



Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο  
Σχολή Χημικών Μηχανικών  
Τομέας (I) Χημικών Επιστημών  
Εργαστήριο Οργανικής Χημείας

## **ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Σχεδιασμός, σύνθεση και χαρακτηρισμός νέων  
αναλόγων της υδροξυτυροσόλης και μελέτη  
αντιοξειδωτικής δράσης.**



**ΤΣΕΡΤΟΥ ΕΙΡΗΝΗ**

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Δέση Αναστασία ,

Επικ. Καθηγήτρια ΕΜΠ

Αθήνα 2014

Στους γονείς μου

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και στο Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2013-2014, υπό την επίβλεψη της Επίκουρου Καθηγήτριας Δέτση Αναστασίας.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υπεύθυνη καθηγήτρια μου Δέτση Αναστασία τόσο για την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας όσο και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Με την καθοδήγηση, τις συμβουλές και τις γνώσεις της ήρθε εις πέρας αυτή η αποστολή.

Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, την Λέκτορα Σ. Βουγιούκα και τον Λέκτορα Ε. Τόπακα για την κριτική ανάγνωση του κειμένου και την τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Ευχαριστώ την Ανδρομάχη Τζάνη, υποψήφια διδάκτορα στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας, για την άψογη συνεργασία και την ουσιαστική συνεισφορά της στην συγγραφή αυτής της εργασίας. Η προσφορά του πολύτιμου χρόνου της και η μετάδοση των γνώσεων της ήταν πέρα από κάθε προσδοκία.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στο Δρ Κυριάκο Προυσή, για την πολύτιμη βοήθεια του. Ο χρόνος του και οι γνώσεις του ήταν καταλυτικοί παράγοντες για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ την υποψήφια διδάκτορα, Μαρίνα Ρουσσάκη, για την βοήθεια και τις γνώσεις που μου προσέφερε.

Ευχαριστώ την κα Ζαμπία Κατσανεβάκη, ΕΕΔΙΠ στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας για τη βοήθειά της κατά τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τη Δρ Θεοδώρα Καλογεροπούλου, Διευθύντρια Ερευνών στο Ινστιτούτο Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών για την συνεργασία και την δυνατότητα να χρησιμοποιήσω τις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου για την διεξαγωγή ορισμένων πειραμάτων.

Ευχαριστώ την κ. Σοφία Λουπασάκη, ερευνήτρια στο Μεσογειακό Αγρονομικό Ινστιτούτο Χανίων για τις μετρήσεις της αντιοξειδωτικής δράσης των ενώσεων.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου και τους φίλους μου που με στηρίζουν σε κάθε μου όνειρο.

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b>	<b>ΣΕΛΙΔΑ</b>
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ</b>	<b>4</b>
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ</b>	<b>6</b>
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ</b>	<b>7</b>
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ</b>	<b>8</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>10</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ</b>	<b>11</b>
1.1 Εισαγωγή	12
1.2 Η δομή της υδροξυτυροσόλης	13
1.3 Από ποια φυτά απομονώνεται η υδροξυτυροσόλη	13
1.4 Οι βιολογικές ιδιότητες της υδροξυτυροσόλης	17
1.4.1 Βιοδιαθεσιμότητα και φαρμακοκινητικές ιδιότητες	17
1.4.2 Αντιοξειδωτική δράση	18
1.4.3 Καρδιοπροστατευτική δράση	19
1.4.4 Αντικαρκινική δράση	20
1.4.5 Αντιμικροβιακή δράση	21
1.4.6 Αντιδιαβητική δράση	22
1.4.7 Νευροπροστατευτική δράση	22
1.4.8 Αντι-νιτροσο παράγοντας	23
1.4.9 Αντι-ιική δράση	23
1.4.10 Πρόληψη οστεοπόρωσης	23

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΗΣ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗΣ</b>	<b>25</b>
2.1 Εισαγωγή	26
2.2 Ανάλογα της υδροξυτυροσόλης	27
2.2.1 Αλκυλο-υδοξυτυροσολο-αιθέρες	27
2.2.2 Εστέρες της υδροξυτυροσόλης	30
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΝΕΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΗΣ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗΣ</b>	<b>34</b>
3.1 Σκοπός της εργασίας	35
3.2 Σχεδιασμός και σύνθεση νέων αναλόγων της υδροξυτυροσόλης	36
3.2.1 Η συνθετική πορεία της 2,5-διυδροξυτυροσόλης	36
3.2.2 Η συνθετική πορεία της 4-(6-υδροξυ-εξυλο)βενζενο-1,2-διόλη	37
3.3 Προσδιορισμός της ικανότητας των ενώσεων να δεσμεύουν το H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας	48
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>52</b>
4.1 Όργανα και συσκευές	53
4.2 Σύνθεση της 2,5-διυδοξυτυροσόλης	54
4.3 Σύνθεση της 4-(6-υδροξυ-εξυλο)βενζενο-1,2-διόλη	58
4.4 Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης παραγόμενων ενώσεων κατά την συνθετική πορεία των δύο νέων αναλόγων της υδροξυτυροσόλης	60
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>62</b>
5.1 Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των νέων ενώσεων	63
5.2 Συζήτηση αποτελεσμάτων	65
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>67</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b>	<b>76</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΣΧΗΜΑ	ΣΕΛΙΔΑ
<b>Σχήμα 1</b> Οι κύριες φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου	12
<b>Σχήμα 2</b> Η μοριακή δομή της υδροξυτυροσόλης	16
<b>Σχήμα 3</b> Η βιοσύνθεση της υδροξυτυροσόλης	17
<b>Σχήμα 4</b> Ο σχηματισμός της 2-νιτρο-υδροξυτυροσόλη με νίτρωση της Hty	23
<b>Σχήμα 5</b> Η μοριακή δομή της υδροξυτυροσόλης (1) και των παραγώγων της: των αλκυλο-υδροξυτυροσολοιθέρων (2-9)	27
<b>Σχήμα 6</b> Σύνθεση των αλκυλο-υδροξυτυροσολοιθέρων με αλκυλίωση από αλκυλο-ιωδίδιο	28
<b>Σχήμα 7</b> Η γενική δομή των εστέρων της υδροξυτυροσόλης	30
<b>Σχήμα 8</b> Σύνθεση των εστέρων της υδροξυτυροσόλης από τυροσόλη και ομοβανιλλική αλκοόλη	31
<b>Σχήμα 9</b> Τοποεκλεκτική ακυλίωση της υδροξυτυροσόλης καταλυόμενη με λιπάση B από την C. Antarctica	31
<b>Σχήμα 10</b> Τα δύο νέα ανάλογα της υδροξυτυροσόλης	35
<b>Σχήμα 11</b> Η συνθετική πορεία της 2,5-διϋδροξυτυροσόλης (8)	36
<b>Σχήμα 12</b> Η αντίδραση της ακετυλίωσης και η αντίδραση της φορμυλίωσης για την παραγωγή των ενώσεων <b>2</b> και <b>3</b> αντίστοιχα	37
<b>Σχήμα 13</b> Η οξειδωση της βενζαλδεϋδης (3) προς την αλκοόλη (4) και προστασία του φαινολικού υδροξυλίου (5)	39
<b>Σχήμα 14</b> Η αποπροστασία του οξικού 2-ακετοξυ-4,5-διμεθοξυφαιναιθυλεστέρα (6)	41
<b>Σχήμα 15</b> Ο σχηματισμός της τετρακετυλιωμένης 2,5 –υδροξυτυροσόλης (7)	43
<b>Σχήμα 16</b> Η συνθετική πορεία της 4-(6-υδροξυ-εξυλο)βενζενο-1,2-διόλη (13)	44
<b>Σχήμα 17</b> Ο σχηματισμός του ακόρεστου οξέος <b>10</b> μέσω της αντίδρασης Wittig.	45
<b>Σχήμα 18</b> Η αντίδραση υδρογόνωσης για την μετατροπή του ακόρεστου οξέος <b>10</b> στο κορεσμένο οξύ <b>11</b>	45

<b>Σχήμα 19</b> Η αντίδραση αναγωγής του κορεσμένου οξέος <b>11</b> στην πρωτοταγή αλκόολη <b>12</b>	45
<b>Σχήμα 20</b> Η αποπροστασία και η παραλαβή της 4-(6-υδροξυ-εξυλο)βενζενο-1,2-διόλη ( <b>13</b> )	47
<b>Σχήμα 21</b> Η αντίδραση Fenton	49
<b>Σχήμα 22</b> Οι αντιδράσεις που συμβαίνουν κατά τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης	50

## **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ**

### **ΕΙΚΟΝΑ**

<b>Εικόνα 1</b> «Η πυραμίδα της Μεσογειακής διατροφής»	12
<b>Εικόνα 2</b> «Ποσοτικά αποτελέσματα σε mg ανάλυσης/ kg εκχυλίσματος έξτρα παρθένου ελαιολάδου»	14

### **Εικόνα 3**

Πάνω αριστερά : «Χαρακτηρισμός του φαινολικού προφίλ στο φαινολικό εκχύλισμα του έξτρα παρθένου ελαιολάδου\* με τη τεχνική της ταχείας ανάλυσης με υγρή χρωματογραφία (RRLC) συζευγμένη με φασματοσκοπία μάζας με αναλυτή μαζών με βάση το «χρόνο πτήσης».

Πάνω δεξιά: «Ποσοστιαία κατανομή των κύριων φαινολικών οικογενειών που καθορίζονται στο φαινολικό εκχύλισμα του έξτρα παρθένου ελαιολάδου».

Κάτω: «Ποσοστιαία κατανομή των κύριων φαινολικών οικογενειών και χημική δομή των κυριότερων (ποσοτικά) συστατικών του φαινολικού εκχυλίσματος του έξτρα παρθένου ελαιολάδου, που είναι παράγωγα της υδροξυτυροσόλης (3,4-DHEPA) [ άγλυκο τμήμα της ελαιοευρωπεΐνης (3,4-DHEPA-EA) και άγλυκο τμήμα της αποκαρβοξυλιωμένης ελαιοευρωπεΐνης (3,4-DHEPA-DEA)]»

<b>Εικόνα 4</b> Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H}$ NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) του οξικού 2-φορμυλο-4,5-διμεθοξυφαιλαιθυλετέρα ( <b>3</b> )	38
<b>Εικόνα 5</b> Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H}$ NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) του οξικού 2-ακετοξυ-4,5-διμεθοξυφαιλαιθυλεστέρα ( <b>5</b> )	40
<b>Εικόνα 6</b> Φάσμα πρωτονίου $^1\text{H}$ NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) του οξικού 2,4,5-τριυδροξυφαιλαιθυλεστέρα ( <b>6</b> )	42

**Εικόνα 7** Φάσμα πρωτονίου  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) της 6-(3,4-διμεθοξυφαινυλ)εξαν-1-όλης (12) 46

### **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ ΠΑΡΑΤΗΜΑΤΟΣ**

**Εικόνα 8** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) του οξικού 3,4-διμεθοξυ-φαιναιθυλεστέρα (2) 76

**Εικόνα 9** Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) του οξικού 3,4-διμεθοξυ-φαιναιθυλεστέρα (2) 77

**Εικόνα 10** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) του οξικού 2-φορμυλο-4,5-διμεθοξυφαιναιθυλετέρα (3) 78

**Εικόνα 11** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) του οξικού 2-υδροξυ-4,5-διμεθοξυ-φαιναιθυλεστέρα (4) 79

**Εικόνα 12** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) του οξικού 2-ακετοξυ-4,5-διμεθοξυφαιναιθυλεστέρα (5) 80

**Εικόνα 13** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) του οξικού 2,4,5-τριϋδροξυφαιναιθυλεστέρα (6) 81

**Εικόνα 14** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) της τετρακετυλιωμένης 2,5-υδροξυτυροσόλης (7) 82

**Εικόνα 15** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) της 6-(3,4-διμεθοξυφαινυλ)εξαν-1-όλη (12) 83

**Εικόνα 16** Φάσμα μάζας (ESI-MS) του 6-(3,4-διμεθοξυφαινυλ)εξανοϊκού οξέος (11) 84

**Εικόνα 17** Φάσμα μάζας (ESI-MS) 6-(3,4-διμεθοξυφαινυλ)εξαν-1-όλη (12) 85

### **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ**

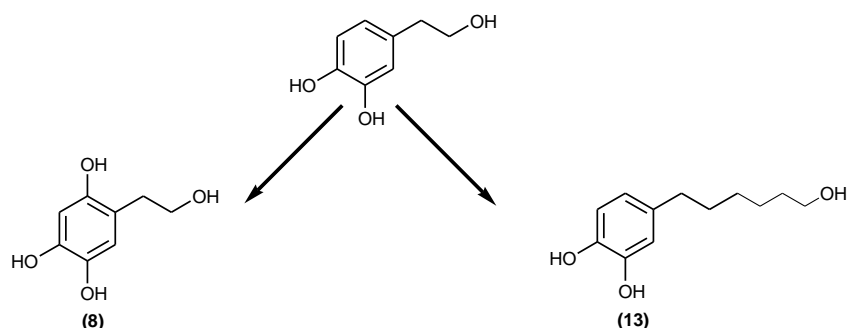
**Πίνακας 1** Προσδιορισμός της συγκέντρωσης  $\text{IC}_{50}$  με την μέθοδο της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης 63



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο σχεδιασμός, η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός της δομής και η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης νέων αναλόγων του φυσικού προϊόντος υδροξυτυροσόλη.

Ειδικότερα, οι νέες ενώσεις που επιλέχθηκαν για σύνθεση και μελέτη είναι η 2,5-διϋδροξυτυροσόλη (**8**), η οποία περιέχει μια επιπλέον ομάδα υδροξυλίου στη θέση 2 του αρωματικού δακτυλίου και η 4-(6-υδροξυ-εξυλο)βενζενο-1,2-διόλη (**13**), η οποία έχει ανθρακική αλυσίδα με έξι άτομα άνθρακα αντί για δύο που έχει η υδροξυτυροσόλη.



Η ταυτοποίηση της δομής των παραγόμενων ενώσεων πραγματοποιήθηκε με Φασματοσκοπία Μαγνητικού Συντονισμού (NMR ) και με Φασματοσκοπία Μάζας (ESI-MS) .

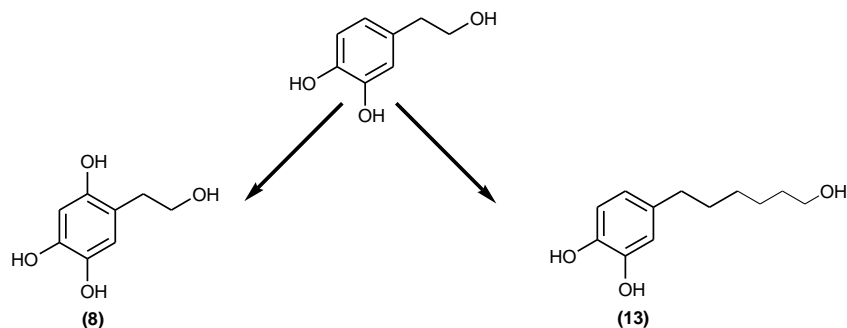
Έπειτα έγινε η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των νέων ενώσεων με την μέθοδο της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης. Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, έγινε η μέτρηση της ικανότητας δέσμευσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου από τις παραγόμενες ενώσεις.

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** υδροξυτυροσόλη, 2,5-διϋδροξυτυροσόλη, 4-(6-υδροξυ-εξυλο)βενζενο-1,2-διόλη, αντιοξειδωτική μελέτη

## ABSTRACT

The aim of this work is the design, synthesis, structure characterization and evaluation of the antioxidant activity of new analogues of the natural product hydroxytyrosol.

Specifically, the new compounds, which were selected for synthesis and study, were 2,5-dihydroxytyrosol (**8**), which contains an extra hydroxyl group at the 2-position of the aromatic ring and 4 - (6-hydroxy-hexyl) benzene-1, 2-diol (**13**), which has a carbon chain of six carbon atoms instead of two.



The identification of the structure of the new compounds was performed by Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR) and Mass spectroscopy (ESI-MS).

The antioxidant activity of the new compounds was evaluated using the chemiluminescence method of luminol. Thus, the ability of the compounds to scavenge hydrogen peroxide was assessed.

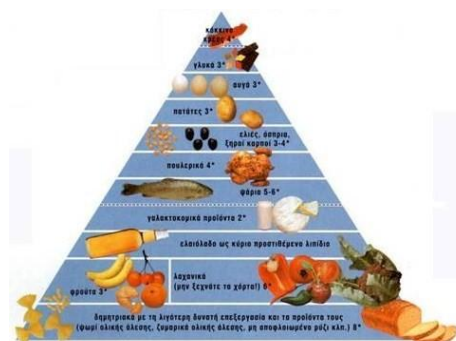
**KEY WORDS:** hydroxytyrosol , 2,5-dihydroxytyrosol, 4 - (6-hydroxy-hexyl) benzene-1, 2-diol, antioxidant study

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**

### **ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗ**

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζονται η δομή, οι φυσικές πηγές της υδροξυτυροσόλης και οι βιολογικές ιδιότητές της.

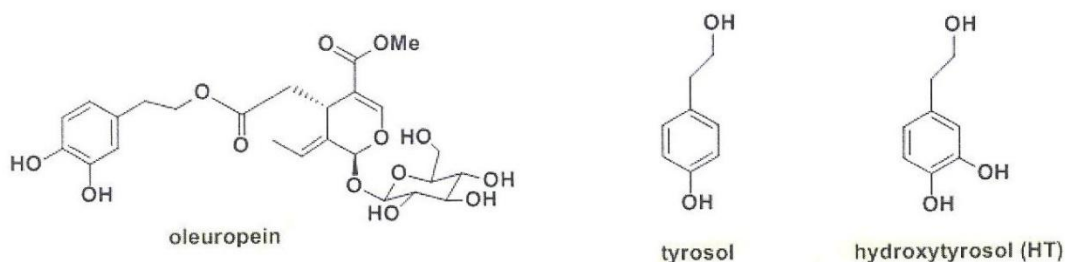
## 1.1 Εισαγωγή



Εικόνα 1: «Η πυραμίδα της Μεσογειακής διατροφής»

Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η χαμηλότερη συχνότητα της στεφανιαίας νόσου, του προστάτη και του καρκίνου του παχέος εντέρου στην Ελλάδα, στην Ιταλία και στην Ισπανία οφείλεται στην Μεσογειακή διατροφή.

Η Μεσογειακή διατροφή είναι σ' ένα μεγάλο βαθμό χορτοφαγική και η κατανάλωση ελαιολάδου αποτελεί την κύρια πηγή σε λιπαρά. Το ελαιόλαδο είναι μια πηγή τουλάχιστον 30 φαινολικών ενώσεων, με σημαντικότερες την ελαιοευρωπείνη, την υδροξυτυροσόλη και την τυροσόλη.



Σχήμα 1: « Οι κύριες φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου»

Οι φαινολικές ενώσεις του ελαιολάδου ή αλλιώς πολυφαινόλες είναι οργανικές ενώσεις που περιέχουν στο μόριό τους τουλάχιστον ένα αρωματικό δακτύλιο με υποκαταστάτες μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες. Οι ενώσεις αυτές έχουν μελετηθεί εκτεταμένα και ορισμένες από αυτές θεωρούνται εξαιρετικά ευεργετικές για τον οργανισμό εξαιτίας της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Η αντιοξειδωτική δράση έγκειται κυρίως στο γεγονός ότι μπορούν και δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες ή άλλες ενεργές μορφές οξυγόνου ή αζώτου. [1] Φαίνεται πως η αντιοξειδωτική δράση των διαφόρων φαινολικών ενώσεων είναι άμεση συνάρτηση της δομής τους και της θέσης των υποκαταστατών του βενζολικού δακτυλίου. [2,3]

Η συνεισφορά τους στα τρόφιμα εστιάζεται κυρίως στο γεγονός ότι τα προστατεύουν από οξειδώσεις που οδηγούν στην αλλοίωση τους, ενώ στον οργανισμό τα οφέλη τους είναι πολύπλευρα. Μια από τις πιο γνωστές δράσεις αφορά την παρεμπόδιση της οξειδωσης της πρωτεΐνης LDL η οποία συνδέεται με τις καρδιαγγειακές παθήσεις. [4,5] Καθώς οι αντιδράσεις ελευθέρων ριζών έχουν συνδεθεί με τις καρκινογενέσεις, η δυνατότητα των πολυφαινόλων να παρεμποδίσουν τις συγκεκριμένες αντιδράσεις τους προσδίδει και αντικαρκινικές ιδιότητες. [6]

Οι πολυφαινόλες βρίσκονται σε σημαντική συγκέντρωση στον ελαιόκαρπο και περνούν στην ελαιώδη φάση κατά τη διαδικασία εξαγωγής τους. Καθώς όμως πρόκειται για υδατοδιαλυτές ενώσεις, το μεγαλύτερο τους ποσοστό διαφεύγει με τα απόνερα και μόνο ένα μικρό ποσοστό (περίπου 1 %) παραμένει στο τελικό προϊόν.

Δεδομένης της προστιθέμενης βιολογικής τους αξίας, η οικονομική παραλαβή τους από ένα φθινό υπόστρωμα όπως είναι τα απόνερα, παρουσιάζει σημαντικό οικονομικό και περιβαλλοντικό ενδιαφέρον.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, όπου κατά τη μελέτη ανάκτησης φαινολικών ενώσεων από τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου, η υδροξυτυροσόλη καθαρίστηκε πιο εύκολα από όλες τις άλλες «βιοφαινόλες», δίνοντας ένα κλάσμα με πολύ υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Σύμφωνα με την μελέτη από ένα λίτρο υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου είναι δυνατόν να ληφθεί ένα εκχύλισμα που περιέχει 1.2 g υδροξυτυροσόλης και περίπου 0.4 g φλαβονοειδών, το οποίο με τη σειρά του μπορεί να κλασματωθεί και συνακόλουθα να παραχθεί 1 g καθαρού προϊόντος υδροξυτυροσόλης. Η εκχύλιση και ο καθαρισμός της υδροξυτυροσόλης από τα υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου μπορεί να υιοθετηθεί ως μια γρήγορη, φθηνή και απλή εναλλακτική λύση για την χημική ή ενζυματική σύνθεση της.[7]

Η υδροξυτυροσόλη, λοιπόν, είναι μια πολύτιμη πηγή φυσικού αντιοξειδωτικού και αποτελεί αντικείμενο ενδιαφέροντος για τις βιομηχανίες φαρμάκων, τροφίμων και καλλυντικών.

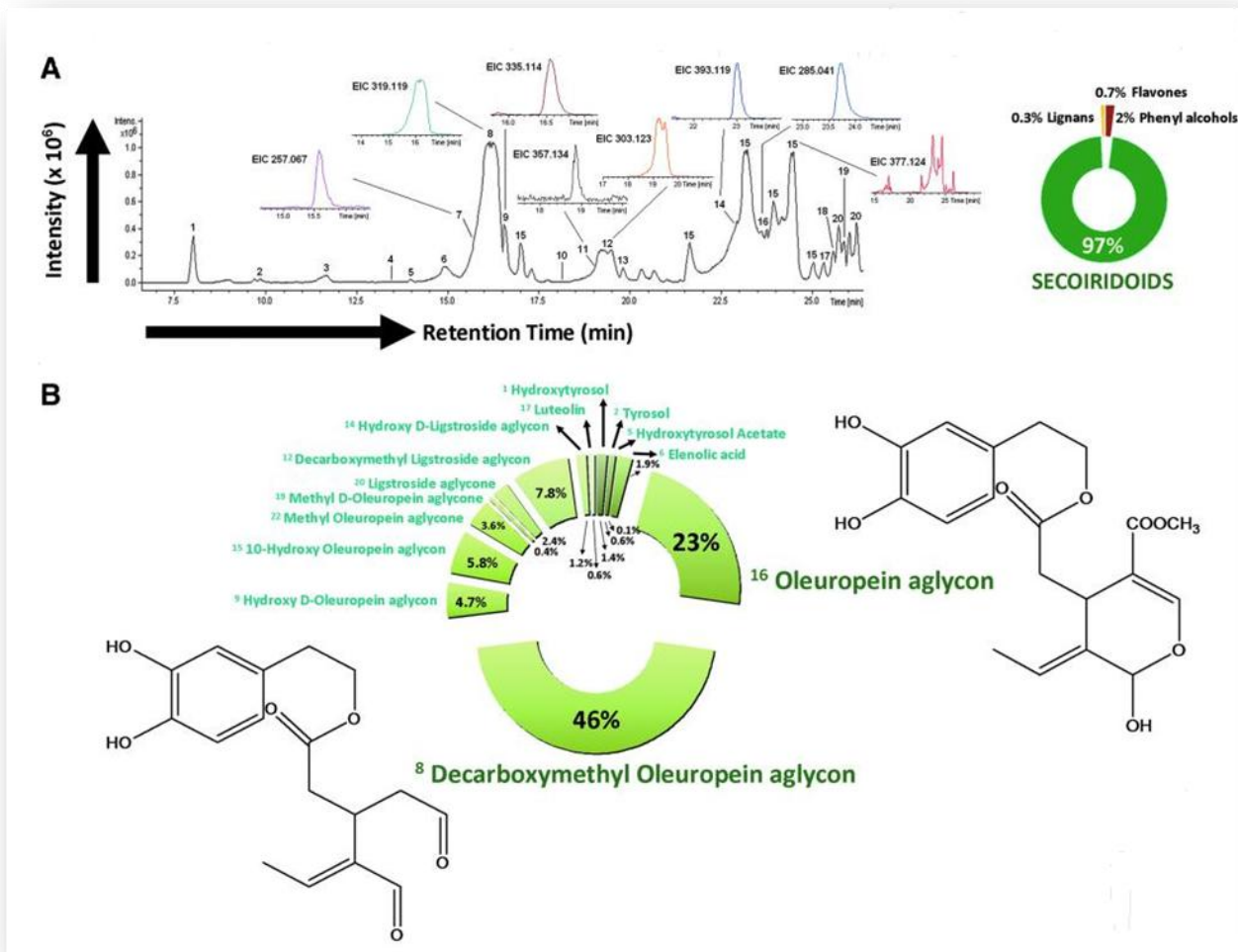
Quantitative Results Expressed in mg Analyte/ kg of Picual Extra Virgin Olive Oil Phenolic Extract

<i>Phenolic compounds</i>	<i>Concentration</i>	<i>Percent</i>
<b>Simple phenols</b>	<b>14.467±0.285</b>	<b>2.116</b>
Hydroxytyrosol	9.625±0.208	1.408
Tyrosol	4.162±0.109	0.609
Hydroxytyrosol acetate	0.680±0.003	0.099
<b>Secoiridoids</b>	<b>662.673±4.782</b>	<b>96.942</b>
Elenolic acid	13.123±0.125	1.920
Hydroxy elenolic acid	0.097±0.002	0.014
Oleuropein aglycon	157.917±1.257	23.102
Decarboxymethyl oleuropein aglycon	314.429±2.189	45.998
Hydroxy <i>D</i> -oleuropein aglycon	32.373±1.584	4.736
1 <i>O</i> -Hydroxy oleuropein aglycon	39.479±0.806	5.775
Methyl oleuropein aglycon	24.349±0.516	3.562
Methyl <i>D</i> -oleuropein aglycon	2.903±0.079	0.425
Ligstroside aglycon	16.261±0.709	2.379
Decarboxymethyl ligstroside aglycon	53.652±0.354	7.849
Hydroxy <i>D</i> -ligstroside aglycon	8.087±0.353	1.183
<b>Lignans</b>	<b>1.587±0.061</b>	<b>0.232</b>
Pinoresinol	0.815±0.032	0.119
Syringaresinol	0.772±0.029	0.113
<b>Flavones</b>	<b>4.852±0.084</b>	<b>0.710</b>
Luteolin	4.041±0.065	0.591
Apigenin	0.811±0.040	0.119
<b>Total phenolic contents</b>	<b>683.579±4.169</b>	<b>100.000</b>

Value= $\bar{X}$ ±standard deviation (SD). Percent distribution of identified phenolic compounds.

