ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ (Ι) ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Σύνθεση νέων βενζυλόξυ – αναλόγων χαλκονών και ωρονών και μελέτη της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους ικανότητάς τους

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Άλκηστις Τζιόλα – Μπάρα

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ

Δρ. Αναστασία Δέτση

Επίκουρος Καθηγήτρια ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ 2016

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η σύνθεση και η μελέτη της φαρμακευτικής δράσης δύο κατηγοριών χημικών ενώσεων. Ειδικότερα, συντέθηκαν τέσσερεις χαλκόνες και τρεις ωρόνες, των οποίων η δομή και η καθαρότητα εξετάστηκαν μέσω φασματοσκοπίας NMR ^{1}H και φασματοσκοπία μάζας, και μελετήθηκαν για ενδεχόμενη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.

Οι χαλκόνες και οι ωρόνες αποτελούν υποκατηγορίες των φυσικών φλαβονοειδών. Οι χαλκόνες σχηματίζονται στο πρώτο στάδιο του βιοσυνθετικού μονοπατιού, και μέσω της συνθάσης της ωρεοσιδίνης κυκλοποιούνται σε ωρόνες. Ο δομικός σκελετός των χαλκονών αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους (A και B) που συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός α,β –ακόρεστου καρβονυλικού δεσμού τριών ανθράκων. Αντίστοιχα, τα μόρια των ωρονών περιλαμβάνουν ένα ετεροκυκλικό σύστημα βενζοφουρανίου συνδεδεμένο με μια βενζυλιδενο –ομάδα στη θέση 2. Και οι δύο κατηγορίες φλαβονοειδών παρουσιάζουν μία ποικιλία βιολογικών δράσεων που τις καθιστά ελκυστικές για τη σύνθεση νέων αναλόγων με φαρμακευτική δράση.

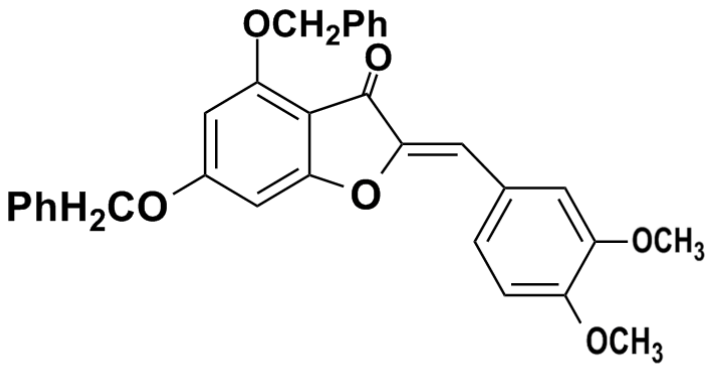
Η παρούσα εργασία βασίστηκε στη σύνθεση, μέσω της αντίδρασης συμπύκνωσης Claisen-Schmidt, αναλόγων χαλκονών που περιείχαν βενζυλόξυ –ομάδες στις θέσεις 4′ και 6′ του δακτυλίου A και διάφορους υποκαταστάτες στη θέση 3 και 4 του δακτυλίου B. Οι χαλκόνες που παρασκευάστηκαν αποτέλεσαν τις αρχικές ενώσεις για τη σύνθεση των αντίστοιχων ωρονών, μέσω της αντίδρασης της οξειδωτικής κυκλοποίησης, στις οποίες διατηρήθηκαν οι δύο βενζυλόξυ –ομάδες στον A δακτύλιο και η θέση των υποκαταστατών στο B.

Όλα τα προϊόντα που παρσκευάσθησαν μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση, μέσω της εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών του DPPH και της αναστολής της λιπιδικής υπεροξείδωσης με AAPH, και την αντιφλεγμονώδη ικανότητα, μέσω της αναστολής της λιποξυγονάσης από σόγια.

Τα σημαντικότερα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτή τη μελέτη ήταν τα εξής:

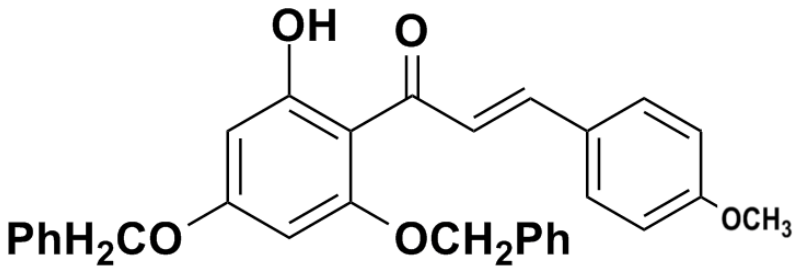
- Η σύνθεση των χαλκονών και των ωρονών ήταν απλή και σε ικανοποιητικές αποδόσεις. Ωστόσο δεν ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητική η καθαρότητά τους καθώς, ακόμα και μετά από ανακρυστάλλωση, κάποια προϊόντα έφεραν ίχνη των αντιδραστηρίων, όπως φάνηκε από τη φασματοσκοπική ανάλυση ^{1}H NMR.

- Οι χαλκόνες και οι ωρόνες μπορούν να τροποποιηθούν δομικά με μεγάλη ποικιλία υποκαταστατών, δημιουργώντας ενώσεις με διαφορετική βιολογική δραστικότητα.
- Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση μέσω της εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών του DPPH, κανένα από τα προϊόντα δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Αυτή η συμπεριφορά ήταν μάλλον αναμενόμενη καθώς ο μηχανισμός εξουδετέρωσης στηρίζεται στην ύπαρξη ελεύθερων υδροξυλικών ομάδων στα αντιοξειδωτικά, χαρακτηριστικό που δεν έφεραν τα προϊόντα.
- Όσον αφορά τη βέλτιστη αντιοξειδωτική δράση μέσω της λιπιδικής υπεροξείδωσης με AAPH, την είχε η ωρόνη **(13)**, η οποία διαθέτει βενζυλόξυ –ομάδες στις θέσεις 4 και 6 του A δακτυλίου και μεθόξυ –ομάδες στις θέσεις 3′ και 4′ του B δακτυλίου. Όλα όμως τα προϊόντα είχαν καλύτερη αντιοξειδωτική συμπεριφορά, από εκείνη του δείγματος αναφοράς..



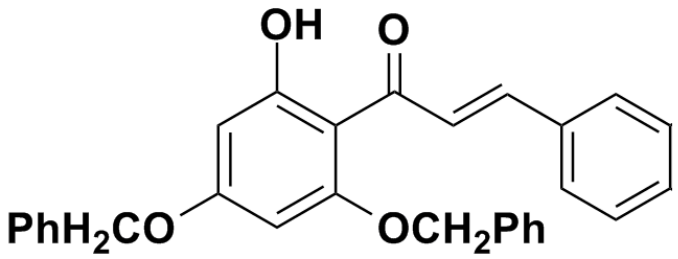
*Σχήμα 1: Χημικός τύπος της ωρόνης **(13)***

- Η αντιοξειδωτική δράση των προϊόντων επηρεάζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό από τη θέση των υποκαταστατών τους, παρά από το είδος τους.
- Τη βέλτιστη αντιφλεγμονώδη δράση την παρουσίασε η χαλκόνη **(10)** ή οποία διαθέτει βενζυλόξυ –ομάδες στις θέσεις 4′ και 6′ του A δακτυλίου και μία μεθόξυ –ομάδα στη θέση 4 του B δακτυλίου.

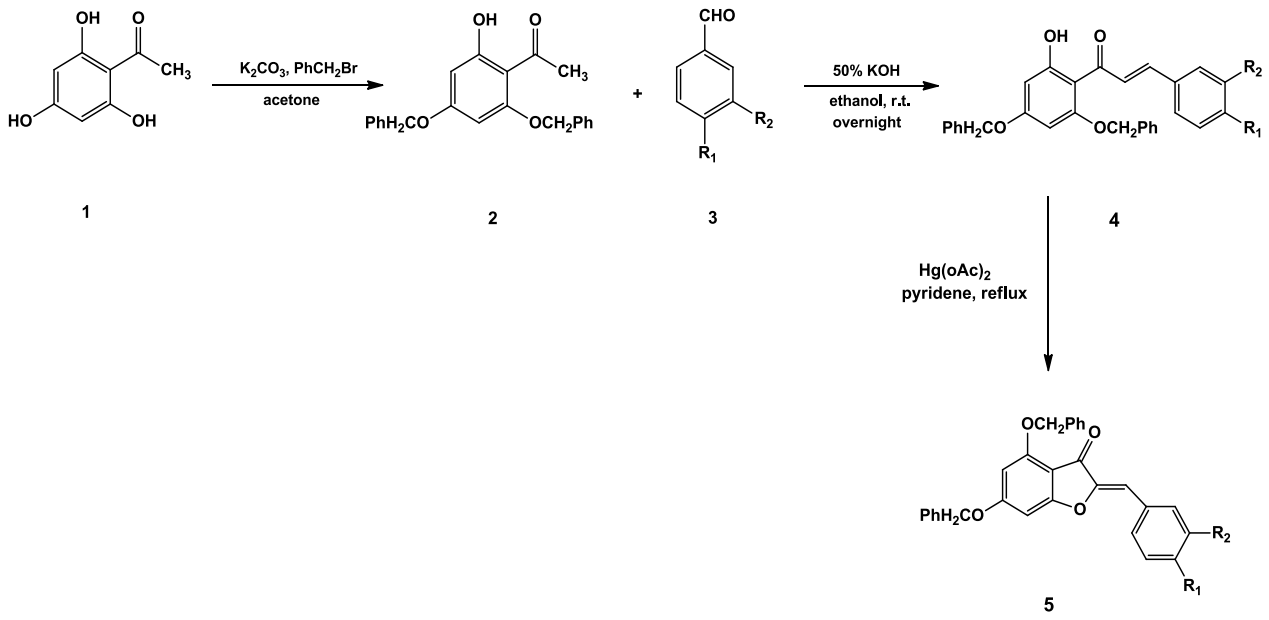


*Σχήμα 2: Χημικός τύπος της χαλκόνης **(10)***

- Η αντιφλεγμονώδης δράση των προϊόντων επηρεάζεται περισσότερο από τη θέση των υποκαταστατών και όχι από το πλήθος τους.
- Συνδυαστικά, την καλύτερη δράση την είχε η χαλκόνη **(7)**.



*Σχήμα 3: Χημικός τύπος της χαλκόνης **(7)***



Σχήμα 4: Το σύνολο των αντιδράσεων που έλαβαν χώρα στην παρούσα εργασία

Επιστημονική Περιοχή: Οργανική σύνθεση βιοδραστικών αναλόγων φυσικών προϊόντων

Λέξεις Κλειδιά: χαλκόνες, ωρόνες, Claisen-Schmidt, οξειδωτική κυκλοποίηση, αντιοξειδωτική δράση, αντιφλεγμονώδης δράση

Abstract

The aim of the current thesis was the synthesis of two categories of compounds and the study of their pharmaceutical activity. In particular, there were synthesized four new analogues of chalcones and three of aurones; their structure was identified via ^{1}H NMR and mass spectroscopy, and they were studied as for their potential antioxidant and anti-inflammatory ability.

Chalcones and aurones consist subcategories of natural flavonoids. Chalcones are created in the first step of the biosynthetic path of flavonoids, and via aureosidin synthase, they are cyclized into aurones. The structural backbone of chalcones includes two aromatic rings (A and B) and an α,β –unsaturated carbonyl chain of three carbons. Respectively, the molecules of aurones are consisted of an eterocyclic benzofuranic system attached to a benzyliden group in position 2. Both chalcones and aurones have presented a variety of biological activities, which makes them an attractive starting point for the chemical synthesis of new analogues with pharmaceutical activity.

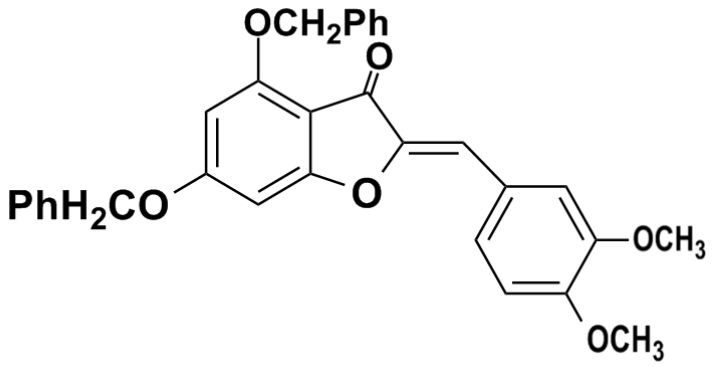
The current thesis is based in the synthesis of new chalcone analogues, through Claisen –Schmidt condensation, which carried benzyloxy –groups in the positions 4' and 6' of A ring and several substituents in the positions 3 and 4 of B ring. The synthesized chalcones were transformed into the respective aurones, through oxidative cyclization, preserving the benzyloxy –groups A ring and the position of the substituents in B ring.

All synthesized products were studied for their antioxidant activity, by scavenging the free radicals of DPPH and inhibiting the lipid peroxidation with AAPH, and their anti-inflammatory activity, by inhibiting soy lipoxygenase's action.

Main results from the aforementioned study are summed below:

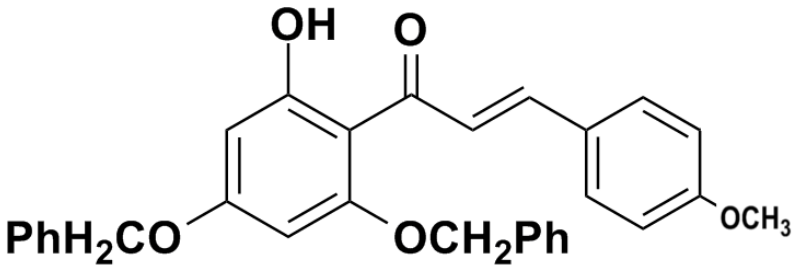
- The chemical synthesis of chalcones and aurones was simple and with of satisfactory yields. Nevertheless, the purity of the products was not the desired, even after applying purification methods like recrystallization, fact which confirmed by the ^{1}H NMR spectra.
- Chalcones and aurones can be modifies structurally with a variety of substituents, aiming to creating compounds with various biological potency.
- Regarding their antioxidant activity by scavenging free radicals of DPPH, none of the products presented notable results. This behavior was mostly expected, since it is required the presence of free hydroxyl groups in the antioxidants for the inactivation of DPPH free radicals, which was missing in the synthesized products.

- Regarding the antioxidant activity by inhibiting lipid peroxidation with AAPH, the aurone **(13)** presented the optimum results, with two benzyloxy groups in 4 and 6 positions in A ring and two methoxy groups in 3′ and 4′ positions in B ring. Yet, all the products presented better antioxidant activity than the reference sample.



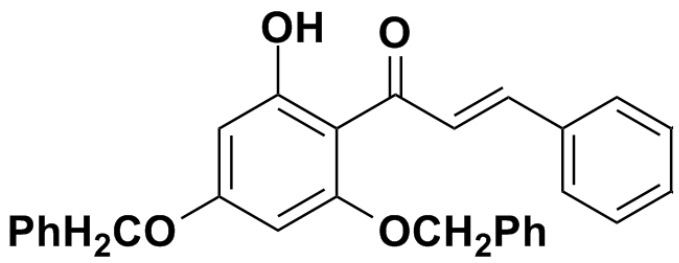
*Σχήμα 5: Chemical structure of aurone **(13)***

- The antioxidant activity of the products is influenced more by the position of the substituents than their species.
- Regarding the anti-inflammatory activity by inhibiting the soy lipoxygenase's action, the chalcone **(10)** presented the optimum results, which carried two benzyloxy groups in 4′ and 6′ positions in A ring and a methoxy group in 4′ group in B ring.

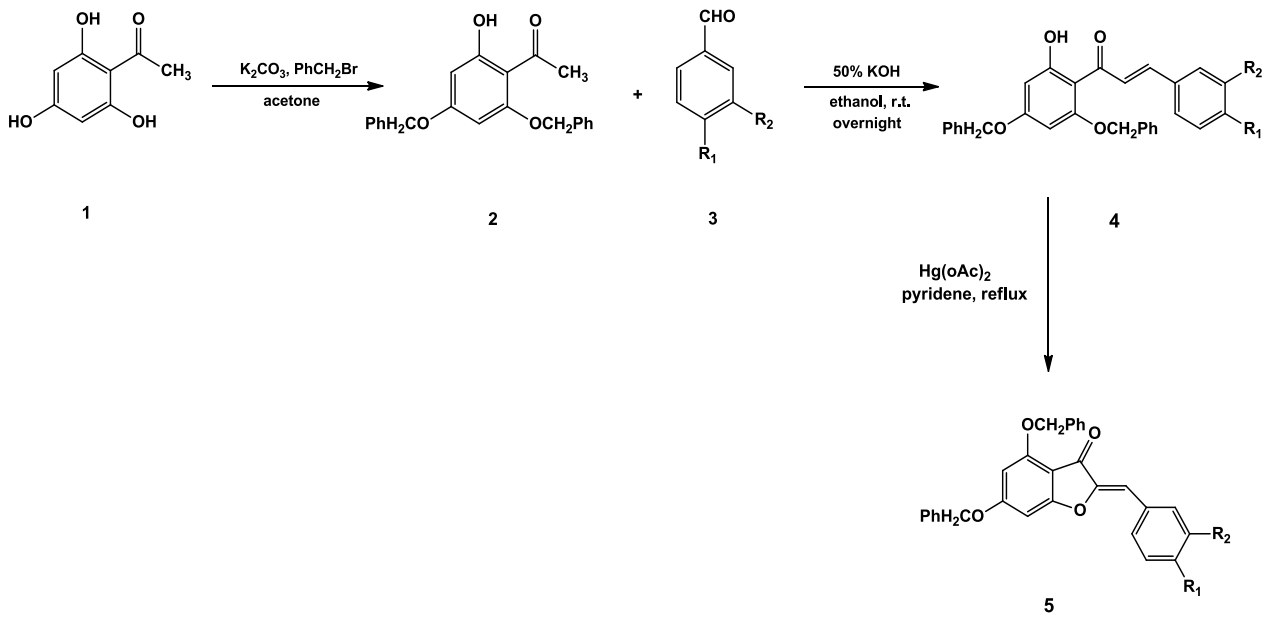


*Σχήμα 6: Chemical structure of chalcone **(10)***

- The anti-inflammatory activity of the products is influenced more by the position of the substituents than their number.
- Combining the two pharmaceutical activities that were studied, antioxidant and anti-inflammatory, the best results were presented by the natural chalcone **(7).**



*Σχήμα 7: Chemical structure of chalcone **(7)***



Σχήμα 8: The overall of chemical reactions which took place in the current thesis

Scientific Field: Organic synthesis of bioactive analogues of natural products

Keywords: chalcones, aurones, Claisen-Schmidt, oxidative cyclization, antioxidant activity, anti-inflammatory activity

Στον αδερφό μου,
Στέργιο

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ 12

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 3
ΔΟΜΙΚΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ 4
Ανθοκυανίνες 4
Φλαβανόνες 4
Φλαβόνες και Φλαβονόλες 5
Ισοφλαβονοειδή 6
Νεοφλαβονοειδή 7
Ήσσονα φλαβονοειδή 7
ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ 7
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ 9
Η ΒΕΝΖΥΛΟΞΥ-ΟΜΑΔΑ ΣΤΑ ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ 13
ΧΑΛΚΟΝΕΣ 17
Σύνθεση χαλκονών 18
Φαρμακευτική δράση των χαλκονών 22
ΩΡΟΝΕΣ 21
Σύνθεση ωρονών 22
Φαρμακευτική χρήση των ωρονών 27

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ 30

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 30
ΠΗΓΕΣ ΤΩΝ ROS 32
ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΩΝ ROS 34
ΤΟ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΟ ΠΑΡΑΔΟΞΟ 35
ΩΦΕΛΕΙΕΣ ΤΩΝ ROS 36
ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΚΑΙ ROS 37

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΧΑΛΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΩΡΟΝΩΝ ΜΕ ΒΕΝΖΥΛΟΞΥ –ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΕΣ 42

ΕΙΣΑΓΩΓΗ 42
ΣΥΝΘΕΣΗ ΧΑΛΚΟΝΩΝ 44
ΣΥΝΘΕΣΗ ΩΡΟΝΩΝ 49

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ 51

ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ DPPH 51
ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΜΕ AAPH 52
ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΛΙΠΟΞΥΓΟΝΑΣΗ ΑΠΟ ΣΟΓΙΑ 56

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....60

ΌΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ.....60

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....61

*2 –υδρόξυ -4,6 –διβενζυλόξυ –ακετοφαινόνη **(2)**.....61*

Γενική μέθοδος σύνθεσης χαλκονών.....62

*4',6' –διβενζυλόξυ -2' –υδρόξυ –χαλκόνη **(7)**.....63*

*4',6' –διβενζυλόξυ -2' –υδρόξυ -4 –χλώρο –χαλκόνη **(8)**.....64*

*4',6' –διβενζυλόξυ -2' –υδρόξυ -3,4 –διμεθόξυ –χαλκόνη **(9)**.....65*

*4',6' –διβενζυλόξυ -4 –μεθόξυ -2' –υδρόξυ –χαλκόνη **(10)**.....66*

Γενική μέθοδος σύνθεσης ωρονών.....67

*4,6 –διβενζυλόξυ –ωρόνη **(11)**.....68*

*4,6 –διβενζυλόξυ -4' –χλώρο –ωρόνη **(12)**.....69*

*4,6 –διβενζυλόξυ -3',4' –διμεθόξυ –ωρόνη **(13)**.....70*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ 71

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ NMR ^{1}H.....71

Χαλκόνες.....71

Ωρόνες.....79

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ESI –MS.....83

Χαλκόνες.....83

Ωρόνες.....86

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ.....88

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....91

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΒΗΜΑΤΑ.....92

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....93

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... 104

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1: Γενική αντίδραση σύνθεσης χαλκονών....44
Σχήμα 2: Μηχανισμός συμπύκνωσης Claisen-Schmidt για τη σύνθεση χαλκονών...46
Σχήμα 3: Σύνθεση της 2′ –υδρόξυ -4′,6′ –διβενζυλόξυ -ακετοφαινόνης....47
Σχήμα 4: Μηχανισμός αλδολικής συμπύκνωσης για τη σύνθεση της ακετοφαινόνης. 48
Σχήμα 5: Γενική αντίδραση σύνθεσης ωρονών....49
Σχήμα 6: Μηχανισμός της οξειδωτικής κυκλοποίησης των χαλκονών προς σχηματισμό ωρονών....50
Σχήμα 7: Αντίδραση σύνθεσης της 2-υδρόξυ-4,6-διβενζυλόξυ-ακετοφαινόνης....61
Σχήμα 8: Γενική μέθοδος σύνθεσης των χαλκονών....62
Σχήμα 9: Χημικός τύπος της 4',6' -διβενζυλόξυ-2' -υδρόξυ-χαλκόνης....63
Σχήμα 10: Χημικός τύπος της 4′,6′ –διβενζυλόξυ -2′ –υδρόξυ -4 –χλώρο –χαλκόνης 64
Σχήμα 11: Χημικός τύπος της 4′,6′ –διβενζυλόξυ -2′ –υδρόξυ -3,4 –διμεθόξυ – χαλκόνης....65
Σχήμα 12: Χημικός τύπος της 4′,6′ – διβενζυλόξυ -4 – μεθόξυ -2′ – υδρόξυ – χαλκόνης....66
Σχήμα 13: Γενική μέθοδος σύνθεσης των ωρονών....67
Σχήμα 14: Χημικός τύπος της 4,6 –διβενζυλόξυ –ωρόνης....68
Σχήμα 15: Χημικός τύπος της 4,6 –διβενζυλόξυ -4′ –χλώρο –ωρόνης....69
Σχήμα 16: Χημικός τύπος της 4,6 –διβενζυλόξυ -3′,4′ –διμεθόξυ –ωρόνης....70
Σχήμα 17: Δεσμός υδρογόνου μεταξύ του υδροξυλίου της θέσης 2′ και του καρβονυλικού οξυγόνου στις χαλκόνες....73
Σχήμα 18: Απεικόνιση των θέσεων α και β στο διπλό δεσμό άνθρακα των χαλκονών....74

