοιχειομετρικής ποσότητας των αντιδρώντων. Ανάμεσα στις βάσεις που εξετάστηκαν (ανθρακικό κάλιο, ανθρακικό καίσιο), το ανθρακικό καίσιο έδωσε καλύτερες αποδόσεις σε τελικά προϊόντα (20%) έναντι του ανθρακικού καλίου (10%). Τα τελικά καθαρά προϊόντα, ελήφθησαν ύστερα από αντίδραση 1eq2-υδροξυ-ακετοφαινόνης, 4eq του χλωριδίου του οξέος και 5eq ανθρακικού καλίου.

Με στόχο την αύξηση των αποδόσεων της αντίδρασης έγινε προσπάθεια εύρεσης μιας νέας συνθετικής πορείας η οποία περιλάμβανε τις ακετυλιωμένες κουμαρίνες της σειράς Γ. Η αντίδραση συμπύκνωσης πραγματοποιήθηκε παρουσία τριαιθυλαμίνης (Et_3N) και οξικού ανυδρίτη (Ac_2O) και πλεονεκτεί σημαντικά καθώς τα προϊόντα ελήφθησαν σε σημαντικά ικανοποιητικότερες αποδόσεις (>70%) χωρίς να απαιτούνται περαιτέρω διεργασίες καθαρισμού. Τα τελικά προϊόντα των υδροξυ-κουμαρινών, ελήφθησαν ύστερα από αντίδραση απακετυλίωσης των αρχικών μορίων παρουσία υδραζίνης σε διαλύτη μεθανόλη με πολύ ικανοποιητικές αποδόσεις (>80%). Η νέα αυτή συνθετική πορεία, μας οδήγησε στην παραλαβή προϊόντων μεγάλων αποδόσεων που δεν απαιτούν περαιτέρω καθαρισμό.

Για την περαιτέρω διερεύνηση του τρόπου που επηρεάζει η δομή την βιολογική δράση, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις αποπροστασίας των μεθοξυ-ομάδων του αρωματικού δακτυλίου της θέσης 3 των κουμαρινικών αναλόγων, μέσω των οποίων διερευνήθηκε επιπλέον και η επίδραση της παρουσίας κατεχολικού συστήματος (**6c**, **6d**, **6e**) στη βιολογική δράση των μορίων, καθώς και αντιδράσεις βρωμίωσης του μεθυλίου της θέσης 4 του βενζοπυρανικού δακτυλίου, μέσω μηχανισμού ελευθέρων ριζών. Διαπιστώθηκε επίσης ότι οι αντιδράσεις βρωμίωσης των ακετυλιωμένων κουμαρινών παρουσίαζαν ικανοποιητικότερες αποδόσεις σε σύγκριση με την προσπάθεια βρωμίωσης των αντίστοιχων υδροξυλιωμένων κουμαρινών.

Τα αποτελέσματα της μελέτης της βιολογικής δράσης των νέων ενώσεων έδειξαν ότι το ανάλογο **6d** παρουσιάζει ιδιαίτερα αξιόλογη συνδυασμένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, συγκρίσιμη ή και μεγαλύτερη από τις ενώσεις αναφοράς.



Σχήμα 49: Η δομή της κουμαρίνης με την καλύτερη συνδυασμένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.

Αναφορικά με την αντιοξειδωτική δράση των νέων μορίων, η πλειοψηφία των αναλόγων που συντέθηκαν παρουσίασαν ικανοποιητική αναστολή της υπεροξειδωσης του λινελαϊκού οξέος, σε αντίθεση με την μειωμένη ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με την ελεύθερη ρίζα DPPH.

4.3 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Βάσει των αποτελεσμάτων που προέκυψαν μέσω αυτής της ερευνητικής εργασίας ανοίγονται ορίζοντες για την έρευνα στο κομμάτι της σύνθεσης ανάλογων κουμαρινικών παραγώγων και επιπλέον δομικών τροποποιήσεων των νέων ενώσεων. Τα αποτελέσματα των βιολογικών δοκιμασιών των νέων ενώσεων είναι ενθαρρυντικά και μας οδηγούν στην περαιτέρω μελέτη της δράσης των μορίων.

Μία προσέγγιση για μελλοντική σύνθεση νέων αντίστοιχων κουμαρινικών αναλόγων, αφορά στη σύνθεση 5 και 7 διυδροξυ-κουμαρινών μέσω της Γενικής Μεθόδου B που σχεδιάστηκε, χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη την 2,4,6 τριυδροξυ-ακετοφαινόνη.

Επιπλέον, η εισαγωγή διαφορετικών ομάδων ως υποκαταστάτες στον αρωματικό δακτύλιο της θέσης 3 του βενζοπυρανικού δακτυλίου, θα μπορούσε να μας οδηγήσει σε χρήσιμα συμπεράσματα ως προς την πιθανή δραστηριότητα των νέων ενώσεων καθώς επίσης και αντιδράσεις αλκυλίωσης στις υδροξυλιωμένες κουμαρίνες που προέκυψαν αλλά και στα βρωμιωμένα παράγωγα (**7a**, **7b**). Περαιτέρω θα μπορούσε να διερευνηθεί η δυνατότητα των αναλόγων που διαθέτουν φορμυλο-ομάδα στην 4 θέση του βενζοπυρανικού δακτυλίου να αντιδράσουν με υποκατεστημένες ακετοφαινόνες και να οδηγήσουν στο σχηματισμό χαλκονών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

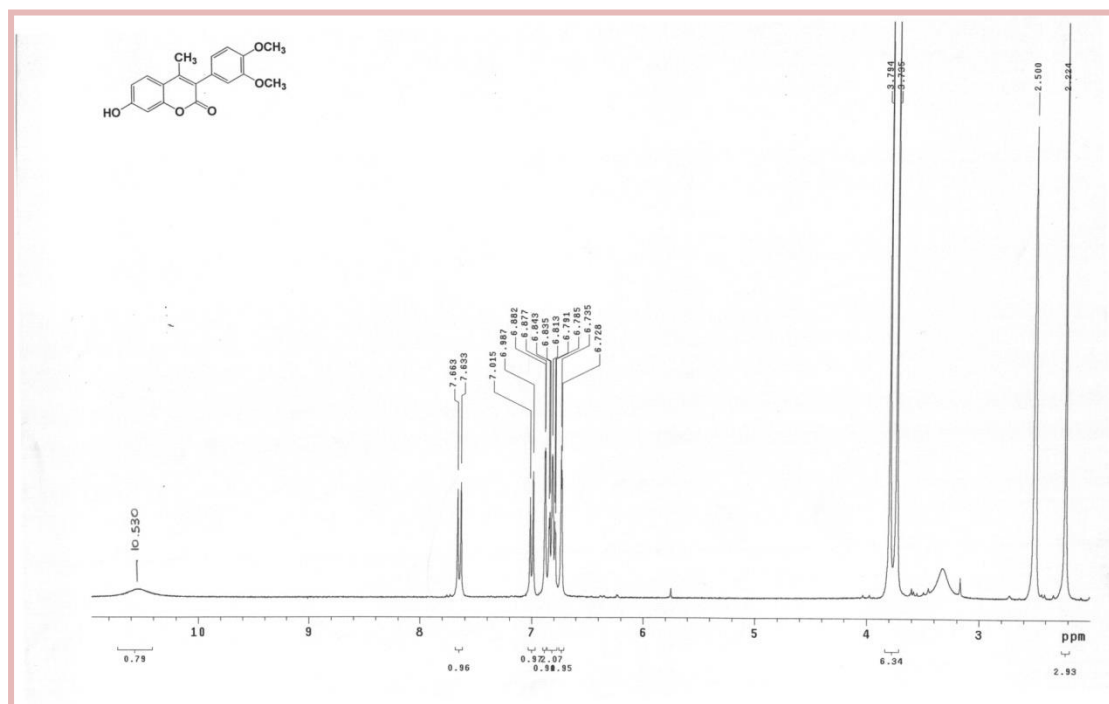
1. Richard O'Kennedy, R.Douglas Thornes. *Coumarins-Biology, Applications nad Mode of Action*. s.l. : JOHN WILEY & SONS, 1997.
2. Milkiewicz, M.Ispanovic, E.Doyle, J. L.Hass, T.L. *Int.J.Biochem.Cell Bio.* (2006), 38,33.
3. Bouis, D. Kusumanto, Y. Meijer, C. Mulder, N, H. Hospers, G.A.P. *Pharm Res.* (2006), 53,89.
4. Hanaban, D.,. *Nat. Med.* (1998), 49,117.
5. Nam, N.-H. Kim, Y. You, Y.- Hong, D-H. Kim, H.-M Ahn, B-Z. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2002), 12,2345.
6. Lee, S. Sivakumar, K. Shin, W.-S. Xie, F. Wang, Q. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2006), 16,4596.
7. Reddy, N. S. Mallireddigari, M. R. Cozenza, S. Gumireddy, K. Bell, S. C. Reddy, E. P. Reddy, M. V. R. *Bioorg. Med. Chem.* (2004), 14,4093.
8. Staunton, J. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*. Oxford : Sammes, P.G., Ed. Pergamon, (1979) 4, 646-651.
9. Reddy, N. S. Gumireddy, K. Mallireddigari, M. R. Cozenza, S. C. Venkatapuram, P. Bell, S.C. Reddy, E. P. Reddy, M. V. R. *Bioorg. Med. Chem.* (2005), 13, 3141.
10. Raad, I. Terreux, R. Richomme, P. Matera, E.-L. Domontet, C. Raynaud, J. and Guilet, D. *Bioorg. Med. Chem.* (2006), 14, 6979.
11. Π., Παρασκευόπουλος. *Βασικές Αρχές Θεραπείας Καρκίνου* . Θεσσαλονίκη : Univ. Stud. Press, (1997), 88.
12. Cox, D. O'Kennedy, R. Thones, R. D. *Hum. Toxicol.* (1989), 29, 703.
13. Reed, J. C. Miyashita, T. Takayama, S. Wang, H. G. Sato, Krajewiski, S. *et. Al. J. Cell Biochem.* (1996), 23.
14. Elinos-Baez, C. M. Leon, F. Santos, E. *Cell Biol. Internat.* (2005), 29, 703.
15. Lee, K.-H Chai, H.-B. Tamez, P.A. Pezzuto, J. M. Cordell, G. A. Win, K. Tin-Wa, M. *Phytochemistry.* (2003), 64, 535.
16. Marshall, M. E. Kervin, K. Benefield, K. Umerani, A. Albainy-Jenei, S. Zhao, Q. Khazaeli, M. B. *J. Cancer Res. Oncol.* (1994), 120.
17. Prince, M. Campell, C. T. Robertson, T. A. Wells, A. J. and Kleiner, H. E. *Carginogenesis.* (2006), 27, 1204.

18. Cai, Y. Kleiner, H. Johnston, D. Dubowski, A. Bostic, S. Ive, W. and DiGiovanni, J. *Carcinogenesis*. (1997), 18, 1521.
19. Kleiner, H. E. Vulimiri, S. V. Reed, M. J. Ubereckem, A. nad DiGiovanni, J. *Carcinogenesis*. (2002), 23,1667.
20. Lopez-Perez, J. L. Olmedo, D. O. Olmo, E. Vasquez, Y. Solis, P. N. Gupta, M. P. and Feliciano, A. S. *J. Nat. Prod.* (2005), 68, 369.
21. Ito, C. Itoigawa, M. Furukawa, H. Tokuda, H. Okuda, Y. Mukainaka, T. Okuda, M. Nishino, H.,. *Cancer Lett.* (1999), 138, 87.
22. Ito, C. Itoigawa, M. Mishina, Y. Filho, V. C. Enjo, F. Tokuda, H. Nishino, H. Furukawa, H.,. *J. Nat. Prod.* (2003), 66, 368.
23. Kostova, I. Manolov, I. Momekov, G. Tzanova, T. Konstantinov, S. Karaivanova, M.,. *Eur. J. Med. Chem.* (2005), 40, 1246.
24. Kostova, I. Momekov.,. *Eur. J. Med. Chem.,.* (2006), 41, 717.
25. Kostova, I. Momekov, G. Zaharieva, M. Karaivanova, M.,. *Eur. J. Med. Chem.,.* (2005), 40, 542.
26. Bailly, F., et al. *Bioorg. Med. Chem.,.* (2004), 12, 5611.
27. Fontecave, M. και Pierre. J., L., *Bull. Soc. Chim. Fr.,.* (1991), 128, 505.
28. Phuwapraisirisan, P. και Surapinit, S. and Tip-Pyang, S.,. *Phytother. Res.,.* (2006), 20, 708.
29. Raj, H. G., et al. *J., Bioorg. Med. Chem.,.* (1998), 6, 833.
30. Hoult, J. R. S. and Paya.,. *M., Chem., Pharmac.,.* (1996), 27(4), 713.
31. Tyagi, Y. K., et al. *R. K. , Eur. J. Med. Chem.,.* (2005), 40,413.
32. Bhalla M., Shukla S., Gujrati V.R., Saxena A.K., Sanger K.C.S., Shanker K.,. *Bool. Chim. Farm., .* (1998), 137, 403.
33. Aihara K., Higuchi T., Hirobe M.,. *Biochm., Biophys. Res. Commun., .* (1990), 168,169.
34. Silvan, A. M., et al. *A. J. Nat. Prod.,.* (1996), 59, 183.
35. .Samuelsson, B., et al. *C., Ann. Rev. Biochem.,.* (1978), 47, 997.
36. Bray, M. A.,. *Agents Actions.,.* (1986), 19, 87.
37. Sharma, G. V. M., et al. *S. V. Tetraedron: Asymmetry.,.* (2005), 16, 1125.
38. Brooks, C. D. W. και Summers, J. B.,. *J. Med. Chem.,.* (1996), 39, 2629.