## Εικόνα 2 :

«Ποσοτικά αποτελέσματα σε mg ανάλυσης/ kg εκχυλίσματος έξτρα παρθένου ελαιολάδου\*». [8] \*Παρατήρηση: Το εκχύλισμα του παρθένου ελαιολάδου που χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή των παραπάνω αποτελεσμάτων είναι από ποικιλία ελιάς Picual από την Κόρδοβα (Ανδαλουσία, Ισπανία) το 2008.



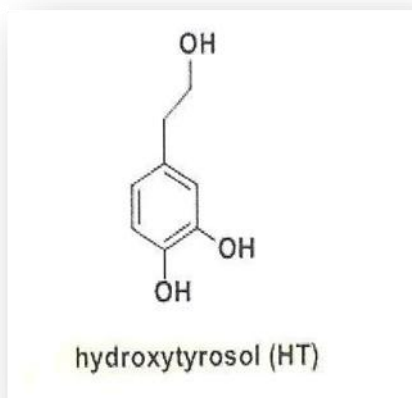
Εικόνα 3

Πάνω αριστερά : «Χαρακτηρισμός του φαινολικού προφίλ στο φαινολικό εκχύλισμα του έξτρα παρθένου ελαιολάδου\* με τη τεχνική της ταχείας ανάλυση με υγρή χρωματογραφία (RRLC) συζευγμένη με φασματοσκοπία μάζας με αναλυτή μαζών με βάση το «χρόνο πτήσης».

Πάνω δεξιά: «Ποσοστιαία κατανομή των κύριων φαινολικών οικογενειών που καθορίζονται στο φαινολικό εκχύλισμα του έξτρα παρθένου ελαιολάδου».

Κάτω: «Ποσοστιαία κατανομή των κύριων φαινολικών οικογενειών και χημική δομή των κυριότερων (ποσοτικά) συστατικών του φαινολικού εκχυλίσματος του έξτρα παρθένου ελαιολάδου, που είναι παράγωγα της υδροξυτυροσόλης (3,4-DHEPA) [ άγλυκο τμήμα της ελαιοευρωπείνης (3,4-DHEPA-EA) και άγλυκο τμήμα της αποκαρβοξυλιωμένης ελαιοευρωπείνης (3,4-DHEPA-DEA)]».

## 1.2 Δομή



Σχήμα 2: «Η μοριακή δομή υδροξυτυροσόλης»

Μοριακό βάρος = 154,16

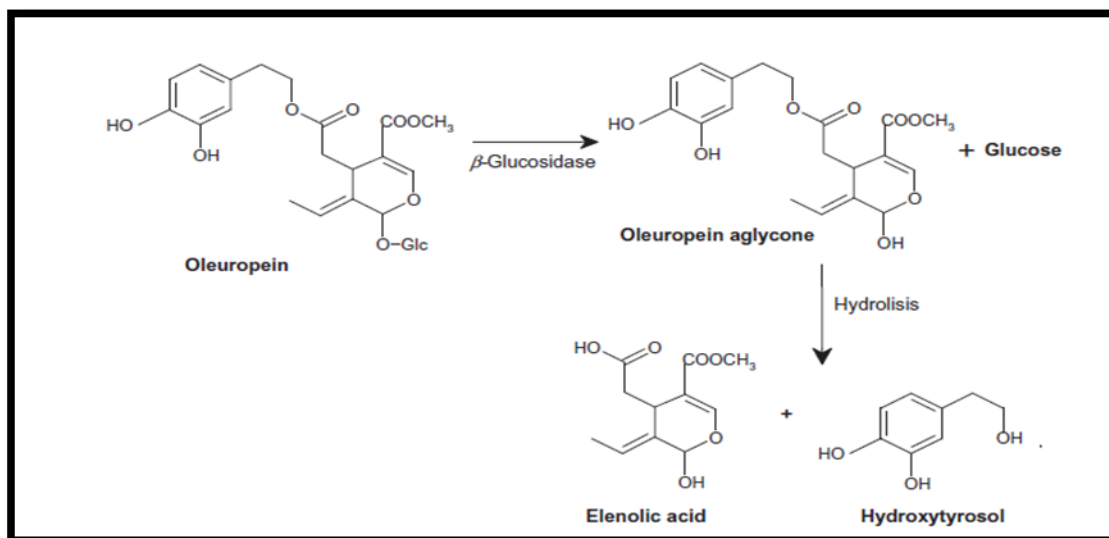


Μοριακός τύπος=C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>

### 1.3 Η υδροξυτυροσόλη στο ελαιόλαδο και στο κρασί:

Η υδροξυτυροσόλη ή αλλιώς 2-(3-4 διυδροξυφαινυλ)αιθανόλη είναι μια πολυφαινόλη. Είναι ένα από τα πολυάριθμα βιοδραστικά συστατικά του κρασιού. Όμως κύρια πηγή υδροξυτυροσόλης στη διατροφή μας είναι το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο και είναι παρών κυρίως με την μορφή σεκοΐριδοειδών παραγώγων, ως οξικός εστέρας ή στην ελεύθερη μορφή της. [9] Η υδροξυτυροσόλη και τα παράγωγα της προκύπτουν από την ελαιοευρωπεΐνη ,που βρίσκεται στον καρπό της ελιάς, κατά την εξαγωγή του ελαιολάδου. [10]





Σχήμα 3: «Η βιοσύνθεση της υδροξυτυροσόλης»

Οι παράγοντες όπως η ποικιλία της ελιάς, η ωρίμανση των καρπών της ελιάς, η διεργασία επεξεργασίας του ελαιόλαδου καθώς και άλλοι γεωπονικοί παράγοντες καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό το τελικό ποσοστό των φαινολικών ενώσεων που ανιχνεύονται στο παρθένο ελαιόλαδο. Οι συγκεντρώσεις μεταξύ 100 και 600 mg / kg έχουν ποσοτικοποιηθεί, και περίπου το ήμισυ του ποσού αυτού αντιστοιχεί στην υδροξυτυροσόλη και τα παράγωγά της. [11]

Το κρασί φαίνεται να είναι μια πολύ σημαντική πηγή της υδροξυτυροσόλης. Μερικοί συγγραφείς περιέγραψαν υψηλότερες συγκεντρώσεις στα ερυθρά κρασιά (3,66 - 4,20 mg / l) από ότι στα λευκά (1,72-1,92mg/l). Και υπέθεσαν το σχηματισμό της υδροξυτυροσόλης από την τυροσόλη κατά την αλκοολική ζύμωση. [12]

## 1.4 Βιολογικές ιδιότητες:

### 1.4.1 Βιοδιαθεσιμότητα και φαρμακοκινητικές ιδιότητες

Όσον αφορά τη βιοδιαθεσιμότητα και τη φαρμακοκινητική της παρούσας βιοδραστικής ένωσης, οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στην υδροξυτυροσόλη που περιέχεται στο ελαιόλαδο, ενώ ελάχιστες έρευνες έχουν διεξαχθεί ώστε να αξιολογήσουν την πρόσληψη της υδροξυτυροσόλης που περιέχεται στον οίνο.[13]

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι φαινόλες του ελαιόλαδου, και συγκεκριμένα η υδροξυτυροσόλη και τα παράγωγά της, είναι σε βιοδιαθεσιμότητα με δόσο- εξαρτώμενο τρόπο. Η απορρόφηση της υδροξυτυροσόλης είναι ταχεία, φθάνοντας τη μέγιστη

συγκέντρωση στο πλάσμα σε 5-10 λεπτά μετά την κατάποση, ακολουθούμενη από ταχεία μείωση. [14] Ταυτόχρονα, η απορρόφησή της εξαρτάται από το «όχημα» χορήγησης, για παράδειγμα οι αρουραίοι απορρόφησαν το 75% και 99% της υδροξυτυροσόλης όταν χορηγήθηκε σε ένα υδατικό διάλυμα-«όχημα» και σ' ένα ελαιώδες «όχημα», αντίστοιχα. [15]

#### 1.4.2 Αντιοξειδωτική δράση

Η αντιοξειδωτική δράση της υδροξυτυροσόλης έχει μελετηθεί εξονυχιστικά με πολλές διαφορετικές τεχνικές σε πρότυπα αβιοτικά συστήματα, όπου παράγονται ποικιλοτρόπως ελεύθερες ρίζες (ROS) και άλλα οξειδωτικά.

Σε σύγκριση με άλλα φαινολικά συστατικά, όπως η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη εμφανίζει πιο αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό χαρακτήρα. Προφανώς, η αντιοξειδωτική δράση δεν σχετίζεται πάντα με την αναλυτική διαδικασία που ακολουθείται στο εργαστήριο και επίσης η κατεχολική δομή δεν απαιτείται πάντα για να έχει ένα μόριο αντιοξειδωτική δράση. Όμως, υπάρχει ένας γενικός κανόνας σύμφωνα με τον οποίο η όρθο-διϋδροξυλική δομή, που υπάρχει στην υδροξυτυροσόλη και στην ελαιοευρωπείνη, είναι υπεύθυνη για την υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Ακολουθούν τα συστατικά με 4-ο-μονοϋδροξυλική δομή (όπως η τυροσόλη και τέλος οι δομές όπως οι 3-ο-υδρόξυ υποκατεστημένες κατεχόλες. Όλες οι παραπάνω ενώσεις είναι ισχυρότερα αντιοξειδωτικά από το ασκορβικό οξύ ή την α-τοκοφερόλη.[16]

Από πειράματα *in vitro* αποδείχθηκε η αντιοξειδωτική δράση της υδροξυτυροσόλης οφείλεται στην ικανότητα της υδροξυτυροσόλης να δεσμεύει αποτελεσματικά ελεύθερες ρίζες, δραστικές μορφές οξυγόνου και ανιόντα υπεροξειδίου. [17]

Μολονότι οι βιολογικές δράσεις των φαινολικών ενώσεων συνήθως σχετίζονται με την δραστηριότητα τους ως προς τον καθαρισμό των ελευθέρων ριζών, από τρέχουσες μελέτες εξάγεται το συμπέρασμα ότι η υδροξυτυροσόλη μπορεί επίσης να προσφέρει μια έμμεση προστασία, αυξάνοντας τα ενδογενή συστήματα άμυνας του οργανισμού. [18] Το 2010 επιβεβαιώθηκε ο πρόσθετος μηχανισμός δράσης, που εμποδίζει τη ζημία από το οξειδωτικό στρες, ο οποίος αφορά στην επαγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων τα οποία ελέγχουν την ενδοκυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου και έτσι δρουν καθοριστικά ως ρυθμιστικοί παράγοντες στην προστασία των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες και την χημικά προκαλούμενη βλάβη. [19]

Λαμβάνοντας υπόψη την αντιοξειδωτική δραστηριότητα της εγγενούς υδροξυτυροσόλης, η ίδια η υδροξυτυροσόλη θα μπορούσε να εμπλέκεται στην

πρόληψη παθολογιών όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές, ο διαβήτης, η φλεγμονή κλπ. των οποίων η αιτιολογία και εξέλιξη σχετίζεται με την βλάβη των ιστών από τις μεσολαβούμενες ελεύθερες ρίζες. Οι βιοδείκτες ,που δείχνουν την έκταση της οξειδωτικής βλάβης, βασίζονται στην μέτρηση ποικίλων σχετιζόμενων σταθερών οξειδωτικών προϊόντων. Για παράδειγμα ,τα προϊόντα αυτά απορρέουν από τη βλάβη του DNA, από την οξείδωση της LDL ή την μειωμένη γλουταθειόνη (GSH) και μπορούν να επιβεβαιώσουν λεπτομερώς την εκτεταμένη βιολογική δραστηριότητα που ορίζεται για την υδροξυτυροσόλη. [20]

### 1.4.3 Καρδιοπροστατευτική δράση

Όσον αφορά την καρδιαγγειακή νόσο, η θετική επιδράση στην υγεία από την πρόσληψη του έξτρα παρθένου ελαιολάδου οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην υψηλή περιεκτικότητά του ελαιολάδου σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA), καθώς και σε φαινολικά συστατικά όπως είναι η υδροξυτυροσόλη.

Το 2006 μια έρευνα της EUROLIVE που πραγματοποιήθηκε σε διακόσιους υγιείς άνδρες εθελοντές, έδειξε ότι η πρόσληψη τριών ειδών έξτρα παρθένου ελαιολάδου με διαφορετικό φαινολικό περιεχόμενο αύξησε την καλή χοληστερόλη και μείωσε την οξειδωτική βλάβη των λιπιδίων με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο. [21]

Επιπλέον, πιο πρόσφατα το 2009 αποδείχθηκε ότι τα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου που αποκτούνται από τα λύματα του ελαιοτριβείου, από τα οποία η *υδροξυτυροσόλη είναι η πιο βιοδραστική ένωση*, αύξησε τα συνολικά επίπεδα της γλουταθειόνης στο πλάσμα όταν χορηγήθηκε σε 98 υγιείς εθελοντές. Αυτά τα αποτελέσματα επισημαίνουν την ικανότητα της υδροξυτυροσόλης να εμποδίζει την οξείδωση της κακής χοληστερόλης και να βελτιώνει το προφίλ των λιπιδίων.

Επί πρόσθετα, η υδροξυτυροσόλη έδειξε μια ωφέλιμη επίδραση στην λειτουργία των αιμοπεταλίων· επιβεβαιώθηκε η ικανότητα της υδροξυτυροσόλης να εμποδίζει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων *in vitro*. [22]

Αξιοσημείωτο είναι ότι η κατανάλωση ελαιολάδου που περιέχει υψηλό-φαινολικό ποσοστό από 21 υπερ-χοληστερολαιμικούς εθελοντές , μείωσε τον αναστολέα του ενεργοποιητή πλασμογόνου 1 (PA1 )και τον παράγοντα VII, που συνδέονται με τις αλλαγές στο μεταγευματικό αιμοστατικό προφίλ, και που οδηγούν σε μια λιγότερο «θρομβο-παραγωγική» κατάσταση.[23]-[25] Όσον αφορά την ανάπτυξη αθηροσκληρωτικών βλαβών, μια μελέτη που διεξάχθηκε σε υπερλιπιδαιμικά κουνέλια που διατρέφονται με δίαιτα συμπληρωμένη με υδροξυτυροσόλη, παρουσίασαν βελτίωση της αντιοξειδωτικής κατάστασης και τη μείωση του μεγέθους των αθηροσκληρωτικών βλαβών. [26]

Τέλος, οι αυξημένες συγκεντρώσεις των δεικτών φλεγμονής συνδέονται άμεσα με τον αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο. Σχετικά με τη προ-φλεγμονώδη κυτοκίνη και τη C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, έχει βρεθεί ότι έχουν βελτιωθεί σημαντικά σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο που κατανάλωναν ελαιόλαδο πλούσιο σε φαινολικά συστατικά. [24] Πρόσφατα, η δραστηριότητα της υδροξυτυροσόλης, που βρισκόταν σ' ένα μείγμα σε ποσοστό 20% (HT-20), αξιολογήθηκε σε δοκιμασία επαγόμενης οξείας φλεγμονής σε αρουραίους. Τα τρωκτικά έλαβαν διαφορετικές δόσεις του μείγματος- HT-20 (100, 250 και 500 mg/kg σώματος) από το στόμα. Το προϊόν εμπόδισε σημαντικά και την οξεία φλεγμονή. Η αναλγητική δράση των δόσεων από το μείγμα- HT-20, που δεν ήταν σε δοσοεξαρτώμενο τρόπο, ήταν σε θέση να μειώσει τις προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες IL-1 βήτα και TNF-άλφα, αλλά όχι να αυξήσει την αντιφλεγμονώδη mRNA έκφραση των κυτοκινών IL-10. [27]

#### 1.4.4 Αντικαρκινική δράση

Οι επιδημιολογικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα δείχνουν ότι η κατανάλωση ελαιολάδου μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο για τον καρκίνο του μαστού. [28] Επιπλέον, ορισμένες μελέτες παρέμβασης παρουσίασαν σημαντική βελτίωση σχετικά με τους ιθύνοντες της οξειδωτικής ζημιάς του DNA μετά την πρόσληψη του παρθένου ελαιολάδου. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την ικανότητά του για την πρόληψη ορισμένων τύπων καρκίνου.

Στην EUROLIVE η υπό μελέτη πρόσληψη του ελαιολάδου, ανεξάρτητα από το φαινολικό περιεχόμενο, ελάττωσε τα επίπεδα της 8-οξο-2'-δεοξυγουανοσίνη του ουροποιητικού. [29] Επιπλέον, η κατανάλωση παρθένου ελαιολάδου, πλούσιο σε φαινολικά συστατικά, θα μπορούσε να είναι υπεύθυνο για τη μείωση της βλάβης του DNA στα λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. [30]

Η σύνδεση μεταξύ της χρόνιας φλεγμονής και της ανάπτυξης όγκων είναι θέμα ιδιαίτερης προσοχής. Εκτιμάται ότι μια φλεγμονή συμβάλει 15-20 % στη εμφάνιση όλων των τύπων καρκίνου. Κατά αυτή την έννοια, η περιγραφείσα αντιφλεγμονώδη δράση στον τομέα της καρδιοπροστατευτικής ικανότητας της υδροξυτυροσόλης, εμμέσως δείχνει την δυναμική αντικαρκινική δράση. [31] Μάλιστα, η υδροξυτυροσόλη εμποδίζει τη μεταγραφή των ενζύμων COX-2 και 5-λιποξυγονάσης, μειώνοντας τη σύνθεση της προσταγλανδίνης E2 και, ως εκ τούτου, μειώνεται και η χρόνια επίδραση που σχετίζεται με νόσους όπως ο καρκίνος. [10] Παρομοίως, η θεραπεία των κυττάρων Caco-2, με τις πολυφαινόλες του ελαιολάδου γίνεται με αναστολή της έκφρασης των ενζύμων COX-2. [32]

Επιπλέον, η υδροξυτυροσόλη μεταβάλλει την βιοσύνθεση εικοσανοειδών όγκων και γενικά δείχνει ένα ευρύ φάσμα επιδράσεων κατά των όγκων όπως η αναστολή του

πολλαπλασιασμού και η προώθηση της απόπτωσης σε αρκετές ανθρώπινες «όγκου-κυττάρου» γραμμές μέσω διαφόρων μηχανισμών. [33],[34]

Τέλος, η οξειδωτική βλάβη του DNA εμποδίζεται από την υδροξυτυροσόλη σε ανθρώπινα μονοκύτταρα κύτταρα αίματος και κύτταρα HL60. [35]

#### 1.4.5 Αντιμικροβιακή δράση

Η υδροξυτυροσόλη είναι σε θέση να αναστείλει ή να καθυστερήσει τον ρυθμό ανάπτυξης ενός φάσματος βακτηρίων και μυκήτων. Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα των πολυφαινολών, που περιέχονται στον καρπό της ελιάς [36], στα λύματα του ελαιοτριβείου [37], στα φύλλα της ελιάς [38] και στο ελαιολάδο [39],[40], έχει καταγραφεί κατ'επανάληψην.

Το 2006 αποδείχτηκε μια ισχυρή βακτηριοκτόνος δράση της υδροξυτυροσόλης ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, η βακτηριοκτόνος δράση ήταν υψηλότερη, σε γενικές γραμμές, για τα θετικά κατά Gram βακτήρια από ότι στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια.

Επιπλέον, φάνηκε η βακτηριοκτόνος δράση, όχι μόνο εναντίον επιβλαβών βακτηριδίων της εντερικής μικροχλωρίδας (του *Clostridium perfringens* και του *Escherichia coli*), αλλά και ενάντια ωφέλιμων μικροοργανισμών όπως τα βακτήρια: *Lactobacillus acidophilus* και *Bifidobacterium bifidum*. Επίσης, τα περισσότερα από τα τροφικά παθογόνα βακτήρια που ελέγχθηκαν (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Yersinia sp.*, και *Shigella sonnei*) δεν κατάφεραν να επιβιώσουν μετά από 1 ώρα σε επαφή με την υδροξυτυροσόλη. [41]

Σε πολλές μελέτες, επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι η υδροξυτυροσόλη έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες ενάντια πολλών στελεχών βακτηρίων, που αποτελούν αιτιακούς παράγοντες για λοιμώξεις του εντέρου ή του αναπνευστικού συστήματος του ανθρώπου.[42] Πιο πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η υδροξυτυροσόλη έχει μια ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση *in vitro* κατά του Ελικοβακτηριδίου του πυλωρού. Συνεπώς, φαίνονται οι δυνατότητές της ως ένας χημειοπροληπτικός παράγοντας όσον αφορά τα πεπτικά έλκη ή το γαστρικό καρκίνο. [43]

Τέλος, η υδροξυτυροσόλη, έχει δείξει εκτός από αντιβακτηριακή δραστηριότητα και αντιμυκητιακή δραστηριότητα κατά του *Fusarium sambucinum*, του *Verticillium dahliae* και του *Alternaria solani*, σε πρόσφατες δοκιμές με εκχυλίσματα εμπλουτισμένα με υδροξυτυροσόλη. [44]

#### **1.4.6 Αντιδιαβητική δράση**

Το οξειδωτικό στρες παίζει επίσης ένα ρόλο στην παθογένεση της «αντίστασης στην ινσουλίνη» και έχει υποτεθεί ότι με τα αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται μέσω της διατροφής θα μπορούσε να μειωθεί ο κίνδυνος του διαβήτη. Συνεπώς, ειδικές διαιτητικές «στρατηγικές» μπορούν να συμβάλουν στην βελτίωση της ομοιόστασης της γλυκόζης και να βοηθήσουν στην πρόληψη της ασθένειας. [45]

Θεωρώντας ότι η υδροξυυροσόλη εμπλέκεται στην πρόληψη του οξειδωτικού στρες, η επίδρασή της σε διαβητικούς αρουραίους αξιολογήθηκε μετά τη κατανάλωση καθαρής υδροξυυροσόλης. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την ικανότητα της υδροξυυροσόλης να εμποδίζει το οξειδωτικό στρες [46],[47]και την υπεργλυκαιμία. [4]

Επίσης, η ελαιοευρωπείνη και η υδροξυυροσόλη αντιμετώπισαν την χρόνια φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες χωρίς αλλαγή της πίεσης του αίματος που επάγουν τα καρδιαγγειακά, ηπατικά, και μεταβολικά συμπτώματα στο μοντέλο αρουραίου (όπου λόγω της διατροφής του προκαλείται παχυσαρκία και διαβήτης). [48]

Τέλος, βρέθηκε πρόσφατα σε διαβητικούς αρουραίους μια ανασταλτική δράση της υδροξυυροσόλη σε παγκρεατική τοξικότητα, αφού πρώτα κατανάλωσαν μια διατροφή συμπληρωμένη με υδροξυυροσόλη. [49]

#### **1.4.7 Νευροπροστατευτική δράση**

Έχει προταθεί η σημασία του ελαιολάδου, ενός από τα σημαντικότερα συστατικά της Μεσογειακής διατροφής, για την αντιμετώπιση νευροεκφυλιστικών ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία, όπως η νόσος Αλτσχάιμερ και η νόσος Πάρκινσον. [50] Πρόσφατα, τα ευρήματα σχετικά με τα οφέλη της υδροξυυροσόλη για την πρόληψη νευρικών παθήσεων έχουν πολλαπλασιαστεί.

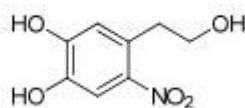
Υποστηρίζεται ότι η υδροξυυροσόλη θα μπορούσε να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να εμφανιστεί στον εγκέφαλο. Η μέτρηση της ελεύθερης υδροξυυροσόλης, με υγρή χρωματογραφία με φθορισμό σε μικροδιαπίδυση από το αίμα και τον εγκέφαλο αναισθητοποιημένων αρουραίων, επιτρέπει τον προσδιορισμό της ταχείας εξάλειψης της υδροξυυροσόλης και την εκτίμηση της τελικής πρόσληψης της από τον εγκέφαλο. [51]

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι εκχύλισμα εμπλουτισμένο σε ελαιοευρωπείνη έχει δείξει νευροπροστατευτική δραστηριότητα με τον σχηματισμό ενός μη ομοιοπολικού συμπλόκου με το πεπτιδίο Αβ, το οποίο είναι ένα βασικό χαρακτηριστικό πολλών νευροεκφυλιστικών ασθενειών. Συνεπώς, υδροξυυροσόλη, η οποία είναι το κύριο

προϊόν αποικοδόμησης της ελαιοευρωπεΐνης, θεωρείται ως πολύ καλή δυνητική νευροπροστατευτική ένωση. [52]

#### 1.4.8 Αντι-νιτροσο παράγοντας

Οι αντι-νιτροσο ιδιότητες της υδροξυτυροσόλης καθώς και άλλων φυτικών πολυφαινολών έχουν γίνει αντικείμενο έρευνας. Τα αποτελέσματα για την υδροξυτυροσόλη έδειξαν ότι αντιδρά με το νιτρικό νάτριο σε pH=3 και προκύπτει η 2-νιτρο-υδροξυτυροσόλη, η οποία έχει την ικανότητα να σαρώνει τα χημικά είδη που προκαλούν νιτρωση. [53]



Σχήμα 4: «Ο σχηματισμός της 2-νιτρο-υδροξυτυροσόλης με νίτρωση της υδροξυτυροσόλης.»

#### 1.4.9 Αντι-ιική δράση

Η υδροξυτυροσόλη και η ελαιοευρωπεΐνη θεωρούνται ως μια ξεχωριστή κατηγορία υπεύθυνων παραγόντων για την αναστολή του HIV-1, γιατί εμποδίζουν στον HIV την είσοδο εντός του κυττάρου ξενιστή και δεσμεύουν την καταλυτική θέση του HIV-1 ενζύμου ιντεγκράσης. Έτσι, αυτοί οι παράγοντες παρέχουν ένα πλεονέκτημα έναντι άλλων αντι-ιικών θεραπειών, αφού εμποδίζουν τόσο την είσοδο όσο και την ενσωμάτωση του ιού. [54],[55],[56]

Η υδροξυτυροσόλη και τα παράγωγά της είναι επίσης χρήσιμα, όταν εφαρμόζονται τοπικά, ως μικροβιοκτόνο για την πρόληψη της HIV-λοίμωξης, καθώς και άλλων σεξουαλικά μεταδιδόμενων ασθενειών που προκαλούνται από μύκητες, βακτήρια ή ιούς. [57]

#### 1.4.10 Πρόληψη οστεοπόρωσης

Η υδροξυτυροσόλη μπορεί να έχει κρίσιμες επιπτώσεις στο σχηματισμό και τη διατήρηση των οστών. Και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μια αποτελεσματική θεραπεία για την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της οστεοπόρωσης, καθώς μπορεί

να διεγείρει την εναπόθεση ασβεστίου και να αναστείλει το σχηματισμό πολυπύρηνων οστεοκλαστών με ένα δόσο-εξαρτώμενο τρόπο.