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Χημικές μετατοπίσεις και σταθερές σύζευξης για τα βινυλικά υδρογόνα των χαλκονών **(7)-(10)** 74
Πίνακας 2: Αποτελέσματα οξείδωσης του DPPH, σε διάστημα 20min και 60min....88
Πίνακας 3: Αποτελέσματα αναστολής της φυτικής λιποξυγονάσηςαπό σόγια (LO) και της λιπιδικής υπεροξείδωσης (LP)....89

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Γενική δομή φλαβονοειδών 3
Εικόνα 2: Δομικά χαρακτηριστικά φλαβονοειδών 6
Εικόνα 3: Διδιάστατες απεικονίσεις των φλαβονοειδών γενιστεΐνη, κερσετίνη, καπφερόλη, λουτεολίνη και απιγενίνη [32] 12
Εικόνα 4: Δομή της ουβαρετίνης 14
Εικόνα 5: Γενική δομή γερικουδρανίνης Α 15
Εικόνα 6: Χημικές δομές και δράσεις αναστολής της αρωματάσης της βιοχανίνης Α και των αναλόγων της [65] 16
Εικόνα 7: Το D-ασπαρτικό οξύ και τα θρέο-βενζυλοξυλιωμένα ανάλογα του ασπαρτικού (TBOA) 17
Εικόνα 8: Γενική δομή χαλκονών 18
Εικόνα 9: Μηχανσμός συμπύκνωσης Claisen Schmidt 19
Εικόνα 10: Μηχανισμός συμπύκνωσης Claisen-Schmidt με τη χρήση υπερήχων 20
Εικόνα 11: Συμπύκνωση Claisen-Schmidt με χρήση ιοντικών υγρών 21
Εικόνα 12: Συμπύκνωση Claisen-Schmidt με χρήση μικροκυμάτων 21
Εικόνα 13: Μηχανισμός αντίδρασης Suzuki για τη σύνθεση χαλκονών 22
Εικόνα 14: Μηχανισμός αλδολικής συμπύκνωσης τύπου Mukaiyama 22
Εικόνα 15: Ανάλογο χαλκόνης με υποσχόμενη αντιβακτηριακή δράση [79] 23
Εικόνα 16: 4'-καρβόξυ-χαλκόνες με βακτηριοστατικό προφίλ [80] 24
Εικόνα 17: Οι ρετροχαλκόνες, λικοχαλκόνη Α και C 25
Εικόνα 18: Ανάλογα χαλκονών με βάση τη λικοχαλκόνη C, με αντιλεισμανιακή δράση [89] 26
Εικόνα 19: 3' - φαινυλουρενυλικά ανάλογα χαλκονών με ανθελονοσιακή δράση [94] 27
Εικόνα 20: Η 2,4-διμεθόξυ-4'-βουτόξυχαλκόνη με εξαιρετικές in vitro και in vivo ανθελονοσιακές ιδιότητες, και η κυριότερη πρενυλιωμένη χαλκόνη, η ξανθοχουμόλη [95.96] 28
Εικόνα 21: Διχαλκόνες τύπου BB με αντιμυκητησιακή δράση [102] 29
Εικόνα 22: Δομικά χαρακτηριστικά και η σχέση δομής-αντιφλεγμονώδους δράσης λιποφιλικών, αλκυλιωμένων χαλκονών [111] 32
Εικόνα 23: Ν-αλκυλιωμένες χαλκόνες με αντιφλεγμονώδη δράση [113] 33
Εικόνα 24: Η 2',4',2,4,-τετραϋδρόξυ-χαλκόνη και το αντίστοιχο φυσικό μόριο t-στιλβένιο, ως αναστολείς της τυροσινάσης [116] 35
Εικόνα 25: Χημική δομή των υβριδικών χαλκονών [119] 18
Εικόνα 26: Σχεδιασμός των 1,3-διχαλκονών με 3 μονάδες προπενόνης ως φαρμακοφόρες [66] 20
Εικόνα 27: Γενική δομή ωρονών 21
Εικόνα 28: Χημική δομή σουλφουρετίνης [127] 22

Εικόνα 29: Συμπύκνωση βεζοφουρανονών και αρυλαλδεϋδών σε στερεό καταλύτη αλουμινίου, για την παραγωγή ωρονών [129] 23
Εικόνα 30: Ξηρή σύνθεση ωρονών, με στερεό βασικό καταλύτη KF –Al2O3και ακτινοβολία μικροκυμάτων [130] 24
Εικόνα 31: Σύνθεση ωρονών κατά Wheeler [133] 25
Εικόνα 32: Σύνθεση ωρονών μέσω της γενικευμένης μεθόδου Wheeler, με χρήση TBATB ως μέσω βρωμίωσης [135] 26
Εικόνα 33: Σύνθεση ωρόνης με συμπύκνωση κουμαρανόνης με αρυλαλδεΰδη σε μίγμα ουρίας/χλωριδίου χολίνης [136] 26
Εικόνα 34: Σύνθεση ωρονών σε 3 βήματα, καταλυόμενη από Au [137] 27
Εικόνα 35: Φυσικές ωρόνες αλτισιλίνη H, I και J από την Artocarpus altilis, με εξαιρετική αναστολή της τυροσινάσης [138] 28
Εικόνα 36:Γενική δομή αζαωρονών [139] 28
Εικόνα 37:Η φυσική 5,6,7-τριμεθόξυ-3',4'-διϋδρόξυ-ωρόνη, δομικά όμοια στην κομπρεστατίνη Α-4, ως αντικαρκινικός φορέας [140] 29
Εικόνα 38: Ενζυμικές και μη ενζυμικές διεργασίες για την παραγωγή ROS, στο εσωτερικό των ζωϊκών κυττάρων [141] 33
Εικόνα 39: Κυτταρικές οξειδωτικές αλληλεπιδράσεις [147] 41
Εικόνα 40: 4',6' –διβενζυλόξυ -2' –υδρόξυ –χαλκόνες που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία. 43
Εικόνα 41: 4,6 –διβενζυλόξυ-ωρόνες που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία 43
Εικόνα 42: Σταθερή και ανηγμένη μορφή του DPPH (με ελεύθερη ρίζα και χωρίς, αντίστοιχα) 52
Εικόνα 43: Μηχανισμός λιπιδικής υπεροξείδωσης 54
Εικόνα 44: Μονομοριακή αποσύνθεση του αζω –εκκινητή και δημιουργία ελεύθερης ρίζας 55
Εικόνα 45: Το ενζυμικό μονοπάτι της 5 –λιποξυγονάσης [153] 57
Εικόνα 46: Αναγωγή του σιδήρου στο ένζυμο της λιποξυγονάσης 58
Εικόνα 47: Παραδείγματα αναστολέων της 5-LO, το NDGA βάσει οξειδοαναγωγής και το zileuton βάσει δημιουργίας χηλικού συμπλόκου με το μόριο του σιδήρου στο ενεργό κέντρο του ενζύμου 59
Εικόνα 48: Φάσμα 1H NMR ($COCl_3$, 300 MHz) της χαλκόνης **(8)** 72
Εικόνα 49: Φάσμα 1H NMR ($COCl_3$, 300 MHz) της χαλκόνης **(7)** 76
Εικόνα 50: Φάσμα 1H NMR ($COCl_3$, 300 MHz) της χαλκόνης **(9)** 77
Εικόνα 51: Φάσμα 1H NMR ($COCl_3$, 300 MHz) της χαλκόνης **(10)** 78
Εικόνα 52: Φάσμα 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της ωρόνης **(11)** 80
Εικόνα 53: Φάσμα 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της ωρόνης **(12)** 81
Εικόνα 54: Φάσμα 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της ωρόνης **(13)** 82
Εικόνα 55: ESI –MS φάσμα της χαλκόνης **(7)** 84
Εικόνα 56: ESI –MS φάσμα της χαλκόνης **(8)** 84
Εικόνα 57: ESI –MS φάσμα της χαλκόνης **(9)** 85

Εικόνα 58: ESI –MS φάσμα της χαλκόνης **(10)** 85
Εικόνα 59: ESI –MS φάσμα της ωρόνης **(11)** 86
Εικόνα 60: ESI –MS φάσμα της ωρόνης (12) 87
Εικόνα 61: ESI –MS φάσμα της ωρόνης **(13)** 87
Εικόνα 62: Φάσμα ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της χαλκόνης **(7)** 93
Εικόνα 63: Φάσμα ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της χαλκόνης **(8)** 94
Εικόνα 64: Φάσμα ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της χαλκόνης **(9)** 95
Εικόνα 65: Φάσμα ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της χαλκόνης **(10)** 96
Εικόνα 66: Φάσμα ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της ωρόνης **(11)** 97
Εικόνα 67: Φάσμα ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της ωρόνη **(12)** 98
Εικόνα 68: Φάσμα ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της ωρόνη **(13)** 99
Εικόνα 69: ESI –MS φάσμα της χαλκόνης **(7)** 100
Εικόνα 70: ESI –MS φάσμα της χαλκόνης **(8)** 100
Εικόνα 71: ESI –MS φάσμα της χαλκόνης **(9)** 101
Εικόνα 72: ESI –MS φάσμα της χαλκόνης **(10)** 101
Εικόνα 73: ESI –MS φάσμα της ωρόνης **(11)** 102
Εικόνα 74: ESI –MS φάσμα της ωρόνης **(12)** 102
Εικόνα 75: ESI –MS φάσμα της ωρόνης **(13)** 103

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας του τμήματος Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2013-2015, υπό την επίβλεψη της Δρ. Α. Δέτση, Επίκουρου καθηγήτριας ΕΜΠ.

Για την πραγματοποίηση αυτής της εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Την υπεύθυνη Δρ. Αναστασία Δέτση, Επίκουρου Καθηγήτριας ΕΜΠ, για την ανάθεση του θέματος της διπλωματικής εργασίας, την ανάληψη ευθυνών εντός του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας και της ερευνητικής δραστηριότητάς του, την υπομονή κατά την εκπόνηση της εργασίας και την καθοδήγησή της καθόλη της διάρκειά της.

Την μεταδιδακτορικό Μαρίνα Ρουσσάκη για την υποστήριξή και τη βοήθεια σε εργαστηριακό επίπεδο και στη λήψη και επεξήγηση των φασμάτων NMR.

Τη διδακτορικό Ανδρομάχη Τζάνη για τη βοήθειά της στα τελευταία στάδια της διπλωματικής, σε ό,τι αφορούσε το αρχειακό υλικό των φασμάτων NMR.

Το συμφοιτητή χημικό μηχανικό Αλκιβιάδη – Ορφέα Χατζηβασιλείου για την καθοδήγησή του τους πρώτους μήνες εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Την καθηγήτρια Φαρμακευτικής ΑΠΘ Δήμητρα Χατζηπαύλου –Λίτινα, για τη διεξαγωγή των πειραμάτων αξιολόγησης της αντιφλεγμονώδους και αντιοξειδωτικής δράσης των μορίων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Το προσωπικό του Οριζόντιου Εργαστηρίου της σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ για τη λήψη των φασμάτων ESI –MS.

Το Rodrigo Franco για την πολύτιμη βοήθεια στην αναζήτηση των βιβλιογραφικών πηγών, χωρίς την οποία δε θα ήταν δυνατή η συγγραφή της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω προσωπικά τους ανθρώπους που μου στάθηκαν καθόσο διήρκησε η εκπόνηση της εργασίας. Την οικογένειά μου, για την υπομονή

και την κατανόηση. Τη δέυτερη οικογένειά μου από το BEST Athens, το 19° προεδρείο και τους Χρήστο, Ναταλία και Γιάννη, που χωρίς τη συμβολή τους αυτή η εργασία θα είχε τελειώσει νωρίτερα πλην όμως με λιγότερο ενδιαφέρον. Τους φίλους Βασίλη, Ελένη, Έβελυν, Alice και Rodrigo, Cecilia, και την Ιφιγένεια.

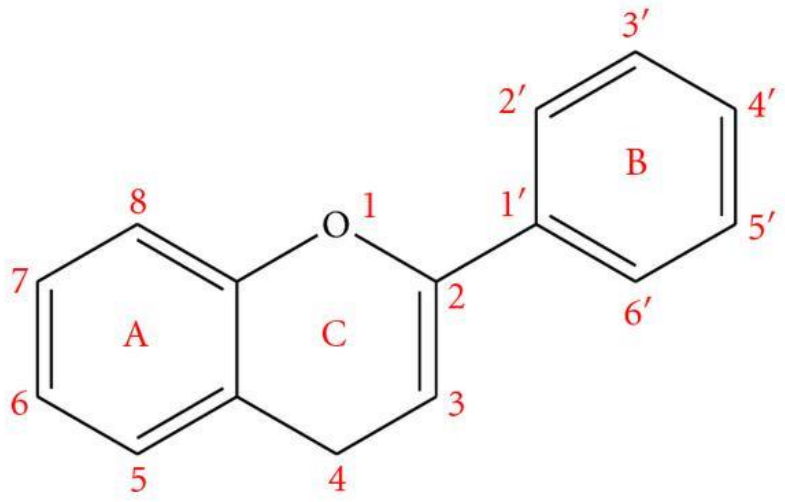
"If life seems jolly rotten; there's something you've forgotten
Forget about your sin – give the audience a grin
Just purse your lips and whistle – that's the thing"

Monty Python.

Κεφάλαιο 1
Φλαβονοειδή

Εισαγωγή

Ο όρος «φλαβονοειδές» ορίστηκε για να καλύψει μία ευρεία γκάμα φυσικών προϊόντων που εμφανίζονται στους ιστούς των φυτών, και πολλές φορές στην επιφάνεια ή το εσωτερικό των φυτικών οργάνων. Περιέχουν τον ανθρακικό σκελετό C6 –C3 –C6, ή πιο συγκεκριμένα διαθέτουν φαινυλο-βενζοπυρανικό δομικό σκελετό.



Εικόνα 1: Γενική δομή φλαβονοειδών

Ο δακτύλιος στα αριστερά του μορίου ονομάζεται Α δακτύλιος και προέρχεται από το οξικό/μαλονικό μονοπάτι. Ο δεξιός δακτύλιος, ο οποίος προέρχεται από τους άνθρακες του δακτυλίου της φαινυλαλανίνης, ονομάζεται Β δακτύλιος. Τέλος, ο ετεροκυκλικός δακτύλιος ανάμεσά τους, ονομάζεται C δακτύλιος. Κατά σύμβαση, το ετεροκυκλικό οξυγόνο σχεδιάζεται στη θέση 1, και η αρίθμηση των ανθράκων ξεκινάει από αυτό στον οποίο είναι προσδεμένος ο Β δακτύλιος, δηλαδή στον C-2. Συνεπώς, ο καρβονυλικός άνθρακας είναι ο C-4. Επιπλέον, οι άνθρακες του Β δακτυλίου εμφανίζονται τονούμενοι.

Η κατάταξη των φλαβονοειδών σε συγκεκριμένες κατηγορίες γίνεται με το κατά πόσο συμπίπτουν τα δομικά τους χαρακτηριστικά στα παρακάτω:

a) Αν η γέφυρα των τριών ανθράκων είναι ανοιχτή ή αποτελεί μέρος ενός ετεροκυκλικού δακτυλίου.
b) Σε περίπτωση που ο ετεροκυκλικός δακτύλιος υφίσταται, αν είναι πενταμελής ή εξαμελής.
c) Η θέση πρόσδεσης του Β δακτυλίου
d) Ο βαθμός οξείδωσης του C δακτυλίου
e) Αν η εξεταζόμενη ένωση είναι μονομερές, διμερές ή ανώτερο ολιγομερές.

Ωστόσο, το κυριότερο κριτήριο για την κατάταξη των φλαβονοειδών είναι η θέση πρόσδεσης του αρωματικού δακτυλίου στη βενζοπυρανική ομάδα, σύμφωνα με την οποία τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε 3 βασικές κατηγορίες. Τα φλαβονοειδή (2 –φαινυλο –βενζοπυράνες), τα ισοφλαβονοειδή (3 –βενζοπυράνες) και τα νεοφλαβονοειδή (4 –βενζοπυράνες). Και οι τρεις κατηγορίες προέρχονται από την ίδια χαλκόνη, η οποία ανήκει στην κατηγορία των ήσσονων φλαβονοειδών, και συνεπώς είναι δομικά και λειτουργικά συγγενείς.

Δομικές κατηγορίες φλαβονοειδών

Ανθοκυανίνες

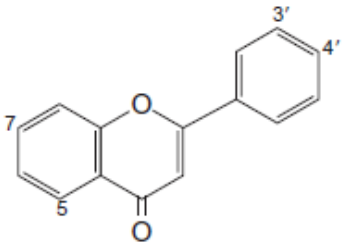
Οι ανθοκυανίνες αποτελούν την πιο εξέχουσα κατηγορία φλαβονοειδών και είναι υπεύθυνες για το κόκκινο, μωβ και μπλε χρώμα σε πολλά λουλούδια. Βασίζονται δομικά στο κατιόν φλαβυλίου και αποτελούνται από μια ανθοκυανιδίνη δεσμευμένη σε ένα ή περισσότερα τμήματα σακχάρων. Οι ανθοκυανιδίνες προκύπτουν σε πολλές γλυκοσυλιωμένες μορφές, ωστόσο εκείνη στη θέση C-3 (3 –*O* –γλυκοζίτες ανθοκυανιδίνης) είναι που θεωρείται κομβικό σημείο για τη βιοσύνθεση των ανθοκυανών. Επίσης είναι εφικτή η προσθήκη περισσότερων σακχάρων στις θέσεις C-5 και C-7, και η τροποποίηση των γλυκοζιτών μέσω ακυλίωσης και συμπλοκοποίησης με μη κυανικά φλαβονοειδή και μεταλλικά ιόντα.

Φλαβανόνες

Δύο δομικά στοιχεία είναι που χαρακτηρίζουν τις φλαβανόνες και τις κάνουν να ξεχωρίζουν από τα υπόλοιπα φλαβονοειδή, η απουσία του διπλού δεσμού μεταξύ C-2 = C-3 και η παρουσία χειρόμορφου κέντρου στον C-2. Η ναρινγκενίνη είναι μία από τις πιο κοινές φλαβανόνες και το πρώτο κυκλοποιημένο φλαβονοειδές που συντίθεται κατά το βιοσυνθετικό μονοπάτι.

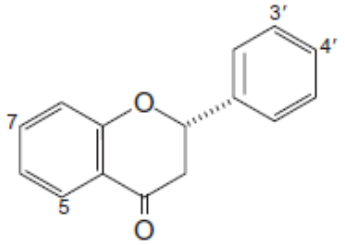
Φλαβόνες και Φλαβονόλες

Αν και βιοσυνθετικά οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες παράγονται ξεχωριστά, μπορούν να μπουν στην ίδια κατηγορία λόγω της χημικής τους συγγένειας. Οι φλαβόνες διαθέτουν υποκαταστάτες στον Α και Β δακτύλιο, αλλά στερούνται οξυγόνου στον C-3. Και χημικά, οι φλαβονόλες είναι 3 –υδροξυφλαβόνες. Τα πιο γνωστά παραδείγματα για τις δύο κατηγορίες είναι η απιγκενίνη για τις φλαβόνες και η καπφερόλη για τις φλαβονόλες.



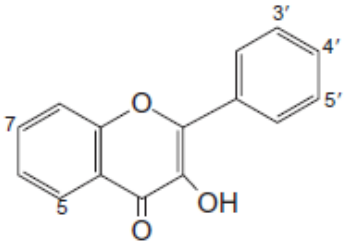
Flavones

	5	6	7	3′	4′
Luteolin	OH		OH	OH	OH
Apigenin	OH		OH	OH	
Chrysin	OH		OH		
Baicalein	OH	OH	OH		
Baicalin	OH	OH			



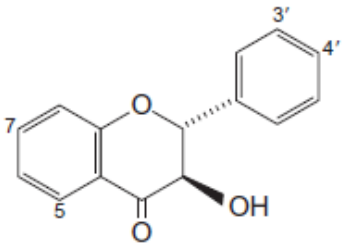
Flavonones

	5	7	3′	4′
Hesperetin	OH	OH	OH	OCH_3
Narigenin	OH	OH		OH



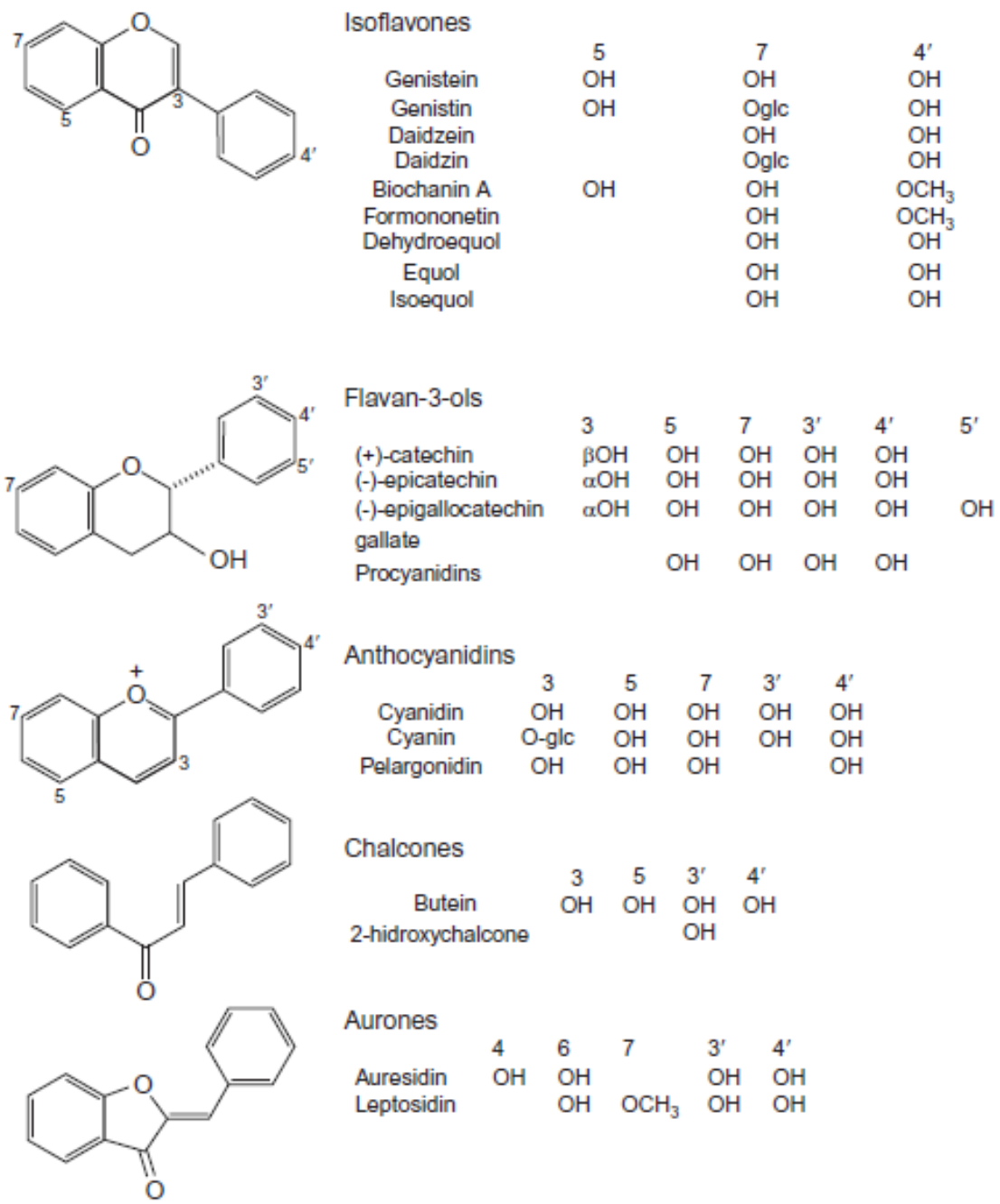
Flavonols

	5	7	3′	4′	5′
Quercetin	OH	OH	OH	OH	
Kaempferol	OH	OH		OH	
Galangin	OH	OH			
Fisetin		OH	OH	OH	
Myricetin	OH	OH	OH	OH	OH
Isoquercetin	OH	OH	OH	OH	
Myricetrin	OH	OH	OH	OH	OH
Rutin	OH	OH	$O_9C_{12}H_{21}$	OH	OH



Flavanolol

	5	7	3′	4′
Taxifolin	OH	OH	OH	OH



Εικόνα 2: Δομικά χαρακτηριστικά φλαβονοειδών

Ισοφλαβονοειδή

Πρόκειται για μια συγκεκριμένη κατηγορία φλαβονοειδών, η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία του φαινυλχρωμανικού σκελετού στη θέση C-3 του B δακτυλίου. Σε αυτή την κατηγορία ξεχωρίζουν οι ισοφλαβόνες και οι ισοφλαβανόνες.