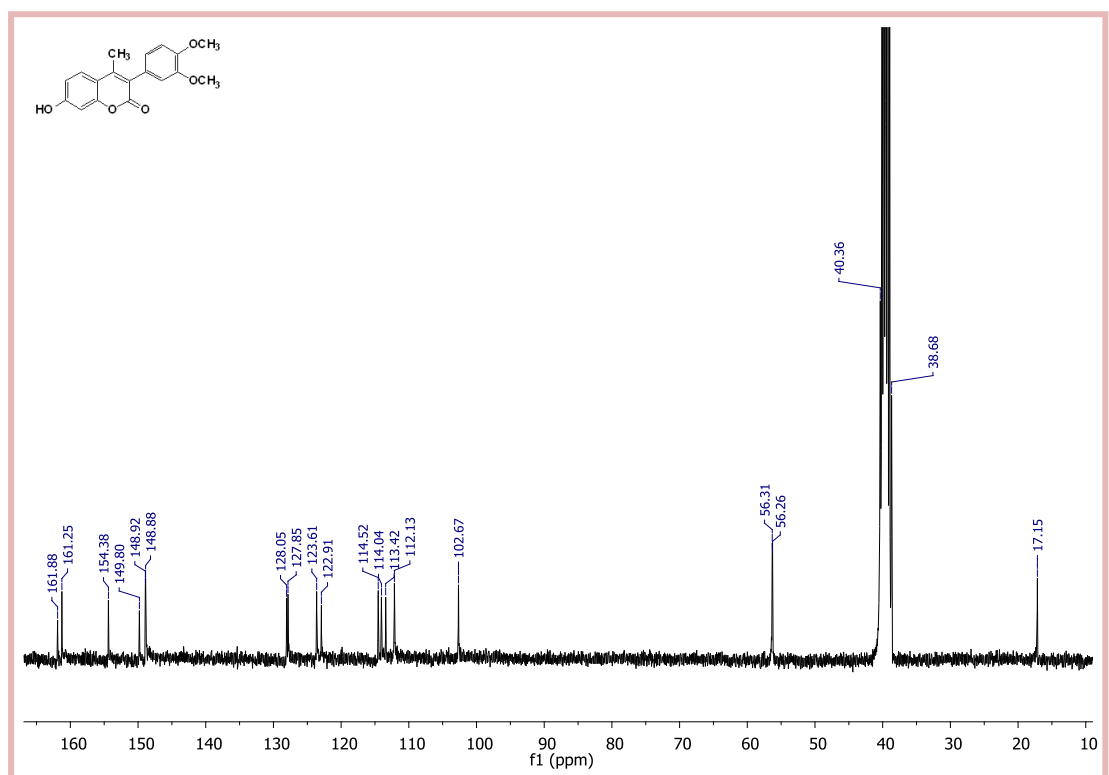
39. Grimm, E. L., et al. *Bioorg. Med. Chem.*, (2006), 16, 2528.
40. Kontogiorgis, C. A. and Hadjipavlou-Litina, D., *J. Med. Chem.*, (2005), 48, 6400.
41. —. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (2004), 14, 611.
42. Khan, I. A., et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (2005), 15, 3584.
43. Ghate, M., Kusanur, R. A. και Kulkarni, M. V., *Eur. J. Med. Chem.*, (2005), 40, 882.
44. Shen, T. Y., “*Burger’s Medicinal Chemistry*”, New York : Wolf, M. E., Ed.; John Wiley & Sons:, (1980), 1217-1219.
45. Hirsh, J. And Weitz, J. I., *Lancet.*, (1999), 351, 1431.
46. Kanazawa, S. Matija, P. B., *Microbes Infect.*, (2001), 3, 167.
47. Yu, D., et al. *Med. Res. Rev.*, (2003), 23(3), 322.
48. Janakiraman, M. N., Mullen, C. R. και Strohback, J. W., *Amer. Crystall. Assoc. Ann. Meet.*, 1995.
49. Sethna, S. and Phadke, R., *Organic Reactions*, New York : John Wiley & Sons:, (1953), 7, 4 .
50. Bose, D. S. and Rudradas, A. P. and Babu, M. H., *Tetrahedron Lett.*, (2002), 43, 9195.
51. Eicher, T. and Hauptmann, S., *The Chemistry of Eterocycles*. New York, : Thieme, G. and Stuttgart, V. :, (1995), 248-251.
52. Harayama, T., et al. *Chemistry Express.*, (1993), 8, 245.
53. Chakravarti, . D. and Majumdar, B., *J. Indian. Chem. Soc.* , (1938), 15, 136.
54. Meth., Con., O.,. “*Comprehensive Organic Synthesis* ”, s.l. : Trost, B. M. and Fleming, I., Eds;Pergamon Pres, (1991), 2, 790.
55. Khuda-Bukhsh A.R., Bhattacharyya SS, Paul S., Poujedaini N., *J. Chin. Integr. Med.* , (2010), 8(9): 853-862.
56. Beena Tyagi, Manish K. Mishra, Raksh V. Jasra. *Journal of Molecular Catalysis A*. (2007), 47, 56.
57. Detsi, A., et al.. ‘Natural and synthetic 2’-hydroxy-chalcones and aurones: synthesis characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity’ , *Bioorg. Med. Chem.* , 2009, 17 , 8073-8085.

58. Mehrabian M, Allayee H. 5-Lipoxygenase and atherosclerosis,. *Curr Opin Lipidol.*, 2003; 14:447–57.
59. Gallwitz WE, Mundy GR, Lee CH, Qiao M, Roodman GD, Raftery M,. et al. 5-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid stimulate isolated osteoclasts to resorb calcified matrices,. *J Biol Chem.*, 1993; 268:10087–94.
60. Ghosh J, Myers CE. . Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. . *Proc Natl Acad Sci USA* ., 1998; 95:13182–7.
61. Theodoros Symeonidis, Konstantina C. Fylaktakidou, Dimitra J. Hadjipavlou-Litina, Konstantinos E. Litinas,. *Europ. Journal of Med. Chem.* 44 ., (2009) 5012–5017.
62. McMillian RM, Walker ERH. . Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors. . *Trends Pharmacol Sci.* ., 1992;13:323-30.
63. Drazen JM., D., Asthma therapy with agents preventing leukotriene synthesis or action,. *Proc Assoc Am Physicians* ., 1999; 111: 547-59.
64. Inhibition of 5-Lipoxygenase Product Synthesis by Natural Compounds of Plant Origin . . *Oliver Werz Planta Med* ., (2007) ; 73: 1331- 1357.
65. Rao, B. Vittal. *Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*., 1980, V19B(3), 232-234 .
66. Freund, Walter J., *Journal of the Chemical Society*. 1952, P1954-5 CAPLUS.
67. Sawhney, P. L. and Seshadri, T. R.,. *Journal of Scientific & Industrial Research*. (1954), 13B, 316-20.
68. Garazd, M. M.,. *Chemistry of Natural Compounds*. 2009, V45(2), P158-163 CAPLUS.
69. Valente, Sergio, et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*., (2010), 20(19), 5827-5830.
70. Yang, Jie, et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*., (2011), 21(21), 6420-6425.
71. C. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem* 2003 18, 63.
72. C. Liegeois , C. G. Lermusieau ,S. J. Collin ,*Agric. Food. Chem* 2000 48 1129

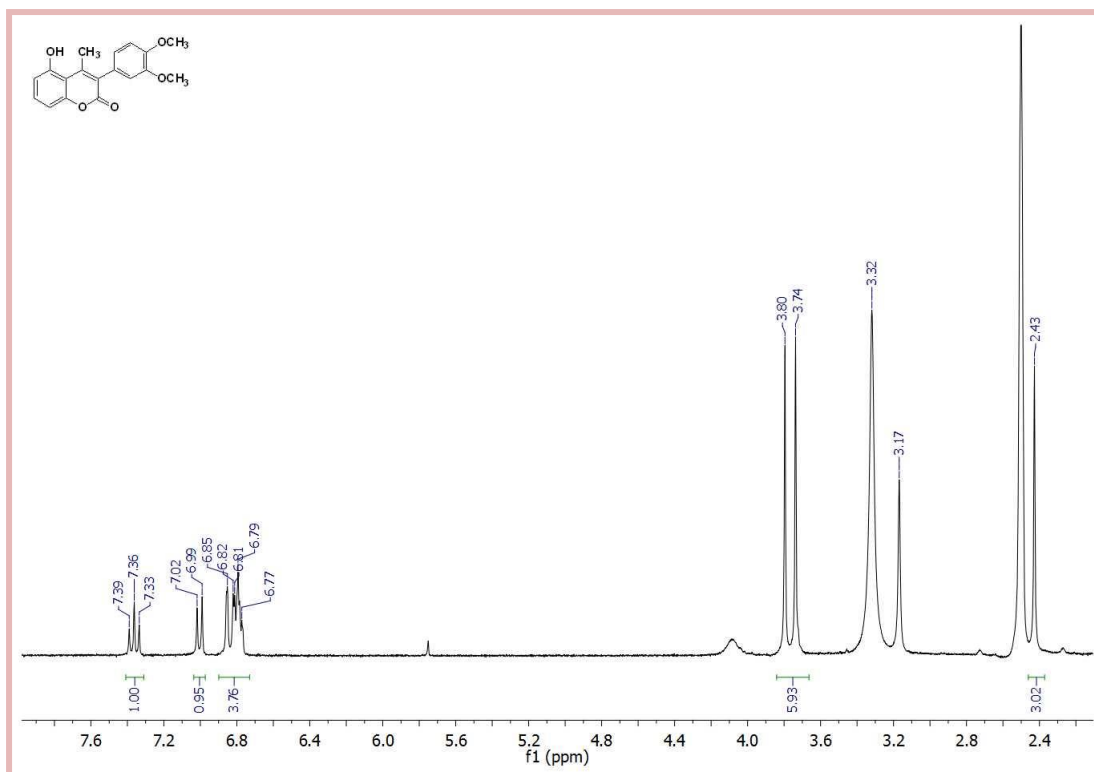
Παράρτημα Φασμάτων



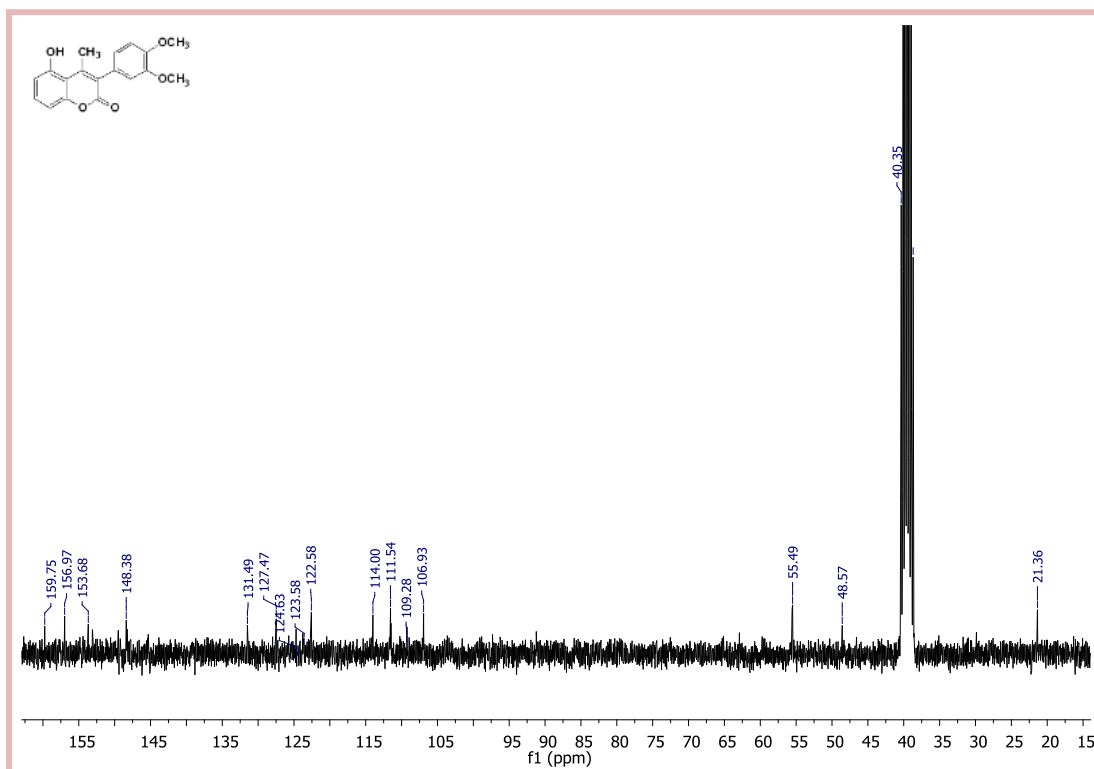
Εικόνα 14: Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **4b**