Η υδροξυτυροσόλη κατέστειλε επίσης την οστική απώλεια του σπογγώδους οστού σε μηριαία οστά ωθηκεκτομηθέντων ποντικών. [58]



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

### **ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΗΣ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗΣ**

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζονται εκτενώς οι δύο πιο σημαντικές κατηγορίες αναλόγων μορίων της υδροξυτυροσόλης των οποίων έχει πραγματοποιηθεί η σύνθεση και η μελέτη της δράση τους.

## 2.1 Εισαγωγή

Η σύνθεση αναλόγων της υδροξυτυροσόλης ήταν και είναι επιτακτική ανάγκη κυρίως για δύο λόγους. Ο πρώτος λόγος ήταν ότι η υδροξυτυροσόλη μέχρι και τις αρχές της δεκαετίας του 2000 δεν ήταν εμπορικά διαθέσιμη. Επίσης, η εμπορευσιμότητα της, στη συνέχεια, από μερικές χημικές βιομηχανίες την καθιστούσε είδος πολυτελείας εξαιτίας της υψηλής τιμής της.[59] Ο δεύτερος, και πιο σημαντικός, λόγος είναι η μειωμένη διαλυτότητα της υδροξυτυροσόλης σε λιπόφιλο περιβάλλον. Ο υδροφιλικός χαρακτήρας των αντιοξειδωτικών όπως η υδροξυτυροσόλη αποτελεί σοβαρό μειονέκτημα γιατί μειώνει την σταθεροποίηση των λιπαρών και των ελαίων, με αποτέλεσμα να μειώνονται και οι εφαρμογές στην βιομηχανία τροφίμων. Συνεπώς, νέα συντιθέμενα λιπόφιλα παράγωγα θα προωθούν τις βιολογικές ιδιότητες με σεβασμό στο μέσο διασποράς και στην διέλευση μέσω των κυτταρικών μεμβρανών και προστατεύοντας το υπόστρωμα κατά τη διανομή του.[60]

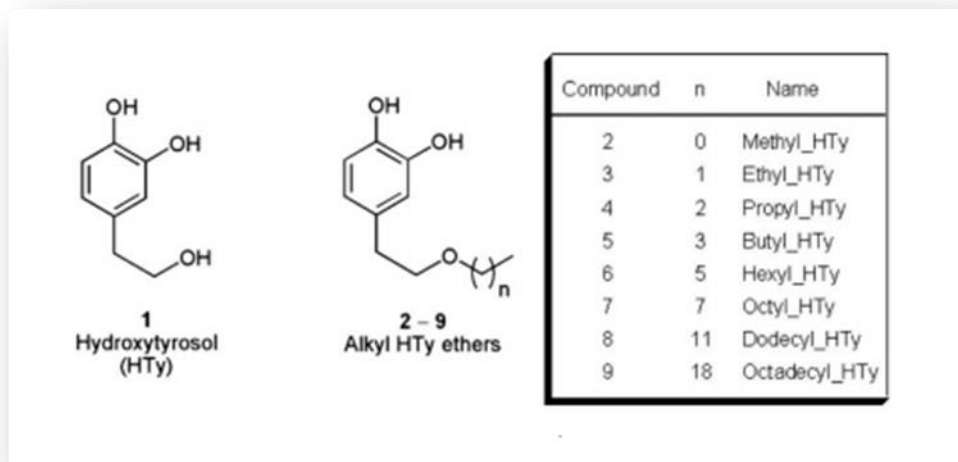
Στις μέρες μας τα μόνα φυσικά, λιπόφιλα αντιοξειδωτικά, που είναι διαθέσιμα, είναι οι τοκοφερόλες και το β-καροτένιο. Ενώ οι συνθετικές, λιπόφιλες, αντιοξειδωτικές ενώσεις, οι οποίες χρησιμοποιούνται σήμερα, όπως η ΒΗΑ (βουτυλοϋδροξυανισόλη), το ΒΗΤ (βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο), η ΤΒΗΟ (t-βουτυλο-υδροκινόνη) και το ΡG (προπυλγαλλικό) δεν φαίνεται να είναι απολύτως ασφαλή και η χρήση τους στα τρόφιμα μπορεί να περιοριστεί ή να απαγορευθεί στο εγγύς μέλλον.

Το γεγονός ότι τα περισσότερα φυτοχημικά με αντιοξειδωτική δράση είναι υδρόφιλα αποτελεί μια πρόκληση για τους επιστήμονες τροφίμων.[61] Επομένως, η παραγωγή νέων αναλόγων της υδροξυτυροσόλης από πιο απλές, αποδοτικές και οικονομικές συνθετικές διεργασίες, στοχεύει στο να γίνουν προσιτές σε όλους οι παρόμοιες ή και καλύτερες ευεργετικές βιολογικές ιδιότητες που παρουσιάζουν τα συντιθέμενα ανάλογα σε σχέση με την υδροξυτυροσόλη.

Μια συνοπτική παρουσίαση των βιολογικών ιδιοτήτων των παραγώγων της υδροξυτυροσόλης, που έχουν συντεθεί και μελετηθεί, είναι η αντιμικροβιακή [62], η αντιφλεγμονώδης [63], η υποτασική και η υπογλυκαιμική δραστηριότητα [64], η αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων[64], η επαγωγή απόπτωσης των κυττάρων HL-60 (ανθρώπινα κύτταρα προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας) κá. [65]

## 2.2 Ανάλογα της υδροξυτυροσόλης:

### 2.2.1 Αλκυλο-υδροξυτυροσολο-αιθέρες



Σχήμα 5: «Η μοριακή δομή της υδροξυτυροσόλης **1** και των παραγώγων της αλκυλο-υδροξυτυροσολο-αιθέρων **2-9**»

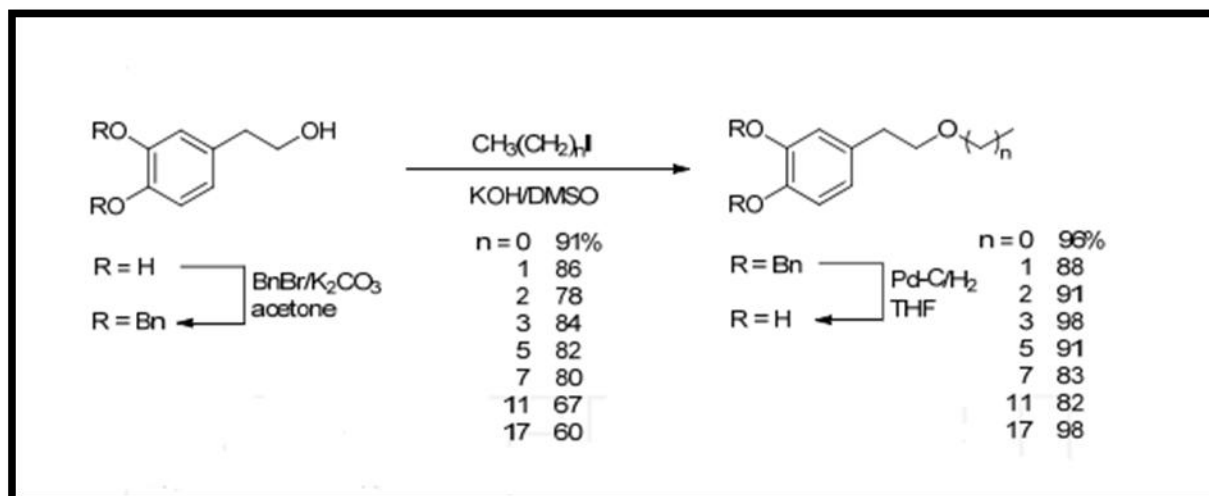
Πολλά διαφορετικά λιπόφιλα ανάλογα υπάρχουν φυσιολογικά στον ελαιόκαρπο και στο παρθένο ελαιόλαδο. Η ποσότητα τους σχετίζεται με την ποικιλία της ελιάς και την ωρίμανση της, το κλίμα, την τοποθεσία, το είδος της σύνθλιψης καθώς και με την διαδικασία εξαγωγής του ελαιολάδου.[ 66]

Αυτή η κατηγορία αναλόγων πλεονεκτεί σε σχέση με την ελεύθερη υδροξυτυροσόλη εξαιτίας της υψηλής πολικής φύσης της υδροξυτυροσόλης που έχει ως αποτέλεσμα να μειώνει την διαλυτότητα της υδροξυτυροσόλης σε λιπόφιλο περιβάλλον.

Τα παρακάτω λιπόφιλα παράγωγα παρήχθησαν από την ανακτώμενη υδροξυτυροσόλη των υγρών αποβλήτων του ελαιολάδου.[67]

## Σύνθεση

Η διαδικασία σύνθεσης των αλκυλο-υδροξυτυροσολο-αιθέρων περιγράφεται παρακάτω:



Σχήμα 6: «Σύνθεση των αλκυλο-υδροξυτυροσολοαιθέρων με αλκυλίωση από αλκυλο-ιωδίδιο.»

Οι αλκυλο-υδροξυτυροσολοαιθέρες παρήχθησαν σε μια διεργασία τριών βημάτων. Πρώτα γίνεται η προστασία των αρωματικών υδροξυλομάδων μέσω της αντίδρασης-βενζυλίωσης με βενζυλοβρωμίδιο παρουσία ανθρακικού καλίου ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ). Μετά γίνεται η προσθήκη αλκυλο-ιωδιδίου υπό βασικές συνθήκες και τέλος ακολουθεί η αποπροστασία με καταλυτική υδρογόνωση ( $\text{Pd} / \text{C}$ ) για να ληφθούν οι αντίστοιχοι αιθέρες.

Παρατηρήθηκε ότι η απόδοση στο βήμα της αλκυλίωσης ποικίλει και εξαρτάται κυρίως από το μήκος της αλκυλικής αλυσίδας. Πιο συγκεκριμένα η απόδοση μειώνεται όσο το μήκος της αλυσίδας αυξάνεται. Αυτό συμβαίνει επειδή μειώνεται η διαλυτότητα του αλκυλο-ιωδιδίου στον διαλύτη (DMSO) όσο αυξάνεται η αλυσίδα.[68]

Επίσης, η οξειδωτική σταθερότητα της λιπιδικής μήτρας των παραπάνω συντιθέμενων ενώσεων, που μετρήθηκε με την μέθοδο Rancimat, έδειξε υψηλή προστατευτική ικανότητα και παρόμοιους χρόνους επαγωγής με την υδροξυτυροσόλη, ενώ είχε υψηλότερους χρόνους επαγωγής από το BHT και την α-τοκοφερόλη. [61],[69]

Επιπλέον, η αντιοξειδωτική δράση των λιπόφιλων υδροξυτυροσολο- αιθέρων ήταν ελαφρώς χαμηλότερη σε χύμα λάδια και υψηλότερη σε υδρόφιλα μέσα σε σύγκριση με την υδροξυτυροσόλη αναφοράς.

Τέλος παρατηρήθηκε ότι το μήκος της αλκυλικής αλυσίδας είχε θετική επίδραση στο υδρόφιλο μέσο για τα λιπόφιλα παράγωγα με μικρές αλκυλικές αλυσίδες (μέθυλο, αίθυλο, πρόπυλο, βούτυλο), ενώ σε αυτά με μακρύτερες αλκυλικές αλυσίδες (μέχρι δεκαόκτυλο) διατηρήθηκε ή η ακόμα και μειώθηκε η αντιοξειδωτική τους δράση, πιθανών λόγω της στερεοχημικής επίδρασης των υδρογονανθρακικών αλυσίδων. [68]

Οι ιδιότητες των συντιθέμενων ενώσεων που μελετήθηκαν αφορούν κυρίως την ακεραιότητα των κυττάρων και τις σταθερές τιμές της κυτταρικής οξειδωτικής κατάστασης. Έτσι, στην πιο πρόσφατη μελέτη (2011) αξιολογήθηκαν οι προστατευτικές επιδράσεις αυτών των ενώσεων κατά του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από το t-BOOH (tert butyl hyperoxide) σε κύτταρα HepG2, αφού πρώτα διεξήχθη αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας των ενώσεων προκειμένου να εκτιμηθούν οποιοσδήποτε πιθανές επιβλαβείς επιδράσεις στην φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων HepG2. [70]

Οι συνθετικές ενώσεις που αναφέρονται στη συγκεκριμένη εργασία [72] είναι σταθερές κατά τη διεργασία της πέψης in vitro [71], απορροφούνται γρήγορα και μεταβολίζονται μερικώς από τα κύτταρα CaCo-2/TC7 με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο λόγω του λιπόφιλου χαρακτήρα τους.

Είναι αξιοσημείωτο ότι 40-85% των ενώσεων που μεταφέρονται κατά μήκος των μονοστοιβάδων των εντεροκυττάρων δεν μεταβολίζονται, και αναμένεται να φτάσουν στην «πύλη αίματος» χωρίς να έχουν τροποποιηθεί και εν συνεχεία φτάνουν στο ήπαρ.

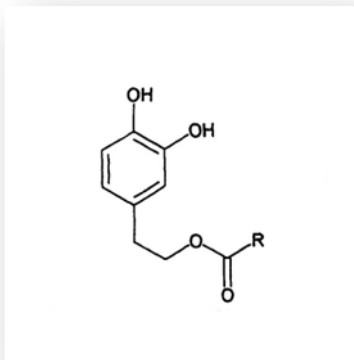
Οι συντιθέμενοι αλκυλο-υδροξυτυροσολοαιθέρες έχουν δείξει να απορροφούνται καλά στα κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος [73]. Κατά συνέπεια, οι αλκυλο-υδροξυτυροσολοαιθέρες μπορούν να διαδραματίσουν έναν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη του οξειδωτικού στρες, και κατ' επέκταση στη πρόληψη των ηπατικών νοσημάτων [74],[ 75].

Από τη μελέτη των παραπάνω παραγώγων διεξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

- Η λιπόφιλη φύση των αλκυλο-υδροξυτυροσολοαιθέρων σχετίζεται με τη ρύθμιση του αντιοξειδωτικού αμυντικού μηχανισμού.
- Προστατεύουν τα ανθρώπινα κύτταρα HepG2 από τη ζημία που προκαλείται από t-BOOH εμποδίζοντας τον σχηματισμό ριζών και ρυθμίζοντας την αντιοξειδωτική άμυνα.
- Θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιοενεργά συστατικά στην παραγωγή και ανάπτυξη των λειτουργικών λιπαρών τροφίμων που έχουν την προστιθέμενη

αξία της συμβολής στην προστασία κατά των ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. [70]

### 2.2.2 Εστέρες της υδροξυτυροσόλης



Σχήμα 7: «Η γενική δομή των εστέρων της υδροξυτυροσόλης»

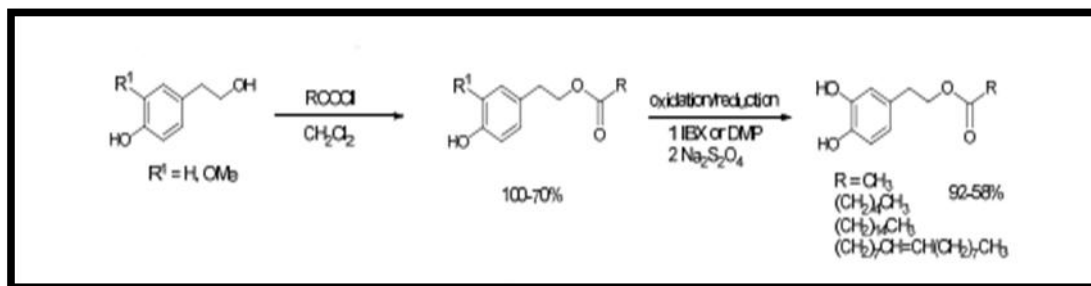
Οι εστέρες της υδροξυτυροσόλης με οξέα που περιέχουν μεγάλες κορεσμένες ή ακόρεστες αλκυλικές αλυσίδες, εμφανίζουν καλή διαλυτότητα σε έλαια και γαλακτώματα και έχουν χρησιμοποιηθεί σαν πρόσθετα σε φαγητά και καλλυντικά προϊόντα. Η πιο απλή ένωση από αυτή τη κατηγορία παραγώγων είναι ο εστέρας της υδροξυτυροσόλης με οξικό οξύ που απαντάται στο ελαιόλαδο. [76]

Η αντιοξειδωτική δράση του εστέρα αυτού είναι παρόμοια με της υδροξυτυροσόλης αλλά είναι πολύ υψηλότερη από την εμπορεύσιμη α-τοκοφερόλη και την ελαιοευρωπείνη. [77]

Πρόσφατα, έχει αναφερθεί ότι τα λιπόφιλα φαινυλο-παράγωγα που έχουν αμφιφιλική δομή, είναι πιθανό στο μέλλον να έχουν εφαρμογές στον τομέα της νανοτεχνολογίας.[78]

Παρακάτω θα περιγραφούν δύο τρόποι σύνθεσης των εστέρων της υδροξυτυροσόλης:

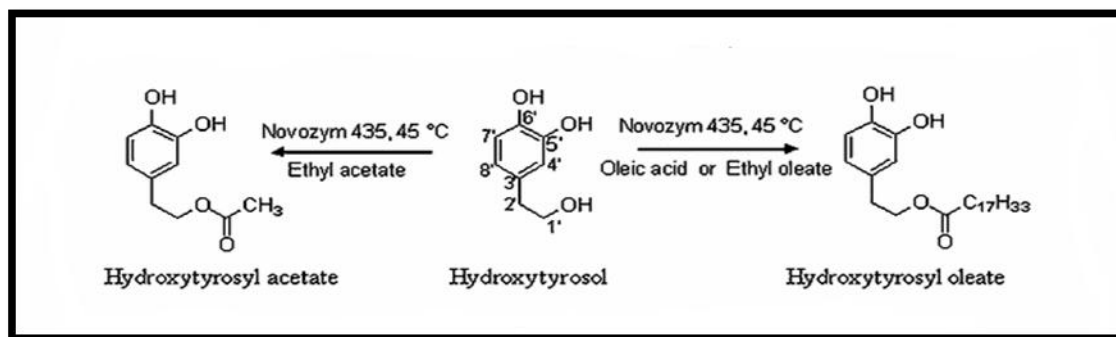
## Σύνθεση 1



Σχήμα 8: «Σύνθεση των εστέρων της υδροξυτυροσόλης από τυροσόλη και ομοβανιλλική αλκοόλη»

Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει την επιλεκτική εστεροποίηση της τυροσόλης και της ομοβανιλλικής αλκοόλης με ακυλοχλωρίδια σε διχλωρομεθανίο ως διαλύτη, για να δώσει τους αντίστοιχους οξικούς εστέρες, σε ποσοστό 90% και ποσοτικές αποδόσεις αντιστοίχως, με τη χρήση μόνο μιας μικρής περίσσειας ακετυλοχλωριδίου σε διχλωρομεθάνιο χωρίς καταλύτες. Οι συγγραφείς προτείνουν την όξινη καταλυόμενη ακυλίωση εξαιτίας των ιχνών υδροχλωρικού οξέος που προέρχονται από την υδρόλυση του ακετυλοχλωριδίου κατά τη διάρκεια των πειραματικών συνθηκών. Παρόμοια επιλεκτικότητα παρατηρήθηκε με τη χρήση πολλών κορεσμένων ή ακόρεστων ακυλοχλωριδίων με μακρύτερες αλυσίδες όπως το εξανοΐλο, παλμιτοΐλο, ολεοΐλο και λινολεοΐλο χλωρίδιο. Ακολουθεί η οξειδωση με 2-ιωδοξυβενζοϊκό οξύ (IBX) ή αντιδραστήριο Dess-Martin (DMP), καθώς και επί τόπου αναγωγή με διθειονικό νάτριο ( $Na_2S_2O_4$ ) του εστέρα της τυροσόλης και της ομοβανιλλικής αλκοόλης, που οδηγεί στα αντίστοιχα παράγωγα της υδροξυτυροσόλης. [79]

## Σύνθεση 2



Σχήμα 9: «Τοποεπιλεκτική ακυλίωση της υδροξυτυροσόλης καταλυόμενη με λιπάση B από την *C. Antarctica*.»

Για την σύνθεση του εστέρα της υδροξυτυροσόλης με οξικό οξύ, το πολυφαινολικό υπόστρωμα διαλύθηκε σε οξικό αιθυλεστέρα και η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη της ακινητοποιημένης *C. antarctica* λιπάση B (Novozym 435).

Η ενζυματική σύνθεση του ολεϊκού εστέρα της υδροξυτυροσόλης διεξήχθη σε 2-μεθυλο-2-βουτανόλη χρησιμοποιώντας είτε ελαϊκό οξύ σαν ακυλο-δότη είτε σ' ένα χωρίς διαλύτη μέσο όπου ο ελαϊκός αιθυλεστέρας είναι το αντιδραστήριο ακυλίωσης. [60]

Σε γενικές γραμμές, η οξειδωση των τυροσολο-παραγώγων προχώρησε με υψηλότερες αποδόσεις (92 - 77%) σε σύγκριση με των ομοβανιλλιλο-παραγώγων (88 - 58%). (σύνθεση 1).

Η χρήση ενζύμων, όπως οι λιπάσες (*A. niger*, *C. cylindracea*, *M. javanicus*, *P. cepacia*, *M. miehei*, *C. viscosum*, *P. fluorescens*, *R. arrhizus*, *R. niveus*, *C. antarctica*, πάγκρεας χοίρου και φυτόρο σιταριού) ως καταλύτες σε μη υδατικούς διαλύτες για την παρασκευή λιπόφιλων παράγωγων απευθείας από υδροξυτυροσόλη έχει περιγραφεί ευρέως τα τελευταία χρόνια [80],[81],[82],[83].[68] (σύνθεση 2)

Οι ιδιότητες των συντιθέμενων ενώσεων συνοπτικά είναι οι παρακάτω:

Οι συντιθέμενοι εστέρες εμφάνισαν μια δόσο-εξαρτώμενη κυτταροτοξικότητα εναντίον των ανθρώπινων κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa). Η ημιμέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση (IC50) που απαιτήθηκε ήταν 0.42 και 0.33 mM, αντιστοίχως, ενώ για την υδροξυτυροσόλη ήταν 0.46 mM.

Τα λιπόφιλα παράγωγα έδειξαν να εξασκούν κυτταροτοξικές επιδράσεις μέσω προκλήσεως της απόπτωσης σε ανθρώπινα κύτταρα λευχαιμίας HL-60, όπως ακριβώς και η Hty. [84]

Πρόσφατα στοιχεία έδειξαν ότι ο οξικός εστέρας της υδροξυτυροσόλης ανέστειλε τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων εξαιτίας της μειωμένης σύνθεσης της θρομβοξάνης. [85]

Από τη μελέτη των παραπάνω παραγώγων διεξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

- Η ακυλίωση μέσω ενζυματικών αντιδράσεων εστεροποίησης (σύνθεση 2) θεωρείται ως μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος για την παρασκευή λιπόφιλων και πιο σταθερών παράγωγων της υδροξυτυροσόλης και ίσως και πολλών άλλων πολύτιμων μορίων.
- Αυτή η διαδικασία αποφεύγει τη χρήση τοξικών αντιδραστηρίων και επιτρέπει ήπιες συνθήκες αντίδρασης(σύνθεση 2).



- Η εκμετάλλευση των λιπασών σε βιοκαταλυτικές αντιδράσεις για την παρασκευή των λιπόφιλων υδροξυτυροσολοεστέρων αποτελεί μια οικονομική και οικολογική μέθοδο (σύνθεση 2).
- Η διαδικασία αυτή συνέβαλε όχι μόνο στη μείωση της πολικότητας της υδροξυτυροσόλης , αλλά είναι υπεύθυνη και για την αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας της (σύνθεση 2). [60]

Άλλες κατηγορίες αναλόγων της υδροξυτυροσόλης:

1. Υδροξυτυροσόλη που προέρχεται από ισοχρωμάνια [86],[ 87]
2. Υδροξυτυροσολο-γλυκουρονικά παράγωγα [88],[ 89],[ 90]
3. Γλυκοζίτες της υδροξυτυροσόλη [91], [92]
4. Αρυλο-υδροξυτυροσολο παράγωγα [93]
5. Συμπλοκοποίηση υδροξυτυροσόλης με β-κυκλοδεξτρίνες [94],[ 95]

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**

#### **ΝΕΑ ΑΝΑΛΟΓΑ ΤΗΣ ΥΔΡΟΞΥΤΥΡΟΣΟΛΗΣ**

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζεται ο σχεδιασμός και η συνθετική πορεία των δύο νέων αναλόγων της υδροξυτυροσόλης. Επίσης παρουσιάζεται η αρχή της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των νέων ενώσεων.

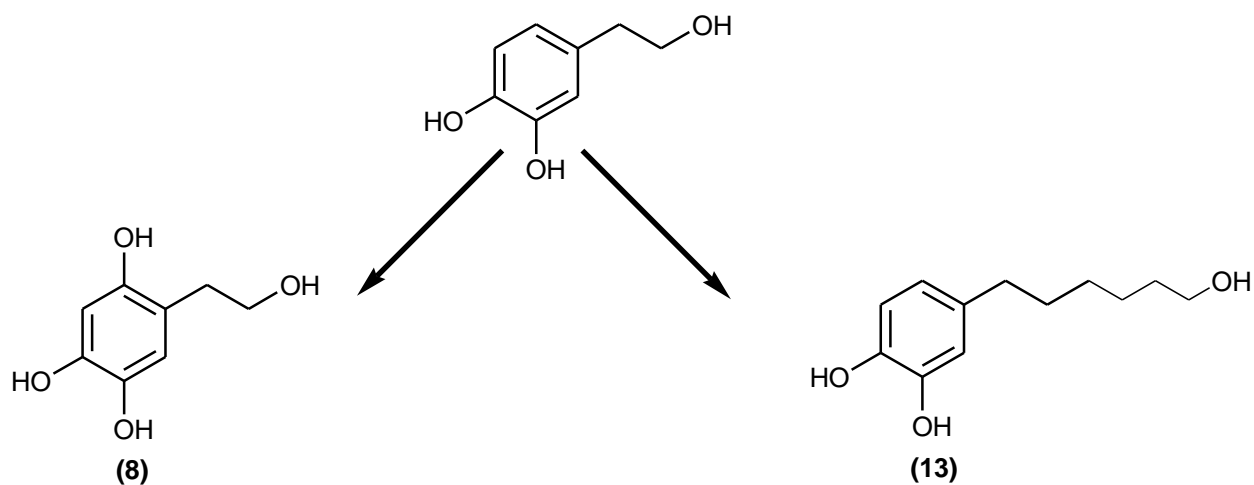
### 3.1 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός της δομής και η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης νέων αναλόγων της υδροξυτυροσόλης.