Οι ισοφλαβόνες επιδεικνύουν τον ίδιο βαθμό οξείδωσης στον ετεροκυκλικό δακτύλιο με τις φλαβόνες, αλλά πιο σύνθετους υποκαταστάτες στους άλλους δύο. Οι ισοφλαβανόνες έχουν τον ίδιο βαθμό συγγένειας με τις ισοφλαβόνες, όπως και οι φλαβανόνες με τις φλαβόνες. Αυτή τη φορά το χειρικό κέντρο των ισοφλαβονών είναι στον C-3.

Νεοφλαβονοειδή

Νεοφλαβονοειδή ονομάζεται η ομάδα παραγώγων φλαβονοειδών, όπου η αρυλική ομάδα είναι προσδεμένη στον C-4, σε αντίθεση με τον C-2 στα φλαβονοειδή και τον C-3 στα ισοφλαβονοειδή. Ένα ακόμα χαρακτηριστικό που έχει παρατηρηθεί ευρέως στα νεοφλαβονοειδή, είναι οι C –πρένυλο υποκαταστάτες στον A δακτύλιο.

Ήσσονα φλαβονοειδή

Σε αυτή την κατηγορία φλαβονοειδών, ανήκουν οι χαλκόνες, οι διϋδροχαλκόνες, οι φλαβανόνες, οι ωρόνες και οι ωρονόλες. Από ιστορική σκοπιά, οι χαλκόνες και οι ωρόνες είναι κυρίως γνωστές ως οι κίτρινες προς πορτοκαλί χρωστικές των άνθεων, σε κάποια είδη του *Coreopsis* και άλλες τάξεις της οικογένειας Asteraceae. Η κατανομή αυτών των φλαβονοειδών δεν περιορίζεται μόνο στα άνθη, αλλά έχουν παρατηρηθεί και σε πολλούς ιστούς φυτών.

Βιοσυνθετικό μονοπάτι φλαβονοειδών

Το βιοσυνθετικό μονοπάτι των φλαβονοειδών αποτελεί τμήμα του ευρύτερου φαινυλπροπανοειδούς μονοπατιού, από το οποίο παράγονται πολλοί δευτερεύοντες μεταβολίτες, όπως τα φαινολικά οξέα, οι λιγνίνες, οι λιγνάνες και οι στιλβένες. Οι βασικοί προκέρσορες των φλαβονοειδών είναι η φαινυλαλανίνη και το μαλονυλικό CoA.

Στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των φλαβονοειδών, κάθε παράγωγο μιας αντίδρασης, μπορεί να λειτουργήσει ως υπόστρωμα για ένα ή περισσότερα από τα επόμενα βήματα του μονοπατιού. Επίσης, το προϊόν κάθε ενζυμικής δράσης κατά τη διάρκεια του μονοπατιού είναι δυνατό να παίξει το ρόλο της πρόδρομης ένωσης για διαφορετική αντίδραση, ανάλογα με τις φυσιολογικές συνθήκες που επικρατούν εκείνη τη στιγμή στο φυτό.

Ξεκινώντας τη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών, οι πρώτες ενώσεις που παρασκευάζονται είναι οι χαλκόνες, μέσω της ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης του *p* –κουμαρυλικού CoA και του μαλονυλικού CoA. Το *p* –κουμαρυλικό CoA παράγεται από το αμινοξύ της φαινυλαλανίνης, και το μαλονυλικό CoA από το ακέτυλο CoA. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση μεταξύ τους ονομάζεται συνθάση της χαλκόνης (CHS) και η χαλκόνη που παρασκευάζεται είναι η 2',4',6',4 –τετραυδρόξυ –χαλκόνη.

Στη συνέχεια, οι χαλκόνες λειτουργούν ως υπόστρωμα για την καταλυτική δράση της ισομεράσης της χαλκόνης (CHI), ούτως ώστε να παρασκευαστούν οι φλαβανόνες. Ειδικά από την 2',4',6',4 –τετραυδρόξυ –χαλκόνη παρασκευάζεται η ναρινγκενίνη.

Σε αυτό το σημείο, παρατηρείται ο πρώτος «κόμβος» του βιοσυνθετικού μονοπατιού, όπου ένα προϊόν μπορεί να αποτελέσει υπόστρωμα για παραπάνω από μία αντιδράσεις. Αρχικά, υπό τη δράση της 3 –υδροξυλάσης της φλαβανόνης, οι φλαβανόνες μετατρέπονται σε 3 –υδροφλαβανόνες (εναλλακτικά διϋδρο –φλαβονόλες). Αυτό είναι και το πρώτο βήμα για την παραγωγή της πιο επιφανούς κατηγορίας φλαβονοειδών, τις ανθοκυανίνες. Οι 3 –υδροφλαβανόνες μετατρέπονται σε ανθοκυανίνες υπό τη δράση της αναγωγάσης της διϋδρο –φλαβονόλης (DFR).

Η DFR όμως παρουσιάζει μεγάλη εξειδίκευση με αποτέλεσμα ένα μικρό μέρος των φλαβανονών να καταλήγουν σε ανθοκυανίνες, με αυτό τον τρόπο. Ωστόσο, υπάρχει ένας ακόμα μηχανισμός μέσω του οποίου παρασκευάζονται οι ανθοκυανίνες. Οι διϋδροφλαβονόλες μετατρέπονται εύκολα σε φλαβαν -3,4 –διόλες (λευκοκυανιδίνες), οι οποίες καταλυόμενες από την συνθάση της ανθοκυανίνης (ANS) καταλήγουν σε ανθοκυανίνες.

Κλείνοντας με τις διϋδροφλαβονόλες, υπάρχει ακόμα η δυνατότητα να καταλυθούν από τη συνθάση της φλαβονόλης ώστε να επιτευχθεί αφυδρογόνωση, οπότε και θα παραχθούν φλαβανόλες.

Επιστρέφοντας στο πρώτο κομβικό σημείο, τις φλαβανόνες, εκτός από την υδροξυλίωσή τους από την F3H, είναι πιθανές ακόμα δύο μετατροπές. Κατ' αρχάς, είναι εφικτή η μετατροπή των φλαβανονών σε φλαβόνες με την απομάκρυνση ατόμων υδρογόνου από τον C-2 και τον C-3, και τη σύζευξή τους με διπλό δεσμό. Η εν λόγω μετατροπή καταλύεται από την συνθάση της φλαβόνης (FNS).

Η τρίτη μετατροπή των φλαβανονών περιλαμβάνει την μετακίνηση της αρυλικής ομάδας από τον C-2 στον C-3, και τη δημιουργία ισοφλαβονών. Η δεδομένη αντίδραση καταλύεται από τη συνθάση της ισοφλαβόνης (IFS) και την παραγωγή μίας ελεύθερης ρίζας. [1], [2], [3], [4]

Φαρμακευτικές ιδιότητες των φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή εκτός του ότι αποτελούν μεγάλο μέρος της ανθρώπινης διατροφής, έχει αποδειχθεί και η φαρμακευτική τους χρήση. Πιο συγκεκριμένα, διαθέτουν αντι-φλεγμονώδη, αντιϊκή, αντιδιαβητική, αντιαλλεργική, αντιμυκητιασική, αντι-οξειδωτική και αντικαρκινογόνο δράση. [5], [6], [7], [8], [9]

Πολλές από τις βιολογικές λειτουργίες των φλαβονοειδών οφείλονται στην αντιοξειδωτική τους δράση. Οι μηχανισμοί με τους οποίους την επιτυγχάνουν, σχετίζονται με την εξουδετέρωση των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), όπως ανιόντα υπεροξειδίου, ελεύθερες ρίζες, υπεροξείδια του λιπιδίου και υδροϋπεροξείδια. [10] Η βασική αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών που καθορίζει την εν δυνάμει θεραπευτική τους αξία, είναι η χρήση τους ως δότες υδρογόνου ή ηλεκτρονίου, εξουδετερώνοντας ελεύθερες ρίζες και λήγοντας την πορεία αλυσωτών αντιδράσεων. [11], [12], [13] Μελέτες δομής-σχέσης έδειξαν ότι τρία είναι τα σημαντικά, δομικά στοιχεία των φλαβονοειδών για τη δραστηριότητά τους:

1. Η *ορθο*-διϋδρόξυ ομάδα του Β δακτυλίου η οποία παρέχει υψηλή σταθερότητα στο φλαβονοειδές μετά την απώλεια ενός πρωτονίου, συμμετέχοντας έτσι στη δημιουργία μιας φαινολικής ρίζας και της μετατόπισης ηλεκτρονίου
2. Η παρουσία του 2,3-διπλού δεσμού σε συνδυασμό με την 4-καρβονυλική ομάδα του C δακτυλίου επιτρέπουν τη μετατόπιση ενός ηλεκτρονίου της φαινολικής ρίζας από το Β στον C δακτύλιο
3. Η 3-υδρόξυ ομάδα σε συνδυασμό με το 2,3-διπλό δεσμό που αυξάνουν το φαινόμενο του συντονισμού, για τη μεταφορά του ηλεκτρονίου κατά μήκους του μορίου [14]

Επίσης ένας ακόμα αντιοξειδωτικός μηχανισμός των φλαβονοειδών είναι η αναστολή της δράσης της οξειδάσης της ξανθίνης, η οποία οδηγεί στη δημιουργία ανιόντων του υπεροξειδίου και υπεροξειδίων του υδρογόνου [15].

Μεγάλο μέρος της έρευνας για τις φαρμακευτικές ιδιότητες των φλαβονοειδών έχει στόχο την αντιφλεγμονώδη δράση τους και τους μηχανισμούς με τους οποίους την πετυχαίνουν. Η ανάπτυξη φλεγμονών περιλαμβάνει την εμφάνιση τεσσάρων φαινομένων: οίδημα, πόνος, ερύθημα και τοπική αύξηση της θερμοκρασίας. Εκτός από αυτά, η ανάπτυξη φλεγμονών σηματοδοτείται από την απελευθέρωση συγκεκριμένων ουσιών, των φλεγμονωδών μεσολαβητών, από διάφορες κυτταρικές πηγές. Οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Σε εκείνους που παράγονται από κύτταρα, όπως η σεροτονίνη, η ισταμίνη, οι κυτοκίνες και οι χημοκίνες, το μονοξείδιο του αζώτου (NO), οι

δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και οι λιπιδικοί μεσολαβητές (προστανοειδή, λευκοτριένια και λιποξίνες), και σε εκείνους που παράγονται από συστατικά του πλάσματος (π.χ. η βραδυκινίνη) [16], [17].

Τα φλαβονοειδή παρεμβαίνουν στα παραπάνω μόρια αποτρέποντας την εμφάνιση φλεγμονών, είτε ως αντιοξειδωτικά, είτε ως αναστολείς της παραγωγής κυτοκινών και χημοκινών και των προϊόντων που προκύπτουν από την εμφάνισή τους [18]. Στη συνέχεια, αναλύονται εν συντομία οι βασικοί μηχανισμοί αναστολής της ανάπτυξης φλεγμονών από τα φλαβονοειδή.

Αρχικά, ο κυριότερος αντι-φλεγμονώδης μηχανισμός των φλαβονοειδών είναι η αναστολή της παραγωγής και της δράσης των κυτοκινών. Η παραγωγή των κυτοκινών θεωρείται προ-φλεγμονώδης διαδικασία και προάγεται από την ενεργοποίηση προ-φλεγμονωδών μεταγραφικών παραγόντων, ευαίσθητων στο οξειδωτικό στρες (π.χ. ο πυρηνικός παράγοντας κB, NF-κB). Συνεπώς, με την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών από τα φλαβονοειδή, αναστέλλεται και η παραγωγή των φλεγμονωδών μεσολαβητών κυτοκινών. Αμοιβαία, η αναστολή παραγωγής κυτοκινών, όπως ο παράγοντας TNFα, αναστέλλει και την παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίου (μέσω της έκφρασης της NADPH οξειδάσης) τα οποία με τη σειρά τους θα οδηγούσαν στη δημιουργία προ-φλεγμονωδών μορίων όπως ο NF-κB [16], [18], [19].

Επιπλέον, η αναστολή παραγωγής κυτοκινών σε αρχικό στάδιο περιορίζει το φαινόμενο της διεύρυνσης της φλεγμονής, από την παραγωγή περισσότερων κυτοκινών και χημοκινών αλλά και προστανοειδών (π.χ. προσταγλαδίνη E_2, PGE_2). Τέλος, με την αναστολή παραγωγής των κυτοκινών μειώνεται η έκφραση της επαγόμενης συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (iNOS), η οποία είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου σε φλεγμονώδεις καταστάσεις. Ο περιορισμός του ενζύμου iNOS είναι πολύ σημαντικός, γιατί το παραγόμενο NO ανήκει στα υπεύθυνα μόρια για την καταστροφή των ιστών στις περιοχές των φλεγμονών [19], [20], [21], [22], [23].

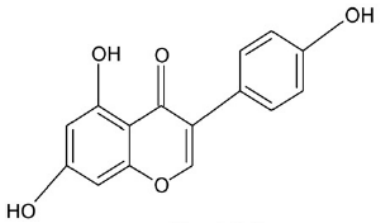
Οι κυτοκίνες, εκτός από την άμεση ή έμμεση προαγωγή των φλεγμονών, διαμορφώνουν την δραστηριότητα και την ευαισθησία των βλαβοϋποδοχέων, δηλαδή των νευρώνων υπεύθυνων για τα ερεθίσματα του πόνου. Συνεπώς, μειώνοντας την παραγωγή κυτοκινών, τα φλαβονοειδή είναι σε θέση να αναστέλλουν τη δράση των βλαβοϋποδοχέων και εν τέλει του συμπτώματος του πόνου [16].

Σε δεύτερο επίπεδο, έρευνες έχουν δείξει ότι τα φλαβονοειδή, εκτός του ότι αναστέλλουν την παραγωγή προ-φλεγμονωδών μορίων, προάγουν την έκφραση αντίστοιχων αντιφλεγμονωδών, όπως ο ανταγωνιστής υποδοχέας της ιντερλευκίνης 1 (IL-1 ra) από τη λουτεολίνη στα μακροφάγα. Παράλληλα, ορισμένα

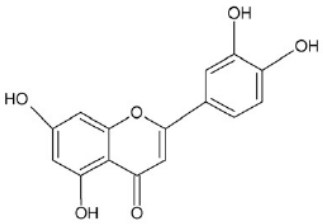
φλαβονοειδή διαμορφώνουν και περιορίζουν τη δραστηριότητα ενζύμων απαραίτητων για την ανάπτυξη των φλεγμονών, όπως η απενεργοποίηση της μυελοπεροξειδάσης από την μυρισιτρίνη και κερσετίνη σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες [21], [24], [25], [26].

Από τις προαναφερθείσες ανασταλτικές δράσεις των φλαβονοειδών, η πιο πιθανό για κλινική χρήση είναι εκείνη της αναστολής της ενεργής θέσης της κυκλοξυγενάσης 1 και 2 και της 5-λιποξυγενάσης (COX-1, COX-2, 5-LO), καταλήγοντας στην αναστολή της παραγωγής προστανοειδών και λευκοτριενών αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα, η κλινική χρήση εκχυλισμάτων φλαβονοειδών παρουσίασε λιγότερες συγκριτικά με τη χρήση συμβατικών φαρμάκων για τις ίδιες παθήσεις. Για παράδειγμα, η χρήση των φλαβονοειδών μείωσε τις γαστρικές αλλοιώσεις που προέρχονταν από τα παραδοσιακά φάρμακα, όπως η ασπιρίνη, και μάλιστα προώθησε την επούλωση των ιστών. Επιπλέον, τα φλαβονοειδή είναι χαμηλής τοξικότητας σε αντίθεση με τους συμβατικούς αναστολείς λευκοτριενών, ο οποίοι προκαλούν νευρολογικές παρενέργειες και ηπατοτοξικότητα [16], [27], [28], [29].

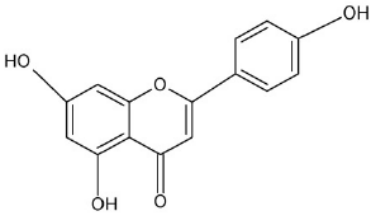
Τέλος, εκτός από τη δραστηριότητα των φλαβονοειδών στην παραγωγή προ-φλεγμονωδών μορίων, έχει παρατηρηθεί η παρέμβασή τους στα μονοπάτια σηματοδότησης ενζύμων, υπεύθυνων για την ενεργοποίηση οξειδωτικού στρες. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η αναστολή των MAP κινασών, η οποία κατέληξε στη μειωμένη παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίου [30]. [31].



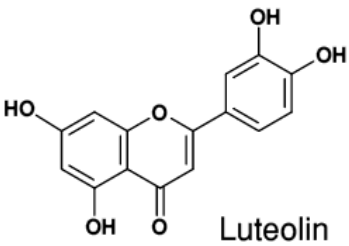
Genistein



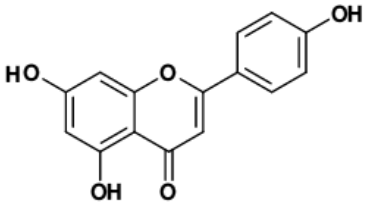
Quercetin



Kaempferol



Luteolin



Apigenin

Εικόνα 3: Διδιάστατες απεικονίσεις των φλαβονοειδών γενιστεΐνη, κερσετίνη, καπφερόλη, λουτεολίνη και απιγενίνη [32]

Μερικά από τα φυσικά φλαβονοειδή που έχουν επιδείξει ισχυρή αντι-φλεγμονώδη προστασία είναι η απιγενίνη (4',5,7-τριϋδρόξυφλαβόνη), η γενιστεΐνη (4',5,7,-τριϋδρόξυ-ισοφλαβόνη), η λουτεολίνη (3',4',5,7- τετραϋδρόξυφλαβόνη – απομονωθείσα από το φυτό *Lonicera japonica,* η καπφερόλη και η κερσετίνη (3,3',4',5,7-πενταϋδρόξυφλαβόνη). Αποτελούν συστατικά της ανθρώπινης διατροφής, όπως το τσάι και τα μήλα, και in vivo έρευνες σε ποντίκια ήταν που επιβεβαίωσαν τη φαρμακευτική τους δράση. Συγκεκριμένα, και τα πέντε φλαβονοειδή ρύθμισαν την έκκριση προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως ο παράγοντας NF-κB και TNF-α, προς το ελάχιστο και μειώθηκε η παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO), της συνθάσης iNOS, ιντερλευκινών IL-6 και ιντερφερονών γ (INF-γ). [32], [33], [34], [35], [36], [37]

Η ιδιότητα των φλαβονοειδών να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, τους προσδίδει τη δυνατότητα αντικαρκινικής χρήσης τους. Ειδικότερα, μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου, ελαττώνοντας το οξειδωτικό στρες (ROS), το οποίο έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί διασπάσεις στις αλυσίδες του DNA και αφύσικες συνδέσεις του. Επιπλέον, εμποδίζουν την εκκίνηση, την προώθηση και την ανάπτυξη του καρκίνου, αλληλεπιδρώντας με τους καταρράκτες σηματοδότησης των πρωτεϊνών κινασών, που εμπλέκονται στην κυτταρική άμυνα. [8], [38], [39], [40], [41], [42], [43]

Εξετάζοντας συγκεκριμένες κατηγορίες φλαβονοειδών και των αντικαρκινικών τους δράσεων, έχει αποδειχθεί ότι το σύμπλεγμα φλαβονών, που αποτελείται από τη γουοκονίνη, τη γουοκονισίνη, τη βαϊκαλίνη, τη βαϊκαλεΐνη και την απιγενίνη, μειώνει τη δραστηριότητα της κινάσης της τυροσίνης στις περιπτώσεις του καρκίνου του μαστού. Παράλληλα, η ομάδα των ισοφλαβονών, γενιστεΐνη, νταϊντζεΐνη, γενιστίνη και φορμονονετίνη, έχει επιδείξει οιστρογονικές και αντικαρκινικές ιδιότητες, χρήσιμες για την αντιμετώπισης της λευκαιμίας και του καρκίνου του μαστού και του προστάτη. Τέλος, οι φλαβονόλες κερσετίνη, μυρισετίνη και καπφερόλη προληπτική δραστηριότητα κατά του καρκίνου, αναστέλλοντας ένζυμα υπεύθυνα για καρκινογενέσεις και τροποποιώντας μονοπάτια μεταγωγής σήματος [7], [44], [45], [46]

Δεδομένων των προαναφερθέντων θετικών παρατηρήσεων κατά του καρκίνου και των καρκινογενέσεων, η έρευνα έχει επεκταθεί από την αναζήτηση και την εξέταση των φυσικών φλαβονοειδών στη σύνθεση νέων αναλόγων, με βελτιωμένες ιδιότητες και μεγαλύτερη πιθανότητα κλινικής χρήσης τους. [47]

Τέλος, αναφέρεται το γεγονός ότι έχει παρατηρηθεί συσχέτιση μεταξύ της διατροφικής λήψης φλαβονοειδών και της μειωμένης θνητότητας από τη

στεφανιαία νόσο και άλλες καρδιαγγειακές παθήσεις. Συγκεκριμένα, έχουν παρατηρηθεί αντιαθηρογενετικά, αντιπηκτικά και αντι-υπερτασιακά αποτελέσματα, συνδεόμενα με την κατανάλωση φλαβονοειδών , αλλά και αγγειοδιασταλτικά στους λείους μύες. Ωστόσο, πρέπει να περατωθεί περαιτέρω έρευνα ώστε να εξακριβωθούν και να κατανοηθούν οι μηχανισμοί που συνδέουν τα φλαβονοειδή με αυτού του είδους τις φαρμακευτικές ιδιότητες. [48]

Η βενζυλόξυ-ομάδα στα φυσικά προϊόντα

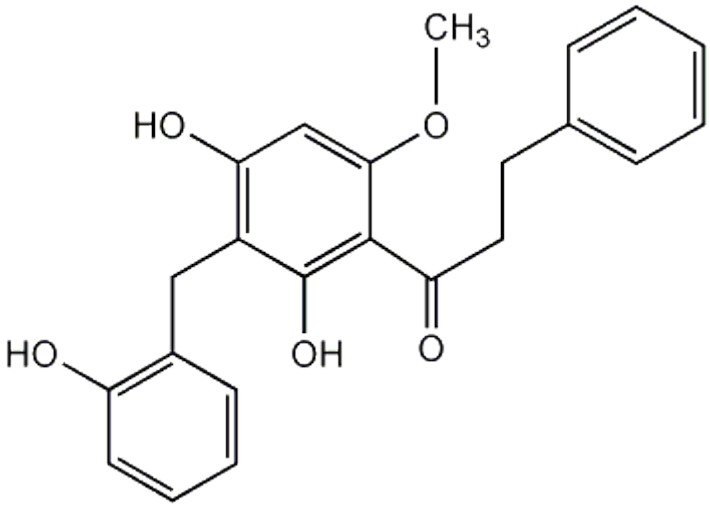
Σχεδόν όλα τα φλαβονοειδή, ακόμα και τα πιο στοιχειώδη όπως η 2',4',6',4 –τετραυδρόξυ –χαλκόνη, η ναρινγκενίνη, η απιγκενίνη και η καπφερόλη, συνήθως εμφανίζονται στη φύση συνδεδεμένα με κάποιους υποκαταστάτες. Πρόκειται για πρόσθετα δομικά «χαρακτηριστικά» που προσδένονται στο φλαβονοειδή σκελετό, όπως υδροξυλομάδες, μεθυλομάδες, σάκχαρα με γλυκοζιτικούς δεσμούς και συνδυασμός αυτών.