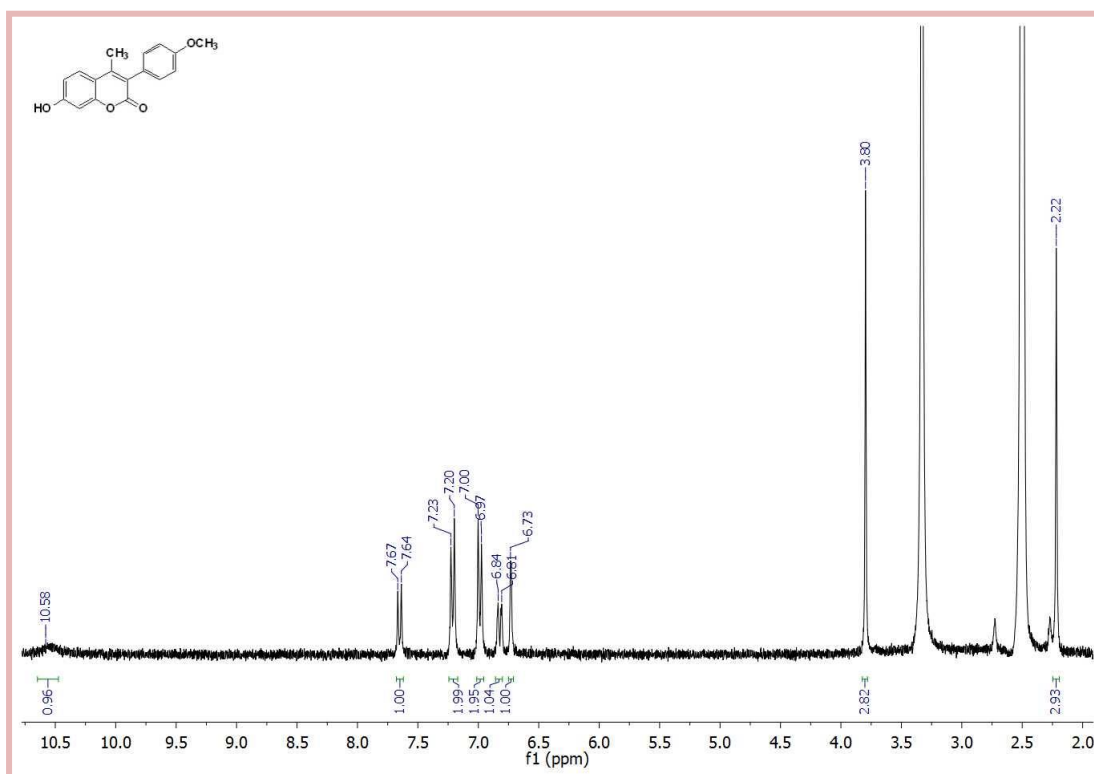
Εικόνα 15: Φάσμα άνθρακα $^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **4b**



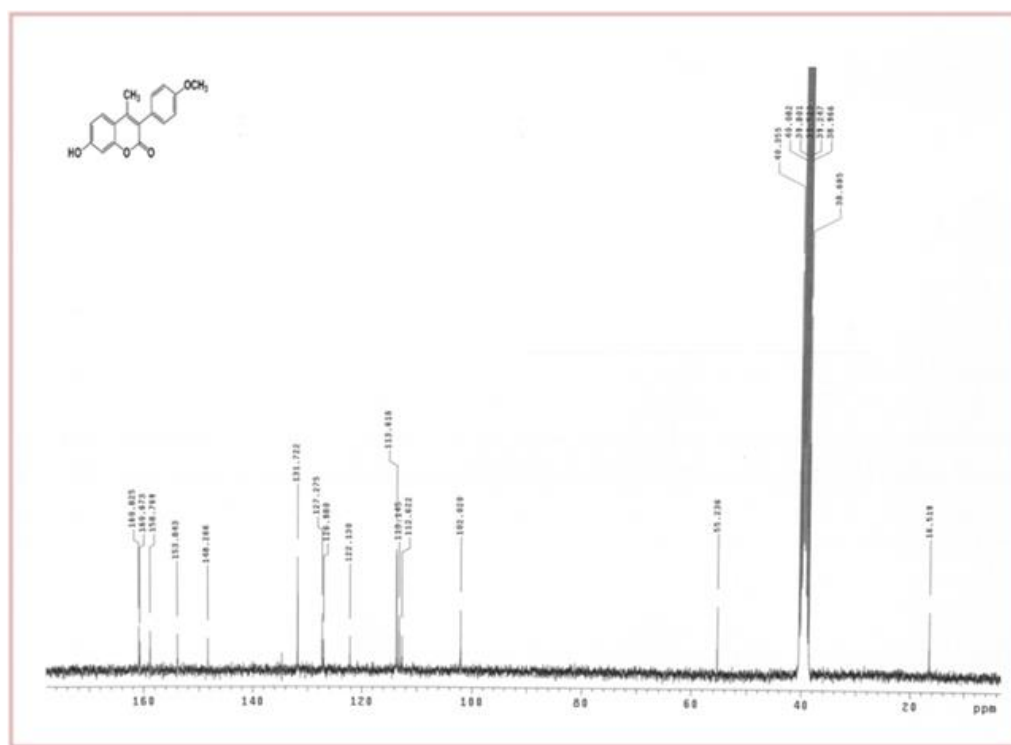
Εικόνα 16: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **4f**



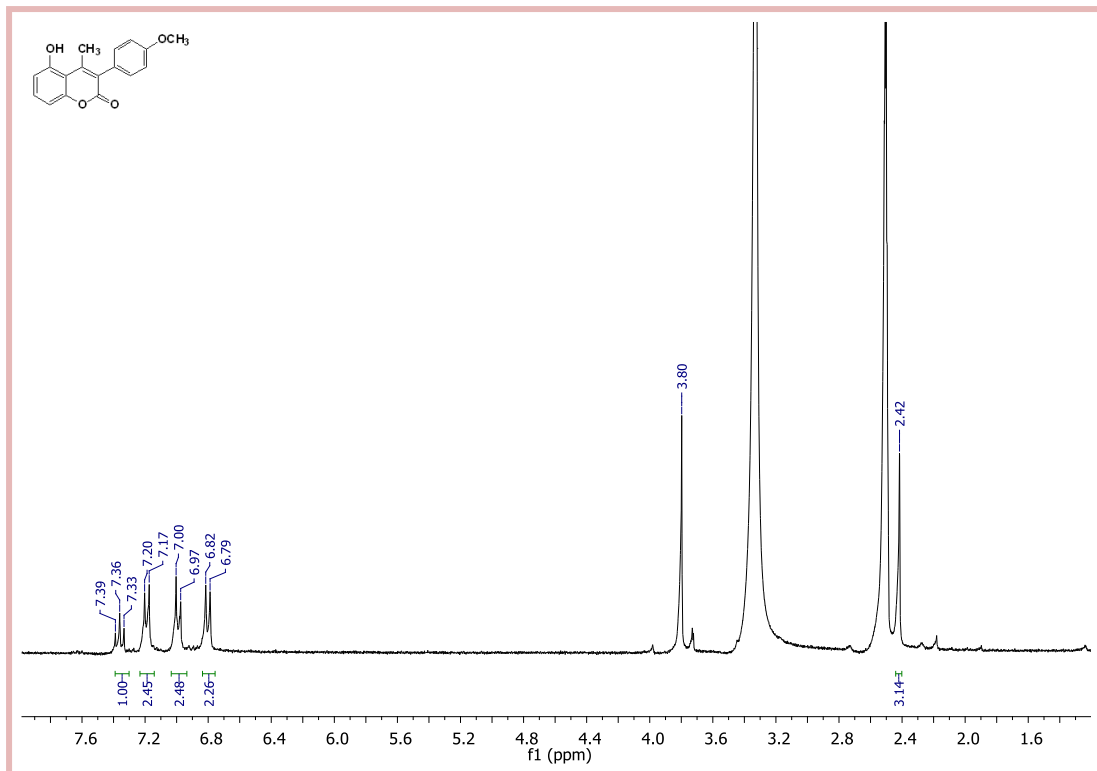
Εικόνα 17: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **4f**



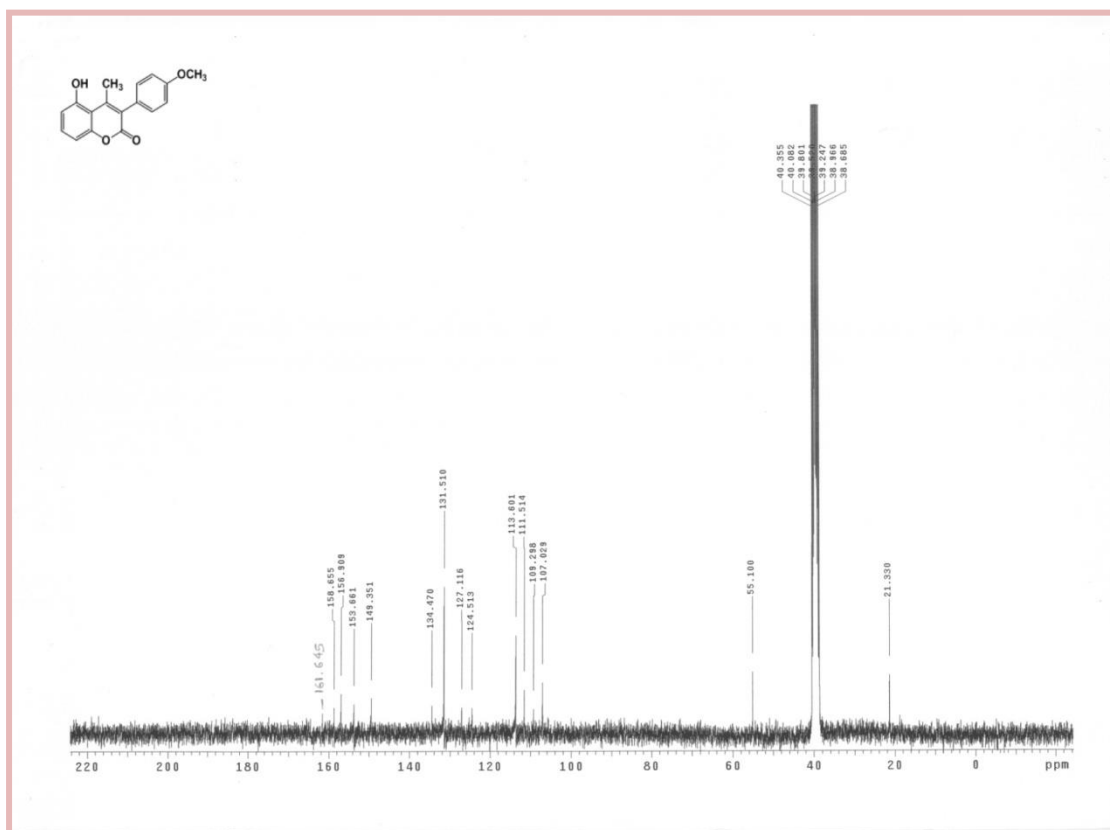
Εικόνα 18: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **4a**



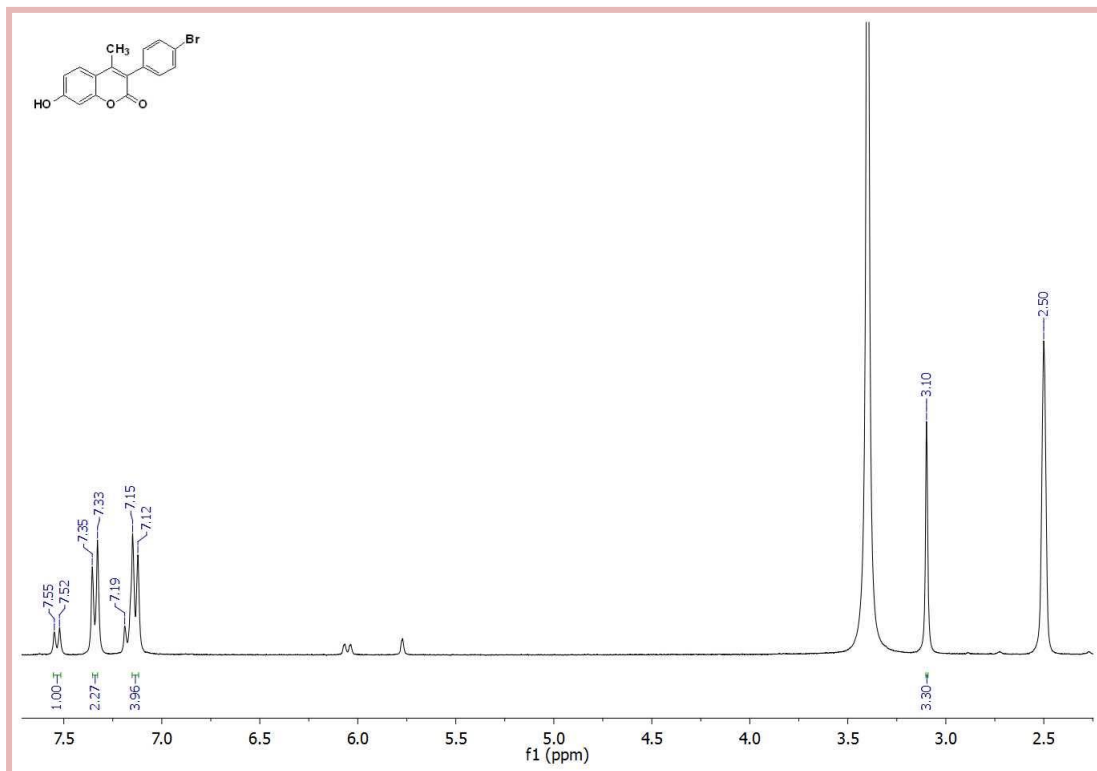
Εικόνα 19: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **4a**