Ο απώτερος στόχος, μέσω της μελέτης της σχέσης δομής- δράσης μιας νέας ένωσης, είναι ο σχεδιασμός νέων ενώσεων με πολλά υποσχόμενο βιοδραστικό προφίλ.

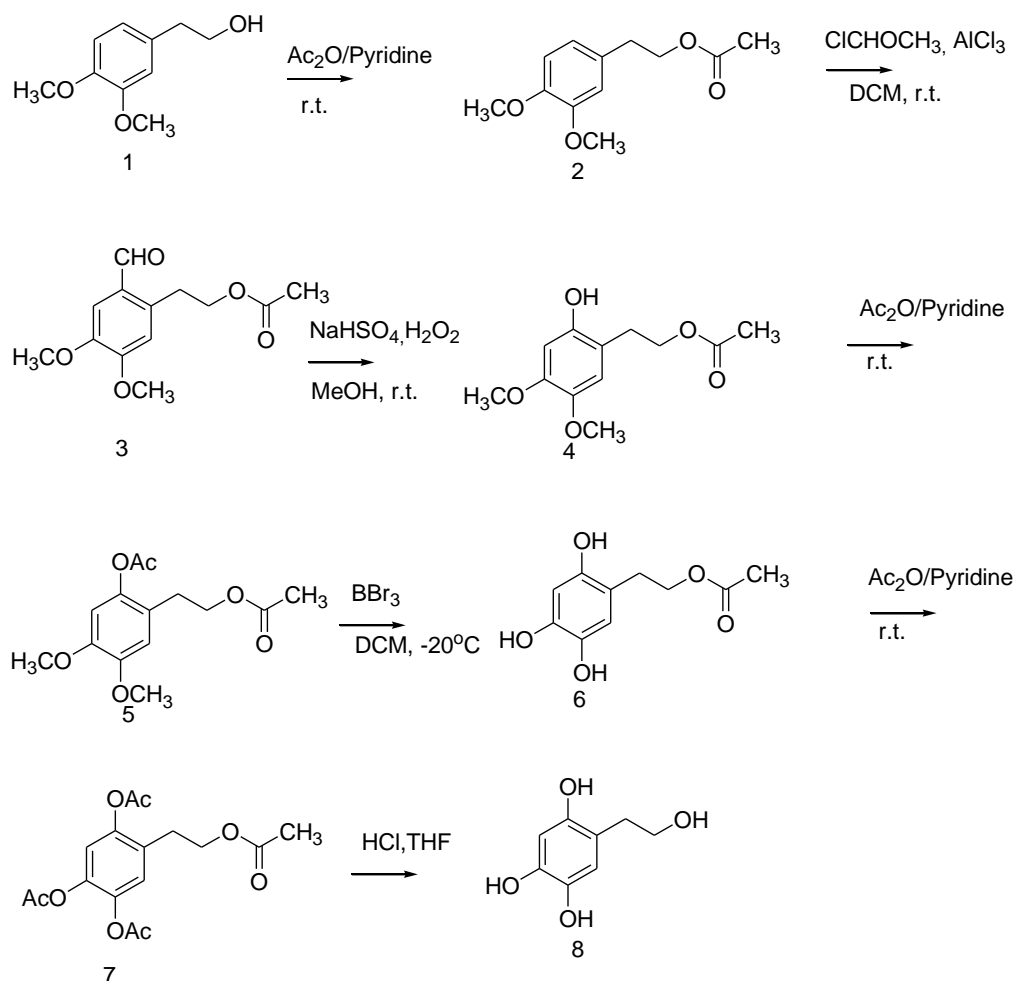
### 3.2 Σχεδιασμός και σύνθεση των νέων αναλόγων

Οι νέες ενώσεις που επιλέχθηκαν για σύνθεση και μελέτη είναι η 2,5-διϋδροξυτυροσόλη (**8**), η οποία περιέχει μια επιπλέον ομάδα υδροξυλίου στη θέση 2 του αρωματικού δακτυλίου και η 4-(6-υδροξυ-εξυλο)βενζενο-1,2-διόλη (**13**), η οποία έχει ανθρακική αλυσίδα με έξι άτομα άνθρακα αντί για δύο που έχει η υδροξυτυροσόλη.



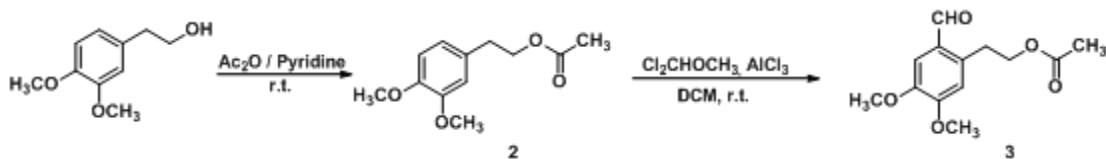
Σχήμα 10: «Τα δύο νέα ανάλογα της υδροξυτυροσόλης»

### 3.2.1 Η συνθετική πορεία για την 2,5-διϋδροξυτυροσόλη



Σχήμα 11: Η συνθετική πορεία της 2,5-διϋδροξυτυροσόλης (**8**)

Αρχικά γίνεται η ακετυλίωση της 2-(3,4 διμεθοξυφαινυλ)αιθανόλης (**1**) για την προστασία του ελεύθερου υδροξυλίου, μέσω της αντίδρασης ακετυλίωσης του υδροξυλίου με οξικό ανυδρίτη σε διαλύτη πυριδίνη. Στη συνέχεια γίνεται η αντίδραση φορμυλίωσης του οξικού 3,4 διμεθοξυ-φαιναιθυλεστέρα (**2**) στην θέση 6 του αρωματικού δακτυλίου σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται από τους Amendola *et al.* [96] (Σχήμα 12)



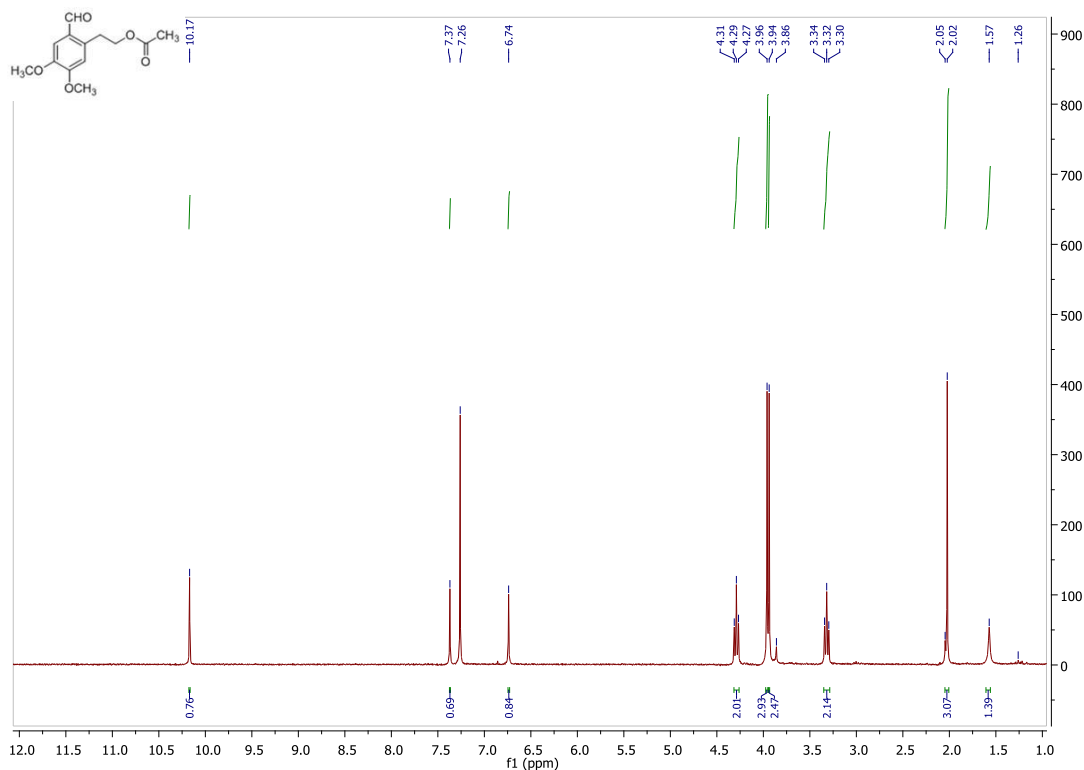
Σχήμα 12: Η αντίδραση της ακετυλίωσης και η αντίδραση της φορμυλίωσης για την παραγωγή των ενώσεων **2** και **3** αντίστοιχα.

Ως αντιδραστήριο φορμυλίωσης χρησιμοποιήθηκε ο διχλωρομεθυλομεθυλαιθέρας παρουσία τριχλωριούχου αργιλίου ως οξέος κατά Lewis, σε διαλύτη άνυδρο διχλωρομεθάνιο. Το συγκεκριμένο αντιδραστήριο φορμυλίωσης χρησιμοποιείται συχνά για τη σύνθεση υποκατεστημένων αρωματικών αλδευδών.

Η αντίδραση αυτή αρχικά πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας ακριβώς την προτεινόμενη πορεία των Amendolla et al. αλλά διαπιστώθηκε ότι ο χρόνος αντίδρασης που αναφερόταν (2h) δεν ήταν αρκετός για να ολοκληρωθεί η αντίδραση.

Μετά από σειρά δοκιμαστικών αντιδράσεων, προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες για την αντίδραση που περιλαμβάνουν χρόνο αντίδρασης 24 h. Η παραγόμενη υποκατεστημένη βενζαλδεΐδη **3** παραλήφθηκε σε καθαρή μορφή μετά από χρωματογραφία στήλης, και αποτελεί μια ένωση ευαίσθητη στο φως και τη θερμότητα γι' αυτό και είναι απαραίτητη η φύλαξη της σε κατάψυξη.

Παρακάτω παρατίθεται το φάσμα της ένωσης **3**, με το οποίο έγινε η ταυτοποίηση της επιθυμητής ένωσης.



Εικόνα 4: Φάσμα πρωτονίου  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) του οξικού 2-φορμυλο-4,5-διμεθοξυφαιναιθυλετέρα (**3**)

Στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **3**, στα 10.17 ppm παρατηρείται μια απλή κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο, αυτό της χαρακτηριστικής ομάδας της αλδεΐδης. Στα 7.37 ppm και στα 6.74 ppm παρατηρούνται δύο απλές κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια που είναι συνδεδεμένα στον αρωματικό δακτύλιο.

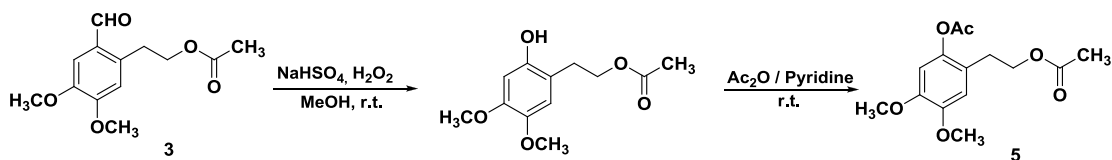
Στα 4.29 ppm, εμφανίζεται μια τριπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στο μεθυλένιο που είναι συνδεδεμένο με την εστερική ομάδα. Η τριπλή αυτή κορυφή, οφείλεται στη σύζευξη των πρωτονίων της με τα δύο πρωτόνια της γειτονικής ομάδας του μεθυλενίου.

Χαρακτηριστικές είναι και οι απλές κορυφές που παρατηρούνται στα 3.96 ppm και 3.94 ppm, με ολοκλήρωση για τρία πρωτόνια η κάθε μία, που οφείλονται στα πρωτόνια των μεθοξυ-ομάδων στην πάρα και μέτα θέση του αρωματικού δακτυλίου.

Έπειτα στα 3.32 ppm, εμφανίζεται μια τριπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στο μεθυλένιο που είναι συνδεδεμένο με τον αρωματικό δακτύλιο και οφείλεται στη σύζευξη με τα δύο πρωτόνια του γειτονικού άνθρακα του μεθυλενίου.

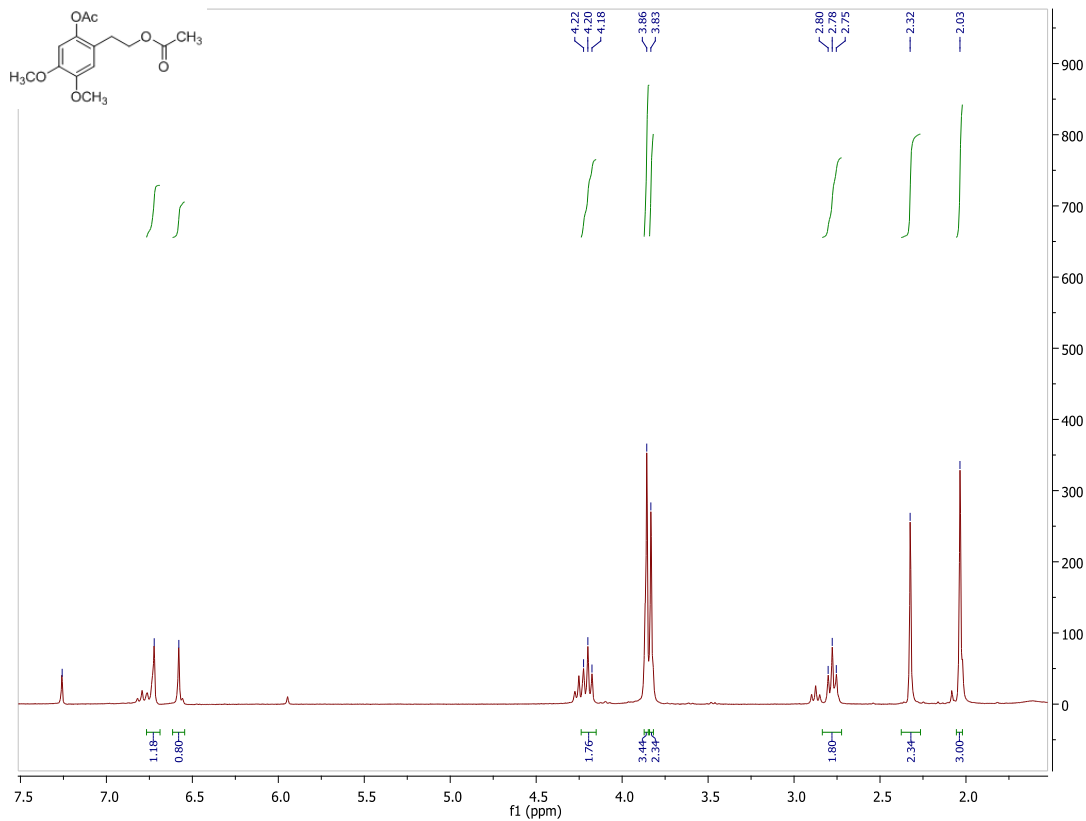
Τέλος, στα 2.02 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή που ολοκληρώνεται για τρία πρωτόνια, χαρακτηριστική της ομάδας του μεθυλίου.

Η βενζαλδεΰδη **3** μετατράπηκε στη φαινόλη **4** μέσω της αντίδρασης οξειδωσης Dakin, χρησιμοποιώντας  $H_2O_2$  σε ασθενώς όξινο διάλυμα μεθανόλης. (Σχήμα 13) Η αντίδραση Dakin χρησιμοποιείται κυρίως για την σύνθεση φαινολών από βενζαλδεΰδες και πραγματοποιείται μέσω σχηματισμού ενδιάμεσης υπεροξυημιακετάλης.



Σχήμα 13: Η οξείδωση της βενζαλδεΰδης **3** προς την αλκοόλη **4** και προστασία του φαινολικού υδροξυλίου **5**.

Παρατίθεται παρακάτω το φάσμα της ένωσης **5**, με το οποίο έγινε η ταυτοποίηση της επιθυμητής ένωσης.



Εικόνα 5: Φάσμα πρωτονίου  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) του οξικού 2-ακετοξυ-4,5 διμεθοξυφαιναίουλεστέρα (**5**)

Στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ένωσης **5**, στα 6,72 και 6,58 ppm παρατηρούνται δύο απλές κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια που είναι συνδεδεμένα στον αρωματικό δακτύλιο.

Έπειτα στα 4.20 ppm, εμφανίζεται μια τριπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στο μεθυλένιο. Η τριπλή αυτή κορυφή, οφείλεται στη σύζευξη των πρωτονίων της με τα δύο πρωτόνια της γειτονικής ομάδας του μεθυλενίου.

Χαρακτηριστικές επίσης είναι οι δύο απλές κορυφές στα 3.86 και 3.83 ppm, με ολοκλήρωση για τρία πρωτόνια η κάθε μία, που οφείλονται στα πρωτόνια των μεθοξυομάδων στην πάρα και μέτα θέση του αρωματικού δακτυλίου.

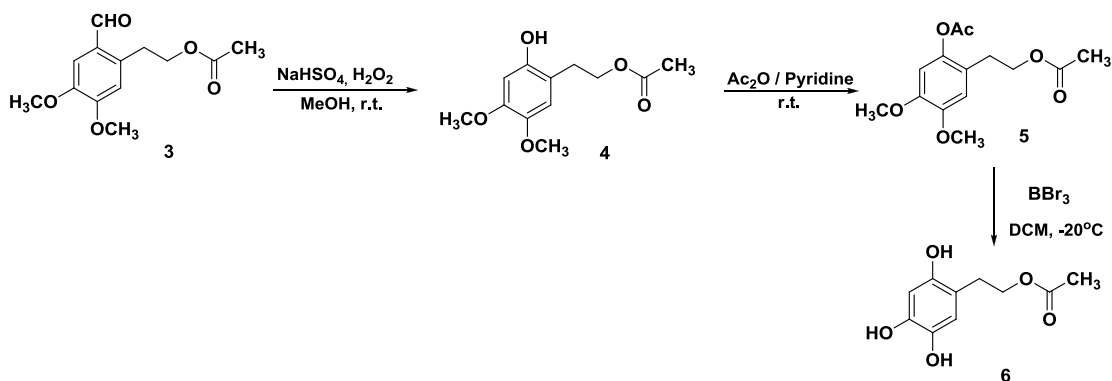
Στα 2.78 ppm, εμφανίζεται μια τριπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στο μεθυλένιο που είναι συνδεδεμένο με τον αρωματικό δακτύλιο και οφείλεται στη σύζευξη με τα δύο πρωτόνια του γειτονικού άνθρακα του μεθυλενίου.



Η απλή κορυφή στα 2.32 ppm οφείλεται στα ισοδύναμα πρωτόνια της ακετυλο-ομάδας και ολοκληρώνεται για τρία πρωτόνια.

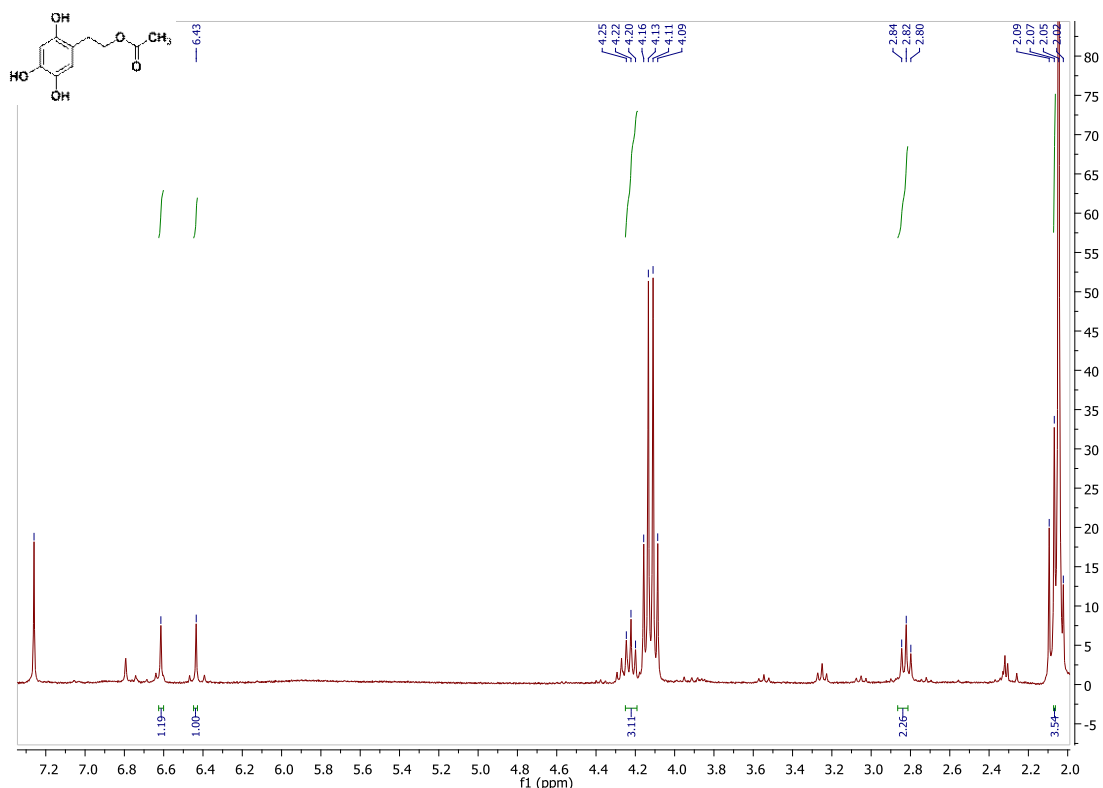
Τέλος, η απλή κορυφή στα 2.03 ppm αποδίδεται στα πρωτόνια του μεθυλίου της μεθοξυκαρβονυλο-ομάδας.

Την προστασία του φαινολικού υδροξυλίου με τη μορφή οξικού εστέρα (παράγωγο **5**), ακολούθησε η απομάκρυνση όλων των προστατευτικών ομάδων των αρωματικών υδροξυλίων με επίδραση τριβρωμιούχου βορίου σε διαλύτη άνυδρο διχλωρομεθάνιο και χαμηλή θερμοκρασία (-20 °C). Η ένωση **6** αποτελεί την πρόδρομη ένωση του τελικού προϊόντος 2,5-διυδροξυτυροσόλη (**8**). (Σχήμα 14)



Σχήμα 14: Η αποπροστασία του οξικού 2-ακετοξυ-4,5-διμεθοξυφαιναιθυλεστέρα (**6**)

Παρακάτω παρατίθεται το φάσμα της ένωσης **6**, με το οποίο έγινε η ταυτοποίηση της επιθυμητής ένωσης .



Εικόνα 6: Φάσμα πρωτονίου  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) του οξικού 2,4,5-τριϋδροξυφαιναίθυλεστέρα (**6**)

Στα 6.61 ppm και στα 6.43 ppm παρατηρούνται δύο απλές κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια που είναι συνδεδεμένα στον αρωματικό δακτύλιο.

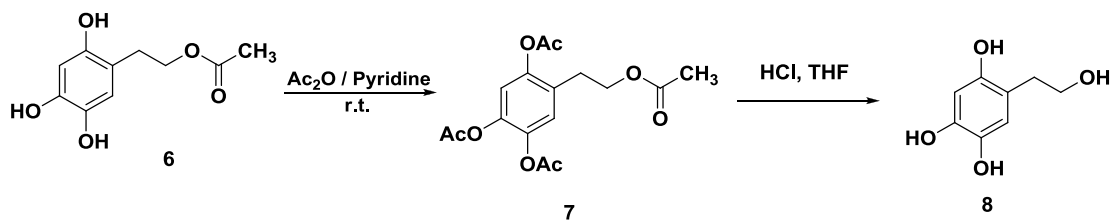
Στα 4.22 ppm, εμφανίζεται μια τριπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στο μεθυλένιο που είναι συνδεδεμένο με την εστερική ομάδα. Η τριπλή αυτή κορυφή, οφείλεται στη σύζευξη των πρωτονίων της με τα δύο πρωτόνια της γειτονικής ομάδας του μεθυλενίου.

Έπειτα στα 2.82 ppm, εμφανίζεται μια τριπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στο μεθυλένιο που είναι συνδεδεμένο με τον αρωματικό δακτύλιο και οφείλεται στη σύζευξη με τα δύο πρωτόνια του γειτονικού άνθρακα του μεθυλενίου.

Τέλος στα 2.05 εμφανίζεται μια απλή κορυφή που αντιστοιχεί στα τρία πρωτόνια της ομάδας του μεθυλίου.

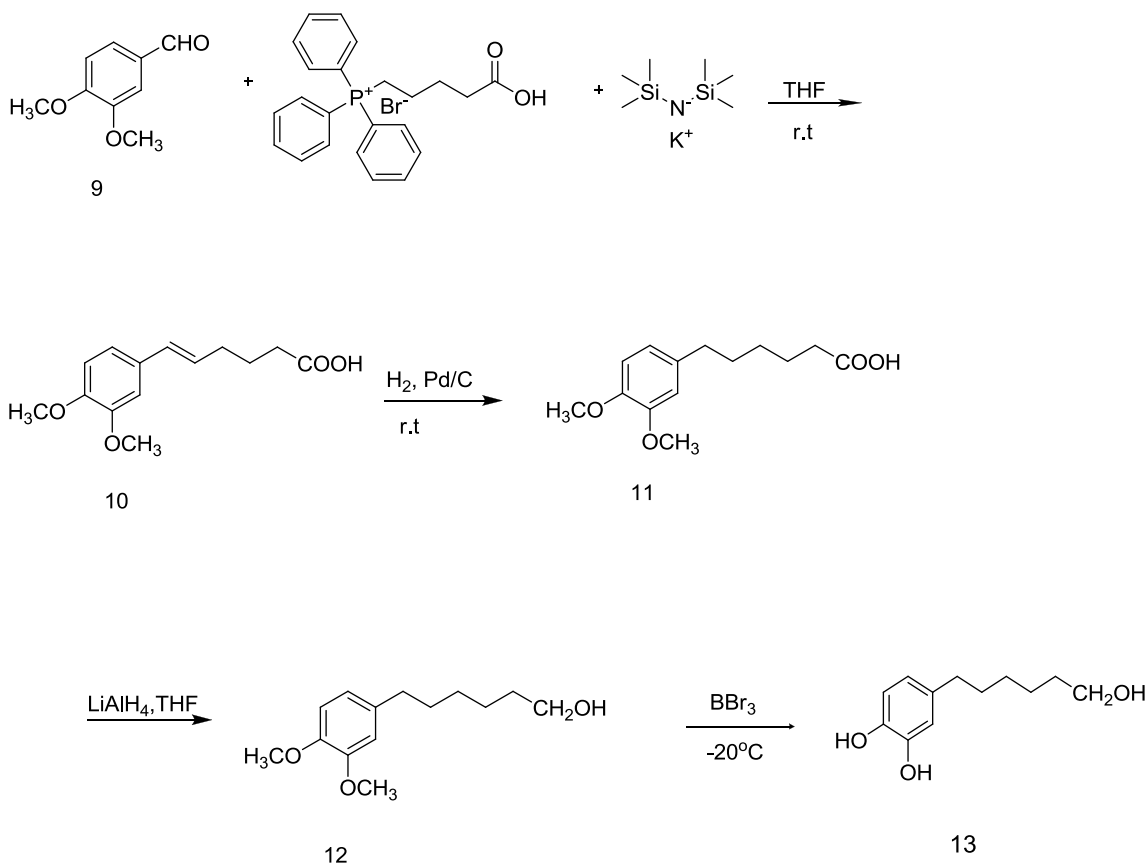
Η τελική αποπροστασία της ένωσης **6** προς την επιθυμητή ένωση **8** πραγματοποιήθηκε σε μικρή δοκιμαστική κλίμακα και διαπιστώθηκε ότι η τελική ένωση **8** λαμβάνεται σε καθαρή μορφή. Επειδή όμως η 2,5-διϋδροξυτυροσόλη (**8**) είναι

ιδιαίτερα ευαίσθητη στο φως και τον αέρα, επιλέχθηκε η μετατροπή της ένωσης **6** στην αντίστοιχη υπερακετυλιωμένη ένωση **7** (Σχήμα 15), η οποία είναι σταθερή και μπορεί να διατηρηθεί στο ψυγείο χωρίς να αλλοιώνεται. Η απομάκρυνση των ακετυλοπροστατευτικών ομάδων θα πραγματοποιηθεί οποτεδήποτε απαιτείται άμεση χρήση της 2,5-διυδροξυτυροσόλης (**8**).