Κατά τη σύνθεση των φλαβονοειδών, παρουσιάζεται η ευκαιρία σχηματισμού προστατευτικών ομάδων και η αξιοποίησή τους κατά τη χρήση των νέων μορίων. Πιο συγκεκριμένα, ο καίριος ρόλος των προστατευτικών ομάδων είναι ότι επιτρέπουν τη χημική δραστηριότητα του μορίου στο ένα άκρο του, αφήνοντας αδιατάρακτους τους υποκαταστάτες στο άλλο.

Ένας από τους γνωστούς μηχανισμούς προστασίας είναι η χρήση της βενζυλικής ομάδας. Για την απομάκρυνσή της από το μόριο, προηγείται υδρογόνωση κάτω από ήπιες συνθήκες, ειδικά αν υπάρχουν ευαίσθητες σε οξύ/βάση λειτουργικές ομάδες στο φλαβονοειδές. [1]

Τα βενζυλιωμένα φλαβονοειδή εμφανίστηκαν για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία το 1976, όταν η βιολογικά ενεργή ουβαρετίνηΕικόνα 4: Δομή της ουβαρετίνης (Εικόνα 4), η 2 –υδρόξυ –βενζυλο –διϋδροχαλκόνη από την *Uvaria acuminate*, και 2 ισομερή 2 –υδρόξυ –βενζυλο –φλαβανόνες από την *Uvaria chamae*, η χαμανετίνη και η ισοχαμανετίνη, ταυτοποιήθηκαν. Επίσης, απομονώθηκαν από την *Uvaria leptocladon* δύο C –βενζυλιωμένες διϋδροχαλκόνες, η τριουβαρετίνη και η ισοτριουβαρετίνη.

Έκτοτε, βρέθηκαν στη φύση πολλά βενζυλιωμένα φλαβονοειδή, δομικά συγγενή στα παραπάνω. Ενδιαφέρον προκαλεί το ότι, αν και οι φλαβανόνες απαντώνται συχνά, οι βενζυλιωμένες φλαβανόνες είναι ιδιαίτερα σπάνιες και περιορίζονται στο γένος της *Uvaria*. [49], [50], [51]



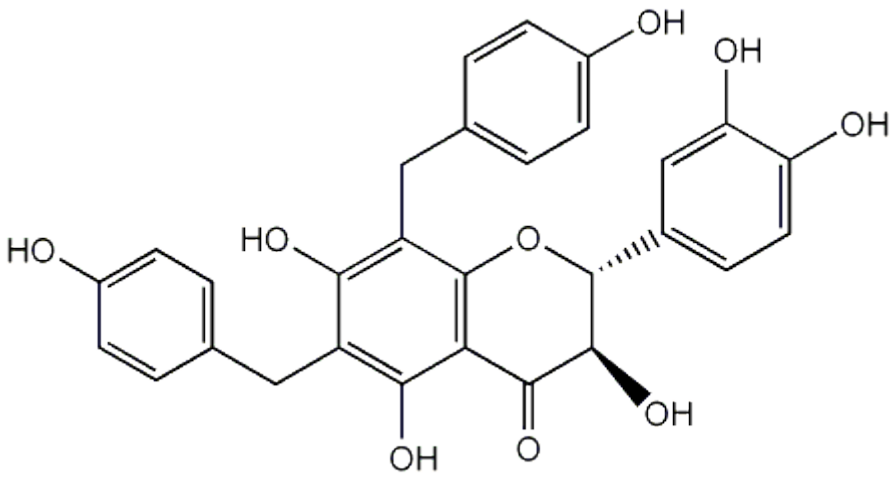
Εικόνα 4: Δομή της ουβαρετίνης

Για κάποιες από αυτές τις βενζυλιωμένες φλαβανόνες έχουν επιβεβαιωθεί οι φαρμακευτικές ιδιότητες, καθότι επέδειξαν δραστικότητα *in vivo* στη P-388 λευκοκυτταρική λευχαιμία σε ποντίκια και *in vitro* σε ανθρώπινα κύτταρα προερχόμενα από καρκίνωμα στο ρινοφάρυγγα. Έχουν επίσης δείξει ισχυρή αντιμικροβιακή δραστηριότητα απέναντι στον *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis* και *Mycobacterium smegmatis*, συγκρίσιμη με του θειϊκού άλατος της στρεπτομυκίνης. [52], [53], [54]

Τα μέλη του γένους της *Uvaria* ανήκουν στη γενικότερη κατηγορία φυτών, που ονομάζεται Annonaceae. Στην ίδια κατηγορία, αλλά σε διαφορετικά γένη, έχουν ταυτοποιηθεί και απομονωθεί βενζυλιωμένα φλαβονοειδή, όπως στη *Mitrella mesnyi* [55], *Xylopia africana*, *Miliusa balancae*, *Melodorum fruticosum*. [56], [57], [58]

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι απομονωθείσες βενζυλιωμένες χαλκόνες από τα γένη *Desmos* και *Ellipeiopsis*, λόγω της ευρείας ιατρικής τους χρήσης. Πιο συγκεκριμένα, απομονώθηκε από το *Desmos chinensis* η 2′,4′ –διυδρόξυ -3′ –(2,6 –διυδρόξυβενζυλ) -6′ –μεθόξυχαλκόνη, η οποία χρησιμοποιούταν στην παραδοσιακή κινέζικη ιατρική για την καταπολέμηση της ελονοσίας, της δυσεντερίας και του ιλίγγου. [59] Τέλος, η πιο πρόσφατη C –βενζυλιωμένη χαλκόνη που ταυτοποιήθηκε και απομονώθηκε είναι η 2′,4′ –διυδρόξυ -3′ –(2 –υδρόξυβενζυλ) -6 –μεθοξυχαλκόνη, από το *Ellipeiopsis cherrevensis*. Για την τελευταία, αναφέρθηκαν πολύ καλές τιμές κυτταροτοξικής δραστηριότητας σε καρκίνο του πνεύμονα (NCI-H187), επιδερμικό καρκίνωμα (KB) και κύτταρα από καρκίνο του μαστού (BC), ανθελονοσιακή δράση έναντι του *Plasmodium falciparum*, και αντιμικροβακτηριακή δράση έναντι του *Mycobacterium tuberculosis*. [60]

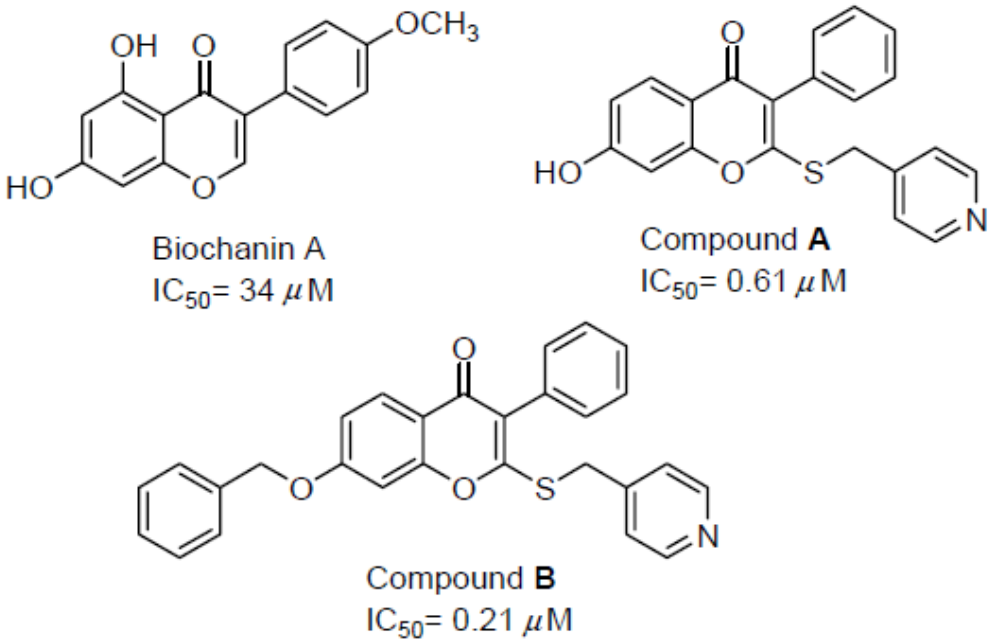
Δεδομένου ότι αν και σπάνια, τα φυσικά προϊόντα που φέρουν βενζυλόξυ –ομάδες σε θέση υποκαταστάτη, διαθέτουν τόσες φαρμακευτικές δυνατότητες, έστρεψε το ενδιαφέρον της έρευνας στη σύνθεση βενζυλιωμένων φυσικών προϊόντων. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η μοριακή τροποποίηση του φυσικού προϊόντος γερικουδρανίνη Α (Εικόνα 5) και η εξακρίβωση της σχέσης δομής-δράσης. Τα φυσικά C-βενζυλιωμένα φλαβονοειδή γερικουδρανίνη Α, Β, C, Ε και J προέρχονται από το είδος *Cudrania tricuspidata* της οικογένειας Moraceae και διαθέτουν κυτταροτοξικές ιδιότητες και ευρεία χρήση στην παραδοσιακή ιατρική χωρών της Ανατολής. [61], [62] Τα νέα C-βενζυλιωμένα φλαβονοειδή που συντέθηκαν, με δομικό μοτίβο τη γερικουδρανίνη Α, εξετάστηκαν ως προς την κυττατοξικότητά τους έναντι δεκαέξι διαφορετικών ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων. Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά και συγκρίσιμα με αυτά συμβατικών φαρμάκων, ανοίγοντας το δρόμο για περισσότερες μοριακές τροποποιήσεις των C-βενζυλιωμένων φλαβονοειδών με στόχο τη βελτίωση του κυτταροτοξικού προφίλ τους. [63]



Εικόνα 5: Γενική δομή γερικουδρανίνης Α

Η αντικαρκινική δράση βενζυλιωμένων φλαβονοειδών έχει μελετηθεί ιδιαίτερα για την περίπτωση του καρκίνου του μαστού. Για παράδειγμα, οι Su *et al.* συνέθεσαν βενζυλιωμένες ισοφλαβόνες (Εικόνα 6) με στόχο τη μελέτη της δράσης τους ως παρεμποδιστών της αρωματάσης και, επαγωγικά, ως αναστολέων παραγωγής οιστρογόνων. Τα οιστρογόνα είναι καθοριστικά για την ανάπτυξη του μετα-εμμηνοπαυσιακού καρκίνου του μαστού και παράγονται από τα ανδρογόνα, υπό την καταλυτική δράση της αρωματάσης. Συνεπώς η παρεμπόδιση της αρωματάσης τέθηκε ως στόχος για την καταπολέμηση του καρκίνου του μαστού, χωρίς τη χρήση ορμονών. Αυτό έγινε εφικτό, με τη μοριακή τροποποίηση της φυσικής ισοβλαβόνης Βιοχανίνη Α, προσθέτοντας την 2-(4'-πυριδυλ-μέθυλ)- θείο ομάδα στον C δακτύλιο και την 7-βενζυλόξυ ομάδα στον Α δακτύλιο και

βελτιώνοντας την κυτταροτοξική δράση κατά 168 φορές. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων, συμπεραίνεται ότι η 7-βενζυλόξυ ομάδα είναι πολύ σημαντική για τη διαδικασία πρόσδεσης του φλαβονοειδούς στο ένζυμο. [64], [65]

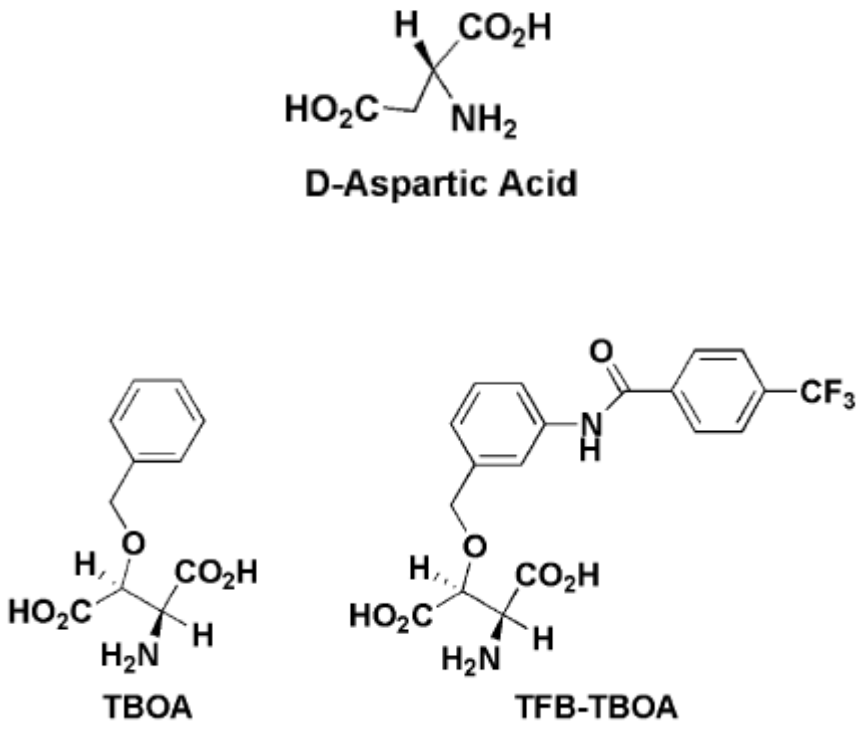


Εικόνα 6: Χημικές δομές και δράσεις αναστολής της αρωματάσης της βιοχανίνης Α και των αναλόγων της [65]

Πιο πρόσφατα, οι Sharma *et al.* συνέθεσαν βενζυλιωμένες χαλκόνες και διαπίστωσαν την ισχυρή αντικαρκινική τους δράση έναντι ανθρώπινων κυττάρων προερχόμενα από επιθετικό καρκίνο του μαστού (MDA-MB-231). Ο τρόπος δράσης αυτών των χαλκονών έναντι του καρκίνου περιελάμβανε απόπτωση, επέμβαση στον κυτταρικό κύκλο και απώλεια της δυναμικότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης, με αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση του mRNA. [66]

Εκτός από τις εφαρμογές στη γενική παθολογία, βενζυλιωμένα ανάλογα φυσικών προϊόντων έχουν χρησιμοποιηθεί και για τη μελέτη του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ). Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι νευροδιαβιβαστές γλουταμικό και ασπαρτικό, η μεταφορά τους από υψηλής συγγένειας μεταφορείς διεγερτικών αμινοξέων (EAATs) στους αντίστοιχους υποδοχείς (EAARs), και ο καθορισμός του διεγερτικού σήματος που δίνουν ανάλογα με την ποσότητα πρόσληψής τους. Η έρευνα εστίασε στην κατάλληλη τοποθέτηση λειτουργικών ομάδων σε χωρικές θέσεις στον ακυκλικό σκελετό των νευροδιαβιβαστών, χρησιμοποιώντας συστήματα δακτυλίου ή υποκαταστάτες που παράγουν μια διαμορφωτική επιλεκτικότητα, με σκοπό τη βελτιωμένη σύνδεση με τους EAATs ή την ολική αναστολή τους. Τα καλύτερα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν από μια

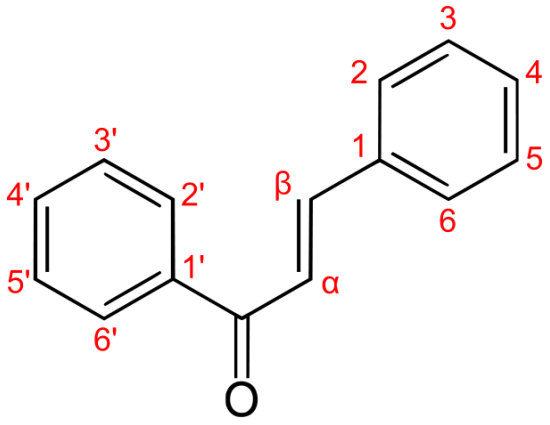
σειρά *θρέο*-βενζυλοξυλιωμένων αναλόγων του ασπαρτικού (TBOA), τα οποία έδρασαν ως αναστολείς μεταφοράς του σήματος από τους EAATs (Εικόνα 7). Βασιζόμενοι σε αυτά, είναι εφικτή η κατανόηση του ρόλου των EAATs στη διαμόρφωση των διεγερτικών σημάτων και την παροχή διεγερσιτοξικής προστασίας, ή ακόμα και στη ρύθμιση της δραστηριότητάς τους για θεραπευτικούς σκοπούς. [67], [68], [69], [70]



Εικόνα 7: Το D-ασπαρτικό οξύ και τα θρέο-βενζυλοξυλιωμένα ανάλογα του ασπαρτικού (TBOA)

Χαλκόνες

Κατά IUPAC, η συστηματική ονομασία των χαλκονών είναι 1,3-διφαίνυλ-2-προπεν-1-όνες. Χημικά, ανήκουν στα φλαβονοειδή ανοιχτής αλυσίδας, όπου οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι συνδέονται με ένα τριανθρακικό α,β-ακόρεστο καρβονυλικό σύστημα. Οι χαλκόνες αποτελούν το πρώτο απομονώσιμο συστατικό κατά τη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών. Παρόλο που θεωρούνται απαραίτητα ενδιάμεσα στο βιοσυνθετικό μονοπάτι, δε συσσωρεύονται σε μεγάλο βαθμό στα φυτά. Αυτό συμβαίνει κυρίως στα φυτά που συγκεντρώνουν φλαβονοειδή που αποδίδουν χρώμα στα άνθη τους.



Εικόνα 8: Γενική δομή χαλκονών

Η πρώτη χαλκόνη ταυτοποιήθηκε ως συστατικό της *Centaurea calcitropa (Asteraceae)* από τους Dawidar et al. το 1989. Επίσης, γνωστές είναι αρκετές χαλκόνες των οποίων ο Α –δακτύλιος προέρχεται από τη ρεσορσινόλη, ενώ ο Β –δακτύλιος δε διαθέτει υποκαταστάτες. Η πιο γνωστή χαλκόνη είναι η 2',4',6',4 –τετραυδρόξυ –χαλκόνη, ή εμπειρικά η «χαλκονοναρινγκενίνη», η οποία συντίθεται υπό τη δράση της συνθάσης της χαλκόνης (CHS).

Όπως συμβαίνει με τις περισσότερες κατηγορίες φλαβονειδών, οι χαλκόνες χαρακτηρίζονται από μεγάλο αριθμό και ποικιλία υποκαταστατών, όπως υδροξυλομάδες, μεθοξυλομάδες, αλκυλομάδες και συνδυασμό αυτών.

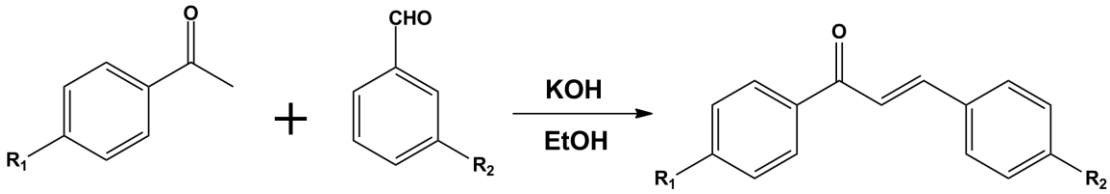
Ένα μικρό τμήμα των παραγώγων των χαλκονών, όπου το πρότυπο της *O*-υποκατάστασης είναι ανεστραμμένο, είναι οι ρετροχαλκόνες. Τυπικό παράδειγμα ρετροχαλκόνης είναι η εχινατίνη (4',4-διϋδρόξυ-2-μεθόξυχαλκόνη), απομονωθείσα από τους ιστούς της *Glycyrrhiza echinata* της οικογένειας Leguminosae, και είναι η ισοδύναμη ρετροχαλκόνη της ισολικιριτιγενίνης.

Έχει αναφερθεί ότι οι χαλκόνες διαθέτουν πολλές χρήσιμες ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων αντιφλεγμονωδών, αντιμικροβιακών, αντιμυκητισιακών, αντιοξειδωτικών, κυτταροτοξικών και αντικαρκινικών δράσεων. [71]

Σύνθεση χαλκονών

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι βασικότερες μέθοδοι σύνθεσης χαλκονών είναι οι εξής:

- Η αντίδραση συμπύκνωσης Claisen –Schmidt μεταξύ μίας κετόνης και μίας αλδεΰδης, σε πολικό διαλύτη όπως αιθανόλη και καταλυόμενη από ασθενή βάση.



Εικόνα 9: Μηχανσμός συμπύκνωσης Claisen Schmidt

Αυτή η μεθοδολογία εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία, οπότε θα αναπτυχθεί περαιτέρω αργότερα.