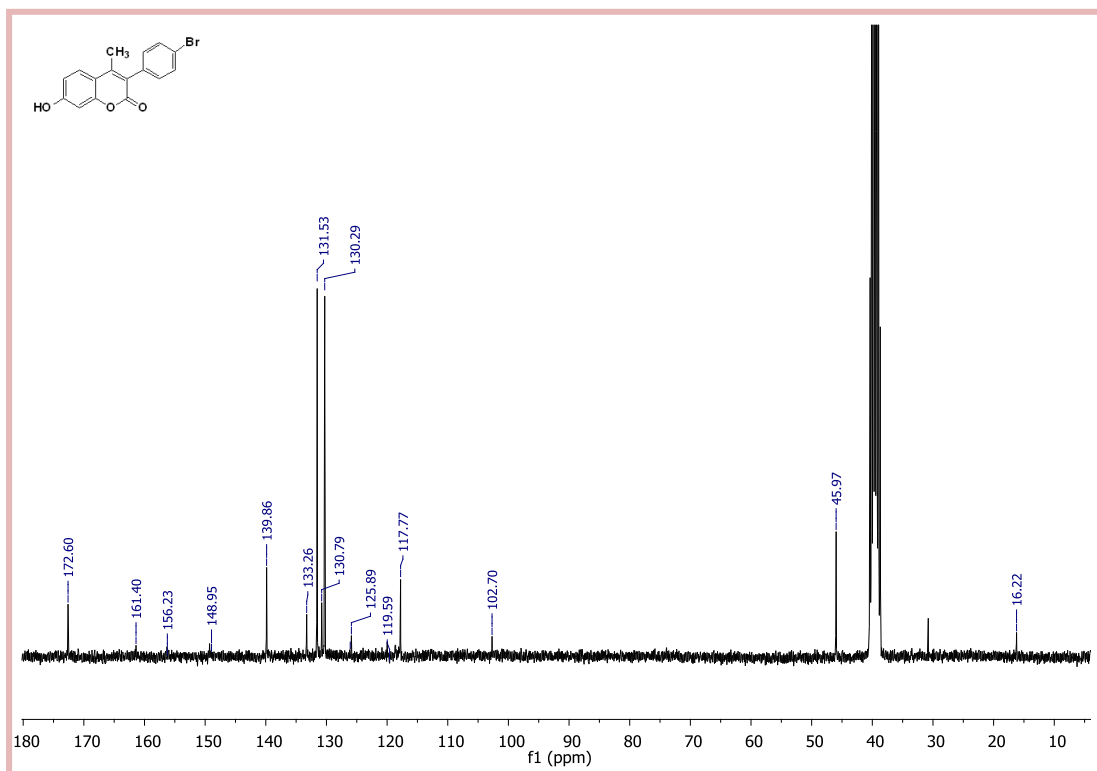
Εικόνα 20: Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **4e**



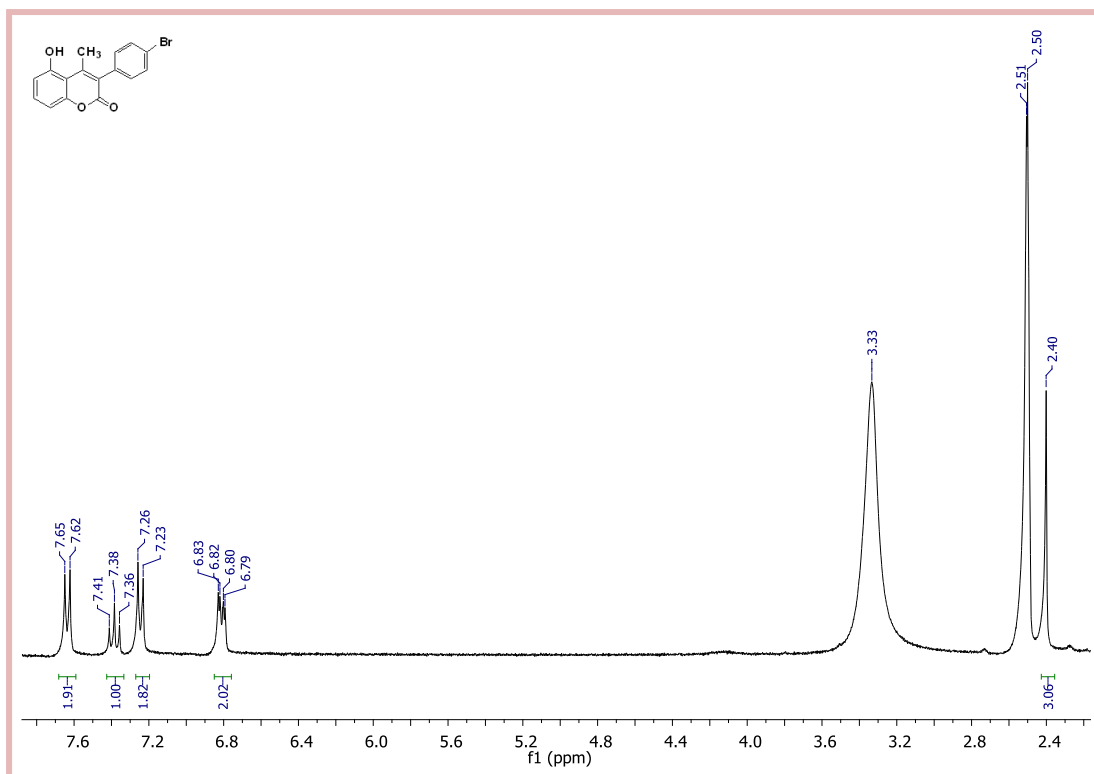
Εικόνα 21: Φάσμα άνθρακα $^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **4e**



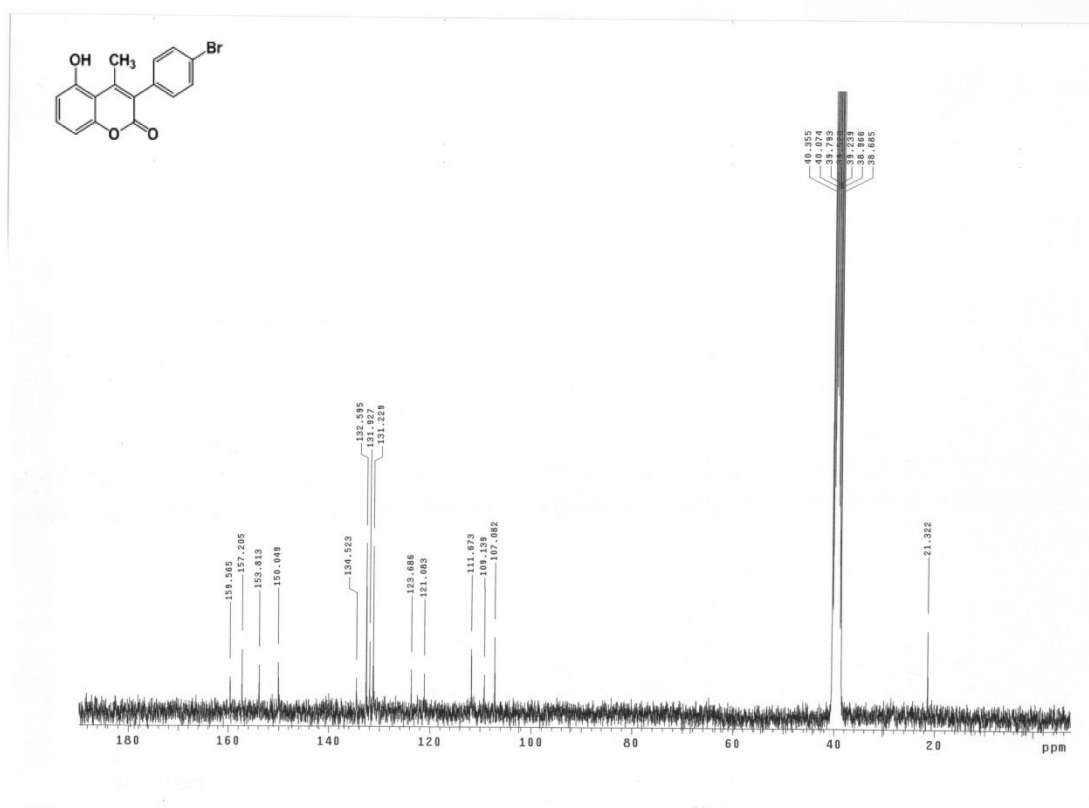
Εικόνα 22: Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **4c**



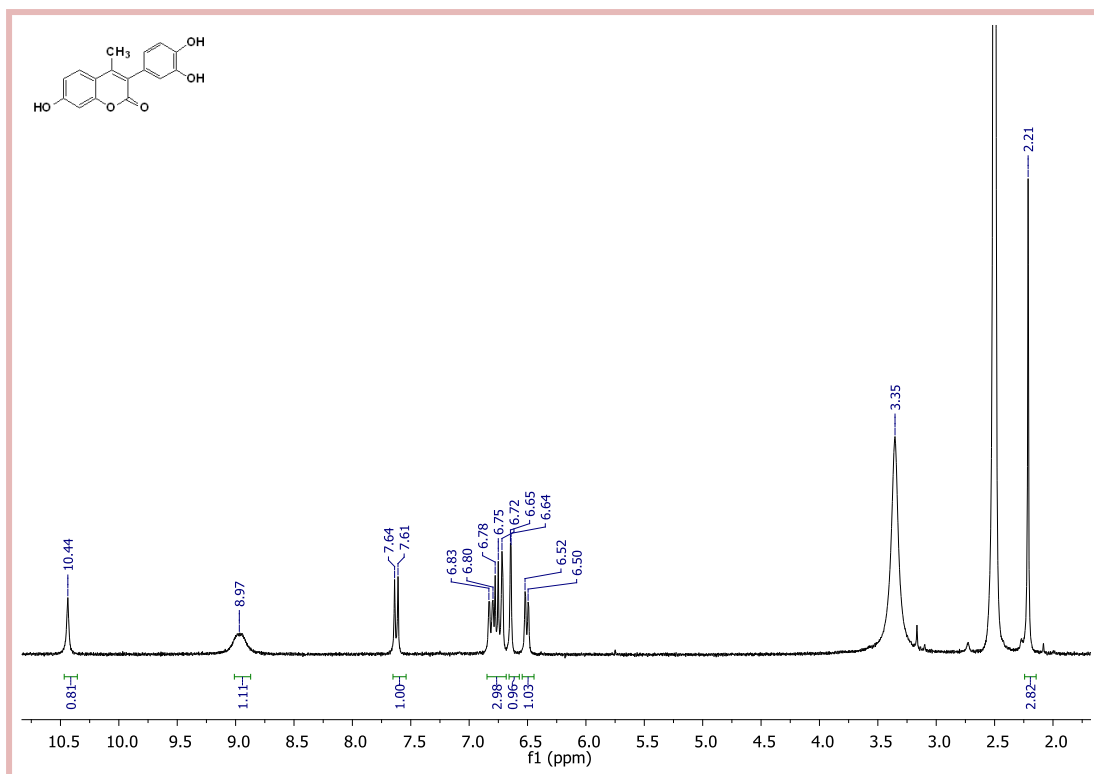
Εικόνα 23: Φάσμα άνθρακα $^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **4c**



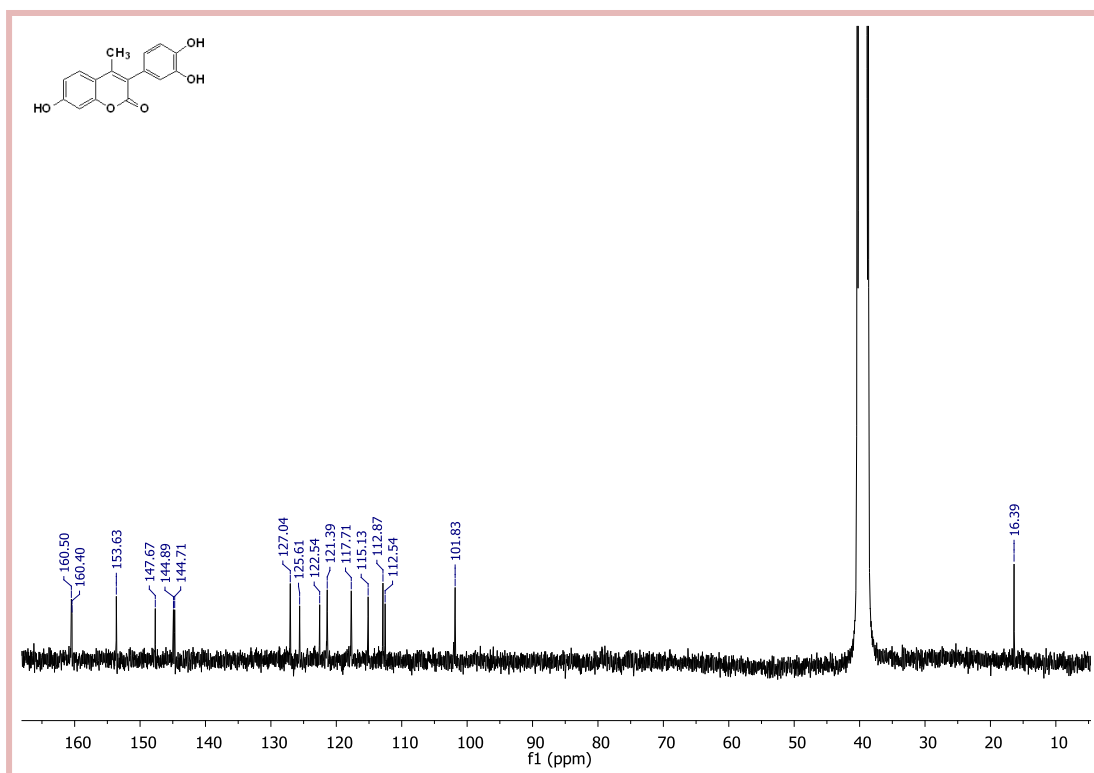
Εικόνα 24: Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **4g**