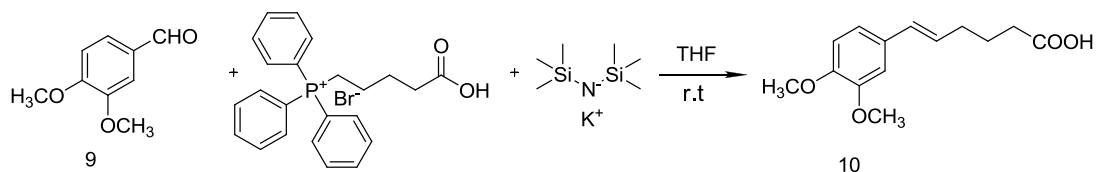
Σχήμα 15: Ο σχηματισμός της τετρακετυλιωμένης 2,5 –υδροξυτυροσόλης (**7**)

### 3.2.2 Η συνθετική πορεία για την 4-(6-υδροξυ-εξυλο)βενζενο-1,2-διόλη



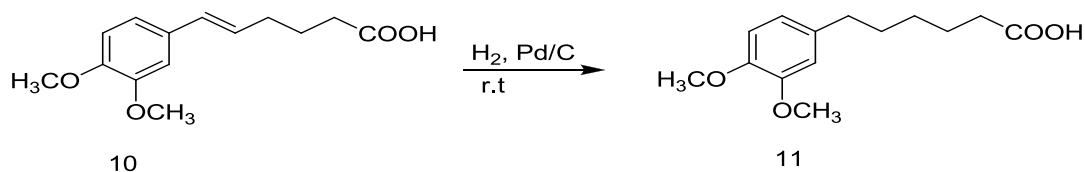
Σχήμα 16: Η συνθετική πορεία της 4-(6-υδροξυ-εξυλο)βενζενο-1,2-διόλη (13)

Η διαδικασία σύνθεσης της 4-(6-υδροξυ-εξυλο)βενζενο-1,2-διόλη (13) περιλαμβάνει για αρχή την **αντίδραση Wittig**, που γίνεται μεταξύ του τριφαινυλοφωσφονιακού βρωμιδίου και της προστατευμένης αλδεΐδης 3,4-διμεθοξυβενζαλδεΐδη (9) σε βασικό περιβάλλον. Με την αντίδραση Wittig γίνεται η παραγωγή του αντίστοιχου ακόρεστου οξέος 10. (Σχήμα 17)



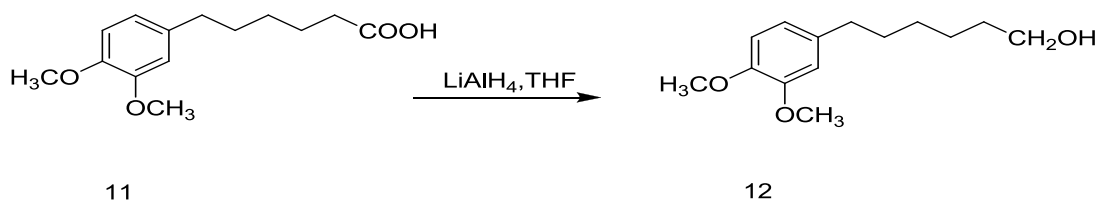
Σχήμα 17: Ο σχηματισμός του ακόρεστου οξέος **10** μέσω της αντίδρασης Wittig.

Στην συνέχεια ακολουθεί η **αντίδραση υδρογόνωσης** και η μετατροπή του ακόρεστου οξέος **10** στο κορεσμένο 6-(3,4-διμεθοξυ-φαινυλο)εξανοϊκό οξύ (**11**). (Σχήμα 18)



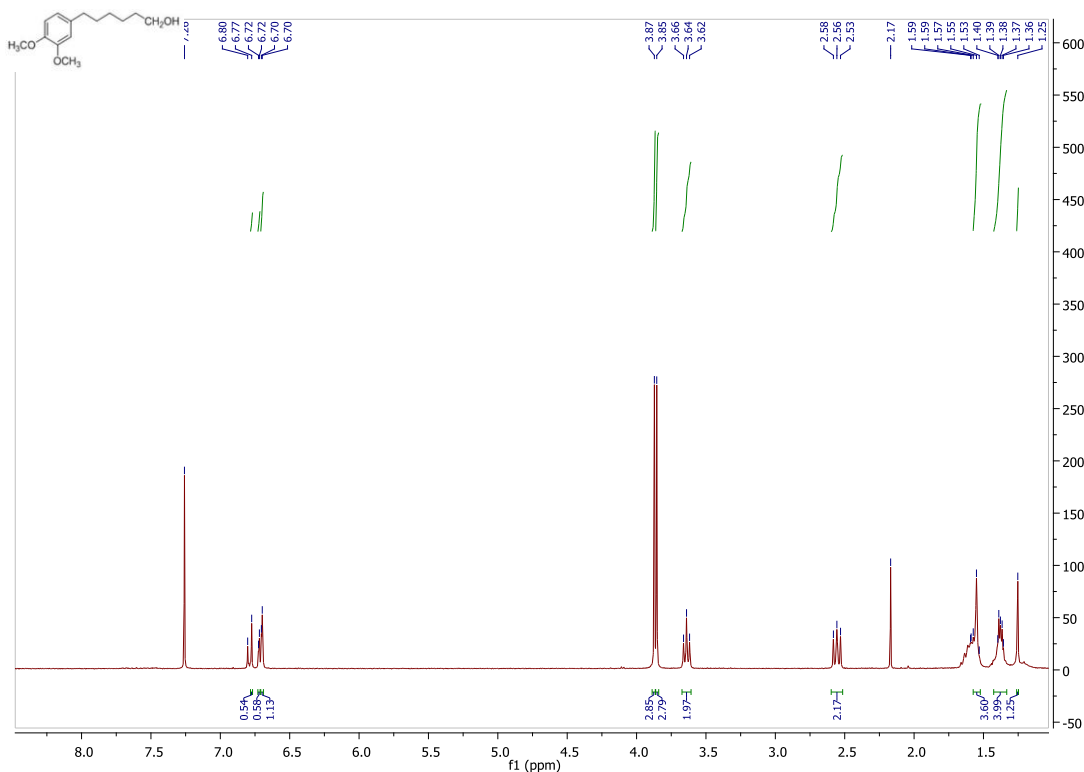
Σχήμα 18: Η αντίδραση υδρογόνωσης για την μετατροπή του ακόρεστου οξέος **10** στο κορεσμένο οξύ **11**

Έπεται η **αναγωγή** του οξέος **11** προς την αντίστοιχη αλκοόλη την 6-(3,4-διμεθοξυ-φαινυλο)εξανο-1-όλη (**12**). Η αναγωγή έγινε με  $LiAlH_4$ , το οποίο χρησιμοποιείται συχνά για την αναγωγή ενός καρβονικού οξέος προς της αντίστοιχη πρωτοταγή αλκοόλη. (Σχήμα 19)



Σχήμα 19: Η αντίδραση αναγωγής του κορεσμένου οξέος **11** στην πρωτοταγή αλκοόλη **12**

Παρακάτω παρατίθεται το φάσμα της ένωσης **12**, με το οποίο γίνεται η ταυτοποίηση της επιθυμητής ένωσης.



Εικόνα 7: Φάσμα πρωτονίου  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) της 6-(3,4-διμεθοξυφαινυλ)εξαν-1-όλης (**12**)

Στα 6.77 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του αρωματικού δακτυλίου της θέσης 2.

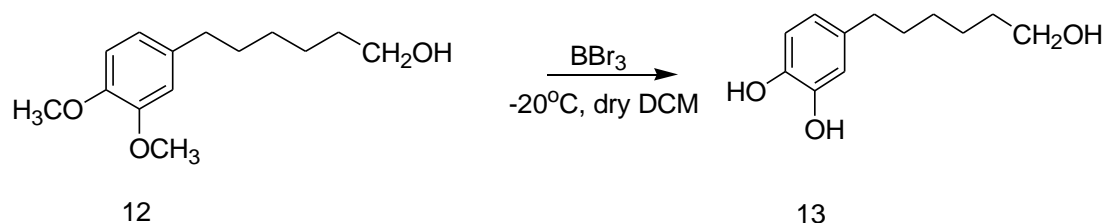
Στη συνέχεια στα 6.72 ppm και 6.70 ppm, παρατηρούνται δύο απλές κορυφές που αντιστοιχούν στα πρωτόνια που είναι συνδεδεμένα στον αρωματικό δακτύλιο στις θέσεις 5 και 6.

Στα 3.87 ppm και 3.85 ppm, δίνουν σήμα τα πρωτόνια των μεθόξυ- ομάδων. Παρατηρούνται λοιπόν, δύο απλές κορυφές οι οποίες ολοκληρώνονται για τρία πρωτόνια η κάθε μία.

Στα 3.64 ppm, εμφανίζεται μια τριπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στο μεθυλένιο που είναι συνδεδεμένο με την ομάδα του υδροξυλίου. Η τριπλή αυτή κορυφή, οφείλεται στη σύζευξη των πρωτονίων της με τα δύο πρωτόνια της γειτονικής ομάδας του μεθυλενίου.

Έπειτα στα 2.56 ppm, εμφανίζεται μια τριπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στο μεθυλένιο που είναι συνδεδεμένο με τον αρωματικό δακτύλιο και οφείλεται στη σύζευξη με τα δύο πρωτόνια του γειτονικού άνθρακα του μεθυλενίου.

Τα υπόλοιπα οκτώ πρωτόνια των μεθυλενίων εμφανίζονται με τη μορφή πολλαπλών κορυφών στις περιοχές 1.59-1.53 και 1.40-1.36. Η παραλαβή του τελικού προϊόντος **13** γίνεται με την απομάκρυνση όλων των προστατευτικών ομάδων των αρωματικών υδροξυλίων με επίδραση τριβρωμιούχου βορίου σε άνυδρο διχλωρομεθάνιο στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . (Σχήμα 20)



Σχήμα 20: Η αποπροστασία και η παραλαβή της 4-(6-υδροξυ-εξυλο)βενζενο-1,2-διόλη (**13**)

Οι υδροξυλομάδες αυξάνουν την ευαισθησία της ένωσης στην οξείδωση και μειώνουν την σταθερότητα της ένωσης **13** και γι' αυτό το λόγο ,σκοπίμως φυλάσσεται η ένωση **12**.Οποτεδήποτε χρειαστεί να μελετηθεί η ένωση **13** μπορεί να γίνει η αποπροστασία της **12** με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω.

### 3.3 Προσδιορισμός της ικανότητας των ενώσεων να δεσμεύουν το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας

Με τον όρο χημειοφωταύγεια, εννοούμε κάθε διαδικασία που αφορά στην εκπομπή ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (συνήθως στην ορατή ή κοντά στην υπέρυθρη περιοχή), που παράγεται από μια ουσία, μέσω μιας χημικής αντίδρασης. Γενικά, στις αντιδράσεις της μεθόδου χημειοφωταύγειας, ένα από τα προϊόντα της αντίδρασης βρίσκεται σε διεγερμένη ηλεκτρονικά κατάσταση, το οποίο παράγοντας φως, μεταπίπτει στη θεμελιώδη κατάσταση. Η ένταση της εκπομπής του παραγόμενου φωτός είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης των χημικών ενώσεων που συμμετέχουν στην αντίδραση χημειοφωταύγειας. Συνεπώς, η μέτρηση της έντασης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αναλυτικούς σκοπούς. Τονίζεται ότι η χημειοφωταύγεια κατέχει μια εξέχουσα θέση ανάμεσα σε άλλες φασματοφωτομετρικές τεχνικές, εξαιτίας της ευαισθησίας και της επιλεκτικότητας που παρουσιάζει.

Η τεχνική αυτή έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

- Δεν απαιτεί εξωτερική πηγή φωτός (τεχνική σκοτεινού πεδίου), επομένως, εξασφαλίζει μείωση των σημάτων θορύβου και βελτίωση των ορίων ανίχνευσης (10 έως 100 φορές χαμηλότερα όρια ανίχνευσης από άλλες τεχνικές φωταύγειας).
- Απαιτεί μόνο έναν ανιχνευτή φωτός, όπως ένας φωτοπολλαπλασιαστής.
- Δεν απαιτεί μονοχρωμάτορα και συχνά δεν απαιτεί ούτε φίλτρο.

Παρόλα αυτά, πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχουν και κάποιοι περιορισμοί στην ανάλυση χημειοφωταύγειας [99], όπως είναι οι παρακάτω:

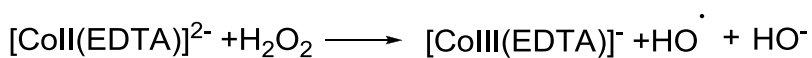
- Η εξάρτηση της εκπομπής χημειοφωταύγειας από ορισμένους παράγοντες όπως είναι: το pH, η παρουσία μεταλλικών ιόντων (κυρίως των στοιχείων μετάπτωσης), η θερμοκρασία, η χημική δομή των πρόδρομων ενώσεων που λαμβάνουν μέρος στην αντίδραση, ο επιλεγμένος καταλύτης καθώς και το γεγονός ότι το μέγεθος της έντασης της χημειοφωταύγειας είναι ανάλογο του όγκου της κυψελίδας.
- Η απλή εκπομπή χημειοφωταύγειας δεν είναι σταθερή αλλά μεταβάλλεται με το χρόνο. Επομένως, το προφίλ εκπομπής-χρόνου μπορεί να διαφέρει σημαντικά σε διαφορετικά συστήματα χημειοφωταύγειας.

Πολλές μέθοδοι χημειοφωταύγειας, απαιτούν λίγα μόνο χημικά συστατικά που πραγματικά παράγουν φως. Η χημειοφωταύγεια της λουμινόλης, που έχει μελετηθεί εκτενώς, και των υπεροξοζαλικών, χρησιμοποιούνται σε αναλυτικές και βιοαναλυτικές μεθόδους. Η λουμινόλη, η οποία είναι μη εξειδικευμένη, χρησιμοποιείται ευρέως σαν χημειοφωταυγικός αισθητήρας. Ο χημειοφωταυγικός εκπομπέας, προέρχεται άμεσα από την οξειδωση της λουμινόλης, από ένα οξειδωτικό μέσο σε βασικό υδατικό διάλυμα. Το πιο σύνηθες οξειδωτικό μέσο είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Ωστόσο, έχουν



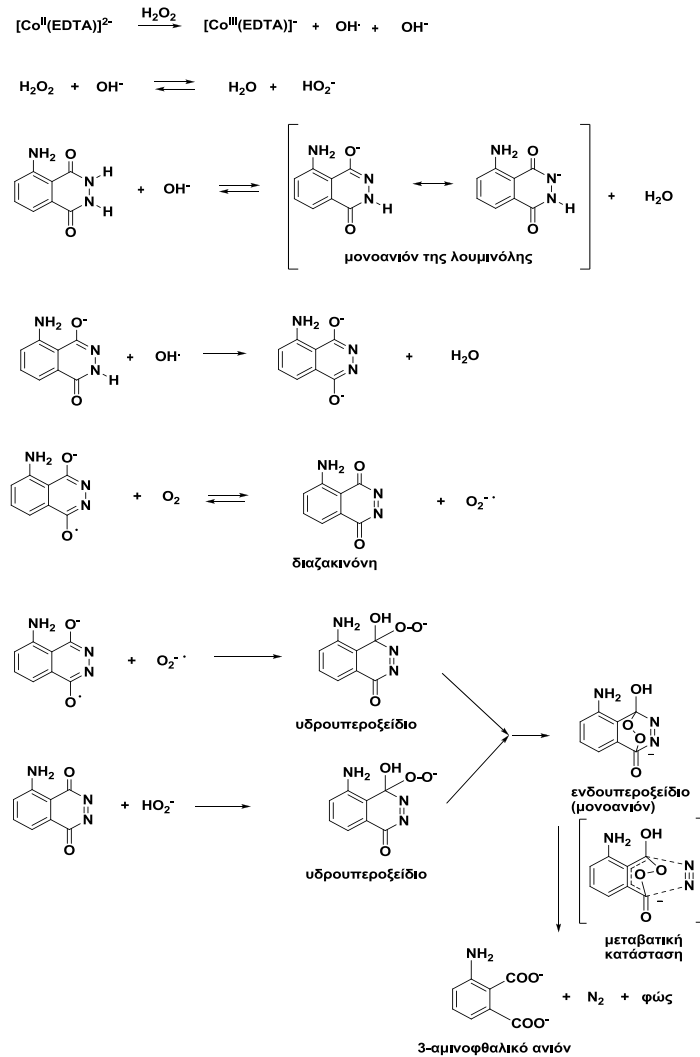
χρησιμοποιηθεί και άλλα οξειδωτικά μέσα, όπως ένζυμα, οργανικάυπεροξειδία , και 2,2'-αζο-δι(2- αμιδινοπροπάνιο).

Πρόσφατα, η μέθοδος χημειοφωταύγειας της λουμινόλης, τροποποιήθηκε για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Αυτή η τροποποιημένη μέθοδος, που δε χρησιμοποιεί ένζυμα και δεν απαιτεί λογισμικό για ολοκλήρωση καμπυλών, λόγω της σταθερής έντασης χημειοφωταύγειας που παράγεται, για ένα λογικό χρονικό διάστημα (έως και 1min), βασίζεται στην καταλυτική οξείδωση της λουμινόλης από  $\text{Co}^{2+}$  και στη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος βορικών σε pH 9, παρουσία EDTA ως μεταλλικό συμπλοκοποιητή. Το προαναφερθέν επίπεδο pH βρέθηκε να δίνει τα βέλτιστα σήματα, αναφορικά με τη χρονική σταθερότητα, την ένταση και την επαναληψιμότητα. Τα σύμπλοκα του κοβαλτίου με το EDTA καταλύουν το σχηματισμό μιας ρίζας υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton που φαίνεται στο Σχήμα 21 .



Σχήμα 21: Η αντίδραση Fenton

Η μέθοδος της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης περιγράφεται από μια σειρά αντιδράσεων, όπου σε βασικό pH, η λουμινόλη μετατρέπεται στο αντίστοιχο μονοανιόν, το οποίο σταθεροποιείται με δομές συντονισμού. Το ανιόν μέσα από διάφορα στάδια, καταλήγει στο σχηματισμό του ενδοϋπεροξειδίου, το οποίο παράγεται σε διεγερμένη κατάσταση και αποβάλλει την περίσσεια ενέργειας υπό μορφή ακτινοβολίας, οπότε μεταπίπτει στη θεμελιώδη ενεργειακή κατάσταση. Οι αντίστοιχες αντιδράσεις φαίνονται στο Σχήμα 22 .



Σχήμα 22: Οι αντιδράσεις που συμβαίνουν κατά τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης

Ρίζες με οξυγονούχο κέντρο, όπως οι ρίζες υδροξυλίου και αλκοξειδίου, που σχηματίζονται από ομολυτική σχάση του υδροϋπεροξειδίου επίσης, προκαλούν οξείδωση της λουμινόλης, που συνοδεύεται από εκπομπή φωτός. Σε όλες τις διεργασίες φωταύγειας, η ένταση του παραγόμενου φωτός εξαρτάται από το πόσο αποτελεσματική είναι η παραγωγή μορίων στη διεγερμένη κατάσταση, μέγεθος που αντιπροσωπεύεται από την κβαντική απόδοση και την ταχύτητα της αντίδρασης:

$$\text{ICI} = \Phi\text{CI} (-dA/dt)$$

ICI είναι η ένταση της εκπομπής (φωτόνια/ δευτερόλεπτο)

ΦCI είναι η κβαντική απόδοση της χημειοφωταύγειας

- dA/dt είναι ο ρυθμός με τον οποίο καταναλώνεται η πρόδρομη ένωση A της διεργασίας.

Η μέγιστη ένταση φωτός, εξαρτάται από τη συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και την κβαντική απόδοση. [97]

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

### **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζονται αναλυτικά οι συνθήκες για την διεξαγωγή των αντιδράσεων, οι αποδόσεις των αντιδράσεων, τα σημεία τήξης των προϊόντων και τα φάσματα NMR για την ταυτοποίηση και τον έλεγχο καθαρότητας αυτών.

## 4.1 Όργανα και συσκευές

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

VarianGemini 300MHz

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

s (singlet, απλό)

d (doublet,διπλό)

t (triplet,τριπλό)

q (quartet, τετραπλό)

m (multiplet, πολλαπλό)

br (broad, ευρύ).

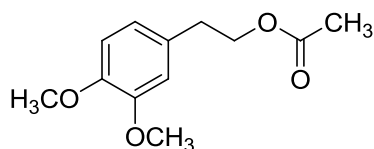
Οι σταθερές συζεύξεως J δίνονται σε Hz.

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

-Για την ξήρανση των παραγόμενων ενώσεων χρησιμοποιήθηκε αντλία υψηλού κενού Edwards.

## 4.2 Σύνθεση της 2,5-διυδροξυτυροσόλης

### Οξικός 3,4 διμεθοξυ-φαιναιθυλεστέρας (2)

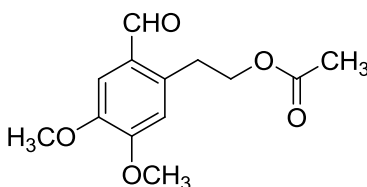


10,9 mmol (2 g) της 2-(3,4 διμεθοξυφαινυλ)αιθανόλη (1) και 115,5 mmol (10,9 ml) οξικού ανυδρίτη, διαλύονται σε 10,94 ml πυριδίνης. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου και η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Η αντίδραση φαίνεται να έχει ολοκληρωθεί και διακόπτεται περίπου μετά από 1 h και 15 min. Με το πέρας της αντίδρασης, γίνεται τοποθέτηση του συστήματος σε παγόλουτρο ώστε να γίνει η επεξεργασία του. Αρχικά το μείγμα οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% w/v (pH < 1). Έπειτα, για την παραλαβή του προϊόντος, γίνεται εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και τέλος ακολουθεί η εξάτμιση του διαλύτη. Το προϊόν (2) έχει άχρωμη ελαιώδη μορφή και χρησιμοποιείται παρακάτω χωρίς περαιτέρω καθαρισμό, αφού λαμβάνεται σε πολύ καθαρή μορφή.

Απόδοση: 95%

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.79 (s, 1H), 6.77 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 4.25 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 2.88 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 2.05 (s, 3H)

### Οξικός 2 φορμυλο-4,5- διμεθοξυφαιναιθυλεστέρας (3)



8,919 mmol (2 g) οξικού 3,3-διμεθοξυ-φαιναιθυλεστέρας (2) και 18,46 mmol (2,462 g) τριχλωριούχου αργιλίου ( $\text{AlCl}_3$ ) προστίθενται σε 160 ml άνυδρου διχλωρομεθανίου, και το μίγμα αναδεύεται στους  $0^\circ\text{C}$ . Στη συνέχεια, προστίθεται στάγδην διάλυμα 1,1-διχλωρομεθυλ-μεθυλ-αιθέρα ( $\text{Cl}_2\text{CHOCH}_3$ ) 22,3 mmol (2,564 g) σε 45 ml άνυδρου διχλωρομεθανίου (DCM). Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 hr. (Κατά τη διάρκεια της στάγδην προσθήκης το σύστημα αποκτά όλο και πιο έντονο πράσινο χρώμα.) Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Με το πέρας της αντίδρασης, προστίθεται πάγος στο σύστημα έως ότου γίνει αποχρωματισμός (λευκό χρώμα). Ακολουθεί εξάτμιση του οργανικού διαλύτη (υπόλειμμα A: ελαφρώς μωβ χρώμα) και εκχύλιση της υδατικής φάσης με οξικό αιθυλεστέρα (υπόλειμμα B: μπέζ χρώμα). Γίνεται ανάμειξη

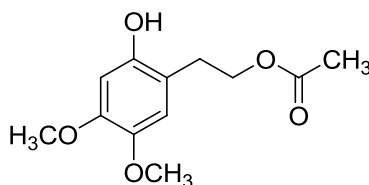
των δύο οργανικών φάσεων και ακολουθούν εκπλύσεις με όξινο ανθρακικό νάτριο ( $\text{NaHCO}_3$ ). Τέλος, γίνεται ξήρανση του συστήματος με θειικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) και εξάτμιση του διαλύτη. Μετά το τέλος της επεξεργασίας, τόσο η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας όσο και το φάσμα έδειξε ότι το προϊόν 3 περιέχει και το starting. Η βενζαλδεΰδη 3 λαμβάνεται κατόπιν καθαρισμού με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα PE/ EtOAc 6,6 : 3,5 ως στερεό με κίτρινο χρώμα.

Απόδοση: 60%

Σημείο τήξεως: 72-75 °C

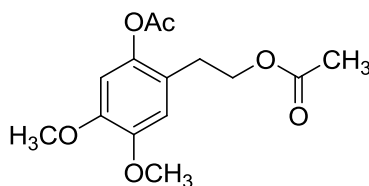
**$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  10.17 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 4.29 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.32 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 2.02 (s,  $J = 6.9$  Hz, 3H).