- Η συμπύκνωση Claisen –Schmidt με τη χρήση υπερήχων έχει αποδειχθεί ότι καταλήγει σε υψηλότερες αποδόσεις, μικρότερο χρόνο και ηπιότερες συνθήκες αντίδρασης. Συγκρινόμενη με τις συμβατικές μεθόδους, η ακτινοβολία υπερήχων θεωρείται μία καθαρή και χρήσιμη τεχνική στην οργανική σύνθεση και ως διεργασία είναι πιο εύχρηστη και λιγότερο κοστοβόρα. Πρόκειται για ένα ηχοχημικό φαινόμενο που προκύπτει από την αλληλεπίδραση μεταξύ του κατάλληλου πεδίου ακουστικών κυμάτων και ενός συστήματος πιθανής χημικής αντίδρασης. Η αλληλεπίδραση λαμβάνει χώρα μέσω του ενδιάμεσου φαινομένου της ακουστικής σπηλαίωσης.

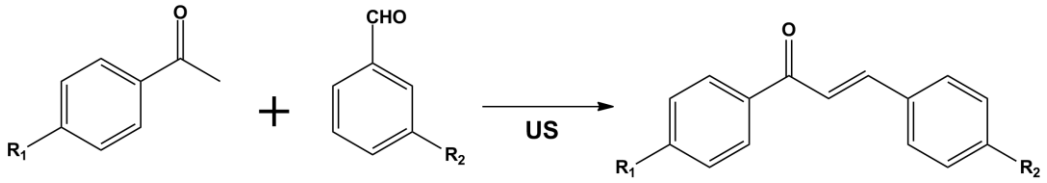
  Η ακουστική σπηλαίωση ως φαινόμενο προκαλεί το σχηματισμό, την ανάπτυξη και την εκρηκτική κατάρρευση φυσαλίδων στην υγρή φάση. Η κατάρρευση είναι μία σχεδόν αδιαβατική διαδικασία, η οποία καταλήγει σε έντονη αύξηση της εσωτερικής ενέργειας στο εσωτερικό της φυσαλίδας, και κατά συνέπεια σε μεγάλη αύξηση της θερμοκρασίας και της πίεσης σε μικροσκοπικές περιοχές του ηχητικά ενεργοποιημένου υγρού. Οι μεγάλες μεταβολές της θερμοκρασίας και της πίεσης οδηγούν στη χημική διέγερση της ύλης που βρίσκεται κοντά ή μέσα στην περιοχή της φυσαλίδας που κατέρρευσε.

  Η αντίδραση Claisen –Schmidt με τη χρήση υπερήχων αποκτά μεγαλύτερες αποδόσεις και αυξημένη εκλεκτικότητα, όταν συνδυάζεται και με ετερογενή κατάλυση. Η ετερογενής κατάλυση αποτελεί προτιμητέα λύση στις αντιδράσεις οργανικής σύνθεσης γιατί αποφεύγονται προβλήματα όπως η

ανάκτηση του καταλύτη, η διαχείριση των αποβλήτων και η παραγωγή προϊόντων από παράλληλες αντιδράσεις (π.χ. αντίδραση Cannizzaro ή αυτοσυμπύκνωση κετονών).

Παραδοσιακά χρησιμοποιούμενοι καταλύτες για την οργανική σύνθεση είναι οι ζεόλιθοι, οι άργιλοι και τα υποστηριζόμενα οξείδια. Πρόσφατα έχουν χρησιμοποιηθεί και οι ενεργοποιημένοι άνθρακες λόγω του αυξημένου τους εμβαδού επιφανείας, της μικροπορώδους δομής και του υψηλού βαθμού επιφανειακή ενεργότητα.

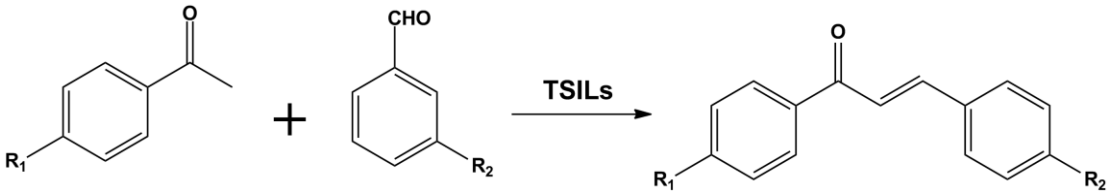
Οι συνθήκες που χρησιμοποιούνται είναι σε θερμοκρασίες 30 -50°C σε υπερηχητικό λουτρό με σύστημα θέρμανσης (40 KHz, 550 W), για 5 ώρες και αποδόσεις έως 80%. [72], [73]



Εικόνα 10: Μηχανισμός συμπύκνωσης Claisen-Schmidt με τη χρήση υπερήχων

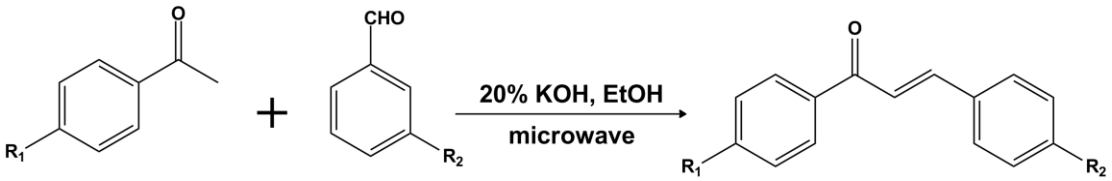
- Μία ακόμα παραλλαγή της κλασσικής συμπύκνωσης Claisen –Schmidt είναι εκείνη με τη χρήση όξινων ιοντικών υγρών. Τα τελευταία χρόνια, τα ιοντικά υγρά έχουν αναδυθεί ως ισχυρή, πράσινη εναλλακτική στους συμβατικούς οργανικούς διαλύτες λόγω συγκεκριμένων ιδιοτήτων τους, όπως μη ανιχνεύσιμη τάση ατμών, μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος υγρής κατάστασης, καθώς και ευκολία ανάκτησης και επαναχρησιμοποίησής τους. Οι Dong et al. χρησιμοποίησαν όξινα ιοντικά υγρά (ειδικού έργου) TSILs για την παραγωγή χαλκονών, όπου τα ιοντικά υγρά είχα διπλό ρόλο, του διαλύτη και του καταλύτη.

Τα ιοντικά υγρά που χρησιμοποίησαν ήταν σε αναλογία 20% και οδήγησαν σε αποδόσεις παραγωγής χαλκόνης 90-95%, εκ των οποίων εκείνα με τη μικρότερη αλκυλική αλυσίδα είχαν την καλύτερη αναμειξιμότητα. Μετά το πέρας της αντίδρασης, τα προϊόντα διαχωρίστηκαν από το καταλυτικό σύστημα με απόχυση με τη χρήση διχλωρομεθανίου. [74]



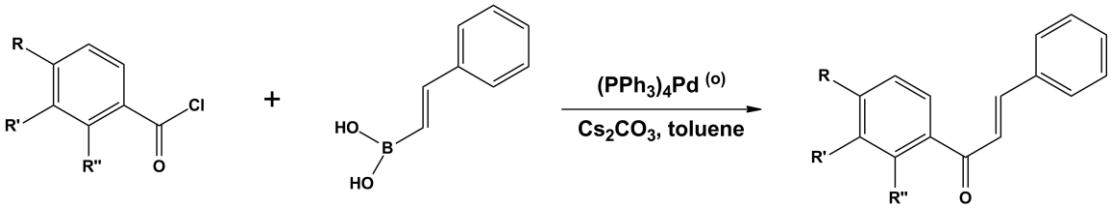
Εικόνα 11: Συμπύκνωση Claisen-Schmidt με χρήση ιοντικών υγρών

- Σε μία ακόμη προσπάθεια ελαχιστοποίησης της χρήσης των τοξικών οργανικών διαλυτών αναφέρεται και η συμπύκνωση Claisen –Schmidt με τη χρήση μικροκυμάτων. Τα πλεονεκτήματα ανέρχονται στο μικρότερο χρόνο αντίδρασης, την ευκολότερη προετοιμασία των αντιδραστηρίων και τα καθαρότερα προϊόντα. Σύμφωνα με τον Srivastava που εφάρμοσε αυτή την τεχνική, έναντι των ισχυρών βάσεων NaOH και KOH χρησιμοποιήθηκε άνυδρο ανθρακικό κάλιο (K_2CO_3), ο χρόνος αντίδρασης κυμάνθηκε μεταξύ 3-5 min και η θερμοκρασία μεταξύ 89-160°C, και οι αποδόσεις άγγιξαν το 80-90%. [75], [76]



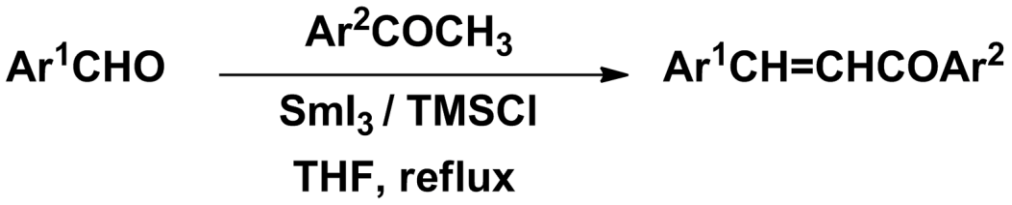
Εικόνα 12: Συμπύκνωση Claisen-Schmidt με χρήση μικροκυμάτων

- Μία ακόμη μέθοδος σύνθεσης χαλκονών είναι η σύζευξη Suzuki, η οποία πρόκειται για σύζευξη φαινυλ-βινυλ-βορονικών οξέων και βενζοϋλοχλωριδίων με σύμπλοκα παλλαδίου ως καταλύτη. Σύμφωνα με την έρευνα των Eddarir et al., η αντίδραση δεν επηρεάζεται από τους υποκαταστάτες τόσο του ακυλοχλωριδίου όσο και του βορονικού οξέος, γεγονός που δίνει πλεονέκτημα στη σύνθεση πολυϋποκατεστημένων χαλκονών. [77]



Εικόνα 13: Μηχανισμός αντίδρασης Suzuki για τη σύνθεση χαλκονών

- Τέλος, ένας ακόμα τρόπος σύνθεσης χαλκονών είναι μέσω της αλδολικής συμπύκνωσης τύπου Mukaiyama, μεταξύ μη κυκλικών κετονών και βενζαλδεϋδών παρουσία ιωδιούχου σαμαρίου και τριμεθυλο-σιλυλο-χλωριδίου. Σύμφωνα με τους Fan & Zhang, οι χαλκόνες που παρασκευάστηκαν με αυτή τη μέθοδο είχαν καλές αποδόσεις, σε ποσοστά 75-82%. [78]



Εικόνα 14: Μηχανισμός αλδολικής συμπύκνωσης τύπου Mukaiyama

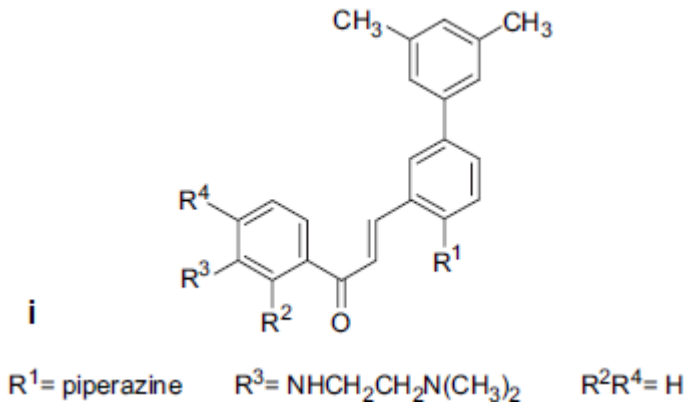
Φαρμακευτική δράση των χαλκονών

Οι χαλκόνες αποτελούν ένα μοναδικό δομικό πρότυπο που σχετίζεται με διάφορες βιολογικές δραστηριότητες. Οι ριζοσπαστικές ιδιότητες των φαινολικών ομάδων που βρίσκονται στις χαλκόνες έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον για τη χρήση συστατικών πλούσιων σε χαλκόνες ως φάρμακα ή συντηρητικά τροφίμων. Οι αντιμολυσματικές και αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες των χαλκονών παρουσιάζονται παρακάτω.

Αντιβακτηριακή δράση

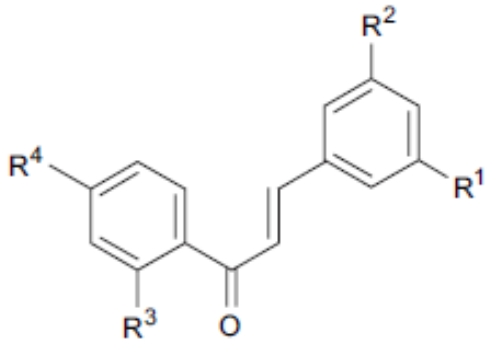
Η αντιβακτηριακή δράση των χαλκονών έχει καταγραφεί λεπτομερώς, τόσο με την απομόνωση και την ταυτοποίηση των φυσικών χαλκονών, όσο και με την σύνθεση και τη μοριακή τροποποίησή τους. Τα εν λόγω αντιβακτηριδιακά αποτελέσματα σχετίζονται με την ικανότητα της α,β –ακόρεστης κετόνης να υποβάλεται στη συζυγή προσθήκη μιας πυρηνόφιλης ομάδας, όπως η θειολική ομάδα, σε κάποια

σημαντική πρωτεΐνη. Παράλληλα, οι Nielsen et al., μελετώντας μια σειρά χαλκονών με αλειφατικούς αμινο –υποκαταστάτες, παρατήρησαν θετικά αποτελέσματα κατά στελεχών του βακτηρίου *Staphylococcus*. Ειδικότερα, αν και οι εν λόγω υποκαταστάτες δεν έδειξαν σημαντική διαφορά όταν βρίσκονταν σε θέσεις του Β δακτυλίου, η λιποφιλικότητα του Α δακτυλίου και η προσθήκη στη θέση 5 αυτού των ογκωδών υποκαταστατών αύξησαν τη δραστικότητα του μορίου. Το πιο υποσχόμενο μόριο από αυτά, το **i,** διέθετε μία πιπεραζίνη στη θέση 2', και ήταν δραστικό έναντι του *S. Aureus (*ανθεκτικό στη μεθυκιλίνη), αλλά και του *Enterococcus faecium* και της *E. coli*. [71], [79]



Εικόνα 15: Ανάλογο χαλκόνης με υποσχόμενη αντιβακτηριακή δράση [79]

Οι Nielsen et al. μελέτησαν επίσης και μια σειρά 4'-καρβόξυ χαλκονών, οι οποίες έδειξαν πολύ καλή αντιβακτηριακή δράση. Η δράση τους σχετίζεται και πάλι με τη λιποφιλικότητα των υποκαταστατών του Α δακτυλίου, η οποία όμως μειώνεται αυξανόμενης της πολικότητας των υποκαταστατών. Συγκεκριμένα οι χαλκόνες **ii** και **iii** είχαν πολύ καλά ανασταλτικά αποτελέσματα στη βακτηριακή ανάπτυξη, ωστόσο δεν προκαλούσαν θνησιμότητα. Δηλαδή οι 4'-καρβοξυ-χαλκόνες ανέπτυξαν ένα βακτηριοστατικό προφίλ, τη στιγμή που οι υδροξυλιωμένες χαλκόνες έχουν αποδειχθεί βακτηριοκτόνες. [80]



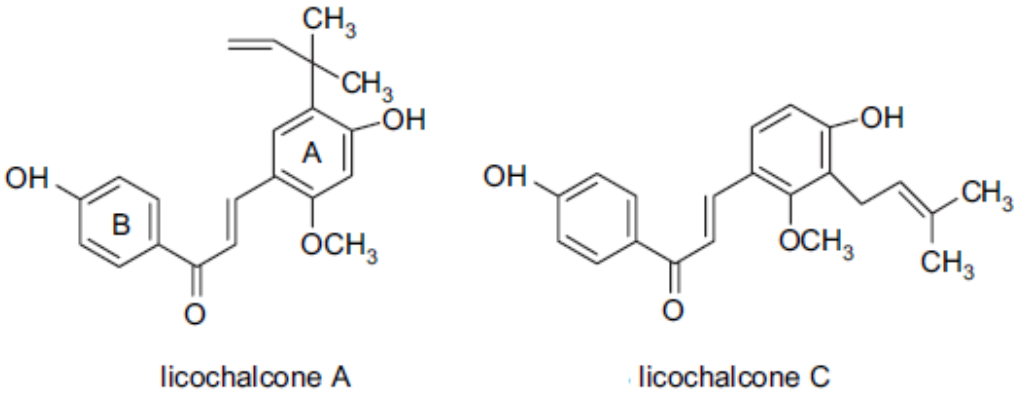
ii R^1R^2= CF_3 R^3= H R^4= COOH

iii R^1R^2= Br R^3= H R^4= COOH

Εικόνα 16: 4'-καρβόξυ-χαλκόνες με βακτηριοστατικό προφίλ [80]

Πιο πρόσφατες μελέτες, έδειξαν ότι και η ασεμπογενίνη και η ισοκιλιτιγερίνη διαθέτουν αντιβακτηριακές ιδιότητες κατά του *S.aureus,* με τη δεύτερη να επιδεικνύει δραστικότητα και στους *S.epidermidis* και *S.haemolyticus*. [81], [82] Επίσης δραστικότητα κατά του ανθρώπινου παθογόνου *S. aureus* αλλά και του ευκαιριακού παθογόνου *B.cereus* έδειξε και η 3',4'-διμέθυλο-5'-μεθυλόξυ-χαλκόνη που απομονώθηκε από το φυτό *Dalea versicolor*, τόσο όταν έδρασε μεμονωμένα όσο και συνεργιστικά με γνωστά αντιβιοτικά (βερβερίνη, ερυθρομυκίνη και τετρακυκλίνη). Μάλιστα, η έρευνα έδειξε ότι η προσθήκη της χαλκόνης αύξησε τη δραστικότητα των αντιβιοτικών. [83]

Ένα ζεύγος ρετροχαλκονών από το φυτό *Glycyrrhiza inflate*, η λικοχαλκόνη Α και η λικοχαλκόνη C, έχουν δείξει επίσης πολύ ευρεία αντιβακτηριακή δράση, ιδιαίτερα έναντι των *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus* και *Micrococcus luteus* (Εικόνα 17). Συγκεκριμένα, τα βακτηριοστατικά αποτελέσματα της λικοχαλκόνης Α εξετάστηκαν από τους Tsukiyama et al. και έδειξαν ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής (MIC) 2-15 μg/ml για σπορογόνα βακτήρια όπως ο *B. subtilis, B. coagulanus* και ο *B. stearothermophilus,* όπως και για το *Clostridium sporogenes* και τα παράγωγα τοξινών *Bacillus cereus*. Η λικοχαλκόνη Α ήταν αποτελεσματική και όταν εξετάστηκε έναντι των *Lactobacillus acidophilus* και *L. plantarum* με MIC ίση με 5 μg/ml, των *Enterococcus faecalis* και *E. faecium* με MIC ίση με 6 μg/ml, όπως και των *Staphylococcus lactis* και *S. Mutans* με MIC ίση με 8 και 5 μg/ml αντίστοιχα. [84]



Εικόνα 17: Οι ρετροχαλκόνες, λικοχαλκόνη A και C

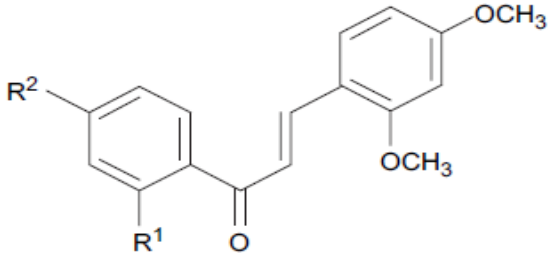
Ειδική μνεία πρέπει να γίνει και για τη δράση των χαλκονών κατά της φυματίωσης και του βακτηρίου που την προκαλεί, του *Mycobacterium tuberculosis*. Η φυματίωση αποτελεί την κορυφαία θνησιγενή μολυσματική ασθένεια και την κύρια αιτία θανάτου των γυναικών σε αναπαραγωγική αιτία. Η λικοχαλκόνη A έδειξε ισχυρή αναστολή τόσο του *M. tuberculosis* όσο και άλλων στελεχών του ίδιου βακτηρίου (*M. kansasii*, *M. xenophii*, *M. marinum*) με MIC ≤ 20 mg/l. Επιπλέον, αυξημένη δραστηριότητα κατά της φυματίωσης επέδειξε η 2'-υδρόξυχαλκόνη με αλογονικό υποκαταστάτη στη θέση 3 του B δακτυλίου (3-χλώρο, 3-ιώδο), με τα ποσοστά αναστολής του *M. tuberculosis* να φτάνουν το 90-92%. [85], [86]

Αντι-λεϊσμανιακή δράση

Η λεϊσμανίαση είναι μια ομάδα διαδεδομένων ασθενειών που προκαλούνται από τα πρωτοζωϊκά παράσιτα που ανήκουν στο γένος της *Leishmania*. Διάφορα είδη του πρωτοζωϊκού αυτού παράσιτου προκαλούν ένα ευρύ φάσμα ασθενειών, από δερματικές αλλοιώσεις προκληθέντων από τη *Leismaniasis major* έως τη θανατηφόρα σπλαγχνική μορφή τους, από τη *Leismaniasis donovani*. Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι μια σειρά φυσικών και συνθετικών παραγώγων χαλκονών είναι ισχυροί παράγοντες κατά της *Leishmania* τόσο σε in vivo όσο και σε in vitro αναλύσεις. [71]

Από τις πιο δραστικές χαλκόνες έχουν αποδειχθεί οι λικοχαλκόνες A και C, οι οποίες παρουσιάζουν ανασταλτικά αποτελέσματα στη δράση σημαντικών πρωτεϊνών, όπως οι ρεντουκτάσες (FRD, NCC, SCC), στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών. [87] Για τη δραστικότητά τους έχουν ξεχωρίσει και οι χαλκόνες **iv-v** έναντι εξω- και ενδοκυτταρικών μορφών των παρασίτων του γένους *Leishmania*. Ειδικότερα, οι Zhai et al. εξέτασαν τη σειρά των νέων οξυγονωμένων

χαλκονών **vi-ix**, οι οποίες παρουσιάσαν αποτελέσματα αναστολής της in vitro ανάπτυξης των *L. major* προμαστιγωτών και των *L. donovani* αμαστιγωτών, πιθανόν λόγω παρεμβολής τους στη λειτουργία των μιτοχονδρίων των παρασίτων. [88]



iv	R^1= H	R^2= $OCH_2CH{=}CH_2$
v	R^1= H	R^2= OC_4H_9
vi	R^1= OH	R^2= H
vii	R^1R^2= H	
viii	R^1= H	R^2= OH
ix	R^1= H	R^2= $OCH_2CH{=}CH_2$

Εικόνα 18: Ανάλογα χαλκονών με βάση τη λικοχαλκόνη C, με αντιλεισμανιακή δράση [89]