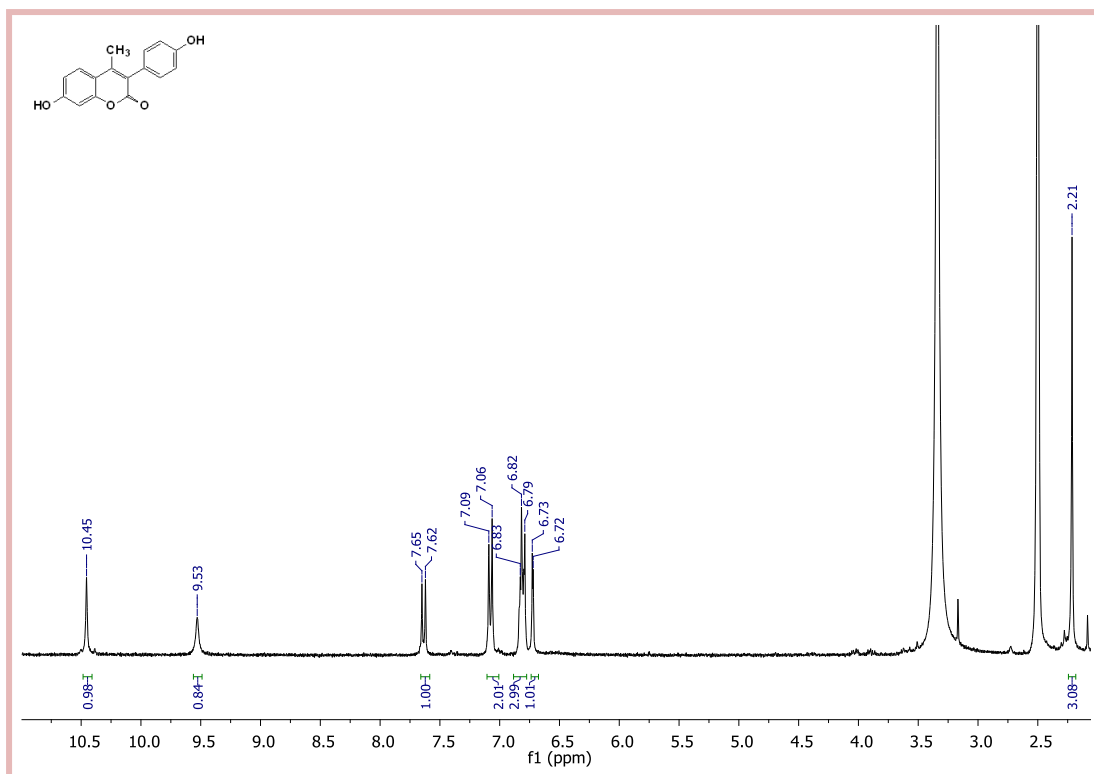
Εικόνα 25: Φάσμα άνθρακα $^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **4g**



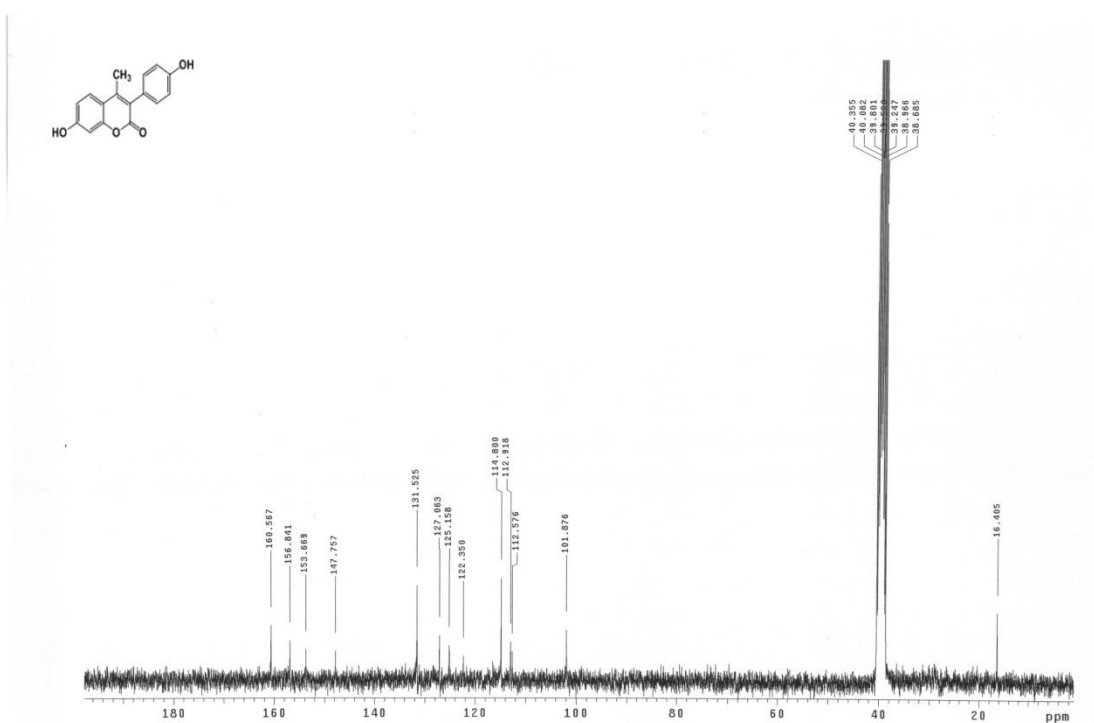
Εικόνα 26: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **6d**



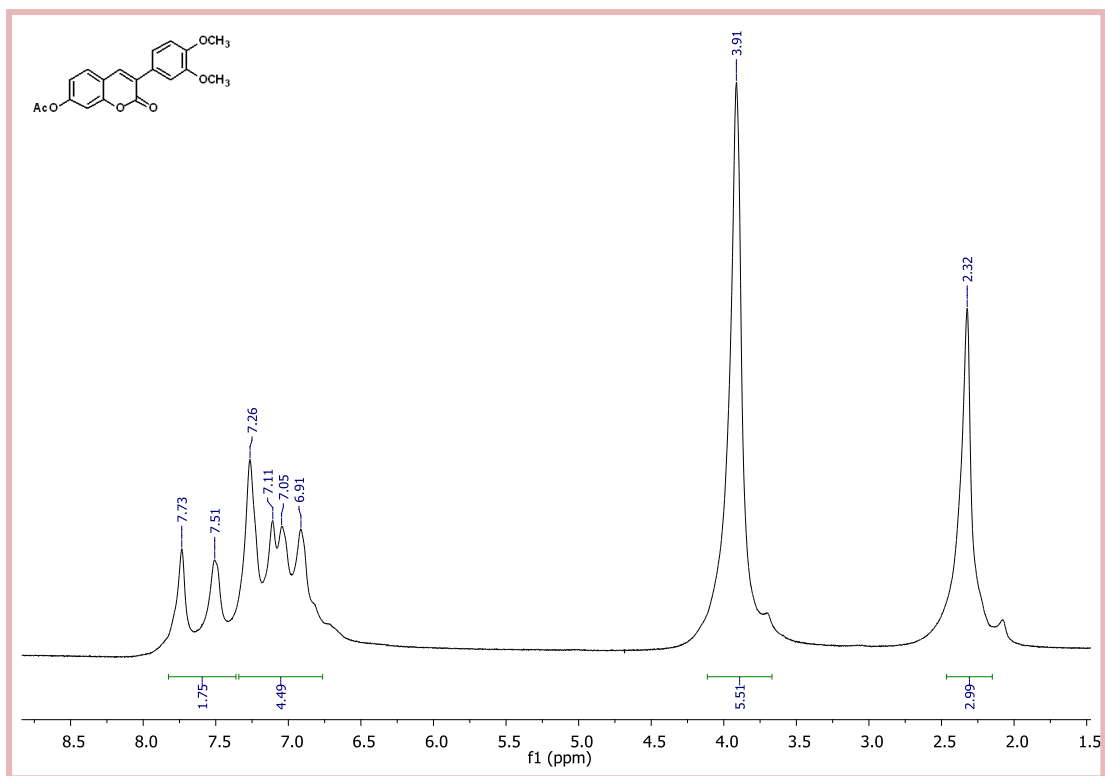
Εικόνα 27: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **6d**



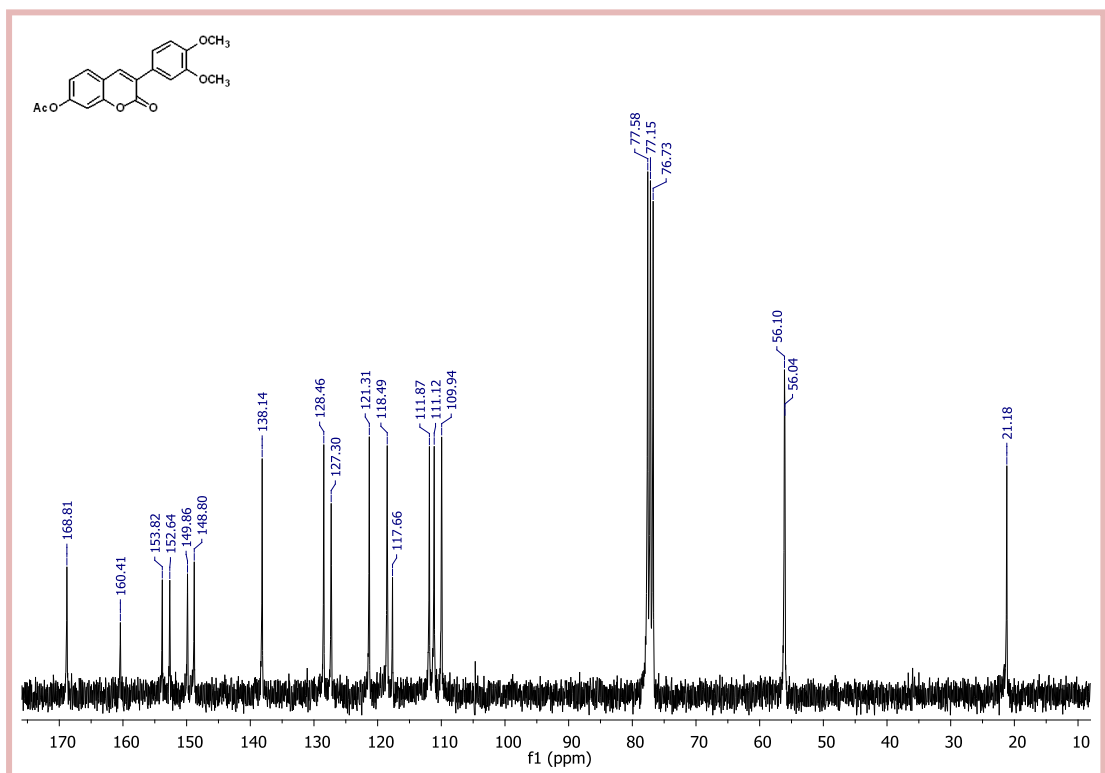
Εικόνα 28: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **6a**



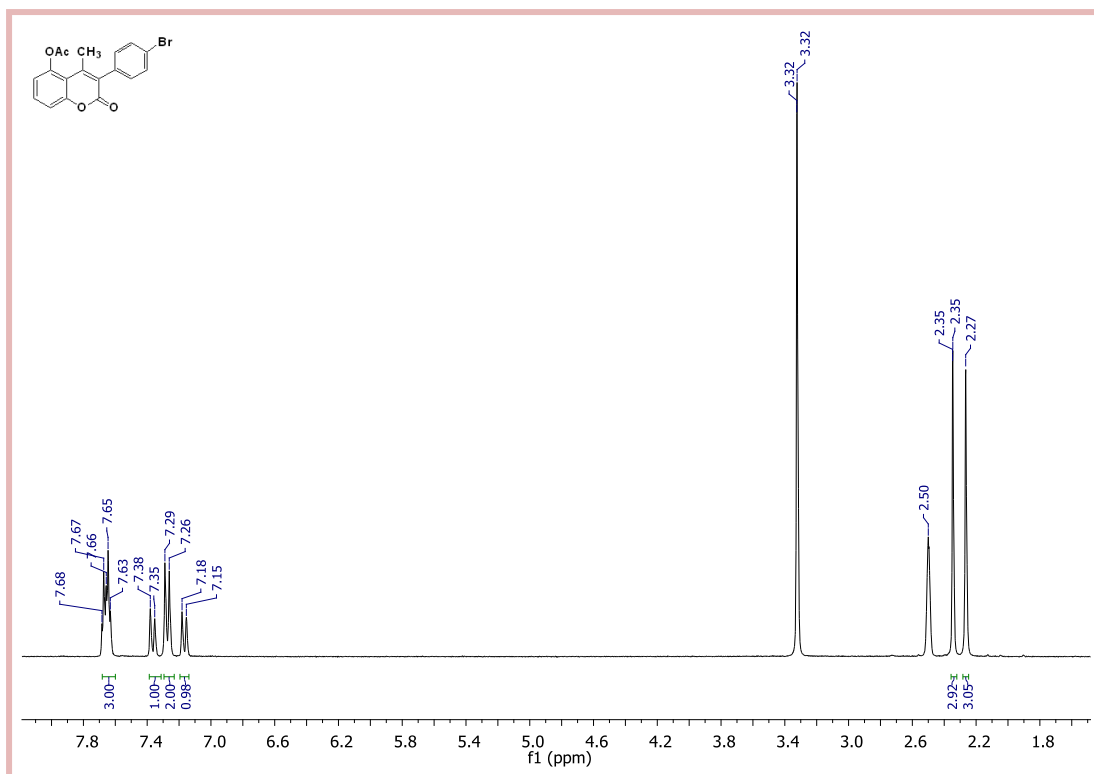
Εικόνα29: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **6a**