#### Οξικός 2-υδροξυ-4,5-διμεθοξυφαιραιθυλεστέρας (4)



3,59 mmol (905 mg) της βενζαλδεΰδης 3, 0,47mmol (64,8 mg) όξινου θειικού νάτριου και 9,08 mmol (308 mg)  $\text{H}_2\text{O}_2$  (υδατικό διάλυμα 50% ), διαλύονται σε 36 ml μεθανόλης. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 3 hr. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Με το πέρας της αντίδρασης , γίνεται εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα , εκπλύσεις με κορεσμένο διάλυμα NaCl, ξήρανση με θειικό νάτριο και τέλος εξάτμιση του οργανικού διαλύτη. Το προϊόν 4 χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

#### Οξικός 2-ακετοξυ-4,5-διμεθοξυφαιραιθυλεστέρας (5)



2,9 mmol (706 mg) οξικού 2-υδροξυ-4,5-διμεθοξυφαιραιθυλεστέρα (παράγωγο 4) και 28,71 mmol (2,7 ml) οξικού ανυδρίτη διαλύονται 2,75 ml πυριδίνης. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 hr. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Με το πέρας της αντίδρασης, γίνεται προσθήκη πάγου και οξίνιση με υδατικό διάλυμα HCl 10% w/v. Έπεται εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και εκπλύσεις , αρχικά, με όξινο ανθρακικό νάτριο και ,εν συνεχεία, με κορεσμένο διάλυμα NaCl. Τέλος, ακολουθεί ξήρανση με

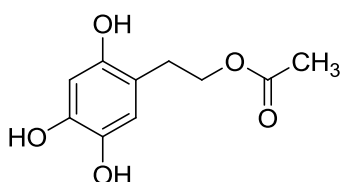
θειικό νάτριο και εξάτμιση του διαλύτη. Η παραλαβή του προϊόντος 5 γίνεται μετά τον καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα PE/ EtOAc 5:5.

Απόδοση: 65%

Σημείο τήξεως: 79-81°C

**<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 6.72 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 4.20 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 2.78 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.03 (s, 3H).

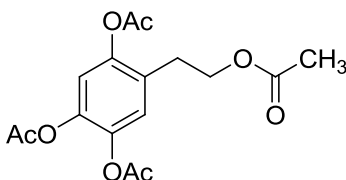
### Οξικός 2,4,5-τριϋδροξυφαινοιθυλεστέρας (6)



0,337 mmol (95 mg) του οξικού 2-ακετοξυ-4,5-διμεθοξυφαινοιθυλεστέρας (παράγωγο 5) και 3 mmol τριβρωμιούχου βορίου διαλύονται σε 6,8ml άνυδρου διχλωρομεθανίου υπό συνεχή ανάδευση στους -20 °C. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Με το πέρας της αντίδρασης γίνεται προσθήκη πάγου καθώς και προσθήκη μεθανόλης για 100 % εξουδετέρωση του τριβρωμιούχου βορίου. Ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και εκπλύσεις με νερό έως ότου το pH=4. Κατόπιν, γίνεται ξήρανση με θειικό νάτριο και εξάτμιση του διαλύτη. Το προϊόν που παραλαμβάνεται έχει πράσινο σκούρο χρώμα και χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

**<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 6.61 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 4.22 (t, J = 7.0 Hz, 3H), 2.83 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.07 (s, 3H)

### Τετρακετυλιωμένη 2,5 –υδροξυτυροσόλη (7)



0,15 mmol (32 mg) του οξικού 2,4,5-τριϋδροξυφαινοιθυλεστέρας (παράγωγο 6) και 4,52 mmol (0,42ml) οξικού ανυδρίτη διαλύονται σε 0,5 ml πυριδίνης. Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 48 hr. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Με το πέρας της αντίδρασης, γίνεται προσθήκη πάγου και οξίνιση με υδατικό διάλυμα HCl 10% w/v. Έπεται εκχύλιση με οξικό



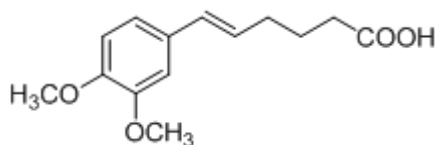
αιθυλεστέρα και εκπλύσεις , αρχικά, με όξινο ανθρακικό νάτριο και ,εν συνεχεία, με κορεσμένο διάλυμα NaCl. Τέλος, ακολουθεί ξήρανση με θειικό νάτριο και εξάτμιση του διαλύτη. Για να παραλάβουμε το καθαρό προϊόν **7** ήταν απαραίτητο να γίνει επανάληψη της αντίδρασης ώστε να εξασφαλίσουμε ότι η μικρή ποσότητα που είχαμε δεν θα χαθεί στην χρωματογραφία στήλης.

**$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  7.09 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 4.21 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 2.83 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 2.30 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.25 (s, 12H), 2.02 (s, 3H).

Παρατήρηση: Όλα τα παράγωγα της παραπάνω σειράς αντιδράσεων φυλάσσονταν στη κατάψυξη.

### 4.3 Σύνθεση της 4-(6-υδροξυ-εξυλο)βενζενο-1,2-διόλης

#### (E)-6-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)εξ-5-ενοϊκό οξύ (10)

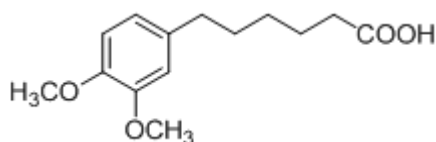


3 mmol (500 mg) της 3,4-διμεθοξυβενζαλδεΐδης (9), 6,02 mmol (2,67 g) τριφαινυλοφωσφονιακό βρωμίδιο και 12,03 mmol (2,4 g) της βάσης λίθιο δις(τριμεθυλοσιλυλο)αμίδιο διαλύονται σε άνυδρο THF. Πιο αναλυτικά, απαιτήθηκαν 18 ml THF για το άλας και 12 ml για το σύνολο της αντίδρασης. Το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 hr .

Είναι αξιοσημείωτα τα εξής: η αντίδραση έγινε υπό εξαιρετικά ξηρές συνθήκες και το έντονο πορτακοκόκκινο χρώμα του μείγματος, το οποίο κατά την εξέλιξη του πειράματος γίνεται περισσότερο πορτοκαλί.

Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Με το πέρας της αντίδρασης το σύστημα τοποθετείται σε παγόλουτρο και γίνεται προσθήκη περίπου 30 ml νερού. Στο στάδιο αυτό παρατηρείται αποχρωματισμός του προϊόντος. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη διαιθυλαιθέρα (Et<sub>2</sub>O) και ακολουθεί εκχύλιση. Επιπλέον , γίνεται οξίνιση της υδατικής φάσης με διάλυμα υδροχλωρίου 10% w/v, ώστε να γίνει εξουδετέρωση της βάσης. Επίσης, γίνεται εκχύλιση της υδατικής φάσης με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc). Σε αυτό το σημείο γίνεται ξήρανση της συνολικής οργανικής φάσης με θειικό νάτριο και εξάτμιση του οξικού αιθυλεστέρα. Το προϊόν που παραλαμβάνεται έχει καφέ χρώμα και ρευστή μορφή και χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Αξίζει να τονιστεί ότι η βάση που χρησιμοποιείται ακόμα και αν είναι καινούργια εγκυμονεί κίνδυνος να έχει αποκτήσει υγρασία και συνεπώς να μην πραγματοποιηθεί η αντίδραση.

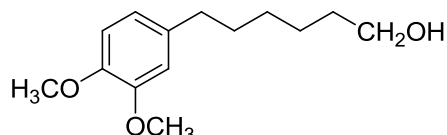
#### 6-(3,4-διμεθοξυφαινυλ)εξανοϊκό οξύ (11)



3 mmol (750,87mg) του οξέος **10** διαλύεται σε 30 ml MeOH. Στο διάλυμα προστίθεται περίπου το 10% της ποσότητας του starting ( παράγωγο 10) Pd/C (10 % w/w) .Κατόπιν εξασφαλίζονται αδρανείς συνθήκες με παροχή Ar και έπεται η παροχή του H<sub>2</sub>. Το μείγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 24 hr. Η πορεία της αντίδρασης

παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Με το πέρας της αντίδρασης γίνεται διήθηση του μείγματος με χρήση του υλικού γη διατόμων. Ακολουθεί η εξάτμιση της μεθανόλης. Το προϊόν χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Αξίζει να σημειωθεί ότι έγινε έλεγχος για την ύπαρξη του επιθυμητού παραγώγου με φασματοσκοπία μάζας όπου παρατηρήθηκε η ύπαρξη κορυφής σε m/z 275 που αντιστοιχεί στο ιόν  $[M+23]^+$ .

### 6-(3,4-διμεθοξυφαινυλ)εξαν-1-όλη (12)



3 mmol (753,87 mg) του 6-(3,4-διμεθοξυφαινυλ)εξανοϊκού οξέος (παράγωγο **11**) διαλύονται σε 6 ml άνυδρου THF και το διάλυμα προστίθεται στάγδην σε διάλυμα 8 ml άνυδρου THF με 10,5mmol  $\text{LiAlH}_4$  (398,47 mg). Το σύστημα αναδεύεται στους  $0^\circ\text{C}$  για περίπου 3 h. Αρχικά το μείγμα έχει σκούρο πράσινο χρώμα. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Με το πέρας της αντίδρασης γίνεται προσθήκη διαλύματος THF-νερού σε αναλογία 95-5 %. Σε αυτό το σημείο παρατηρήθηκε η δημιουργία άλατος και συγκεκριμένα είναι άλας του Al (λευκό στερεό). Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη οξικού αιθυλεστέρα. Ακολουθεί ξήρανση με θειικό νάτριο και εξάτμιση του διαλύτη. Το προϊόν που παραλαμβάνεται έχει τη μορφή διάφανου λαδιού ύστερα από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης σε σύστημα PE: EtOAc 6,5:3,5. Αξίζει να σημειωθεί ότι το προϊόν δεν διαλυόταν στο σύστημα των διαλυτών, γι' αυτό το λόγο έγινε dry packing. Δηλαδή χρησιμοποιήθηκε ένας διαλύτης που διέλυε το προϊόν και στη συνέχεια έγινε προσθήκη της silica ώστε να «παγιδευτεί» το προϊόν στη silica.

Απόδοση :60%

$^1\text{H NMR}$  (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.77 (s, 1H), 6.72 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 6.70 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 3.87 (s, 6H), 3.85 (s, 6H), 3.64 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.56 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 1.59-1.53 (m, 4H), 1.40-1.36(m, 4H), 1.25 (s, 1H).

#### 4.4 Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης παραγόμενων ενώσεων κατά την συνθετική πορεία των δύο νέων αναλόγων της υδροξυτυροσόλης

Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης, ορισμένων παραγόμενων ενώσεων κατά την συνθετική πορεία των δύο νέων αναλόγων της υδροξυτυροσόλης, πραγματοποιήθηκε με προσδιορισμό της ικανότητάς τους να δεσμεύουν το υπεροξειδίο του υδρογόνου, με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης.

##### Υπολογισμός της ικανότητας δέσμευσης του $H_2O_2$

Η μέτρηση της ικανότητας δέσμευσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης, όπως περιγράφηκε στην Ενότητα 3.3. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε φθορισμόμετρο LS55 Luminescence Spectrometer- Perkin Elmer.

##### Προετοιμασία του διαλύματος:

Ρυθμιστικό διάλυμα βορικού οξέος (0,0500 M) (ΔΙΑΛΥΜΑ Α): 3,10 g βορικού οξέος διαλύθηκαν σε 850 mL απιονισμένου νερού, στη συνέχεια, το pH ρυθμίστηκε στο 9,0 με διάλυμα NaOH 1N και αραιώθηκε μέχρι τελικού όγκου 1,000 L.

Διάλυμα λουμινόλης ( $5,60 \cdot 10^{-4}$  M) (ΔΙΑΛΥΜΑ Β): Ζυγίστηκαν 25,0 mg λουμινόλης και διαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα βορικού οξέος μέχρι τελικού όγκου 250,0 mL. Αυτό το διάλυμα διατηρήθηκε σε σκουρόχρωμη φιάλη.

Διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $5,40 \cdot 10^{-3}$  M) (ΔΙΑΛΥΜΑ Γ): 11,0 mL εμπορικά διαθέσιμου υπεροξειδίου του υδρογόνου 30% w/w αραιώθηκαν με απιονισμένο νερό μέχρι όγκου 100,0 mL (1,08 M). 5,00 mL από αυτό το διάλυμα αραιώθηκαν σε 100,0 mL με απιονισμένο νερό ( $5,40 \cdot 10^{-2}$  M). Τέλος, 5,00 mL από το τελευταίο διάλυμα αραιώθηκαν σε 50,0 mL με απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αυτό πρέπει να είναι προσφάτως παρασκευασμένο, γιατί είναι ασταθές.

##### Προετοιμασία του δείγματος:

Τα δείγματα διαλύονται σε διμεθυλοσουλφοξειδίο (DMSO) (συνολικός όγκος: 1,00 mL) ακριβώς πριν την ανάλυση. Παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκεντρώσεων 0,8-3,0 mg/mL.

### Διαδικασία:

Βαθμονόμηση φθοριομετρικής διάταξης: Σε 1,00 mL ρυθμιστικού διαλύματος βορικού οξέος (ΔΙΑΛΥΜΑ Α) προστίθενται 8,4 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 2,63mg EDTA και 0,10 mL διαλύματος λουμινόλης (ΔΙΑΛΥΜΑ Β). Το μίγμα αναδεύεται ισχυρά για 15s και σε αυτό προστίθεται 0,025mL διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (ΔΙΑΛΥΜΑ Γ). Το προκύπτον μίγμα (τυφλό) αναδεύεται ισχυρά για 30s, μεταφέρεται σε γυάλινη κυψελίδα και η ένταση της χημειοφωταύγειας ( $I_0$ ) καταγράφεται όταν επιτευχθεί σταθερή ένταση φωτός (έως 1 min).

Μέτρηση των δειγμάτων:  $x$  mL διαλύματος του δείγματος προστίθενται στο μίγμα των διαλυμάτων Α, Β και Γ, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η ένταση της χημειοφωταύγειας ( $I$ ) καταγράφεται όταν επιτευχθεί σταθερή ένταση φωτός (έως 1 min).

Το κάθε δείγμα μετρήθηκε σε τρεις συγκεντρώσεις, με προσθήκη κατάλληλου όγκου του διαλύματος των δειγμάτων (10,0  $\mu\text{L}$ -25,0  $\mu\text{L}$ -50,0  $\mu\text{L}$ ) και σε κάθε μια από αυτές, πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τρεις μετρήσεις για εξασφάλιση μεγαλύτερης ακρίβειας.

Στη συνέχεια υπολογίζεται ο λόγος  $I_0/I$  και γίνονται τα διαγράμματα  $I_0/I$  συναρτήσει της συγκέντρωσης του δείγματος (mg/mL). Η εξίσωση που συνδέει τα δύο αυτά μεγέθη, είναι γραμμική ( $y=ax+b$ ). Από την εξίσωση αυτή υπολογίστηκε η συγκέντρωση του δείγματος ( $IC_{50}$ ). Η  $IC_{50}$ , που αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού που απαιτείται, ώστε να μειωθεί η αρχική ένταση της χημειοφωταύγειας  $I_0$  κατά 50%, υπολογίστηκε από την εξίσωση της ευθείας, θέτοντας  $y=2$  και υπολογίζοντας το  $x$ .

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5**

### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

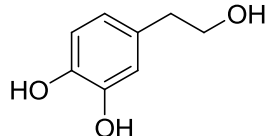
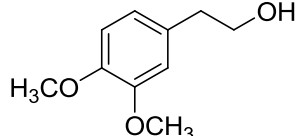
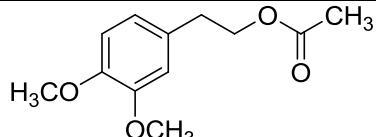
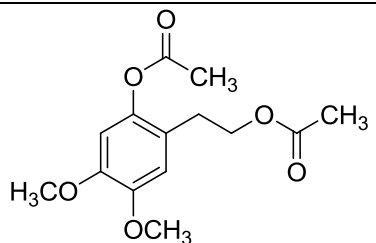
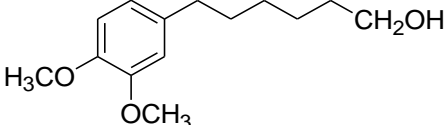
Σε αυτό το κεφάλαιο παρατίθενται τα αποτελέσματα από την αντιοξειδωτική μελέτη ορισμένων παραγόμενων ενώσεων κατά την συνθετική πορεία των δύο νέων αναλόγων της υδροξυτυροσόλης και καταγράφονται τα συμπεράσματα.

## 5.1 Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των νέων ενώσεων

Η αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων που παρασκευάστηκαν μελετήθηκε ως προς την ικανότητά τους να δεσμεύουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου, μια από τις πλέον δραστικές μορφές οξυγόνου. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης, όπως αυτή περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.3 .

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 1, εκφρασμένα ως IC<sub>50</sub>, δηλαδή η συγκέντρωση της ουσίας που προκαλεί 50% ελάττωση της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης και επομένως 50% δέσμευση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Πίνακας 1: Προσδιορισμός της συγκέντρωσης IC<sub>50</sub> με την μέθοδο της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΠΡΟΪΟΝ	IC <sub>50</sub> mg mL <sup>-1</sup>
Υδροξυτυροσόλη		0,002 ± 0,002
1		6,203 ± 0,110
2		3,126 ± 0,015
5		0,813 ± 0,021
12		3,886 ± 0,023

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του Πίνακα 1, η υδροξυτυροσόλη είναι η ένωση που εμφανίζει τη βέλτιστη αντιοξειδωτική δράση, με  $IC_{50}=0,002 \pm 0,002$  mg/mL. Η προστασία του κατεχολικού συστήματος υδροξυλίων με μεθύλια, η ένωση **1**, οδηγεί σε σημαντική ελάττωση της αντιοξειδωτικής δράσης ( $IC_{50}=6,203 \pm 0,110$  mg/mL), όπως άλλωστε είναι αναμενόμενο αφού το κατεχολικό σύστημα είναι το δομικό χαρακτηριστικό που ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση σε αυτή τη μέθοδο.

Η ακετυλίωση του αλκοολικού υδροξυλίου (ένωση **2**) έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της ικανότητας δέσμευσης του  $H_2O_2$  ( $IC_{50}=3,126 \pm 0,015$  mg/mL) σε σχέση με την ένωση **1**. Αξιοσημείωτη είναι η βελτίωση της αντιοξειδωτικής δράσης, σε σχέση με την ένωση **1**, που παρατηρείται από την εισαγωγή μιας ακετοξυ-ομάδας στη θέση 2 του αρωματικού δακτυλίου (ένωση **5**). Το φαινόμενο θα μπορούσε πιθανόν να εξηγηθεί θεωρώντας ότι, στις συνθήκες της μέτρησης της αντιοξειδωτικής δράσης, πραγματοποιείται απακετυλίωση και απελευθέρωση του φαινολικού υδροξυλίου.

Η επιμήκυνση της αλειφατικής αλυσίδας κατά 4 άτομα άνθρακα (αλκοόλη **12**) σε σχέση με την αλκοόλη **1** έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης, γεγονός που υποδεικνύει ότι πιθανότατα και η αντίστοιχη ένωση που θα περιέχει το ελεύθερο κατεχολικό σύστημα θα έχει σημαντική αντιοξειδωτική δράση, συγκρίσιμη πιθανόν με της υδροξυτυροσόλης.



## 5.2 Συζήτηση αποτελεσμάτων

Στη συγκεκριμένη ενότητα θα τονιστούν ιδιαίτερα κάποια σημεία του πειραματικού μέρους αυτής της ερευνητικής εργασίας.

Αρχικά, θα επισημανθούν κάποια πράγματα για την πρώτη σειρά αντιδράσεων που έλαβε χώρα με τελικό στόχο την παραγωγή του νέου αναλόγου της υδροξυτυροσόλης, την 2,5-διυδροξυτυροσόλη (**8**), που περιέχει μια επιπλέον ομάδα υδροξυλίου στη θέση 2 του αρωματικού δακτυλίου σε σχέση με την υδροξυτυροσόλη.

- Η εμπορικά διαθέσιμη 2-(3,4 διμεθοξυφαινυλ)αιθανόλη (**1**) ακετυλιώθηκε για την προστασία του ελεύθερου υδροξυλίου. Η αντίδραση αυτή παρείχε τον οξικό 3,4 διμεθοξυ-φαιναιθυλεστέρα (**2**) σε πολύ καλή απόδοση και σε καθαρή μορφή.
- Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντίδραση φορμυλίωσης του οξικού 3,4 διμεθοξυ-φαιναιθυλεστέρα (**2**) με βέλτιστες συνθήκες για την αντίδραση τις 24 h.
- Ακολουθεί η οξειδωση της βενζαλδεΐδης- οξικού 2 φορμυλο-4,5-διμεθοξυφαιναιθυλεστέρα (**3**) και η μετατροπή της στη φαινόλη- οξικό 2-υδροξυ-4,5-διμεθοξυφαιναιθυλεστέρα (**4**).
- Τέλος γίνεται προστασία του φαινολικού υδροξυλίου με τη μορφή οξικού εστέρα- οξικού 2-ακετοξυ-4,5-διμεθοξυφαιναιθυλεστέρα (**5**) και απομάκρυνση όλων των προστατευτικών ομάδων των αρωματικών υδροξυλίων για την παραλαβή της πρόδρομης ένωσης της 2,5-διυδροξυτυροσόλης, τον οξικό 2,4,5-τριυδροξυφαιναιθυλεστέρα (**6**).
- Με τελική αποπροστασία της ένωσης **6** παραλαμβάνεται το τελικό προϊόν, η 2,5 διυδροξυτυροσόλη (**8**). Όμως λόγω της ευαισθησίας της 2,5- διυδροξυτυροσόλης στον αέρα και στο φως, προτιμήθηκε η μετατροπή της ένωσης **6** στην υπερακετυλιωμένη μορφή της, η οποία είναι σταθερή και μπορεί να διατηρηθεί στο ψυγείο, την τετρακετυλιωμένη 2,5 –υδροξυτυροσόλη (**7**).

Στη συνέχεια, θα επισημανθούν κάποια πράγματα που αφορούν την δεύτερη σειρά αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκε και είχε τελικό στόχο την παραγωγή του νέου αναλόγου της υδροξυτυροσόλης, την 4-(6-υδροξυ-εξυλο)βενζενο-1,2-διόλη (**13**), η οποία έχει ανθρακική αλυσίδα με έξι άτομα άνθρακα αντί για δύο που έχει η υδροξυτυροσόλη.

- Η προστατευμένη αλδεΐδη 3,4- διμεθοξυβενζαλδεΐδη (**9**) μετατρέπεται μέσω της αντίδρασης Wittig σε ακόρεστο οξύ -(E)-6-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)εξ-5-ενοϊκό οξύ (**10**).
- Ακολουθεί η αντίδραση υδρογόνωσης και η μετατροπή του ακόρεστου οξέος στο κορεσμένο 6-(3,4-διμεθοξυ-φαινυλο)εξανοϊκό οξύ (**11**).

- Έπεται η αναγωγή του κορεσμένου 6-(3,4-διμεθοξυ-φαινυλο) εξανοϊκού οξέος (**11**) προς την αντίστοιχη αλκοόλη την 6-(3,4-διμεθοξυ-φαινυλο)εξανο-1-όλη (**12**) με απόδοση 60%.
- Με αποπροστασία των αρωματικών υδροξυλίων της ένωσης **12** μπορεί να παραληφθεί το νέο ανάλογο της υδροξυτυροσόλης, η 4-(6-υδροξυ-εξυλο)βενζενο-1,2-διόλη (**13**). Όμως οι υδροξυλομάδες αυξάνουν την ευαισθησία και μειώνουν την σταθερότητα της ένωσης γι' αυτό και δεν πραγματοποιήθηκε αυτό το στάδιο. Για να γίνει η αποπροστασία του παραγώγου **12** και η παραλαβή του τελικού επιθυμητού προϊόντος **13**, πρέπει το παράγωγο **12** να είναι απόλυτα καθαρό. Στην προκειμένη συνθετική πορεία επιλέχθηκε να προχωρήσει η σύνθεση μέχρι το παράγωγο **12** χωρίς να γίνει προηγουμένως καθαρισμός κάποιου προϊόντος. Η εναλλακτική οδός, που θα μπορούσε να ακολουθηθεί, είναι να γίνει καθαρισμός του παραγώγου **10** (το προϊόν της αντίδρασης Wittig) ώστε να απομακρυνθούν τα υλίδια. Πιθανών τότε να προέκυπτε διαφορετική απόδοση για το παράγωγο **12**.

Τέλος, μια γενική παρατήρηση, η οποία αφορά και τις δύο συνθετικές πορείες των νέων αναλόγων της υδροξυτυροσόλης, αφορά στο βαθμό δυσκολίας των παραπάνω αντιδράσεων. Η δυσκολία στην συγκεκριμένη εργασία έγκειται κυρίως στο γεγονός ότι η σύνθεση των επιθυμητών ενώσεων πραγματοποιείται με σειρά πολλών διαδοχικών αντιδράσεων και ήταν αναγκαία η επανάληψη των πειραμάτων προκειμένου να παρασκευάζονται επαρκείς ποσότητες των ενώσεων τόσο για το επόμενο στάδιο όσο και για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Tripoli E., Giammanco M., Tabacchi G., Di Majo D., Giammanco S., La Guardia M., "The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health", *Nutrition Research Reviews* 18 (2005) 98-112
- [2] Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids", *Free Radical Biology and Medicine*, 20(1996) 933-956
- [3] Nenadis N., Zhang H., -Y., Tsimidou, M.Z., "Structure-antioxidant activity relationships of ferulic acid derivatives: Effect of carbon side chain characteristic groups", *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1874-1879
- [4] Visioli F., Galli C., Galli G., Caruso D., "Biological activities and metabolic fate of olive oil phenols", *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 104 (2002) 677-684
- [5] Visioli F., Poli A., Galli C., "Antioxidant and other biological activities phenols from olives and olive oil", *Medicinal Research Reviews*, 22 (2002) 65-75
- [6] Fresco P., Borges F., Diniz C., Marcues M.P.M., "New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols", *Medicinal Research Reviews*, 26 (2006) 747-766
- [7] Elena De Marcoa, Maria Savarese, Antonello Paduano, Raffaele Sacchi, «Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters», *Food Chemistry* 104 (2007) 858–867
- [8] Alejandro Vazquez-Martin, Salvador Fernández-Arroyo, Sílvia Cufí, Cristina Oliveras-Ferraro, Jesús Lozano-Sánchez, Luciano Vellón, Vicente Micol, Jorge Joven, Antonio Segura-Carretero, Javier A. Menendez. «Phenolic Secoiridoids in Extra Virgin Olive Oil Impede Fibrogenic and Oncogenic Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Extra Virgin Olive Oil As a Source of Novel Antiaging Phytochemicals».
- [9] Mateos, R., Espartero, J. L., Trujillo, M., Ríos, J. J., León-Camacho, M., Alcuía, F., et al. (Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2001) 2185–2192.
- [10] Vissers, M. H., Zock, P. L., Roodenburg, A. J., Leenen, R., & Katan, M. B. Olive oil phenols are absorbed in humans. *Journal of Nutrition*, 132(3), (2002) 409–417.
- [11] Brenes, M., García, A., García, P., Rios, J. J., & Garrido, A. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), (1999) 3535–3540.