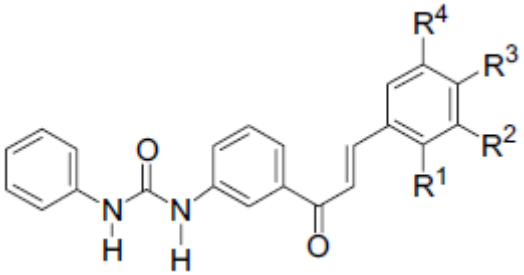
Συνολικά, οι αναλύσεις της in vitro αντιλεϊσμανιακής δραστηριότητας των παραγώγων χαλκονών κατέδειξε ότι οι υποκαταστάτες στο Β δακτύλιο δεν παίζουν ιδιαίτερο ρόλο, αν και η αντικατάσταση των υδροξυλομάδων με οξικές ομάδες αύξησε τη δραστικότητα. [89]

Ανθελονοσιακή δράση

Το *Plasmodium falciparum* και το *Plasmodium vivax* είναι τα κυριότερα παράσιτα της ελονοσίας, με το πρώτο να ευθύνεται για τους περισσότερους θανάτους και να έχει αναπτύξει αντίσταση στα περισσότερα γνωστά φάρμακα. Δεδομένου αυτού, είναι λογική η στροφή ενδιαφέροντος προς τις χαλκόνες και τις ανθελονοσιακές τους ιδιότητες, οι οποίες πιθανόν απορρέουν από την πυρηνόφιλη προσθήκη Michael στο διπλό δεσμό των ενονών. Από τις γνωστές φυσικές χαλκόνες, πολύ δραστική είναι η λικοχαλκόνη Α απέναντι σε στελέχη του *P. falciparum*, τόσο ευαίσθητα όσο και ανθεκτικά στη χλωροκινόνη. [90], [91]

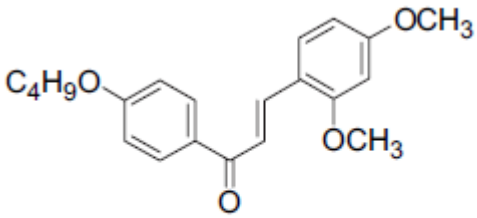
Σε μελέτη των Liu et al. και Go et al. αποδεικνύεται ότι η in vitro ανθελονοσιακή δραστηριότητα των χαλκόνων απέναντι σε στελέχη του ανθρώπινου παρασίτου ανθεκτικό στη χλωροκινόνη, *P. falciparum*, σχετίζεται άμεσα με τις ιδιότητες του Β δακτυλίου. Ως κρίσιμοι παράγοντες ορίστηκαν το μέγεθος και η υδροφοβικότητα των υποκαταστατών, με τις υδροξυλιωμένες χαλκόνες να είναι λιγότερο δραστικές από τις αντίστοιχες αλκοξυλιωμένες. [92], [93]

Οι Dominguez et al. ανέφεραν μια σειρά από φαινυλουρενυλικά παράγωγα χαλκονών, με υποκαταστάτες στον Α δακτύλιο (Εικόνα Εικόνα 19). Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η δραστηριότητα στις περισσότερες περιπτώσεις ρυθμιζόταν σε μεγάλο βαθμό από ομάδες συνδεδεμένες στον υποκατεστημένο αρωματικό Α δακτύλιο (διφθορο-, διχλωρο-, μεθόξυ-). Συγκρίνοντας τα εν λόγω παράγωγα, τα 3'-φαινυλουρενυλικά παράγωγα παρουσίασαν αυξημένη δραστηριότητα σε σχέση με τα 4'-φαινυλουρενυλικά, ιδιαίτερα όσα έφεραν χλωρο-υποκαταστάτη. [94]

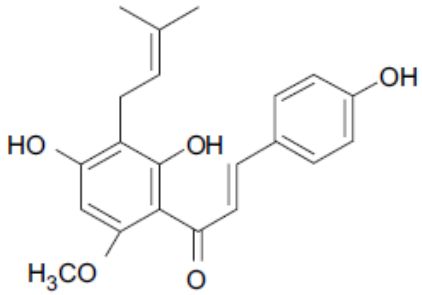


Εικόνα 19: 3' -φαινυλουρενυλικά ανάλογα χαλκονών με ανθελονοσιακή δράση [94]

Ένα νέο μόριο, η 2,4-διμεθόξυ-4'-βουτόξυχαλκόνη, παρουσίασε εξαιρετικές ανθελονοσιακές ιδιότητες τόσο σε ανθρώπινα παράσιτα (in vitro) όσο και σε παράσιτα τρωκτικών (in vivo), χωρίς εμφανείς ενδείξεις τοξικότητας. Τα αποτελέσματα αναστολής της παραπάνω χαλκόνης παρουσιάστηκαν τόσο σε στελέχη του *P. falciparum*, όσο και σε ποντίκια προσβεβλημένα από *P. berghei*, όπου αποφεύχθηκε η παρασιταιμία. [95] Ενδιαφέρον έχουν εγείρει και τα πρενυλιωμένα παράγωγα χαλκονών από λυκίσκο (*Humulus lupulus*), σύμφωνα με τους Frolich et al., οι οποίοι και εξέτασαν τις in vitro αντιπλασμωδιακές τους ιδιότητες. Η κυριότερη από αυτές τις χαλκόνες, η ξανθοχουμόλη, παρουσίασε την ικανότητα να παρεμβαίνει στην διαδικασία αποικοδόμησης της αιμίνης από το *P. falciparum*. [96]



2,4-dimethoxy-4'-butoxychalcone



xanthohumol

Εικόνα 20: Η 2,4-διμεθόξυ-4'-βουτόξυχαλκόνη με εξαιρετικές in vitro και in vivo ανθελονοσιακές ιδιότητες, και η κυριότερη πρενυλιωμένη χαλκόνη, η ξανθοχουμόλη [95.96]

Εν τέλει, όπως προέκυψε από τον in vitro ανθελονοσιακό έλεγχο των Li et al., οι χαλκόνες με χλώρο- και φθόρο-υποκαταστάτες στον Α δακτύλιο και πυρηνόφιλο υποκαταστάτη στο Β δακτύλιο (π.χ. μεθόξυ) είχαν τις καλύτερες ιδιότητες. Επίσης, ο α,β-ακόρεστος κετονικός δεσμός παρέχει σύζευξη μεταξύ των δύο αρωματικών άκρων και είναι κρίσιμος για τη δραστικότητα των μορίων. [97]

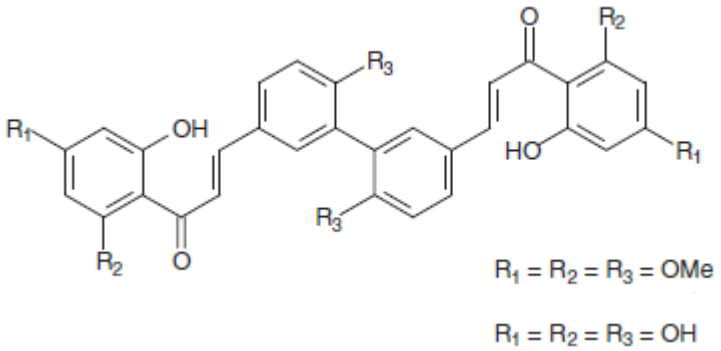
Αντιμυκητησιακή δράση

Εφόσον τα δερματόφυτα είναι μία κατηγορία μυκήτων τα οποία προσβάλλουν χαρακτηριστικά τις κερατινοειδείς περιοχές του σώματος, και οι δερματικές μυκητιάσεις είναι πολύ δύσκολο να καταπολεμηθούν, είναι πολύ ενδιαφέρον το ότι παράγωγα χαλκονών έχουν δείξει δραστηριότητα κατά των δερματόφυτων και καμίας άλλης κατηγορίας μυκήτων. Σύμφωνα με τους Lopez et al. και σχετικά με τους υποκαταστάτες του Α δακτυλίου, υπάρχουν 3 χαρακτηριστικά που καθορίζουν τη σχέση δομής-δράσης των χαλκονών με ανθρώπινους ευκαιριακούς παθογόνους μύκητες. (α) Ομάδες που είναι δότες ηλεκτρονίων τείνουν να εξασθενούν την αντιμυκητησιακή δράση. (β) Ηλεκτρονιόφιλες ομάδες στην *para*-θέση αυξάνουν την ισχύ των μορίων, ενώ ογκώδεις υποκαταστάτες στην *ortho*-θέση την μειώνουν επειδή επηρεάζουν την επιπεδότητα του μορίου και προκαλούν στερεοχημική παρεμπόδιση. (γ) Η παρουσία μιας ενονικής σύνδεσης είναι δομικά απαραίτητη αλλά όχι ικανή για να εξασφαλίσει την αντιμυκητησιακή δραστηριότητα. [98]

Μερικά παραδείγματα χαλκονών με αξιόλογη αντιμυκητησιακή δράση είναι αρχικά η πρενυλιωμένη χαλκόνη, ισομπαβαχαλκόνη, από τα φύλλα της *Maclura tinctoria*, η οποία ήταν ενεργή στους παθογόνους μύκητες *Candida albicans* (με IC_{50} 3μg/ml)

και *Cryptococcus neoformans* (με IC_{50} 7 μg/ml). [99] Επίσης το μεθανολικό εκχύλισμα από τη *Zuccagnia punctate* που περιείχε 2′,4′-διϋδρόξυ-3′-μεθόξυ-χαλκόνη και 2′,4′-διϋδροξυ-χαλκόνη παρουσίασε πολλή καλή δραστηριότητα απέναντι στα *Phomopsis longicolla* και *Colletotrichum truncatum*. [100] Τέλος, ο βιολογικός έλεγχος παραγώγων διϋδροχαλκονών από τους Okunade et al. έδειξε ότι η 2′,4′-υδρόξυ-4′μεθόξυ-διϋδροχαλκόνη έχει σχετικά καλή δραστηριότητα απέναντι στα 2 κυριότερους παθογόνους μύκητες που σχετίζονται με το AIDS, την *C. albicans* και την *C. Neofermans*. [101]

Εκτός από τις χαλκόνες ως μονομερή συστατικά, και οι διμερείς τους ενώσεις, διχαλκόνες, έχουν παρουσιάσει αντιμυκητησιακή δράση πολλές φορές μεγαλύτερη από αυτή των αντίστοιχων μονομερών τους. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Sagrera et al., οι 2′-2‴-διϋδρόξυ-διχαλκόνες τύπου BB (διαφλαβονυλικός δεσμός μεταξύ των B δακτυλίων στη θέση 3) παρουσίασαν δραστικότητα έναντι τουλάχιστον ενός στελέχους μύκητα, κάτι που οφείλεται στην ύπαρξη του α,β-συζευγμένου συστήματος και της συνεπιπεδότητας του A ή B δακτύλιου και των υποκαταστατών του C-3. Παραδείγματα τέτοιων διχαλκονών είναι η 4′,6′,4-τριομεθόξυ-2′,2‴-διϋδρόξυ-διχαλκόνη και η 2′,4′,6′,2‴,4-πεντοϋδρόξυ-διχαλκόνη, οι οποίες ήταν δραστικές έναντι των *C. albicans, C. neoformans, R. stolonifer* και *A. niger*. [102]



Εικόνα 21: Διχαλκόνες τύπου BB με αντιμυκητησιακή δράση [102]

Αντιική δράση

Οι αντιικές ιδιότητες των χαλκονών ανακαλύφθηκαν κατά τη διάρκεια μελετών των ιών των φυτών και των ανθρώπινων ρινοϊών. Η μεταβλητή αντιική δραστικότητα των χαλκονών υποδηλώνει ότι η δραστικότητα κάθε χαλκόνης εξαρτάται από συγκεκριμένα πρότυπα υποκατάστασης.

Ίσως η πιο σημαντική αντιική δραστηριότητα των χαλκονών, είναι η δράση τους κατά του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) που προκαλεί το επίκτητο

σύνδρομο ανοσοανεπάρκειας (AIDS). Οι Wang et al. ανέφεραν ότι η ξανθοχουμόλη είναι επιλεκτικός αναστολέας του HIV-1 και πιθανόν να αντιπροσωπεύει ένα νέο θεραπευτικό φορέα για τις HIV-1 λοιμώξεις. Ο στόχος της ξανθοχουμόλης στον HIV-1 πιθανόν να βρίσκεται στα στάδια μετά την αντίστροφη μεταγραφή. Επίσης, η ξανθοχουμόλη επέδειξε δραστικότητα και απέναντι στον ιό του απλού έρπητα τύπου 1 και 2 (HSV-1, HSV-2) και τον κυτταρομεγαλοϊό (CMV).

Ενδιαφέρον έδειξαν και οι μελέτες των Wu et al. σε χαλκόνες που προέρχονταν από φυτά του γένους *Desmos*, οι οποίες παρουσίασαν πιθανή αντι-HIV δραστηριότητα και καλο θεραπευτικό δείκτη, πιθανόν λόγω της ύπαρξης μεθυλομάδας στη θέση C-4. [103] Επίσης, σε μελέτη τους οι Nakagawa-Goto και Lee, συνέθεσαν χαλκόνες με προέλευση το γένος *Desmos* και πιθανή αντι-HIV δράση. [104] Θετικά αποτελέσματα κατά της πρωτεάσης του HIV-1 έδειξαν και η βουτεΐνη και η φλωρετίνη, με τη βουτεΐνη να προκαλεί αναστολή άνω του 50% σε συγκέντρωση 50μg/ml. [105]

Με αυτά ως γνώμονα, οι Casano et al. συνέθεσαν μία σειρά χαλκονών με μεθόξυ-, φθόρο- και τριφθορομέθυλ- υποκαταστάτες, και την εξέτασαν ως προς την αντι-HIV δράση τους. Οι δοκιμές είχαν πολύ καλά αποτελέσματα, ιδιαίτερα για τα μόρια με para υποκατάσταση στον B δακτύλιο, η οποία ευνοούσε την HIV-2 δραστικότητα. [106]

Αντιφλεγμονώδης δράση

Μία εν δυνάμει θεραπεία των φλεγμονωδών ανωμαλιών, στην οποία στοχεύει και η χρήση των χαλκονών ως αντιφλεγμονώδη, είναι η αναστολή παραγωγής προσταγλαδίνης E_2 (PGE_2) και νιτρικού οξέος (NO).

Η in vitro μελέτη των διμεθυλαμινο-χαλκονών κατέδειξε την ανασταλτική τους δράση στους μεσολαβητές των PGE_2 και NO. Ειδικότερα, η 2′,6′-διμεθόξυ-διμεθυλαμινο-χαλκόνη και η 2′,3′-διμεθόξυ-διμθυλαμινο-χαλκόνη παρουσίασαν αναστολή της παραγωγής NO ανάλογη της σύγκεντρωσής τους, όταν η 2′,4′-διμεθοξυλίωση, η τριμεθοξυλίωση, η απουσία μεθοξυλίων αλλά και η διχλωρίωση οδήγησε σε λιγότερο ενεργά παράγωγα. Όσα παράγωγα ήταν ενεργά, δεν ανέστειλαν μόνο την πραγωγή των PGE_2 και NO, αλλά και την έκφραση της επαγόμενης NO συνθάσης (iNOS) αι της κυκλοοξυγενάσης-2. [107]

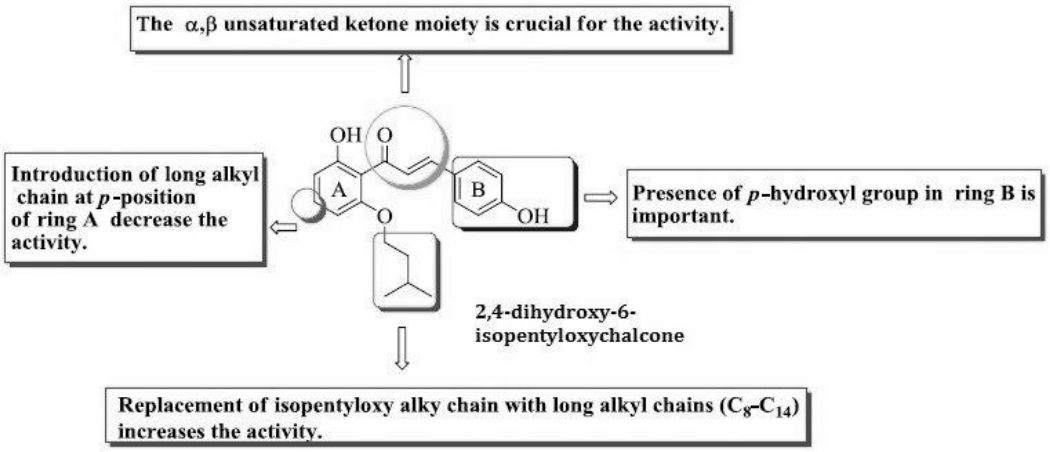
Παράγωγα της τριμεθόξυχαλκόνης, με διάφορες παραλλαγές φθορίωσης, μελετήθηκαν από τους Rojas et al. για τη συμβολή τους στην παραγωγή του NO. Η 2,4,6-τριμεθόξυ-2′-τριφθορο-μεθυλοχαλκόνη ανέστειλε την παραγωγή NO και PGE_2 σε μακροφάγα κύτταρα. Η αναστολή αυτή ήταν της τάξης του 76.3% σε συγκέντρωση 10μM, ανάλογη της δόσης και δεν παρουσίαση κυτταροτοξική

επίδραση. Η μείωση της παραγωγής NO ήταν αποτέλεσμα της αναστολής της έκφρασης της iNOS, ενώ η μείωση της PGE_2 δεν είχε να κάνει με την άμεση επίδραση στην έκφραση της κυκλοοξυγενάσης-2. [108]

Χαλκόνες που φέρουν πρένυλ- και γεράνυλ- ομάδες, ταυτοποιημένες στον λυκίσκο, έχουν αποδειχθεί ότι αναστέλλουν σημαντικά την παραγωγή NO, χωρίς φαινόμενα κυτταροτοξικότητας για συγκεντρώσεις κάτω των 10μM. Η διαφορά μεταξύ αυτών των χαλκονών είναι στην πρενυλική πλευρική αλυσίδα, ωστόσο η ανασταλτική τους ικανότητα ήταν σχεδόν ίδια, γεγονός που υποδηλώνει ότι η πρενυλική αλυσίδα ίσως δεν είναι τόσο σημαντική για τα εν λόγω ανασταλτικά αποτελέσματα. Αντιθέτως, τα συστατικά που στερούνταν τον διπλό δεσμό μεταξύ των α- και β- θέσεων, παρουσίασαν πολύ ασθενέστερη ανασταλτική δραστηριότητα από τις υπόλοιπες χαλκόνες. [71], [109]

Βασιζόμενοι στις παραπάνω αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των πρενυλιωμένων χαλκονών, οι Vogel et al. συνέθεσαν μία σειρά χαλκονών με γονικό μόριο την 3-υδρόξυ-ελιχρυσετίνη και την 3-υδρόξυ-ξανθοχουμόλη, και τις εξέτασαν ως προς την αντιφλεγμονώδη δράση τους. Το πιο δραστικό αποδείχθηκε η 3′-κουμαρόυλ-2′,4,4′-τριϋδρόξυ-6′-μεθόξυ-χαλκόνη η οποία επέδειξε εξαιρετική αντιοξειδωτική δράση και παρεμπόδιση στην έκφραση μοριων που συμμετέχουν στη σειρά ενεργοποίησης τους μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. [110]

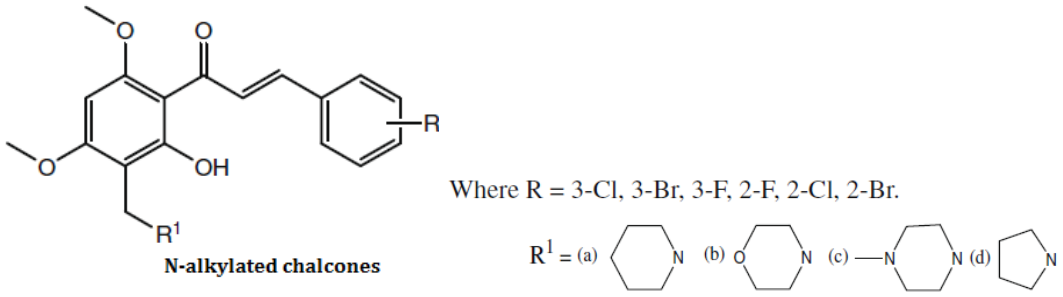
Την αναστολή της έκφρασης του NF-κB προερχόμενου από το πολυσακχαρίδιο (PLS) και κατά συνέπεια την παρεμπόδιση φλεγμονωδών ανωμαλιών, όπως η σήψη, μελέτησαν οι Venkateswararao et al. Οι συγκεκριμένοι ανέλαβαν να ερευνήσουν τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις συνθετικών λιπόφιλων χαλκονών, ξεκινώντας από την 2,4-διϋδρόξυ-6-ισοπεντυλόξυ-χαλκόνη. Η σχέση δομής-δράσης έδειξε ότι η εισαγωγή μεγάλων αλκυλικών αλυσίδων στην *para* θέση του Α δακτυλίου μειώνει τη δραστικότητα του μορίου, κάτι που δε συμβαίνει αν αυτή η εισαγωγή γίνει με την αντικατάσταση της ισοπεντυλόξυ- αλυσίδας (το μέγεθος της αλκυλικής αλυσίδας μεταξύ C8-C14, με βέλτιστο C-10). Επίσης, η παρουσία μιας *p*-υδροξυλομάδας στον Β δακτύλιο υπήρξε σημαντική για την αντιφλεγμονώδη δράση του μορίου, και προτιμότερη από την ύπαρξη μιας *m*-χλώρο ή *m,o*-μεθόξυ ομάδας. [111]



Εικόνα 22: Δομικά χαρακτηριστικά και η σχέση δομής-αντιφλεγμονώδους δράσης λιποφιλικών, αλκυλιωμένων χαλκονών [111]

Η έρευνα των χαλκονών για την σύνθεση νέων αναλόγων με αντιφλεγμονώδη δράση δεν περιορίζεται μόνο στην αναστολή των φλεγμονωδών μεσολαβητών (πχ NF-κB), αλλά και των προφλεγμονωδών ομολόγων. Μία κατηγορία αυτών είναι και τα λευκοτριένια, η βιοσύνθεση των οποίων καταλύεται από τη λιποξυγενάση (LOX). Οι Detsi et al. συνέθεσαν μία σειρά 2'-υδρόξυ-χαλκονών και τις εξέτασαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση και ως προς την αναστολή της λιποξυγενάσης, προερχόμενη από σόγια. Οι εν λόγω χαλκόνες έφεραν δομικά ανά περιπτώσεις μεθόξυλομάδες στον Α δακτύλιο και μεθόξυ-, χλώρο- και μεθύλο-ομάδες στον Β. Με βάσει τις σχέσεις δομής-δράσης, την καλύτερη δραστηριότητα έδειξε η 2',4'-μεθόξυ-χαλκόνη, ενισχύοντας τον ισχυρισμό ότι οι 4'-υποκαταστάτες παίζουν καίριο ρόλο. [112]

Την αναστολή προφλεγμονωδών ενζύμων εξέτασαν και οι Bandgar et al., συνθέτοντας μία σειρά χαλκονών που έφεραν στους υποκαταστάτες τους άζωτο. Οι εν λόγω χαλκόνες εξετάστηκαν και έδωσαν θετικά αποτελέσματα ως προς την αναστολή της τρυψίνης και της β-γλυκουρονιδάσης, και την καλύτερη δραστηριότητα είχαν τα ανάλογα με υποκαταστάτη την ομάδα Ν-μέθυλο πιπεραζίνη στον C-3' και φθόρο-υποκαταστάτη στον C-3. Επίσης, Ν-αλκυλιωμένες χαλκόνες παρουσίασαν αναστολή και της COX-1 και COX-2. [113]



Εικόνα 23: N-αλκυλιωμένες χαλκόνες με αντιφλεγμονώδη δράση [113]

Τέλος, οι Yang et al. ανέλαβαν να εξετάσουν την δυνατότητα των χαλκονών να αναστείλουν την έκκριση του προφλεγμονωδούς μεσολαβητή ιντερλευκίνης-5 (IL-5), παρασκευάζοντας νέα ανάλογα με βενζυλόξυ- και κυκλοεξυλμεθόξυλ-υποκαταστάτες. Από τις μελέτες δομής-δράσης κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι για την αναστολή της IL-5 η ύπαρξη μιας υδρόφοβης ομάδας όπως βενζυλοξυ-ομάδας ή κυκλοεξυλμεθόξυλ-ομάδας είναι απαραίτητη, καθώς και του φαινολικού υδροξυλίου στον C-6'. Επιπλέον υποκαταστάτες που μπορούν να δράσουν ως δότες ηλεκτρονίων στη θέση C-4 αυξάνει την δραστηριότητα. [114]

Αναστολή της τυροσινάσης

Η τυροσινάση, γνωστή και ως οξειδάση της πολυφαινόλης, πρόκειται για ένα ένζυμο που φέρει χαλκό και είναι ευρέως διαδεδομένο στη φύση. Καταλύει 2 αντιδράσεις σχετιζόμενες με το μοριακό οξυγόνο, στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της μελανίνης: την υδροξυλίωση των μονοφαινολών σε ορθοφαινόλες και την οξείδωση των ορθοφαινολών σε ορθοκινόνες. Αυτές οι ορθοκινόνες είναι έντονα δραστικές και τείνουν να πολυμερίζονται αυθόρμητα προς το σχηματισμό καφέ κηλίδων υψηλού μοριακού βάρους (μελανίνες), οι οποίες καθορίζουν το χρώμα του δέρματος των θηλαστικών και του τριχώματός τους. Επίσης, οι κινόνες αντιδρούν με τα αμινοξέα και τις πρωτεΐνες και συνεπώς ενισχύουν την ανάπτυξη του καφέ χρώματος.