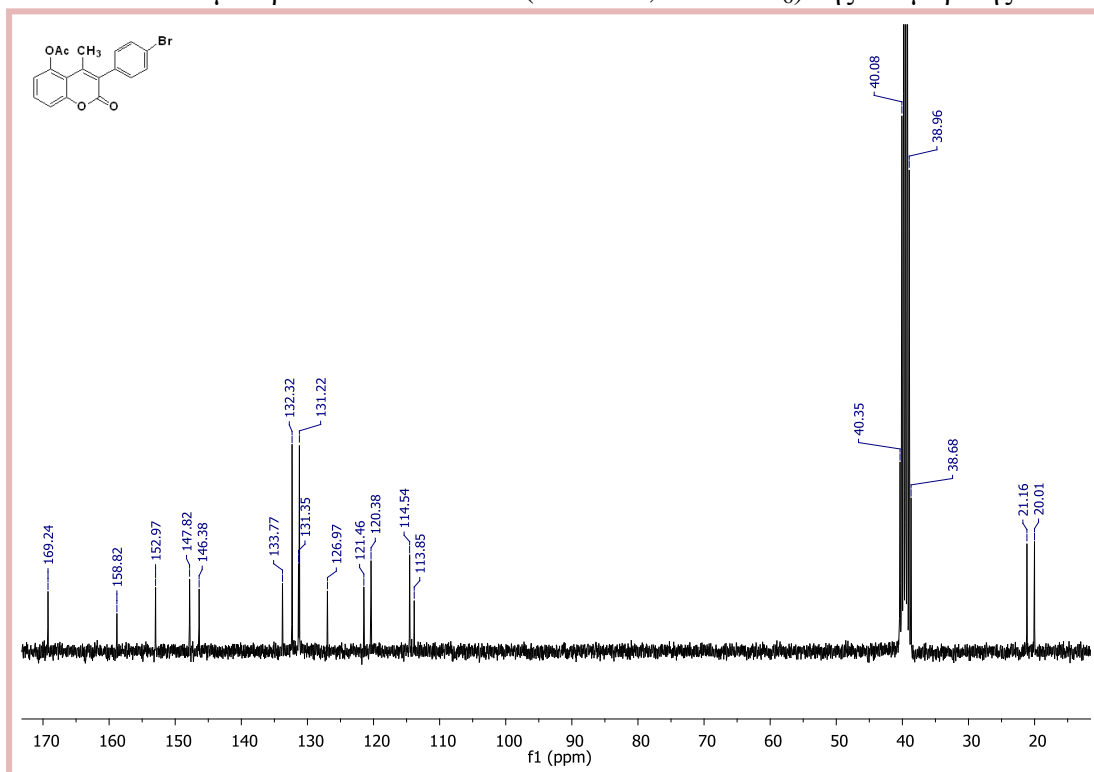
Εικόνα 30: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) της κουμαρίνης **5e**



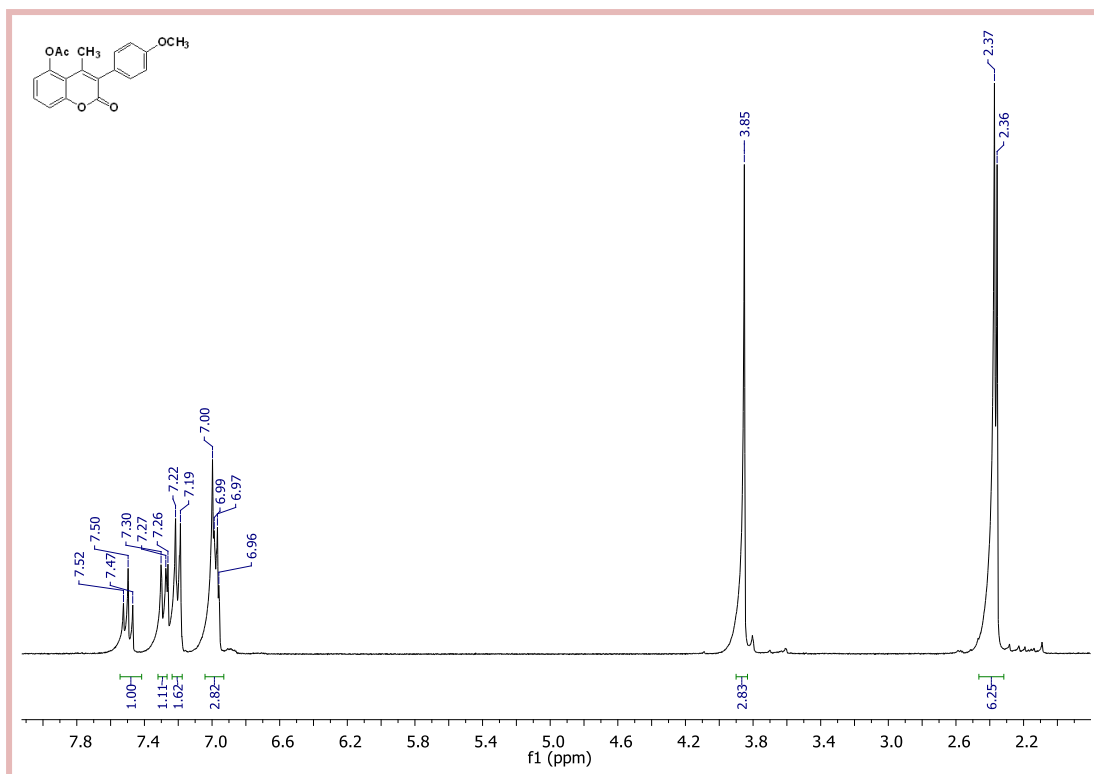
Εικόνα 31: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3) της κουμαρίνης **5e**



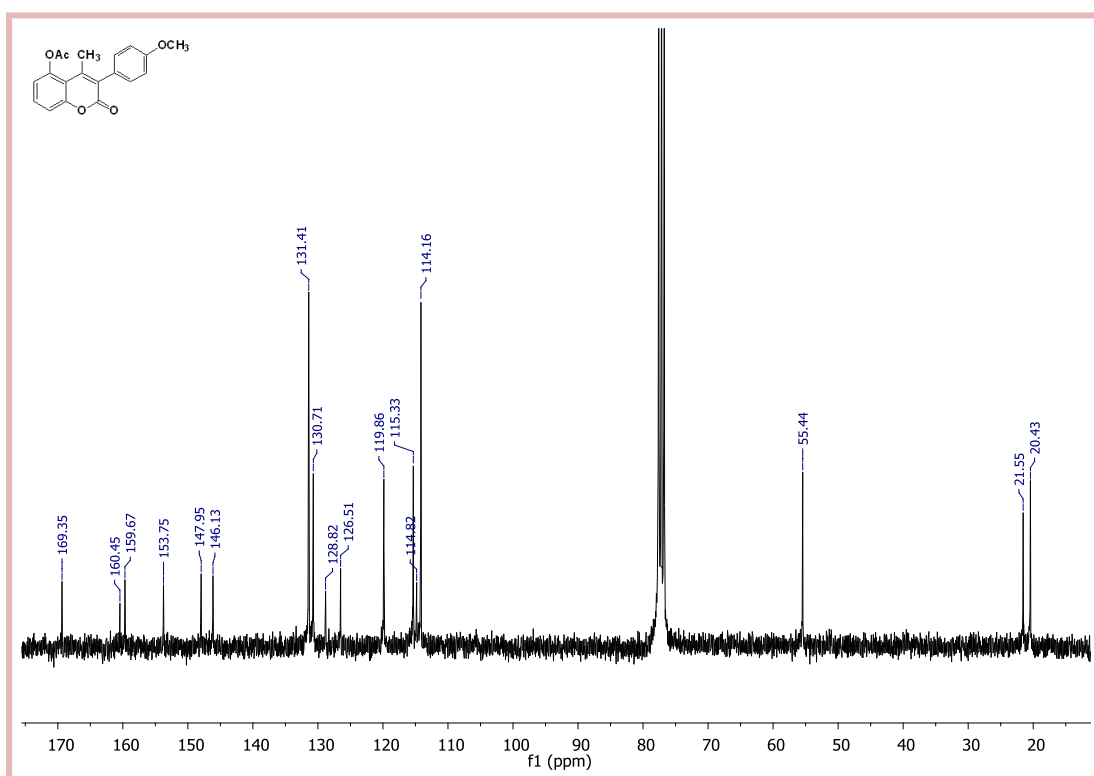
Εικόνα 32: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **5d**



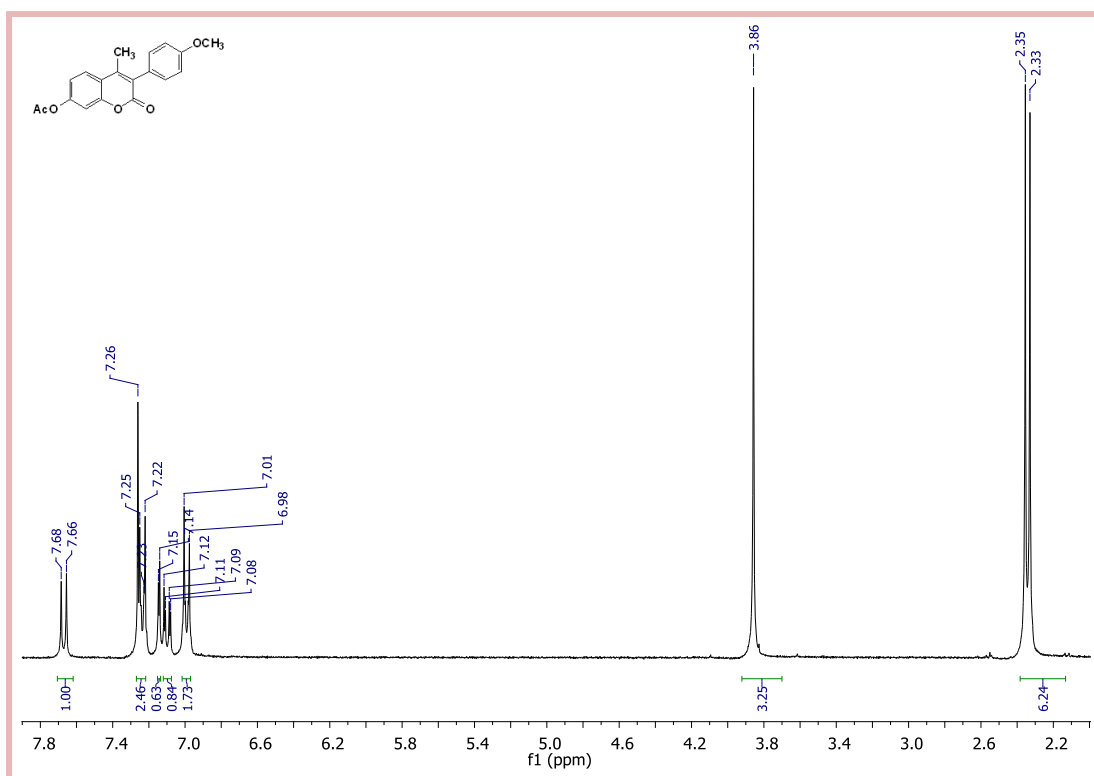
Εικόνα 33: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (75MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **5d**



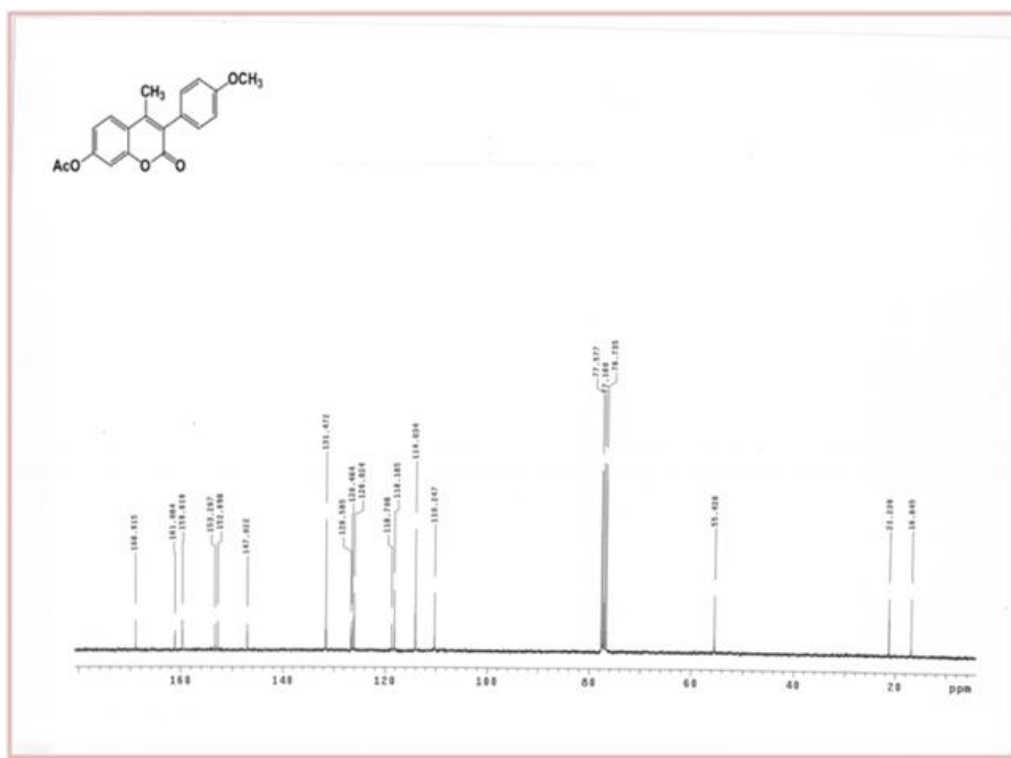
Εικόνα 34: Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) της κουμαρίνης **5b**