- [12] Proestos, C., Bakogiannis, A., Psarianos, C., Koutinas, A. A., Kanellaki, M., & Komaitis, M. High performance liquid chromatography analysis of phenolic substances in Greek wines. *Food Control*, 16(4), (2005). 319–323.
- [13] De la Torre, R., Covas, M. I., Pujadas–Bastardes, M., Fitó, M., & Farré, M. Is dopamine behind the health benefits of red wine? *European Journal of Nutrition*, 45(5), (2006). 307–310.
- [14] D’Angelo, S., Manna, C., Migliardi, V., Mazzoni, O., Morrica, P., Capasso, G., et al. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metabolism and Disposition*, 29(11), (2001). 1492–1498.
- [15] Tuck, K. L., Freeman, M. P., Hayball, P. J., Stretch, G. L., & Stupans, I. The in vivo fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral dosing of labeled compounds to rats. *Journal of Nutrition*, 131(7), (2001). 1993–1996.
- [16] De Pinedo, A., Peñalver, P., & Morales, J. C. Synthesis and evaluation of new phenolic–based antioxidants: Structure–activity relationship. *Food Chemistry*, 103(1), (2007) 55–61.
- [17] Cornwell, D. G., & Jiyan, M. Nutritional benefit of olive oil: The biological effects of hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), (2008) 8774–8786.
- [18] Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A., & Sayadi, S. Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative–rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-Biological Interactions*, 176(2–3), (2008) 88–98.
- [19] Martín, M. A., Ramos, S., Granado–Serrano, A. B., Rodríguez–Ramiro, I., Trujillo, M., Bravo, L., et al. The olive oil phenol Hydroxytyrosol induces antioxidant/ detoxificant enzymes activity and Nrf2 translocation via ERKs and PI3K/AKT pathways in HepG2 cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54(1), (2010) 1–11.
- [20] Mateos, R., & Bravo, L. Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of biomarkers of oxidative damage to macromolecules (DNA, lipids and proteins). *Journal of Separation Science*, 30(2), (2007) 175–191.
- [21] Covas, M. I., Nyyssonen, K., Poulsen, H. E., Kaikkonen, J., Zunft, H. J., Kieseewetter, H., et al. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: A randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 145(5), (2006) 333–341.

- [22] Visioli, F., Wolfram, R., Richard, D., Abdullah, M. I. C. B., & Crea, R. Olive phenolics increase glutathione levels in healthy volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), (2009)1793–1796.
- [23] Pacheco, Y. M., Bermúdez, B., López, S., Abia, R., Villar, J., & Muriana, F. J. Minor compounds of olive oil have postprandial anti-inflammatory effects. *British Journal of Nutrition*, 98(2), (2007)260–263.
- [24] Fitó, M., Cladellas, M., de la Torre, R., Marti, J., Muñoz, D., Schröder, H., et al. Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: A randomized, crossover, controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 62(4), (2008) 570–574
- [25] Dell'Agli, M., Maschi, O., Galli, G. V., Fagnani, R., Dal Cero, E., Caruso, D., et al. Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP– phosphodiesterase. *British Journal of Nutrition*, 99(5), (2008) 945–951.
- [26] González–Santiago, M., Martín–Bautista, E., Carrero, J. J., Fonollá, J., Baró, L., Bartolomé, M. V., et al. One–month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development. *Atherosclerosis*, 188(1), (2006) 35–42.
- [27] Gong, D., Geng, C., Jiang, L., Cao, J., Yoshimura, H., & Zhong, L. Effects of hydroxytyrosol–20 on carrageenan–induced acute inflammation and hyperalgesia in rats. *Phytotherapy Research*, 23(5), (2008).646–650
- [28] Trichopoulou, A., & Dilis, V. Olive oil and longevity. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(10), (2007). 1275–1278.
- [29] Machowetz, A., Poulsen, H. E., Gruendel, S., Weimann, A., Fitó, M., Marrugat, J., et al. Effect of olive oils on biomarkers of oxidative DNA stress in Northern and Southern Europeans. *The FASEB Journal*, 21(1), (2007). 45–52.
- [30] Salvini, S., Sera, F., Caruso, D., Giovannelli, L., Visioli, F., Saieva, C., et al.. Daily consumption of a high–phenol extra virgin olive reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *British Journal of Nutrition*, 95(4), (2006)742–751.
- [31] Marx, J. Cancer research. Inflammation and cancer: The link grows stronger. *Science*, 306(5698), (2004). 966–968.
- [32] Corona, G., Deiana, M., Incani, A., Vauzour, D., Dessi, M. A., & Spencer, J. P. Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX–2 expression by olive oil polyphenols

underlies their anti-proliferative effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(3), (2007) 606–611.

[33] Corona, G., Deiana, M., Incani, A., Vauzour, D., Dessi, M. A., & Spencer, J. P. Hydroxytyrosol inhibits the proliferation of human colon adenocarcinoma cells through inhibition of ERK1/2 and cyclin D1. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(7), (2009). 897–903.

[34] Sirianini, R., Chimento, A., De Luca, A., Casaburi, I., Rizza, P., Onofrio, A., et al. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54(6), (2010). 833–840.

[35] Fabiani, R., Rosignoli, P., De Bartolomeo, A., Fuccelli, R., Servili, M., Montedoro, G. F., et al. Oxidative DNA damage is prevented by extracts of olive oil, hydroxytyrosol, and other olive phenolic compounds in human blood mononuclear cells and HL60 cells. *Journal of Nutrition*, 138(8), (2008). 1411–1416.

[36] Fleming, H. P., Walter, W. M., & Etchells, J. L. Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. *Applied Microbiology*, 26(5), (1973). 777–782.

[37] Capasso, R., Evidente, A., Schivo, L., Orru, G., Marcialis, M. A., & Cristinzo, G. Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *Journal of Applied Bacteriology*, 79(4), (1995). 393–398.

[38] Markin, D., Duek, L., & Berdicevsky, I. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. *Mycoses*, 46(3–4), (2003). 132–136.

[39] Keceli, T., & Robinson, R. K. Antimicrobial activity of phenolic extracts from virgin olive oil. *Milchwissenschaft*, 57(8), (2002). 436–440.

[40] Radford, S. A., Tassou, C. C., Nychas, G. J. E., & Board, R. G. The influence of different oils on the death rate of *Salmonella enteritidis* in homemade mayonnaise. *Letters in Applied Microbiology*, 12(4), (1991). 125–128.

[41] Medina, E., de Castro, A., Romero, C., & Brenes, M. Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: Correlation with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(14), (2006). 4954–4961.

[42] Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N., & Saija, A. On the in vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(8), (1999). 971–974.

- [43] Brenes, M., Medina, E., Romero, C., & de Castro, A. Antimicrobial activity of olive oil. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 18, (2007). 6–8.
- [44] Yangui, T., Dhouib, A., Rhouma, A., & Sayadi, S. Potential of hydroxytyrosol– rich composition from olive mill wastewater as a natural disinfectant and its effect on seeds vigour response. *Food Chemistry*, 117(1), (2009). 1–8.
- [45] Pauwels, E. K. J. The Mediterranean diet, part III: Compounds, components and considerations in relation to the risk of type 2 diabetes. *Drugs Future*, 34(11), (2009). 903.
- [46] Jemai, H., El Feki, A., & Sayadi, S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan–diabetic rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), (2009). 8798–8804.
- [47] Poudyal, H., Campbell, F., & Brown, L. Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate–, high fat–fed rats. *Journal of Nutrition*, 140(5), (2010). 946–953.
- [48] Hamden, K., Allouche, N., Jouadi, B., El-Fazaa, S., Gharbi, N., Carreau, S., et al. Inhibitory action of purified hydroxytyrosol from stored olive mill waste on intestinal disaccharidases and lipase activities and pancreatic toxicity in diabetic rats. *The Food Science and Biotechnology*, 19(2), (2010). 439–447.
- [49] Berr, C., Portet, F., Carriere, I., Akbaraly, T. N., Feart, C., Gourlet, V., et al. Olive oil and cognition: Results from the three–city study. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 28(4), (2009). 357–364.
- [50] Scarmeas, N., Stern, Y., Tang, M. X., Mayeux, R., & Luchsinger, J. A. Mediterranean diet and risk for Alzheimer’s disease. *Annals of Neurology*, 59(6), (2006). 912–921.
- [51] Wu, Y. T., Lin, L. C., & Tsai, T. H. Measurement of free hydroxytyrosol in microdialysates from blood and brain of anesthetized rats by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1216(16), (2009). 3501–3507.
- [52] Bazoti, F. N., Bergquist, J., Markides, K., & Tsiropoulos, A. Noncovalent interaction between amyloid– $\beta$ –peptide (1–40) and oleuropein studied by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17(4), (2006). 568–575.
- [53] De Lucia M, Panzella L, Pezzella A, Napolitano A, & D’Ischia M. Plant catechols and their S–glutathionyl conjugates as antinitrosating agents: expedient synthesis and

remarkable potency of 5-S-Glutathionylpiceatannol Chem Res Toxicol 21: (2008) 2407–2413.

[54] Lee-Huang S, Lin Huang P, Zhang D, Wook Lee J, Bao J, Sun Y, et al. Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part I. Integrase inhibition. Biochem Biophys Res Commun 354: (2007a) 872–878.

[55] Lee-Huang S, Lin Huang P, Zhang D, Wook Lee J, Bao J, Sun Y, et al. Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part II. Integrase inhibition. Biochem Biophys Res Commun. 354: (2007b) 879–884.

[56] Lee-Huang S, Huang PL, Huang PL, Zhang D, Zhang JZH, Chang YT, et al. Compositions and methods for treating obesity, obesity related disorders and for inhibiting the infectivity of human immunodeficiency virus. US Pat Appl Publ US 20090061031 A1 20090305. (2009)

[57] Gómez-Acebo E, Alcami Pertejo J, & Aunon Calles D. Topical use of hydroxytyrosol and derivatives for the prevention of HIV infection. Pat. Appl. Publ. WO 2011067302 A1. (2011)

[58] Hagiwara K, Goto T, Araki M, Miyazaki H, & Hagiwara H. Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. Eur J Pharmacol 662: (2011) 78–84.

[59] Bernini R, Mincione E, Barontini M, & Crisante F. Convenient synthesis of hydroxytyrosol and its lipophilic derivatives from tyrosol or homovanillyl alcohol. J Agric Food Chem 56: (2008b) 8897–8904

[60] Bouallagui Z, Bouaziz M, Lassoued S, Engasser JM, Ghoul M, Sayadi S. Hydroxytyrosol acyl esters: biosynthesis and activities, Appl Biochem Biotechnol. 2011 Mar

[61] Madrona A, Pereira-Caro G, Mateos R, Rodríguez G, Trujillo M, Fernández-Bolaños J, et al. Synthesis of hydroxytyrosyl alkyl ethers from olive oil waste waters. Molecules, 14: (2009) 1762–1772.

[62] Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N., & Saija, A. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 51, (1999). 971–974.

[63] Bitler, C. M., Viale, T. M., Damaj, B., & Crea, R. Hydrolyzed olive vegetation water in mice has anti-inflammatory activity. Journal of Nutrition, 135(2005),1475–1479.

[64] Visioli, F., Bellomo, G., Montedoro, C., & Galli, C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. Atherosclerosis, 117, (1995). 25–32.

[65] Manna, C., Galletti, P., Cucciolla, V., Moltedo, O., Leone, A., & Zappia, V. The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)ethanol counteracts



reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in caco-2-cells. *Journal of Nutrition*, 127, (1997). 286–292

[66] Alcudia, F., Cert, A., Espartero, J. L., Mateos, R., & Trujillo, M. (2004). Method of preparing hydroxytyrosyl esters, esters thus obtained and use of same. PCT WO 2004

[67] Trujillo, M., Mateos, R., Collantes de Teran, L., Espartero, J. L., Cert, R., Jover, M., et al. Lipophilic hydroxytyrosyl esters. Antioxidant activity in lipid matrices and biological systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, (2006). 3779–3785.

[68] José G. Fernández-Bolaños, Óscar López, M. Ángeles López-García and Azucena Maset Biological Properties of Hydroxytyrosol and Its Derivatives, University of Seville Spain

[69] Gema Pereira-Caro, Andrés Madrona , Laura Bravo, José Luis Espartero, Felipe Alcudia ,Arturo Cert , Raquel Mateos, Antioxidant activity evaluation of alkyl hydroxytyrosyl ethers, a new class of hydroxytyrosol derivatives, *Food Chemistry* 115 (2009) 86–91

[70] Gema Pereira-Caro, Beatriz Sarriá, Andres Madrona, José Luis Espartero, Luis Goya, Laura Bravo, and Raquel Mateos J. Agric Alkyl Hydroxytyrosyl Ethers Show Protective Effects Against Oxidative Stress in HepG2 Cells ,2011.

[71] Pereira-Caro, G.; Madrona, A.; Espartero, J.L.; Escuderos, M.E.; Bravo, L.; Mateos, R. In vitro availability of hydroxytyrosol, hydroxytyrosyl acetate and lipophilic hydroxytyrosyl derivatives: alkyl hydroxytyrosyl ethers. *J. Func. Foods*. In press.

[72] Pereira-Caro, G.; Mateos, R.; Saha, S.; Madrona, A.; Espartero, J.L.; Bravo, L.; Kroon, P.A. Transepithelial transport and metabolism of new lipophilic ether derivatives of hydroxytyrosol by enterocyte-like Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 11501- 11509

[73] Pereira-Caro, G.; Bravo, L.; Madrona, A.; Espartero, J.L.; Mateos, R. Uptake and metabolism of new synthetic lipophilic derivatives, hydroxytyrosyl ethers, by human hepatoma HepG2 cells. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 798-806.

[74] Martín, M.A.; Ramos, S.; Granado-Serrano, A.B.; Rodríguez-Ramiro, I.; Trujillo, M.; Bravo, L.; Goya, L. The olive oil phenol hydroxytyrosol induces antioxidant/detoxicant enzymes activity and Nrf2 translocation via ERKs and PI3K/AKT pathways in HepG2 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 2010, 54, 1-11.

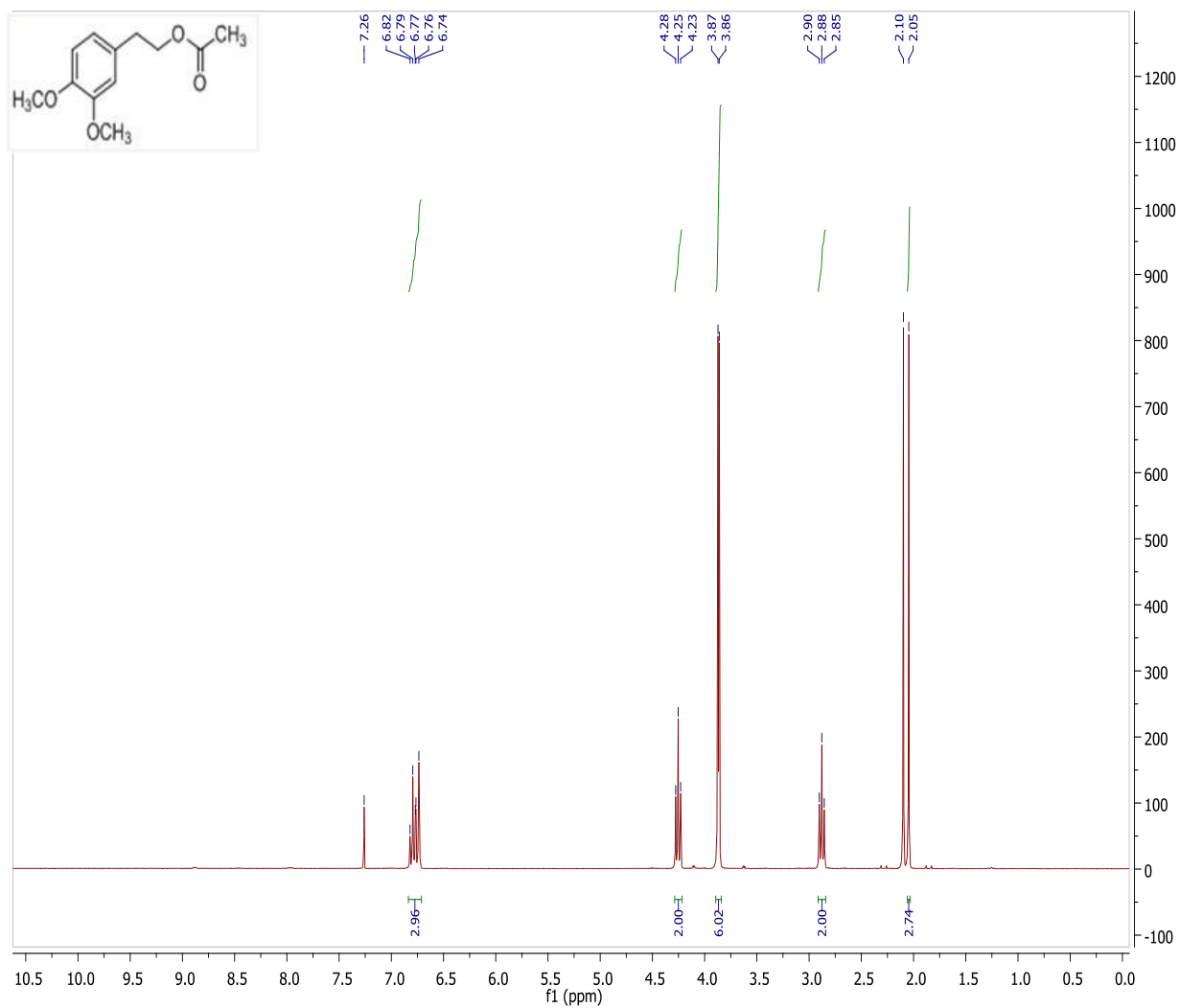
[75] Lima, C.F.; Fernandes-Ferreira, M.; Pereira-Wilson, C. Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. *Life Science*, 2006, 79, 2056-2068.

[76] Brenes, M.; Garcia, A.; Garcia, P.; Rios, J. J.; Garrido, A. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 1999,47, 3535–3540.

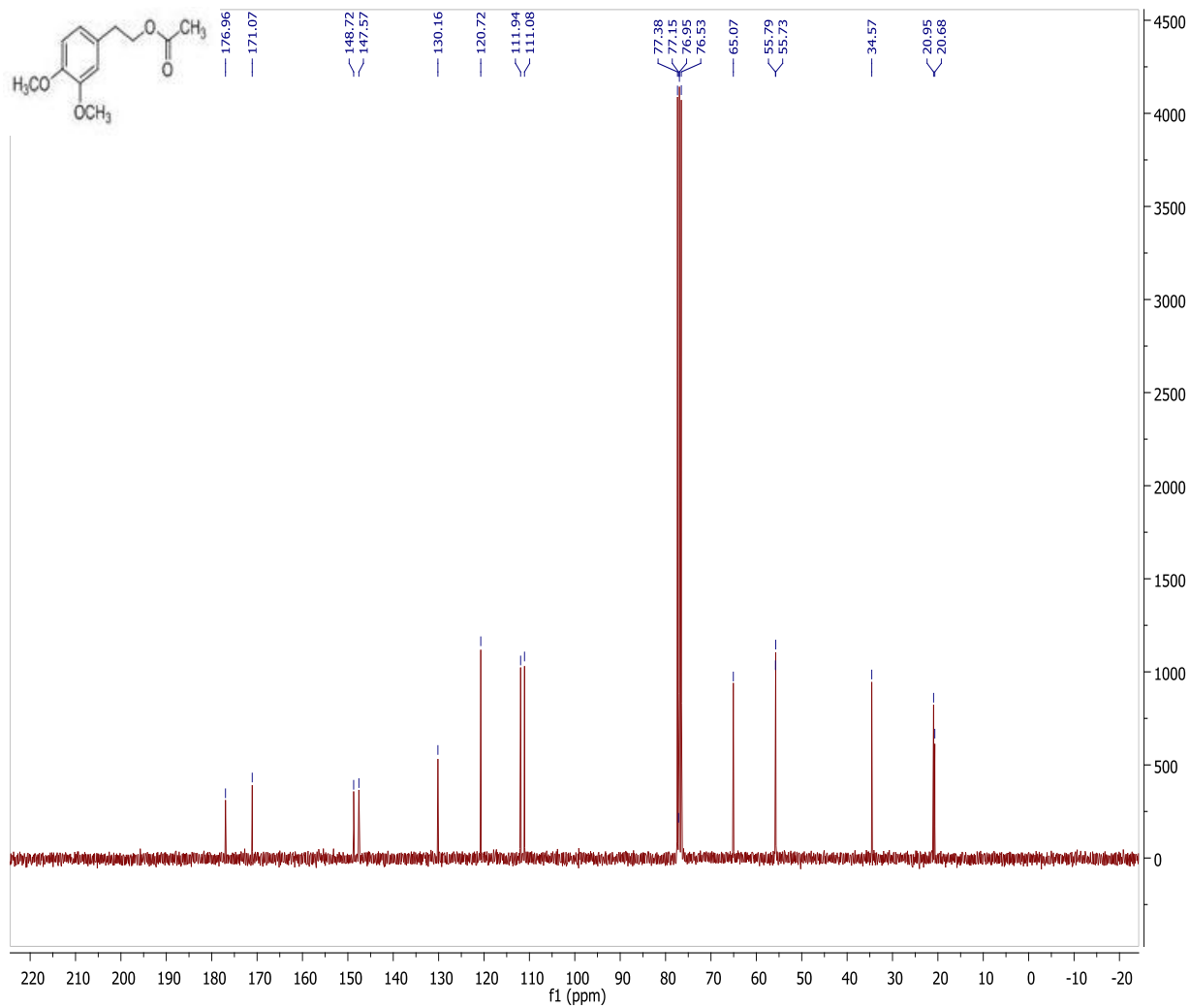
- [77] Gordon, M. H.; Paiva-Martins, F.; Almeida, M. Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 2480–2485
- [78] Pignataro, B.; Sardone, L.; Marletta, G. Self-organizing fiberlike nanostructures and wrapping-up processes in Langmuir-Blodgett films
- [79] Bernini R, Mincione E, Barontini M, & Crisante, F. Method for preparing hydroxytyrosol and hydroxytyrosol derivatives. PCT/IB2008/000598. (2008c)
- [80] Grasso S, Siracusa L, Spatafora C, Renis M, & Tringali C. Hydroxytyrosol lipophilic analogues: Enzymatic synthesis, radical scavenging activity and DNA oxidative damage protection. *Bioorg Chem* 35: (2007) 137–152.
- [81] Torres de Pinedo A, Peñalver P, Rondón P & Morales JC. Efficient lipase-catalyzed synthesis of new lipid antioxidants based on a catechol structure. *Tetrahedron* 61: (2005) 7654–7660.
- [82] Mateos R, Trujillo M, Pereira-Caro G, Madrona A, Cert A, & Espartero JL. New lipophilic tyrosyl esters. Comparative antioxidant evaluation with hydroxytyrosyl esters. *J Agric Food Chem* 56: (2008) 10960–10966.
- [83] Buisman GJH, van Helteren CTW, Kramer GFH, Veldsink JW, Derksen JTP, & Cuperus FP. Enzymatic esterifications of functionalized phenols for the synthesis of lipophilic antioxidants. *Biotechnol Lett* 20: (1998) 131–136.
- [84] Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Rosignoli, P., Servili, M., Montedoro, G. F., & Morozzi, G. *European Journal of Cancer Prevention*, 11, (2002). 351–358.
- [85] Correa, J. A., López-Villodres, J. A., Asensi, R., Espartero, J. L., Rodríguez-Gutiérrez, G., & De La Cruz, J. P. *The British Journal of Nutrition*, 101, (2009). 1157–1164.
- [86] Guiso, M., Marra, C. & Cavarischia, C. Isochromans from 2-(3,4-dihydroxy)phenylethanol. *Tetrahedron Lett* 42: (2001) 6531–6534.
- [87] Bianco, A., Coccioli, F., Guiso, M. & Marra, C. The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: hydroxy-isochromans. *Food Chem.* 77: (2001) 405–411.
- [88] Khymenets O, Joglar J, Clapés P, Parella T, Covas M-I, & de la Torre R. Biocatalyzed synthesis and structural characterization of monoglucuronides of hydroxytyrosol, tyrosol homovanillic alcohol and 3-(4'-hydroxyphenyl)propanol. *Adv Synth Catal* 34: (2006) 2155–2162.