Πολλές δερματολογικές διαταραχές, όπως οι κηλίδες γήρατος και περιπτώσεις ακτινικών βλαβών, προκύπτουν από τη συσσώρευση μεγάλου ποσοστού επιδερμικών κηλίδων. Έτσι, οι αναστολείς της τυροσινάσης απέκτησαν μεγάλη σημασία στην ιατρική και την κοσμητική, ώστε να καταπολεμηθεί η υπερ-κηλίδωση λόγω της ενζυμικής οξείδωσης. Οι περισσότεροι, φυσικοί αναστολείς της τυροσινάσης που έχουν καταγραφεί μέχρι στιγμής αποτελούνται από φαινολική δομή ή μεταλλικούς χηλικούς παράγοντες. Τέτοια συστατικά με φαινολικά

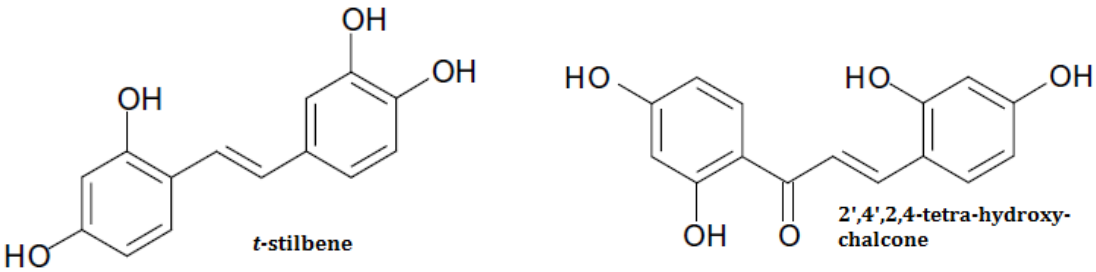
υδροξύλια και να δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα με μέταλλα μετάπτωσης, είναι οι χαλκόνες. Τα φαινολικά υδροξύλια των χαλκονών διαθέτουν αντιοξειδωτική δράση, λόγω της ικανότητάς τους να δίνουν ένα ηλεκτρόνιο, αλλά και να συνθέτουν χηλικά σύμπλοκα με χαλκό και ιόντα σιδήρου, με αποτέλεσμα να μειώνουν τις αντιδράσεις ελευθέρων ριζών και να ελαχιστοποιούν τις δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου (ROS, RNS). Τελικά, οι χαλκόνες εκκαθαρίζοντας τις δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου (ROS, RNS) αναστέλλουν ή καθυστερούν τη δερματική κηλίδωση, δεδομένου ότι τα ROS και RNS προάγουν τη σύνθεση της μελανίνης. Εναλλακτική μέθοδος αναστολής της τυροσινάσης είναι η μείωση του αριθμού των ορθοκινονών άλλων ενδιάμεσων του βιοσυνθετικού μονοπατιού της μελανίνης, και συνεπώς καθυστερώντας τον οξειδωτικό πολυμερισμό.

Κάποιες από τις πρώτες έρευνες πάνω στην αναστολή της τυροσινάσης εφαρμόστηκαν πάνω στις φυσικές χαλκόνες βουτεΐνη και ισολικιριτιγενίνη (ILC), και μάλιστα συντέθηκαν ανάλογα αυτών των δύο, ώστε να εξεταστεί η σχέση δομής-δράσης μεταξύ των υποκαταστατών και τη θέση τους πάνω στους δακτύλιους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η θέση των υδροξυλομάδων πάνω στους δακτύλιους A και B είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη δράση των χαλκονών, και ιδιαίτερα η υδροξυλίωση στον B δακτύλιο συνεισφέρει σημαντικά στην αναστολή του ενζύμου σε σχέση με τον A. μάλιστα αποδείχθηκε ότι η θέση των υδροξυλομάδων στον B δακτύλιο υπερέχει σημασίας από τον αριθμό των υδροξυλικών υποκαταστατών στο μόριο, με πιο δραστική θέση υποκατάστασης τον C-4 του B δακτυλίου. [115]

Συνεχίζοντας την έρευνα πάνω στη δυνητική δράση των χαλκονών ως αναστολείς της τυροσινάσης, οι Khatib et al. συνέθεσαν ανάλογα που έφεραν τμήματα της ρεσορκινόλης και της κατεχόλης. Ο λόγος για τον οποίο επιλέχθηκαν οι συγκεκριμένες δομές στηρίζεται στην υπόθεση ότι η μοριακή δομή που περιέχει στο ίδιο συστατικό ένα τμήμα ρεσορκινόλης (με την ιδιότητα να διεισδύει στο ενεργή πλευρά του ενζύμου και να την αναστέλλει) μαζί με ένα τμήμα κατεχόλης (το οποίο, αν σχεδιαστεί κατάλληλα, μπορεί να δημιουργήσει χηλικό σύμπλοκο με τα ιόντα χαλκού που βρίσκονται στην ενεργή πλευρά του ενζύμου) θα μπορεί να προσδώσει ιδιότητες αναστολής της χαλκόνης. Επίσης, τα νέα μόρια που συντέθηκαν διέθεταν και φαινολικά υδροξύλια, τα οποία μπορούν να αποτρέψουν την κηλίδωση που δημιουργείται από αυτοοξειδωτικές αντιδράσεις.

Τα αποτελέσματα δομής-δράσης έδειξαν ότι η κατεχολική μονάδα στον A δακτύλιο των χαλκονών δημιουργεί χηλικό σύμπλοκο με τα ιόντα χαλκού, ενώ η κατεχολική μονάδα στον B δακτύλιο οξειδώνεται από τα ιόντα χαλκού προς ορθοκινόνες. Επίσης, από τα ανάλογα που παρασκευάστηκαν με όλους τους εναλλακτικούς συνδυασμούς προσθήκης των μονάδων ρεσορκινόλης και κατεχόλης, ο πλέον ισχυρά ανασταλτικός συνδυασμός ήταν αυτός της 2’,4’,2,4-τετραϋδρόξυ-χαλκόνης, δηλαδή η χαλκόνη που περιείχε το τμήμα της ρεσορκινόλης τόσο στον A όσο και

στον Β δακτύλιο. Μάλιστα, η 2′,4′,2,4-τετραϋδρόξυ-χαλκόνη ήταν 7,5 φορές πιο ισχυρή από το αντίστοιχο φυσικό μόριο *t*-στιλβένιο. [116]



Εικόνα 24: Η 2′,4′,2,4,-τετραϋδρόξυ-χαλκόνη και το αντίστοιχο φυσικό μόριο t-στιλβένιο, ως αναστολείς της τυροσινάσης [116]

Αντικαρκινική δράση

Τμήμα της ευρείας φαρμακευτικής δραστηριότητας των χαλκονών αποτελεί και η αντικαρκινική, τόσο των φυσικών όσο και των συνθετικών αναλόγων, τα οποία έχουν επιδείξει κυτταροτοξική δράση (αντιμιτωτική, αναστολείς της ανάπτυξης κυττάρων) σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων. Είναι επίσης δραστικές σε in vivo ελέγχους ως αναστολείς του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και παράγοντες χημειοπροφύλαξης και αντικαρκινικής προώθησης. Δεδομένου ότι ένας μεγάλος αριθμός κλινικά χρήσιμων αντικαρκινικών φαρμάκων παρουσιάζουν γενοτοξικά αποτελέσματα λόγω της αλληλεπίδρασης τους με τα αμινοξέα των νουκλεϊκών οξέων, οι χαλκόνες διατείνεται ότι στερούνται αυτής της σημαντικής παρενέργειας.

Όπως έχει προαναφερθεί η ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων – άλφα (TNF-α) αποτελούν σημαντικοί πολυλειτουργικοί, προφλεγμονώδεις παράγοντες της κατηγορίες των κυτοκινών, στους οποίους έχει στραφεί η φαρμακευτική αντιμετώπιση των φλεγμονών με τη χρήση των χαλκονών. Εκτός αυτού, συμμετέχουν και στην παθογένεση του καρκίνου μέσω μίας σειράς σηματοδοτικών μονοπατιών των κυτοκινών. Συνεπώς έχουν προταθεί ως στόχος για τη θεραπεία του καρκίνου.

Κάποιες από τις φυσικές χαλκόνες που έχουν σημειωθεί για την αντικαρκινική τους δράση είναι η λικοχαλκόνη Α, από τη ρίζα γλυκόριζας, η 3′, 4, 4′,5′ – τετραμεθόξυ – 3 – υδρόξυ – χαλκόνη από το φυτό *Scutellaria barbata* της οικογένειας Labiatae, και η κουρκουμίνη. Ειδικά για η τελευταία, αποτέλεσε δομική αφετηρία για τη σύνθεση δεκαεννέα συνθετικών χαλκονών και την εξέταση της αντικαρκινικής και αντιοξειδωτική δράσης, από τους Anto et al. Ο λόγος που επιλέχθηκε η κουρκουμίνη ως το φυσικό μοντέλο σύνθεσης, είναι γιατί είναι γνωστή για την

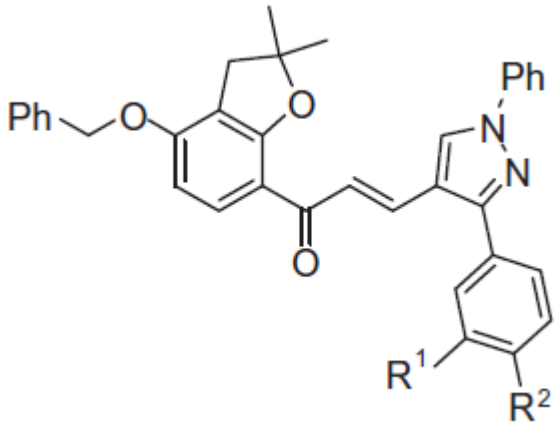
αντιοξειδωτική της δράση και έχει ερευνηθεί και ως χημειοπροληπτικός παράγοντας. Οι συνθετικές χαλκόνες που παρασκευάστηκαν, διέθεταν μια πληθώρα υποκαταστατών (-CH_3, -Cl, -OH, -NO_2, -O-CH_2-O και –$N(CH_3)_2$), σε διάφορες θέσεις επι των μορίων.

Τα in vivo αποτελέσματα των ερευνών έδειξαν θετικά αποτελέσματα κατά του ασκίτη και του καρκίνου του ήπατος σε ποντίκια. Πιο συγκεκριμένα, οι χαλκόνες με μέθυλο και υδρόξυ υποκαταστάτες, καθώς και όσες δεν διέθεταν υποκαταστάτες, έδειξαν αυξημένη κυτταροτοξικότητα, ενώ οι υπόλοιπες τη μείωσαν. Ο λόγος που οι χαλκόνες χωρίς υποκαταστάτες και εκείνες με μέθυλο- και υδρόξυ- ομάδες είχαν καλύτερα αποτελέσματα στις καλλιέργειες ιστών είναι ίσως επειδή προσδίδουν στο μόριο καλύτερη διαπερατότητα στα κύτταρα. Επίσης, καλύτερα αποτελέσματα μείωσης του καρκίνου και αντιοξειδωτικής δράσης παρουσιάστηκαν όταν πυρηνόφιλοι υποκαταστάτες τοποθετούνταν σε *ortho* και *para* θέσεις επί των δακτυλίων. [117]

Οι Bandgar et al. συνέθεσαν μια σειρά μεθοξυλιωμένων χαλκονών, δοκιμάζοντας μια πληθώρα υποκαταστατών και αξιολογώντας την αντικαρκινική τους δράση. Πιο συγκεκριμένα, οι έρευνες επικεντρώθηκαν στις 2,4-διμεθόξυ και 3,4,5-τριμεθόξυ χαλκόνες και τα μόρια που παρασκευάστηκαν, ελέγχθηκαν έναντι πέντε ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών, της ACHN (ρηνικό κυτταρικό καρκίνωμα), της Pancc1 (πανγκρεατικό καρκίνωμα), της Calu1 και H460 (μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα), και της HCT116 (καρκίνωμα του παχέος εντέρου). Τα αποτελέσματα της 2,4-διμεθόξυ-χαλκόνης ήταν εξαιρετικά με ποσοστά αναστολής των καρκινικών σειρών 90-95%, τα οποία όμως δεν παρέμειναν υψηλά (μείωση στο 15-50%) όταν προστέθηκαν υποκαταστάτες στο Β δακτύλιο. Όσον αφορά την 3,4,5-τριμεθόξυ-χαλκόνη, η αντικαρκινική δράση της ήταν αμελητέα, με εξαίρεση τα ανάλογα με μεθοξυ- υποκαταστάτες στο Β δακτύλιο (ποσοστά 50-95%). Τέλος, το καλύτερο αποτέλεσμα (ποσοστό αναστολής 100% συγκρινόμενο με αυτό των συμβατικών αντικαρκινικών φαρμάκων φλαβοπυριδινόλη και γεμσιταμπίνη) είχε η 4’-νίτρο-3,4,5-τριμεθόξυ-χαλκόνη. [118]

Τα τελευταία χρόνια, ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων τύπων φαρμακολογικά ενδιαφέροντων, υβριδικών αναλόγων χαλκονών για την αναζήτηση νέων φαρμάκων έχει εγείρει την προσοχή των ερευνητών. Διάφορες δομικές μετατροπές στο υπόστρωμα της χαλκόνης , ιδιαίτερα με την αποκατάσταση του Α ή/και του Β φαινυλικού δακτυλίου με ετεροκυκλικές ομάδες, έχουν βελτιώσει το βιολογικό τους προφίλ. Βάσει αυτών, οι Nagaraju et al. σχεδίασαν και συνέθεσαν μια νέα τάξη χαλκονών, με τη διϋδροβενζοφουρανική ομάδα ως Α δακτύλιο και είτε μία υποκατεστημένη φαινυλική ή μία πυραζολική ομάδα ως Β δακτύλιο, συνδέοντας τες με τρϊανθρακική αλυσίδα και εξετάζοντας την κυτταροτοξική τους δράση.

Το κυτταροτοξικό δυναμικό των νέων υβριδικών χαλκονών εξετάστηκε in vitro έναντι τεσσάρων καρκινικών κυτταρικών σειρών –του καρκίνου του προστάτη (PC-3), του καρκίνου τους παχέος εντέρου (HT-29), του καρκίνου του πνεύμονα (NCI-H460) και μακροφάγων ποντικιών (B-16). Έπειτα από σύγκριση με δεδομένα βιβλιογραφίας, πιστοποιήθηκε ότι η εισαγωγή της διϋδροφουρανικής ομάδας προσδίδει διαφορετική και αυξημένη δραστηριότητα στα μόρια των χαλκονών, και μάλιστα σημειώθηκε εκλεκτικότητα απέναντι στην PC-3 κυτταρική σειρά του καρκίνου του προστάτη –οπότε και αναμένεται περαιτέρω δομική βελτιστοποίηση για την πιθανή σύνθεση υποψήφιων αντικαρκινικών φαρμάκων. [119]



Εικόνα 25: Χημική δομή των υβριδικών χαλκονών [119]

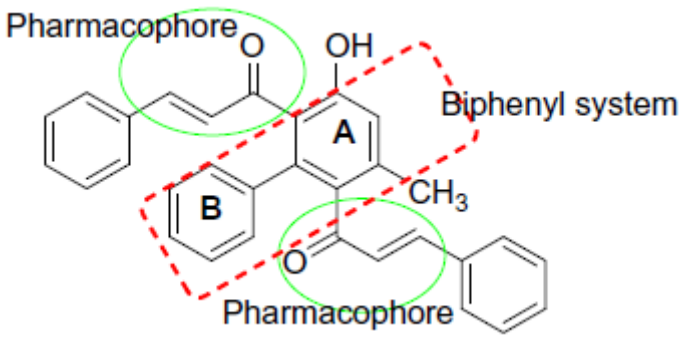
Εκτός από την αναστολή μεσολαβητών των σηματοδοτικών μονοπατιών, οι έρευνες για τη χρήση των χαλκονών ως αντικαρκινικοί παράγοντες έχουν στραφεί και σε άλλους πιθανούς μηχανισμούς. Ένας από αυτούς είναι και η χρήση των χαλκονών για την παρεμπόδιση της διαδικασίας της αγγειογένεσης. Αγγειογένεση ονομάζεται η διαδικασία σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων από προϋπάρχοντα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (EC) διατηρούν την ικανότητά τους να πολλαπλασιάζονται ταχέως, ως απόκριση σε κάποιο φυσιολογικό ερέθισμα, όπως η υποξία για τα αιμοφόρα αγγεία και η φλεγμονή για τα λεμφαγγεία. Συνεπώς, η αγγειογένεση επανεργοποιείται κατά τη διάρκεια της επούλωσης και αποκατάστασης τραυμάτων. Επίσης, σε πολλές διαταραχές, το εν λόγω ερέθισμα μπορεί να γίνει ανεξέλεγκτο, και να οδηγήσει σε μια μεταστροφή της αγγειογένεσης. Η αγγειογένεση θεωρείται ορόσημο για την ανάπτυξη, εισβολή και μετάσταση του καρκίνου –όχι όμως και για την κακοήθειά τους. Οι όγκοι παραμένουν ανάγγειοι και λανθάνοντες για χρόνια, ωστόσο η ανάπτυξη του όγκου μπορεί να έχει ως αφετηρία μια νέο-αγγειογένεση. Η ιδέα της αναστολής της ανάπτυξης των όγκων μέσω της αναστολής της αγγειογένεσης εμφανίστηκε στις αρχές του ’70 από τον Folkman και έχει κερδίσει έδαφος, δεδομένου ότι ο

μηχανισμός της αγγειογένεσης έχει αποσαφηνιστεί και οι αναστολείς της θα μπορούσαν να δράσουν ως αντικαρκινικοί παράγοντες. [120]

Οι Nam et al. μελέτησαν το αντιαγγειογενετικό αποτέλεσμα των συνθετικών 2′,5′-διϋδροξυχαλκονών, οι οποίες παρουσίασαν αξιοσημείωτη κυτταροτοξική εκλεκτικότητα έναντι των ενδοθηλιακών κυττάρων από ανθρώπινη ομφαλική φλέβα (HUVECs), και ειδικά η 2-χλώρο-2′,5′-διϋδρόξυχαλκόνη. [121] Αργότερα, οι Bertl et al. μελέτησαν τα πιθανά αντιαγγειογενετικά αποτελέσματα της ξανθοχουμόλης και της ισοξανθοχουμόλης. Σε in vitro συνθήκες (σε καλλιέργειες τμημάτων κυττάρων του πλακούντα) παρατήρησαν μείωση της τριχοειδούς ανάπτυξης, εξαρτώμενη από τη δόση της ξανθοχουμόλης. Επιπλέον, η ξανθοχουμόλη ανέστειλε επιτυχώς την αγγειογένεση και ανάπτυξη όγκων in vivo. Πιο συγκεκριμένα, η υποδόριος εφαρμογή της για 7 και 14 ημέρες, οδήγησε σε αναστολή της ανάπτυξης ξενομοσχευμάτων καρκίνου του μαστού, κατά 46% και 83% αντίστοιχα, μέσω της καταστολής των NF-κB και Akt μονοπατιών στα ενδοθηλιακά κύτταρα. [122]

Πρόσφατα, οι Lee et al. επιβεβαίωσαν την αντιοαγγειογενετική εφαρμογή των χαλκονών σε in vitro και in vivo συνθήκες. Συγκεκριμένα, η 2′-υδρόξυ-4′-μεθόξυ-χαλκόνη μείωσε την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων, πνευμονικής αρτηριακής προέλευσης. [123] Όμοια, η 2′,4′-διϋδρόξυ-6′-μεθόξυ-3′,5′-διμέθυλοχαλκόνη, από το αποξηραμένο άνθος *Cleistocalyx operculatus*, παρεμπόδισε την αγγειογένεση in vitro και in vivo, και συγκεκριμένα ανέστειλε την υποδόριο ανάπτυξη όγκου του ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος BeI7402 και των GlC-82 ξενομοσχευμάτων του καρκίνου του πνεύμονα. [124]

Οι Sharma et. Al σχεδίασαν και συνέθεσαν νέες δι-χαλκόνες και εξέτασαν την αντικαρκινική τους δράση, έναντι επιθετικών μορφών του καρκίνου του μαστού. Οι νέες χαλκόνες είχαν θετικά αποτελέσματα και ο μηχανισμός δράσης τους περιελάμβανε την επέμβασή τους στον κυτταρικό κύκλο των καρκινικών κυττάρων και την προώθηση της διαδικασίας της απόπτωσης. Η απόπτωση είναι μια διεργασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Ωστόσο, τα καρκινικά κύτταρα ανθίστανται σε αυτή με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους.