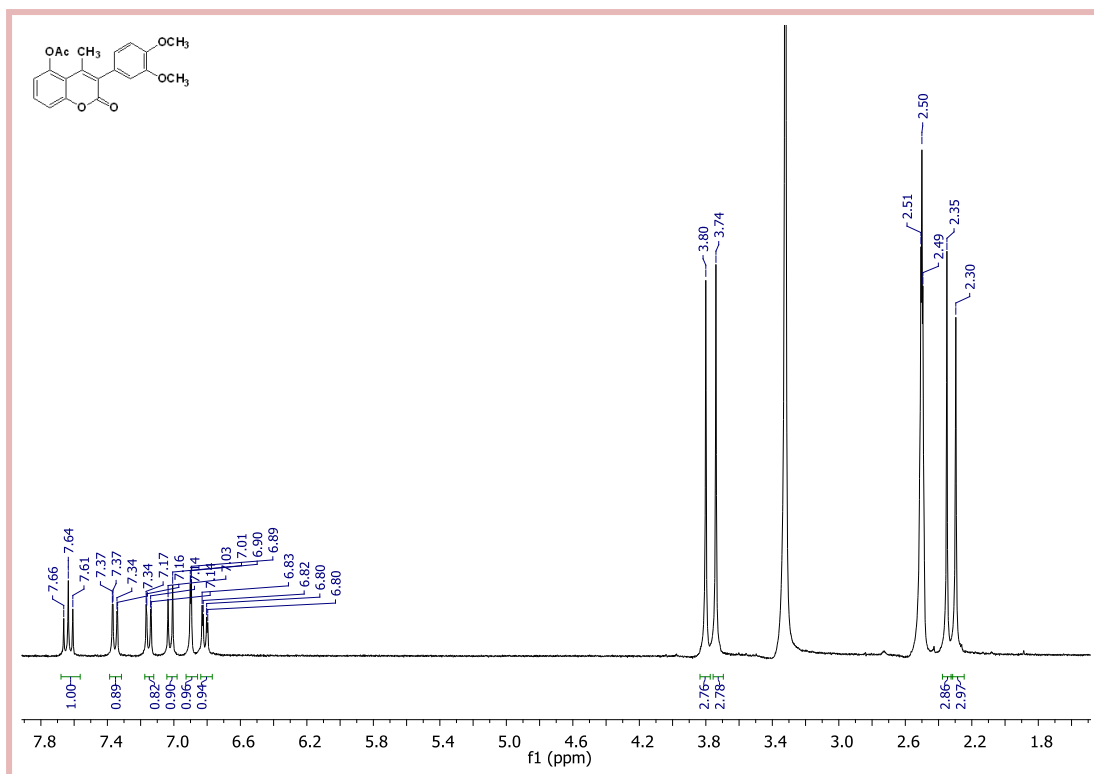
Εικόνα 35: Φάσμα άνθρακα $^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, CDCl_3) της κουμαρίνης **5b**



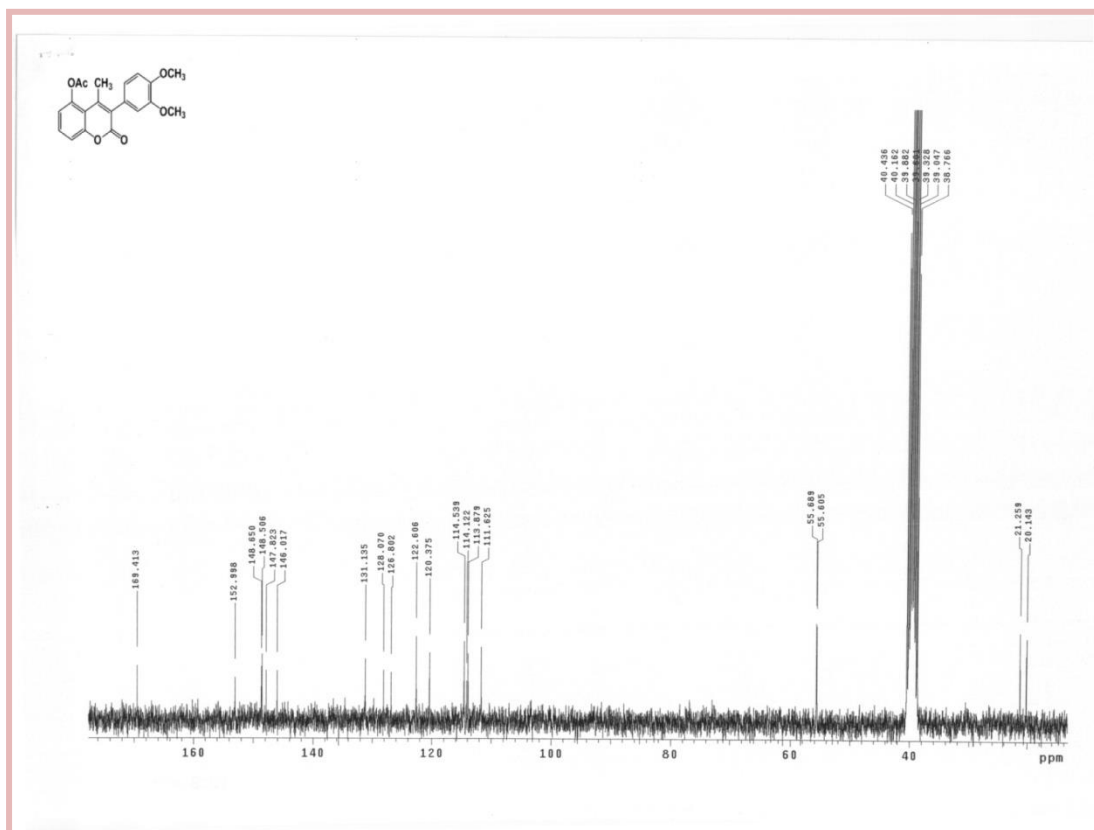
Εικόνα 36: Φάσμα πρωτονίου ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) της κουμαρίνης **5a**



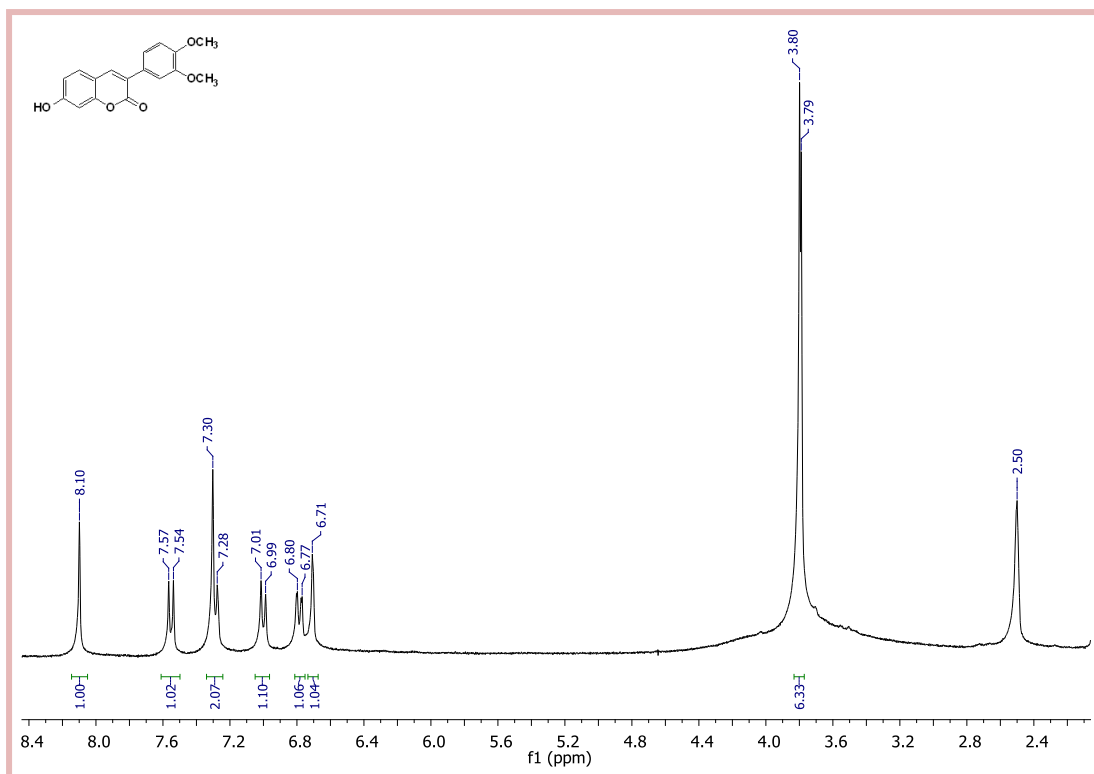
Εικόνα 37: Φάσμα άνθρακα ¹³C NMR (75MHz, CDCl₃) της κουμαρίνης **5a**



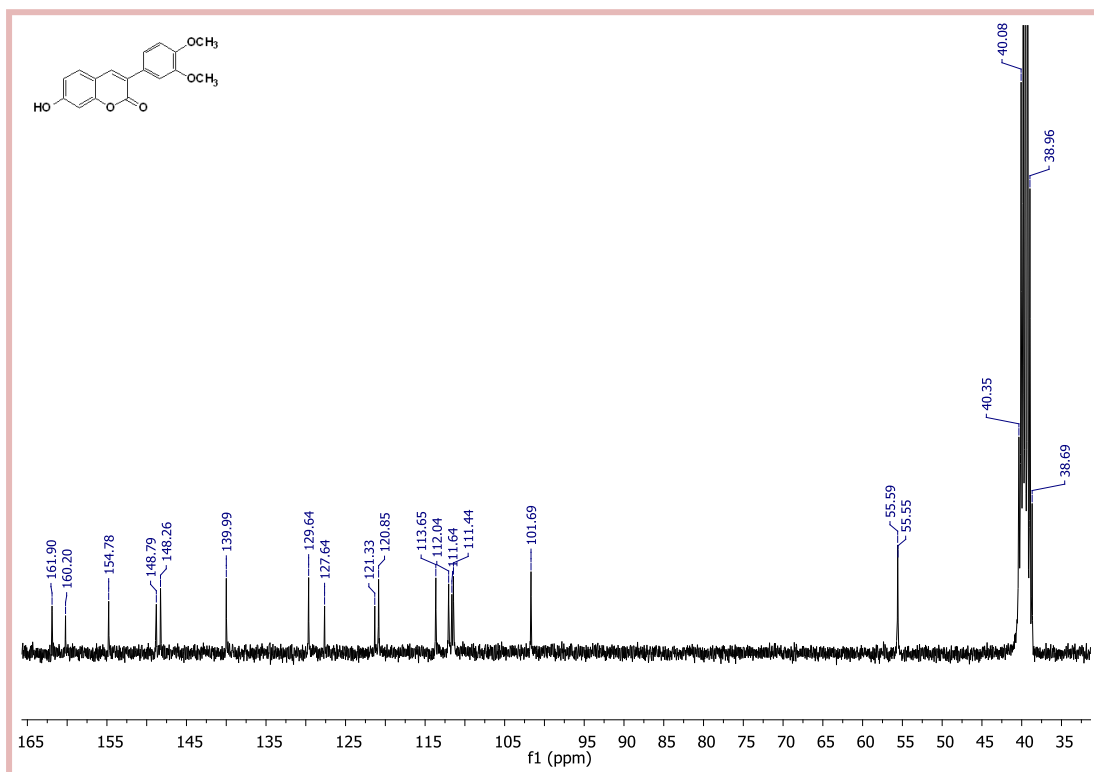
Εικόνα 38: Φάσμα πρωτονίου ¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) της κουμαρίνης 5c



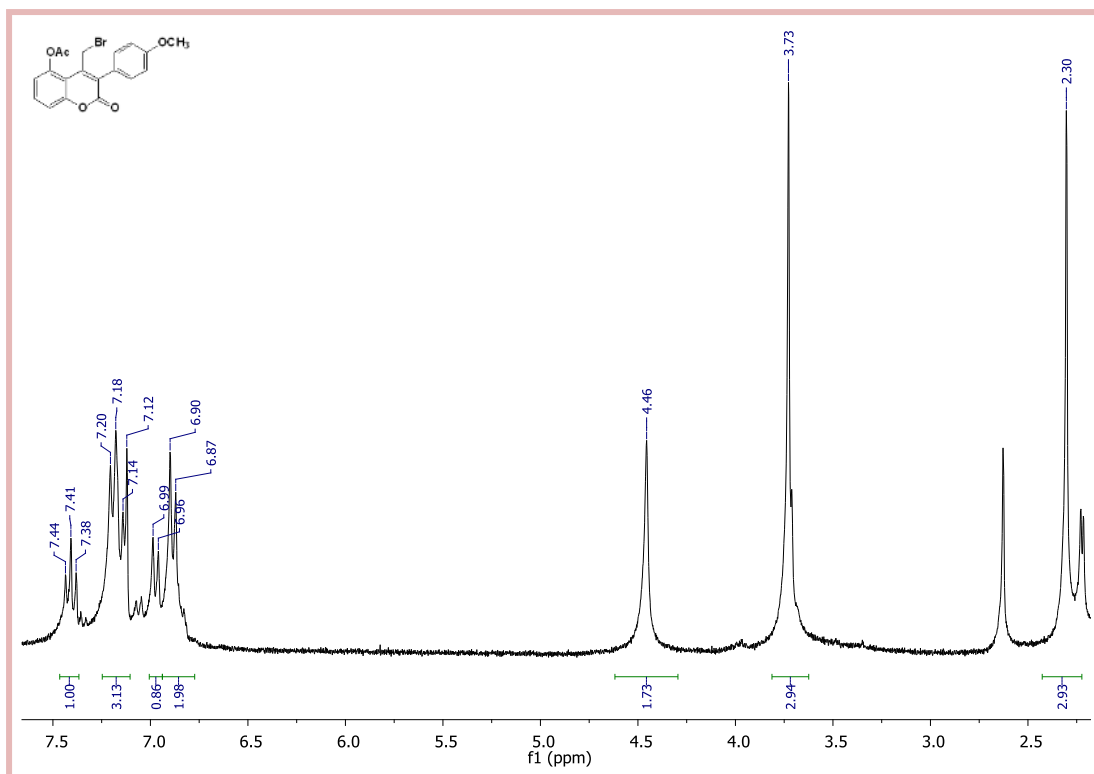
Εικόνα 39: Φάσμα άνθρακα ¹³C NMR (75MHz, DMSO-d₆) της κουμαρίνης 5c