- [89] Khymenets O, Fito M, Taurino S, Muñoz-Aguayo D, Pujadas M, Torres JL, et al. Antioxidant activities of hydroxytyrosol main metabolites do not contribute to beneficial health effects after olive oil ingestion. *Drug Metab Dispos* 38: (2010) 1417–1421
- [90] Lucas R, Alcantara D, & Morales JC. A concise synthesis of glucuronide metabolites of urolithin-B, resveratrol and hydroxytyrosol. *Carbohydr Res* 344: (2009) 1340–1346.
- [91] Bianco A, Mazzei RA, Melchioni C, Romeo G, Scarpati ML, Soriero A, et al. Microcomponents of olive oil III. Glucosides of 2(3,4-dihydroxy-phenyl)ethanol. *Food Chem* 63, (1998) 461–464
- [92] Medina E, Brenes M, Romero C, Garcia A, & de Castro A. Main antimicrobial compounds in table olives. *J Agric Food Chem* 55: (2007) 9817–98.
- [93] Bernini R, Cacchi S, Fabrizi G, & Filisti E. 2-Arylhydroxytyrosol derivatives via Suzuki-Miyaura cross-coupling. *Org Lett*, 10: (2008a) 3457–3460.
- [94] López-García MÁ, López Ó, Maya I, & Fernández-Bolaños JG. Complexation of hydroxytyrosol with  $\beta$ -cyclodextrins: an efficient photoprotection. *Tetrahedron* 66: (2010) 8006–8011.
- [95] Rescifina A, Chiacchio U, Iannazzo D, Piperno A, & Romeo G. Cyclodextrin and caffeine complexes with natural polyphenols from olive and olive oils: NMR, thermodynamic, and molecular modeling studies. *J Agric Food Chem* 58: (2010) 11876–11882.
- [96] S.Amondella, L.Mosca, P.Bovicelli, *ARKIVOC* 2008(viii) 105
- [97] Garcia-Campana A.M., Bayens W. R. G., Historical evolution of chemiluminescence. In 'Chemiluminescence in Analytical Chemistry'. Marcel Dekker. New York, 2001

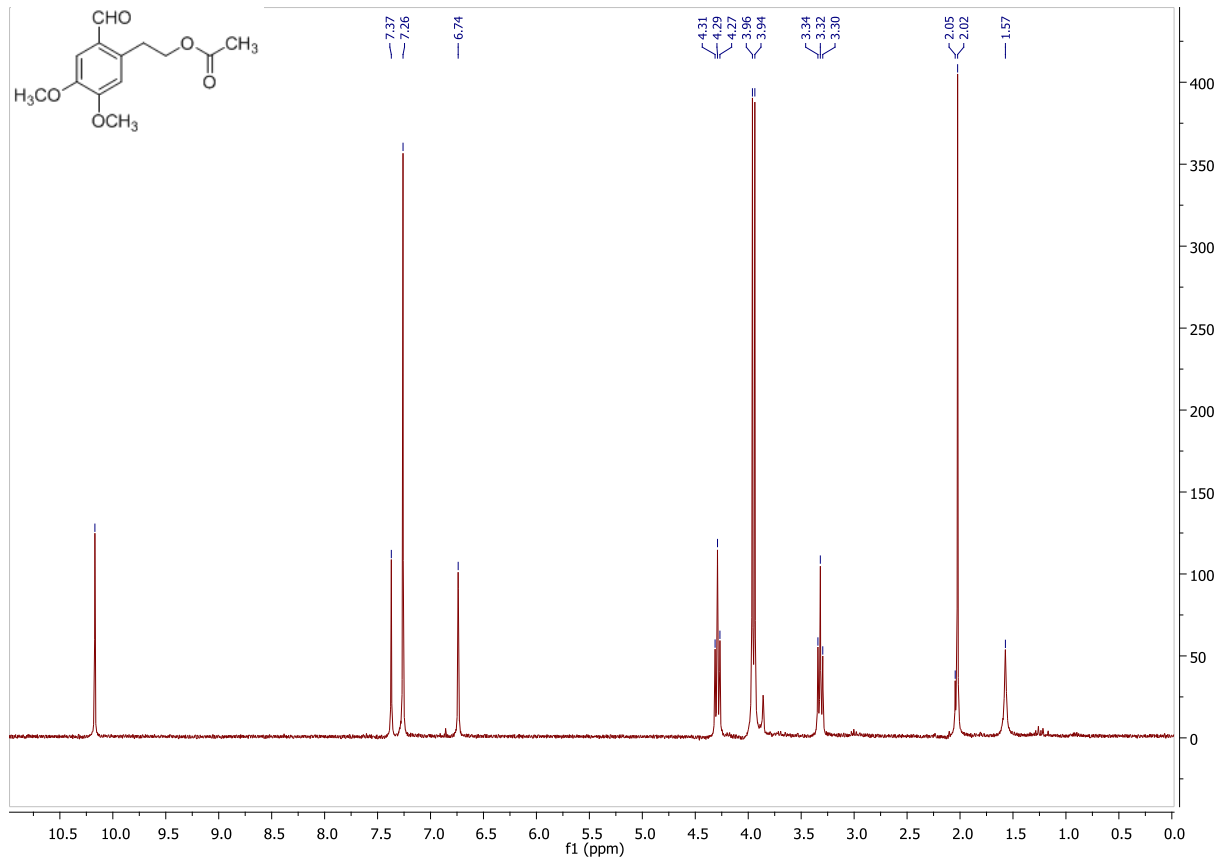
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



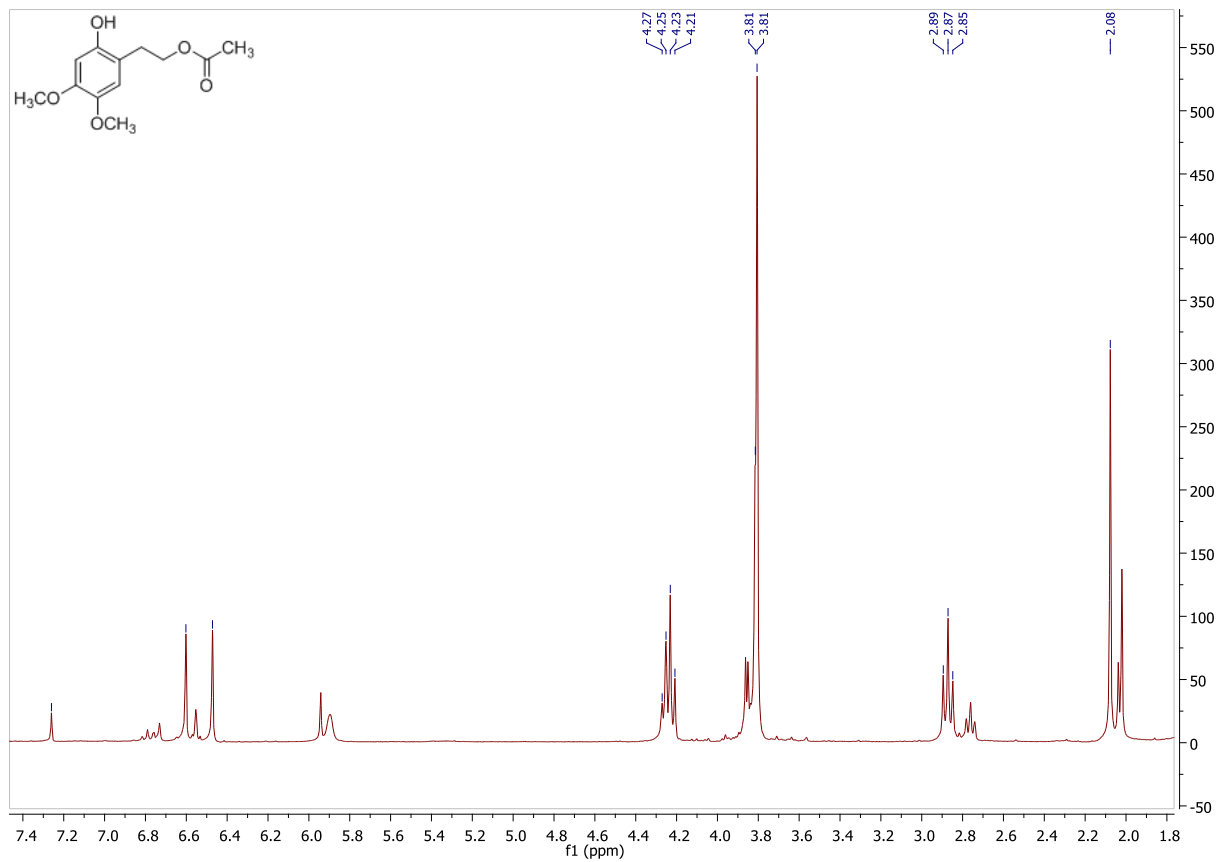
Εικόνα 8 . Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) του οξικού 3,4-διμεθοξυ-φαιλαιθυλεστέρα (2)



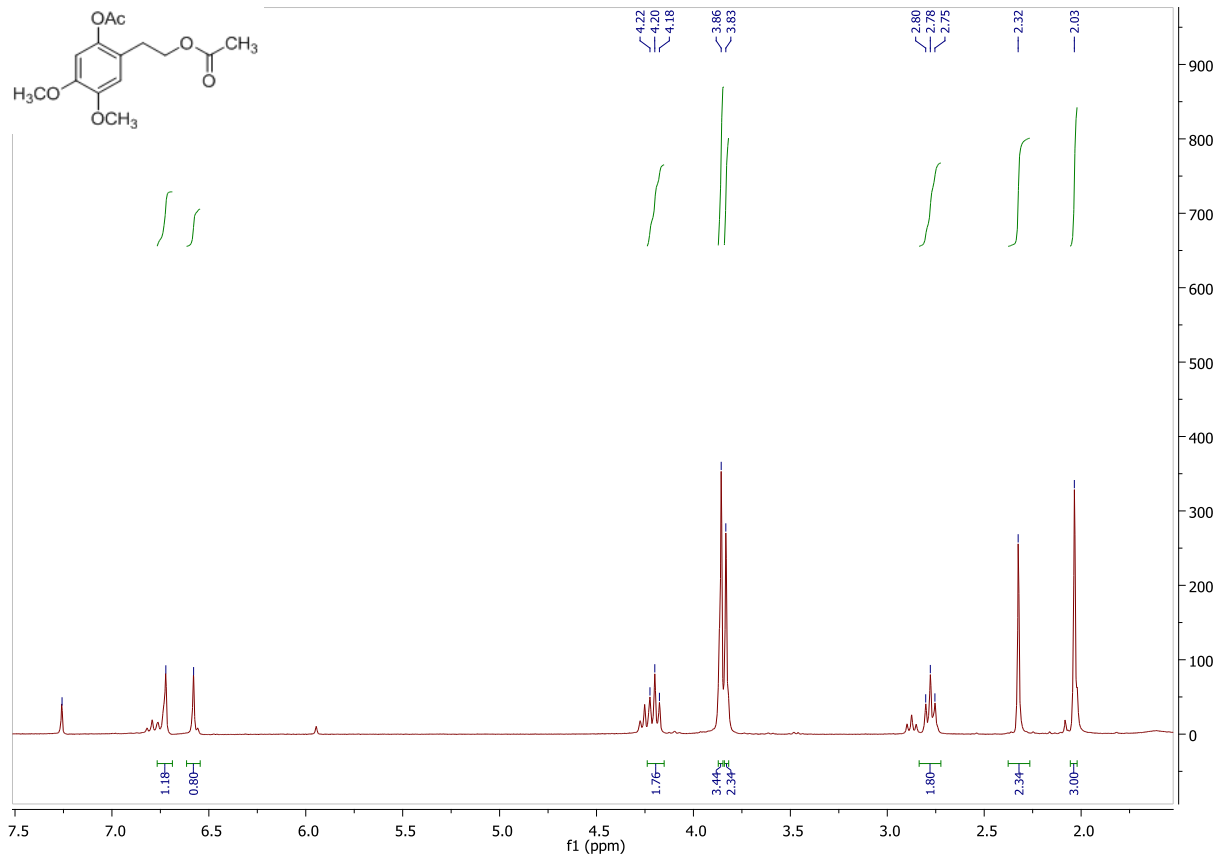
Εικόνα 9 . Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) του οξικού 3,4-διμεθοξυ-φαιλαιθυλεστέρα (2)



Εικόνα 10 . Φάσμα <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) του οξικού 2-φορμυλο-4,5-διμεθοξυφαιναιθυλετέρα (**3**)

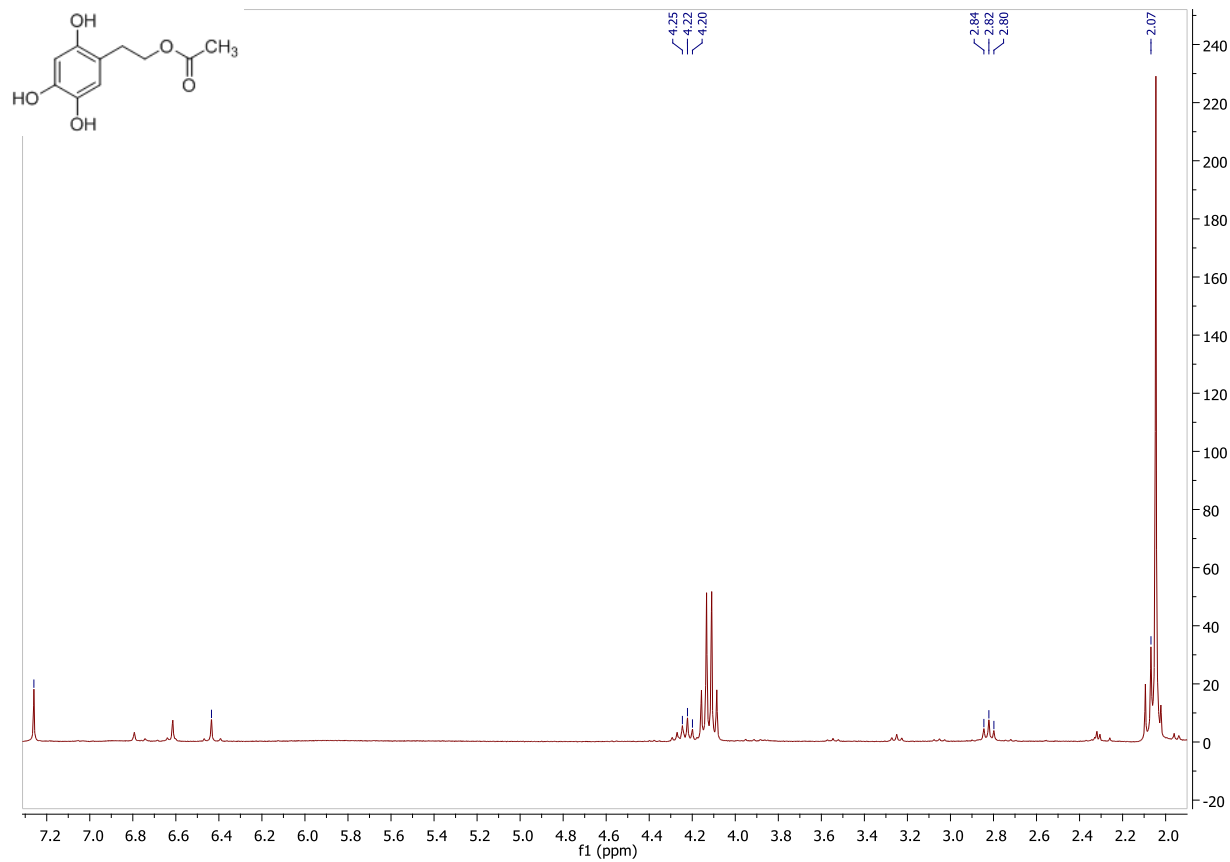


Εικόνα 11 . Φάσμα <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) του οξικού 2-υδροξυ-4,5-διμεθοξυ-φαιραιθυλεστέρα (4)

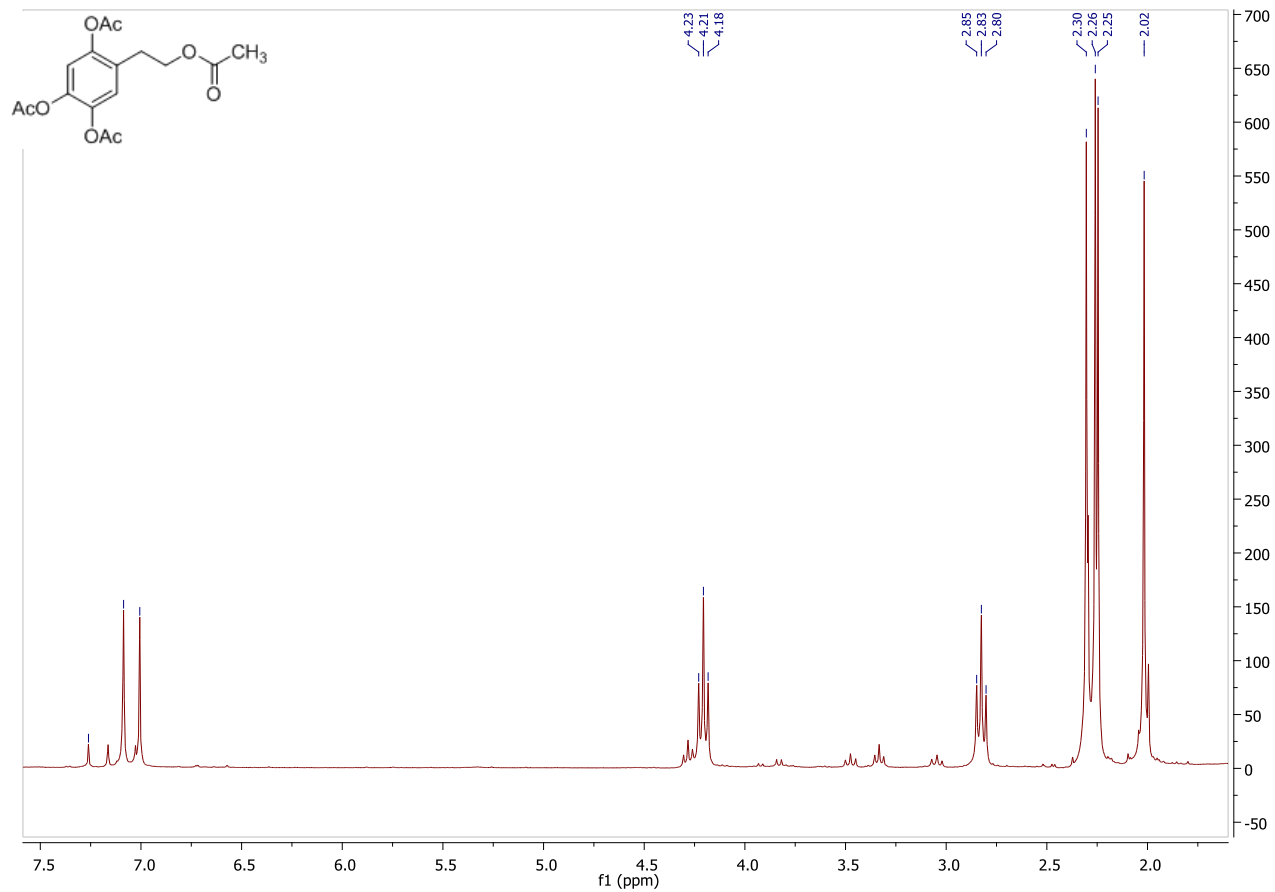


Εικόνα 12 . Φάσμα <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) του οξικού 2-ακετοξυ-4,5 διμεθοξυφαιναιθυλεστέρα (5)

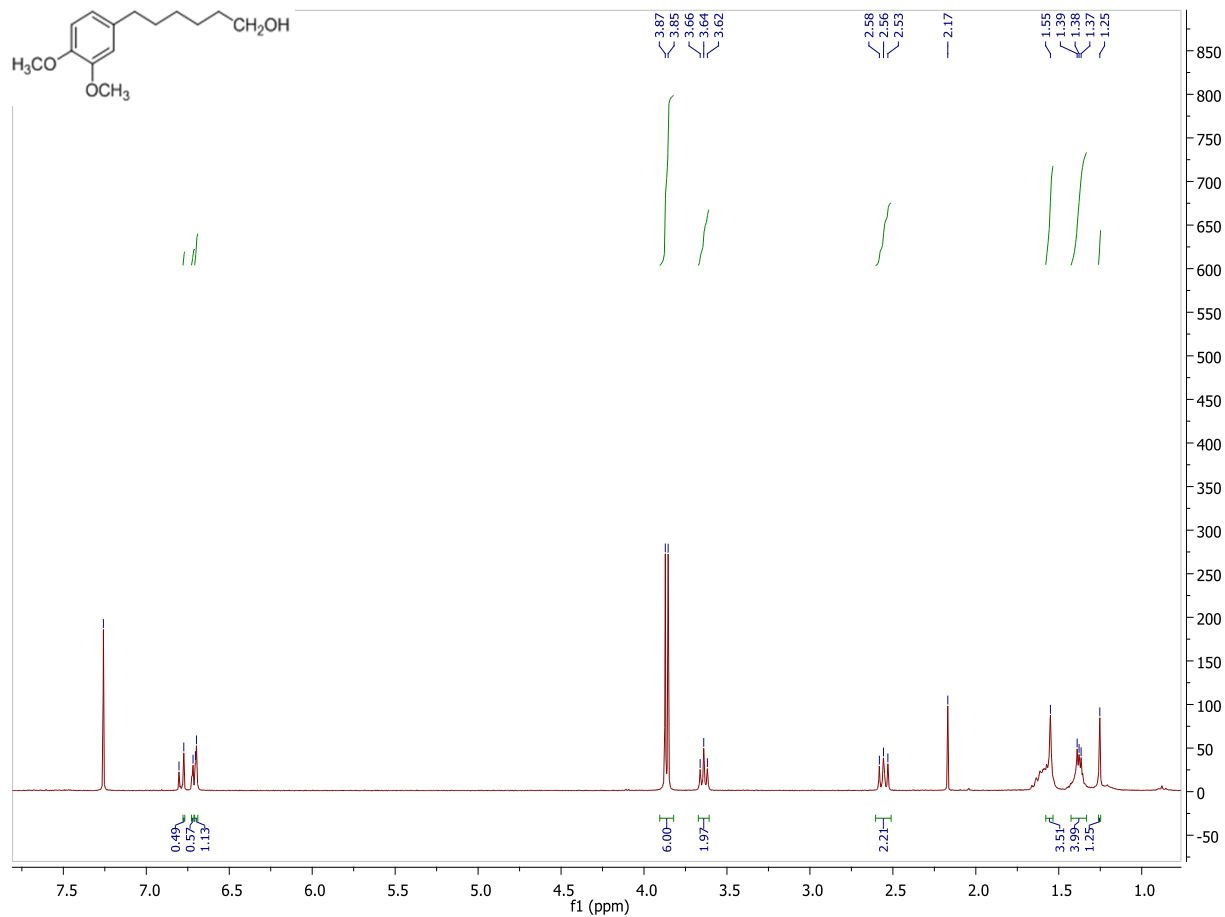




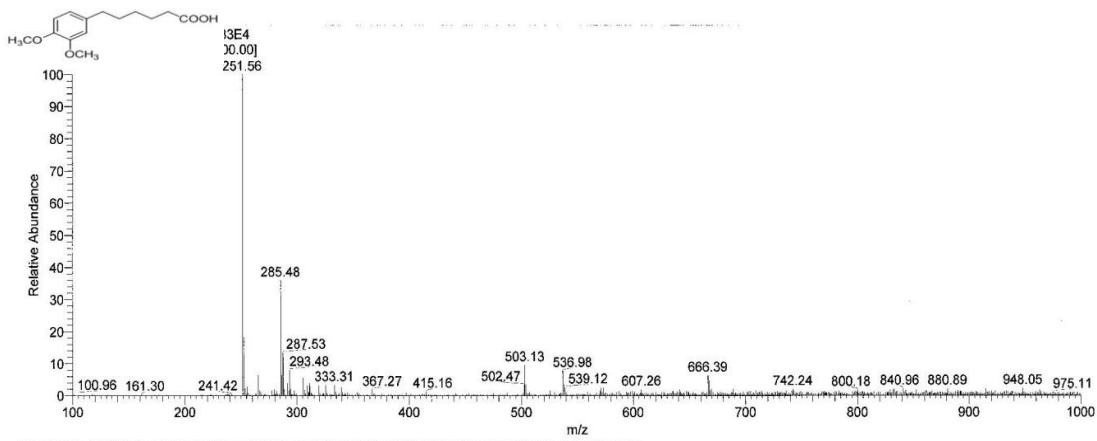
Εικόνα 13 . Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) του οξικού 2,4,5-τριϋδροξυφαιλαιθυλεστέρα (**6**)



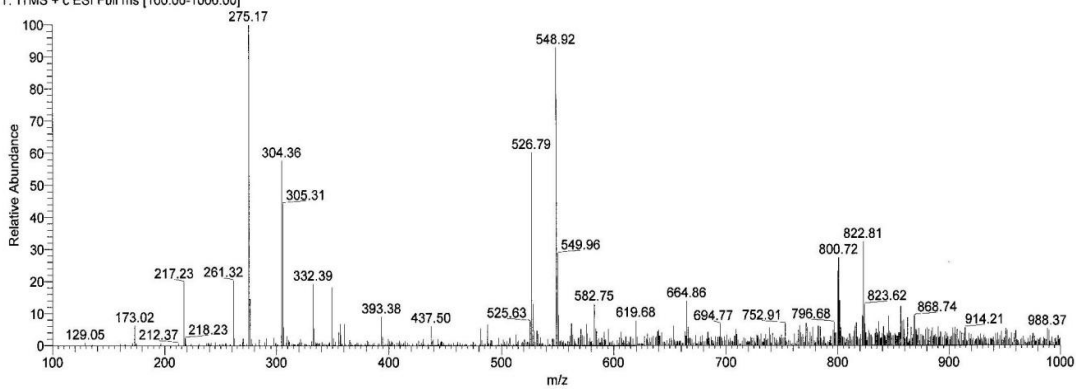
Εικόνα 14 . Φάσμα <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) της τετρακετυλιωμένης 2,5-υδροξυτυροσόλης (**7**)



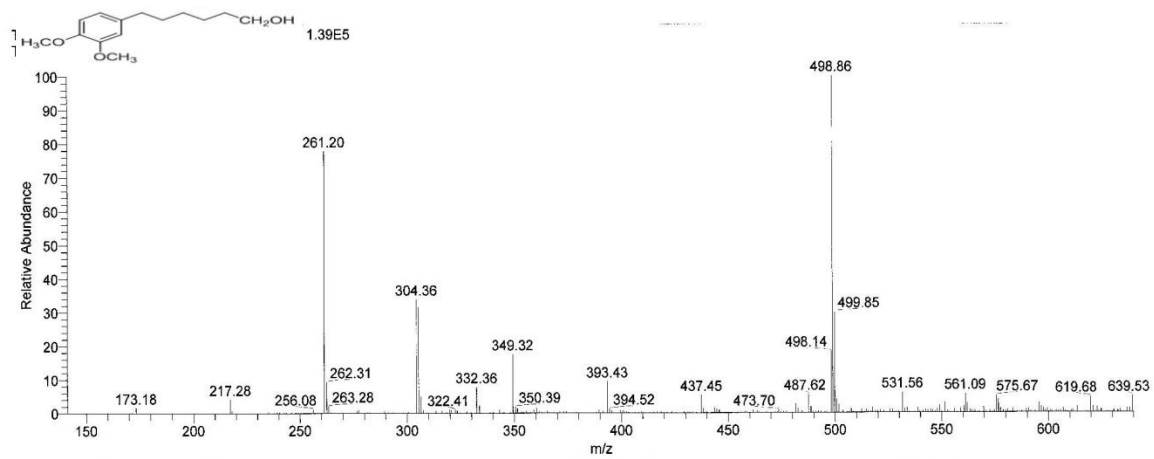
Εικόνα 15. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) της 6-(3,4- διμεθοξυφαινυλ)εξαν-1-όλη (12)



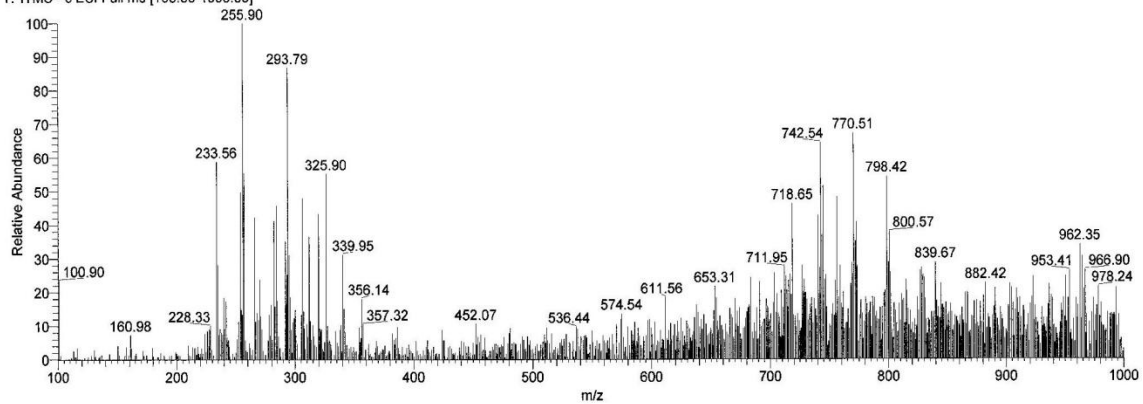
TE18 #80 RT: 0.82 AV: 1 NL: 4.90E4  
 T: ITMS + c ESI Full ms [100.00-1000.00]



Εικόνα 16. Φάσμα μάζας (ESI-MS) του 6-(3,4-διμεθοξυφαινυλ)εξανοϊκού οξέος (11)



TE19\_TLC-3rd-spot #24 RT: 0.24 AV: 1 NL: 7.67E2  
 T: ITMS - c ESI Full ms [100.00-1000.00]



Εικόνα 17. Φάσμα μάζας (ESI-MS) 6-(3,4- διμεθοξυφαινυλ)εξαν-1-όλη (12)