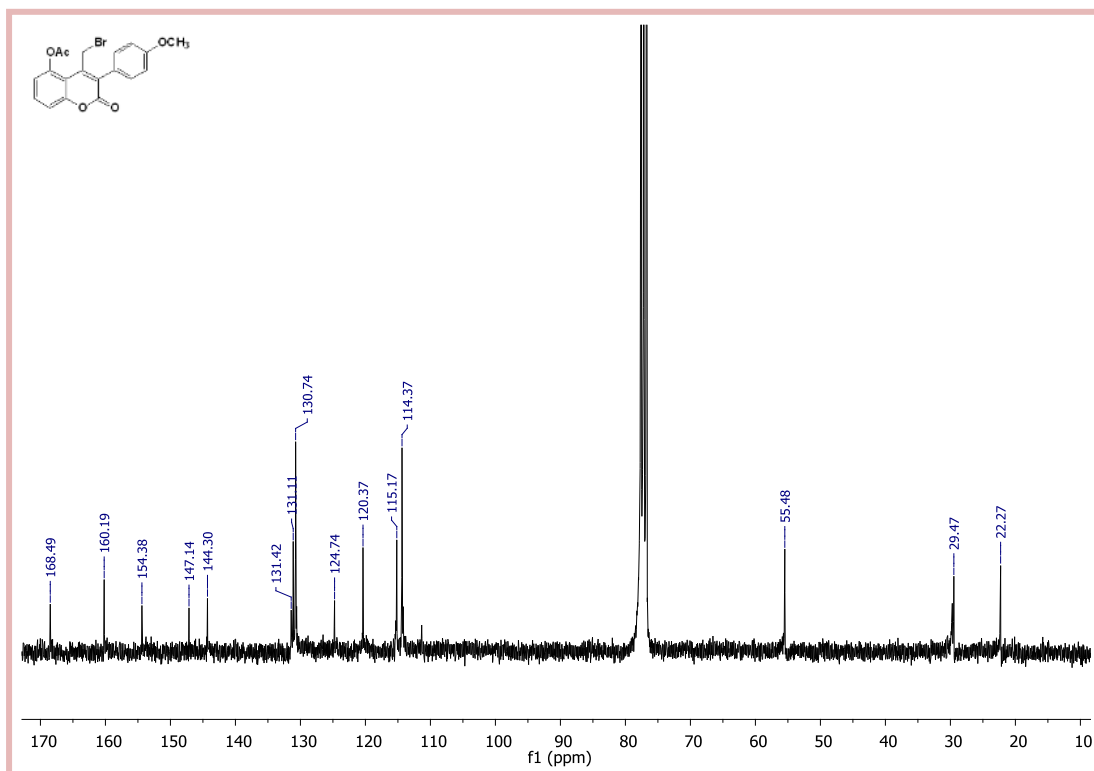
Εικόνα 40: Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **4d**



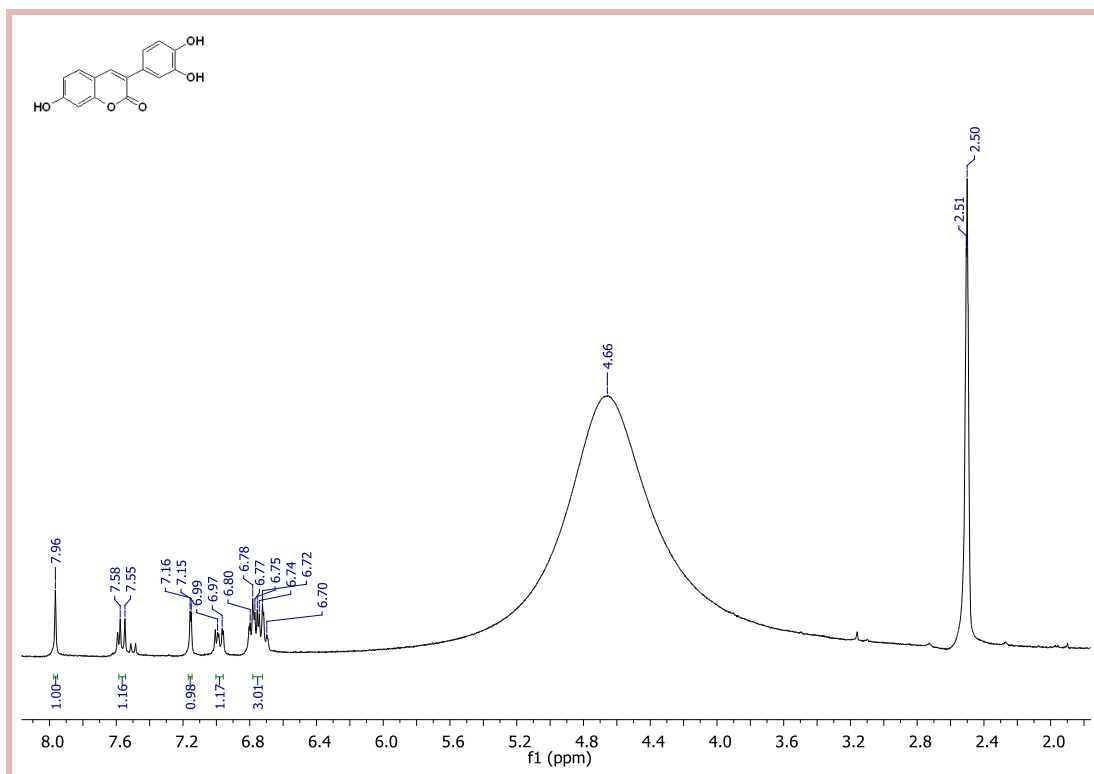
Εικόνα 41: Φάσμα άνθρακα $^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **4d**



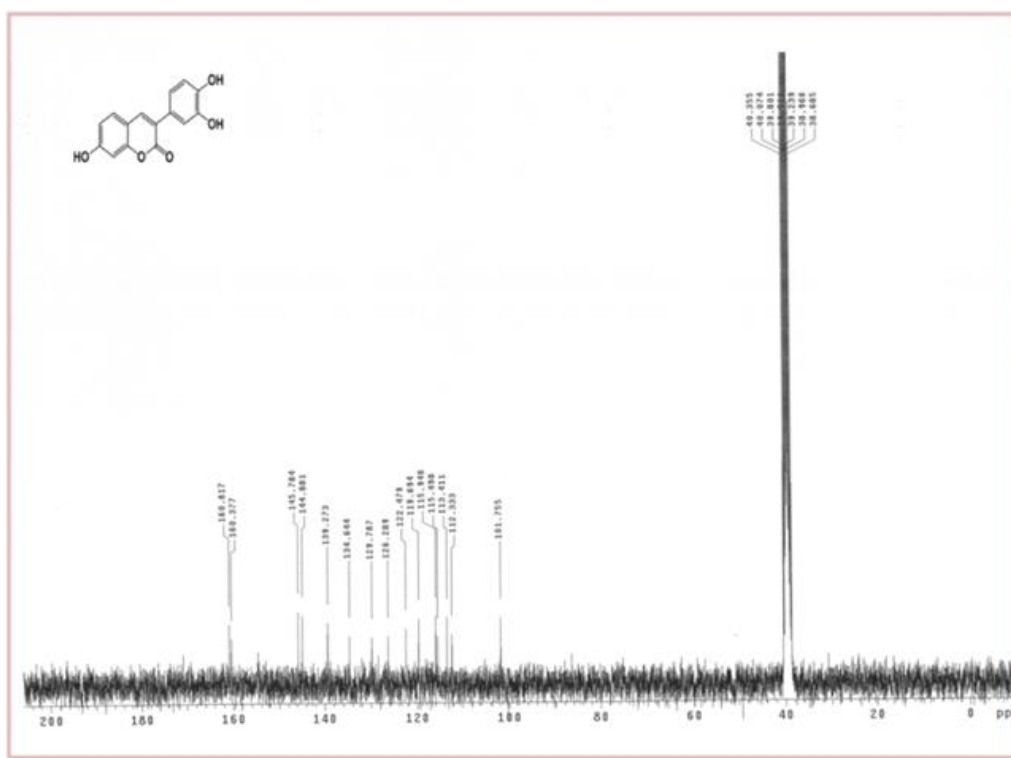
Εικόνα 42: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) της κουμαρίνης **7b**



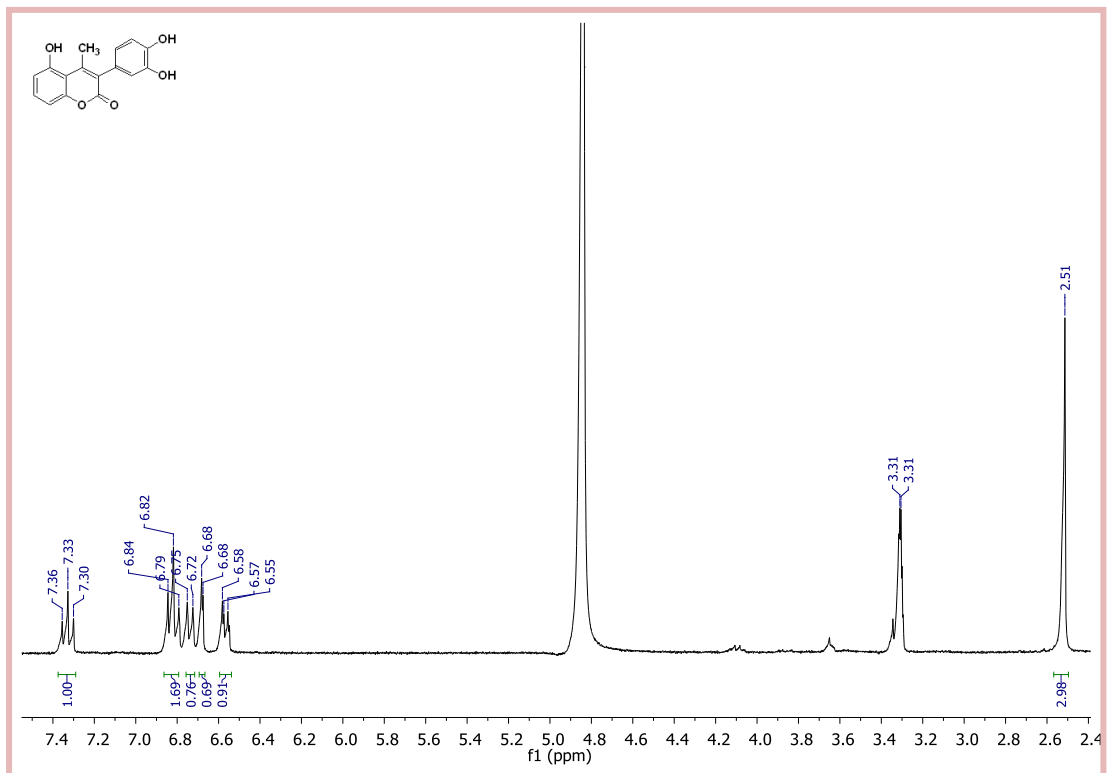
Εικόνα 43: Φάσμα άνθρακα ^{13}C NMR (300MHz, CDCl_3) της κουμαρίνης **7b**



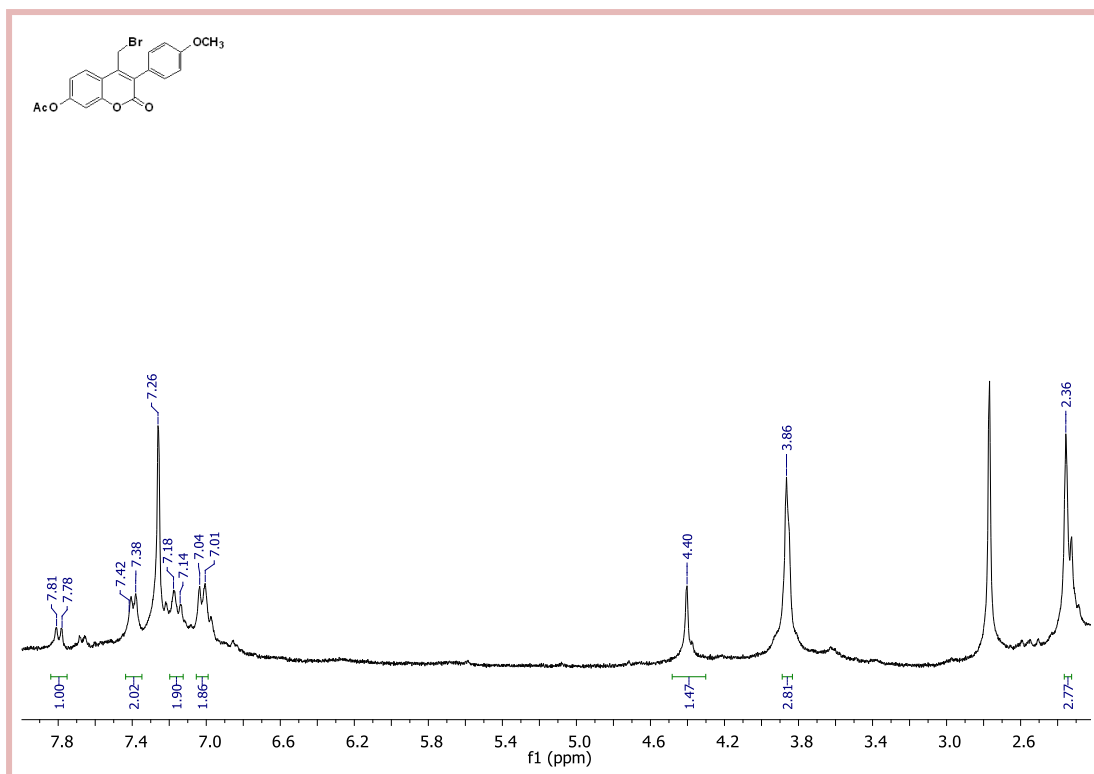
Εικόνα 44: Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **6e**



Εικόνα 45: Φάσμα άνθρακα $^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, DMSO-d_6) της κουμαρίνης **6e**



Εικόνα 46: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, CD_3OD) της κουμαρίνης **6c**



Εικόνα 47: Φάσμα πρωτονίου ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) της κουμαρίνης **7a**