Εικόνα 26: Σχεδιασμός των 1,3-διχαλκονών με 3 μονάδες προπενόνης ως φαρμακοφόρες [66]

Οι δι-χαλκόνες των Sharma et al. αποτελούνταν από ένα 1,3-διακέτυλο διφαίνυλο σύστημα και από μία ακόμα φαινυλ-2-προπενική ομάδα, η οποία θεωρείται φαρμακοφόρος σε αυτά τα συστατικά. Οι νέες χαλκόνες εξετάστηκαν και παρουσίασαν αποτελέσματα αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης στις κυτταρικές σειρές ανθρώπινου καρκίνου του μαστού MDA-MB-231, προκαλώντας μιτοχονδριακής φύσης απόπτωση μέσω της μείωσης των κυττάρων στην S φάση του κυτταρικού κύκλου και αλλαγών στο επίπεδο έκφρασης του mRNA. [66]

Τέλος, για την περιγραφή και την πρόβλεψη των βιολογικών αποτελεσμάτων των χημικών μορίων, πλέον χρησιμοποιείται και η μέθοδος της ποσοτικής σχέσης δομής-δράσης (QSAR), η οποία διαφέρει από την κλασσική σχέση δομής-δράσης (SAR) στο γεγονός ότι πλέον τα πειραματικά δεδομένα παρατήρησης και πρόβλεψης ποσοτικοποιούνται σε μοντέλα οπισθοδρόμησης ή κατανομής, δίνοντας την ευκαιρία εξαγωγής μαθηματικών σχέσεων περιγραφής χημικής δομής και βιολογικής δράσης. Ως δεδομένα εισαγωγής συνήθως δίνονται οι περιγραφικοί παράγοντες ηλεκτρονικών δομών η χημική σκληρότητα (η) και απαλότητα (σ), το χημικό δυναμικό (μ) και ο δείκτης ηλεκτρονιοφιλικότητας (ω).

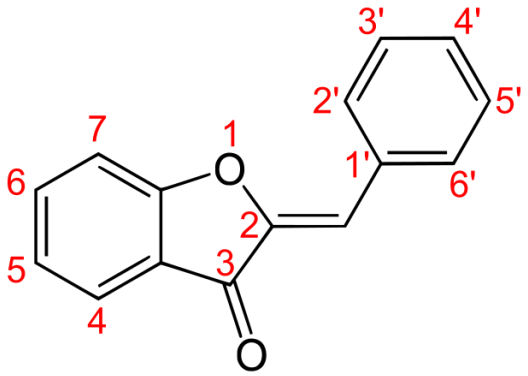
Οι Kupcewicz et al. πρότειναν ως περιγραφικό παράγοντα τη λιποφιλικότητα (υδροφοβικότητα) χαλκονών για την εξήγηση της τοξικότητας τους, και μέσω της απουσίας σημαντικής συσχέτισης μεταξύ κυτταροτοξικότητας και υδροφοβικότητας (εκφρασμένης ως logP) επιβεβαίωσαν τον ομοιοπολικό μηχανισμό δράσης τους. Συγκεκριμένα, έλεγξαν το κυτταροτοξικό αποτέλεσμα έντεκα χαλκονών έναντι τριών καρκινικών κυτταρικών σειρών, γνωρίζοντας ότι πολλά ηλεκτρονιόφιλα είναι κυτταροτοξικά μέσω του ομοιοπολικού μηχανισμού δράσης τους που οδηγεί στο σχηματισμό χημικού δεσμού μεταξύ κυτταροτοξικών συστατικών και βιομορίων (πρωτεΐνες, DNA).

Η τελική ταξινόμηση των χαλκονών σε δύο κατηγορίες συσχετίστηκε με την τοποθέτηση και το χαρακτήρα των υποκαταστατών. Όσο ο Α δακτύλιος παρέμενε

η πιο ηλεκτρονιακά πλούσια περιοχή του μορίου, η χαλκόνη έδειχνε υψηλότερη κυτταροτοξική δράση. Κάτι τέτοιο ήταν εφικτό με την τοποθέτηση δοτών ηλεκτρονίου ως υποκαταστάτες, π.χ. υδρόξυ- και μεθόξυ- ομάδες, στον Α δακτύλιο. Αντίστοιχα, πρότειναν την εισαγωγή δεκτών ηλεκτρονίων ως υποκαταστάτες στο Β δακτύλιο, π.χ. η νίτρο-ομάδα. [125]

Ωρόνες

Οι ωρόνες είναι βασικοί παράγοντες στον χρωματισμό των άνθεων των φυτών και είναι υπεύθυνες για το χρυσοκίτρινο χρώμα τους. Ωστόσο, λόγω της μικρής συχνότητας τους στη φύση, έχουν τύχει μικρότερης προσοχής και μελέτης από τις υπόλοιπες κατηγορίες των ήσσονων φλαβονοειδών. Οι ωρόνες είναι 2-βενζυλιδεν-κουμαραν-3-όνες, με πολλαπλές λειτουργίες του υδροξυλίου στους αρωματικούς τους δακτυλίους. [126]



Εικόνα 27: Γενική δομή ωρονών

Οι ωρόνες έχουν οπτικές ιδιότητες παρόμοιες των χαλκονών, και συχνά εμφανίζονται μαζί. Μάλιστα, οι χαλκόνες μετατρέπονται σε ωρόνες παρουσία μιας ασθενούς βάσης και ατμοσφαιρικού οξυγόνου. Επίσης, η μετατροπή των χαλκονών σε ωρόνες είναι εφικτή και με τη χρήση εκχυλίσματος ενζύμων, που βρίσκονται στους ιστούς των φυτών.

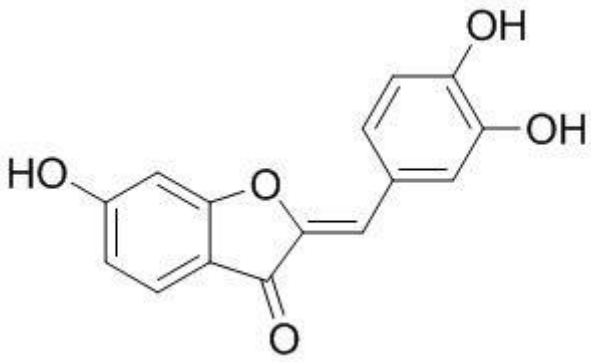
Οι ωρόνες εμφανίζονται σε ένα πλήθος γενών φυτών, με αυτό της *Asteraceae* να αναφέρεται πιο συχνά. [1]

Οι ωρόνες ως φλαβονοειδή, απομονώθηκαν σχετικά πρόσφατα σε σχέση με τις υπόλοιπες κατηγορίες. Μία από αυτή, η βρακτεατίνη, αν και αρκετά κοινή ωρόνη, αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1989 από τον Imperato στο φυτό *Asplenium kaulfusii*. Ακόμα μία από τις πρώτες αναφορές στις ωρόνες ως συστατικά φυτών,

οφείλεται στους Mohan και Joshi (1989) στο στέλεχος *Pterocarpus marsupium* του γένους Fabaceae. Για την ακρίβεια, αυτή είναι και η πρώτη αναφορά C –μεθυλιωμένης ωρόνης.

Η *Antiaris toxicaria*, μέλος του γένους Moraceae, έτυχε μεγάλης προσοχής και ανάμεσα στα συστατικά που απομονώθηκαν από το τοξικό αυτό είδος, ήταν και οι πρώτες δύο C –πρενυλιωμένες ωρόνες. [2]

Μία από τις πιο γνωστές ωρόνες είναι η σουλφουρετίνη, μία άμορφη πορτοκαλί σκόνη, η οποία προέρχεται από το φυτό *Rhus verniciflua* (Anacardiaceae) και τον κορμό του φυτού *Albizzia julibrissin* (Leguminosae). Δομικά η σουλφουρετίνη είναι η 6,3′,4′-τριυδρόξυωρόνη, και είναι γνωστή για τις ποικίλες βιολογικές της δράσεις, όπως αντιοξειδωτική, αντιμεταλλαξιογόνα, αντιδιαβητική και παυσίπονη. Επίσης, έχουν συντεθεί και παράγωγα της σουλφουρετίνης τα οποία παρουσίασαν αντιική, αντιοξειδωτική, αντικαρκινική και ανασταλτική στην τυροσινάση δράση. [127]



Εικόνα 28: Χημική δομή σουλφουρετίνης [127]

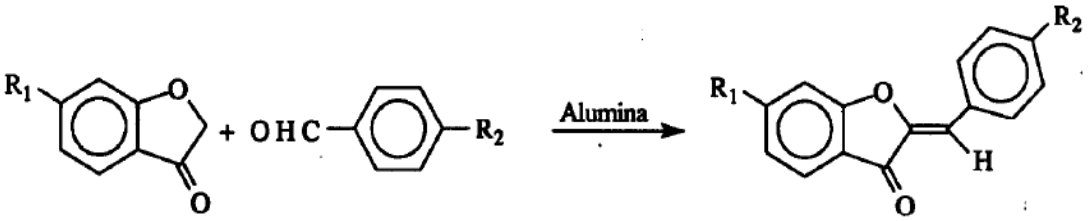
Σύνθεση ωρονών

Συνοπτικά, υπάρχουν τρεις κύριες μέθοδοι σύνθεσης ωρονών: η συμπύκνωση μεταξύ βενζοφουρανονών και βενζαλδεϋδών, η οξειδωτική κυκλοποίηση 2′ –υδρόξυ –χαλκονών, και η καταλυόμενη κυκλοποίηση των *ορθο* –(1 –υδρόξυπροπ -2 –υνυλ)φαινολών ή *ορθο* –υδροξυ –αρυλαιθυνυλ –κετονών. [128]

Στο παρελθόν, η παραγωγή των ωρονών προέκυπτε από τα παραπροϊόντα της Algar-Flynn-Oyamada σύνθεσης φλαβονολών, αντίδραση μεταξύ χαλκονών και αλκαλικού υπεροξειδίου του υδρογόνου, και της Emilewicz –von Kostanecki σύνθεσης φλαβονών, μεταξύ διαλογονιδίων των χαλκονών και κυκλοεξυλαμίνης ή

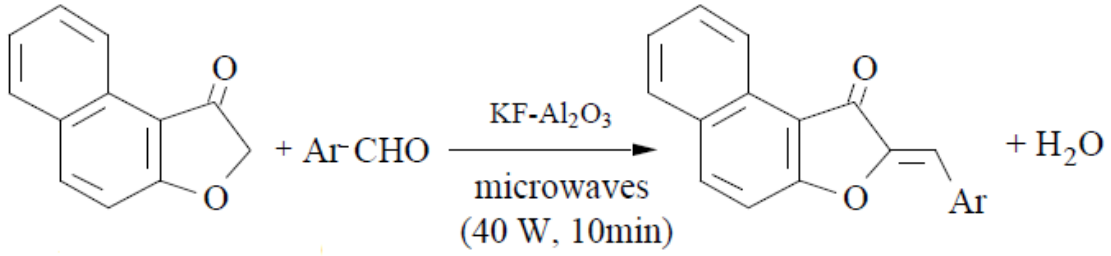
κάποιας βάσης σε αλκοολικό περιβάλλον. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος εγκαταλείφθηκε, τόσο λόγω των μικρών αποδόσεων όσο και της ζήτησης μεγαλύτερης πολυπλοκότητας των νέων αναλόγων των ωρονών, και καθιερώθηκε η συμπύκνωση των κατάλληλα υποκατεστημένων 3(2H) –βενζοφουρανονών με αρυλαλδεΰδες σε θερμό όξινο ή βασικό, αλκοολικό περιβάλλον. Ακόμα όμως κι αυτή η μέθοδος δεν είναι συμβατή με ασταθείς, όξινες ή βασικές, λειτουργικότητες.

Έτσι, εισήχθη η μέθοδος παρασκευής ωρονών με συμπύκνωση βενζοφουρανονών και αρυλαλδεϋδών, χρησιμοποιώντας ως βασικό καταλύτη στερεή επιφάνεια αλουμινίου, από τους Varma and Varma. Τα πλεονεκτήματα της ετερογενούς αυτής κατάλυσης ήταν οι υψηλές αποδόσεις (86 -93%) σε μικρούς χρόνους αντίδρασης (10 -15 min), η παραγωγή των Z –ισομερών, και η αποφυγή παραγωγής ανεπιθύμητων παραπροϊόντων από την αρυλαλδεΰδη, μέσω της παράλληλης αντίδρασης Cannizzaro. [129]



Εικόνα 29: Συμπύκνωση βεζοφουρανονών και αρυλαλδεϋδών σε στερεό καταλύτη αλουμινίου, για την παραγωγή ωρονών [129]

Τη συμπύκνωση 3(2) –ναφθοφουρανονών με αρωματικές αλδεΰδες σε βασικό, στερεό καταλύτη, προτίμησαν οι Villemin et al. για τη σύνθεση ωρονών. Ο καταλύτης που χρησιμοποίησαν ήταν φθοριούχο κάλιο σε οξείδιο αλουμινίου (Al_2O_3 –KF). Μάλιστα, για την επιτάχυνση της αντίδρασης αποφεύχθηκε η χρήση οργανικού διαλύτη, και αντ' αυτού χρησιμοποιήθηκε μέτρια ακτινοβολία μικροκυμάτων (10 min, 40 W). Οι αποδόσεις που σημειώθηκαν ήταν ικανοποιητικές (57 -96%), ακόμα και για στερικά παρεμποδισμένες αλδεΰδες, όπως η 2,4,6 –τριμεθόξυ –αλδεΰδη. [130]



Εικόνα 30: Ξηρή σύνθεση ωρονών, με στερεό βασικό καταλύτη KF –Al2O3και ακτινοβολία μικροκυμάτων [130]

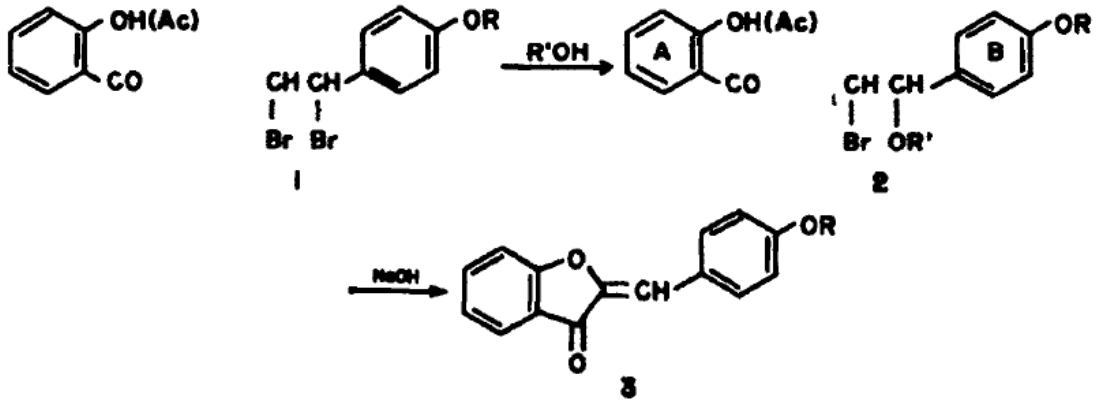
Μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει τύχει και η δεύτερη μέθοδος σύνθεσης ωρονών, μέσω της οξειδωτικής κυκλοποίησης χαλκονών. Πρώτος ο Sekizaki ανέφερε την κυκλοποίηση 2′ –υδρόξυχαλκονών με οξικό υδράργυρο,Hg (II), σε οξικό οξύ, για τη σύνθεση ωρονών με απόδοση 28 -68%, και την παράλληλη παραγωγή φλαβανονών σε ποσοστό 5 -21%, ενώ οι Kurosawa et al. αντικατέστησαν τον οξικό υδράργυρο με οξικό μόλυβδο ή οξικό μαγνήσιο. [131]

Εκτός από τον καταλύτη, αντικείμενο πειραματισμού έχει αποτελέσει και η επιλογή του δ/τη. Οι Detsi et al. αντικατέστησαν το οξικό οξύ με πυριδίνη, στην κυκλοποίηση χαλκονών με οξικό υδράργυρο. Αυτός ο συνδυασμός αντιδραστηρίου –διαλύτη προτάθηκε από τον Subbarajuκαι τους συνεργάτες του, για την ελαχιστοποίηση παράλληλης παραγωγής φλαβονών. Με αυτή τη μέθοδο ήταν εφικτή η απομόνωση των θερμοδυναμικά σταθερότερων Z –ισομερών των προϊόντων, σε ικανοποιητικές αποδόσεις (44 -70%). [112]

Εκτός από τον καταλύτη και το διαλυτικό μέσο, σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζουν και οι υποκαταστάτες των χαλκονών που υφίστανται την οξειδωτική κυκλοποίηση. Οι Thanigaimalai et al. κατάφεραν να συνθέσουν ωρόνες μέσω της οξειδωτικής κυκλοποίησης 2′ –OH -6′ –βενζυλόξυ –χαλκονών με νιτρικό θάλλιο (III) σε αλκοολικό δ/τη, όταν οι para –υποκαταστάτες του B δακτυλίου ήταν υδρογόνο ή ηλεκτρονιόφιλες ομάδες (Cl, CHO, $COOCH_3$, NO_2). Όταν οι εν λόγω υποκαταστάτες ήταν ισχυροί δότες ηλεκτρονίων (OH, OCH_3) η αντίδραση οδηγούσε αποκλειστικά σε ισοφλαβόνες, ενώ αν ήταν ασθενείς η παραγωγή ισοφλαβονών και ωρονών ήταν 1:1. [132]

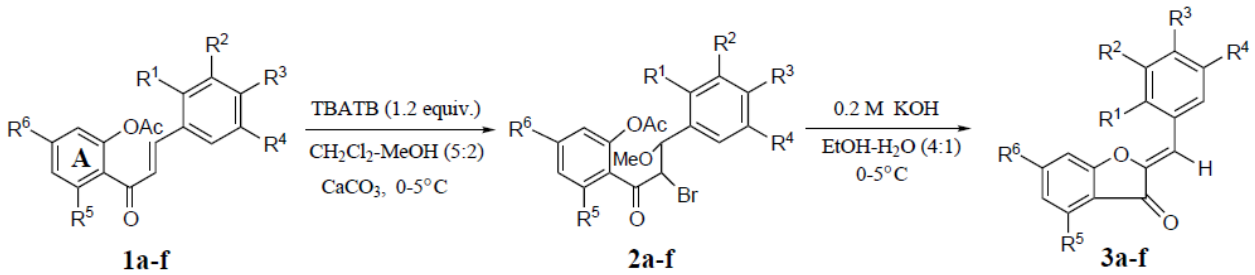
Μία από τις πιο γνωστές μεθόδους σύνθεσης ωρονών είναι η μέθοδος Wheeler, η οποία περιλαμβάνει 3 βήματα: τη διαλυτόλυση άμεσα διαθέσιμων διαλογονιδίων των χαλκονών (1) προς α –αλογονο –β –αλκοξυλ διϋδροχαλκονών (2), και η κυκλοποίηση αυτών σε υδροξείδιο του νατρίου προς ωρόνες (3). Η σύνθεση όμως κατά Wheeler περιορίζεται από το γεγονός ότι οι α –αλογονο –β –αλκοξυλ διϋδροχαλκόνες είναι διαθέσιμες από διαλογονίδια χαλκονών που περιέχουν έναν

ortho- ή para-οξο-υποκαταστάτη στο Β δακτύλιο. Έτσι, οι Donnelly et al. κατάφεραν τη γενίκευση της σύνθεσης Wheeler, μετατρέποντας 2′ –υδρόξυχαλκόνες κατ'ευθείαν σε α –βρωμο –β –μεθόξυ –διϋδροχαλκόνες με χρήση N –βρωμιοηλεκτριμίδης (NBS) σε μεθανόλη.Για την αποφυγή παραγωγής φλαβονών ως παραπροϊόντα, η συγκέντρωση του βασικού καταλύτη δεν θα πρέπει να διατηρείται χαμηλή και θα πρέπει να υπάρχει υποκαταστάτης στις θέσεις 3′ ή/και 6′ του Α δακτυλίου. [133], [134]



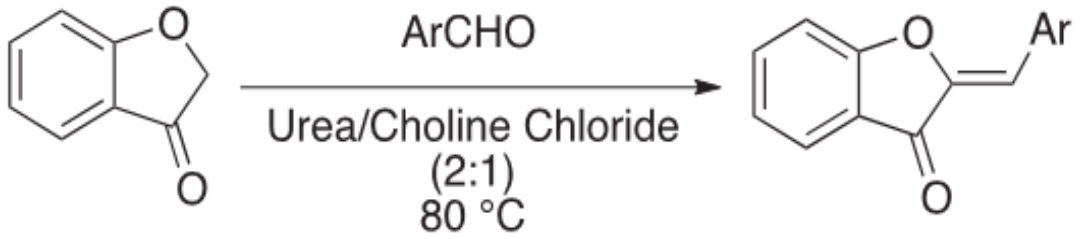
Εικόνα 31: Σύνθεση ωρονών κατά Wheeler [133]

Οι Bose et al. κατέδειξαν ότι εκτός από τις ανωτέρω αδυναμίες της γενικευμένης μεθόδου Wheeler, στην προσπάθεια παραγωγής διβρωμιδίων της 2′ –υδροξυχαλκόνης, περιλαμβάνεται και η χρήση μοριακού βρωμίου το οποίο είναι τοξικό, δύσκολο στο χειρισμό και δίνει χαμηλές συγκεντρώσεις βρωμιωμένων προϊόντων. Αντ' αυτού πρότειναν τη αντικατάσταση του μοριακού βρωμίου με οργανικό τριβρωμιούχο αμμώνιο, στο στάδιο της βρωμίωσης. Έτσι, η αντίδραση περιελάμβανε τη βρωμίωση 2′ –ακετοξυχαλκονών με τριβρωμιούχο *n*–τετραβουτυλαμμώνιο (TBATB) προς α –βρωμο –β –μεθόξυ –χαλκονών, και την κυκλοποίησή τους με υδατικό διάλυμα υδροξειδίου καλίου σε αιθανόλη. Η βρωμίωση πραγματοποιήθηκε παρουσία ανθρακικού ασβεστίου ($CaCO_3$) σε διάλυμα διχλωρομεθανίου –μεθανόλης (CH_2Cl_2 –MeOH), και τα προϊόντα παρήχθησαν σε απόδοση 80%. [135]



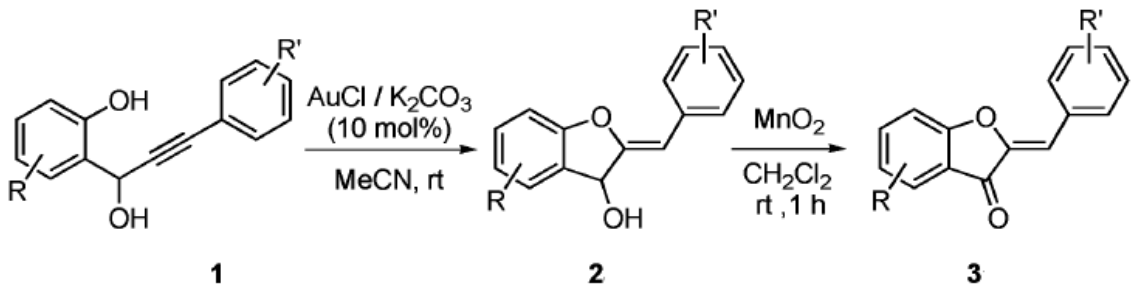
Εικόνα 32: Σύνθεση ωρονών μέσω της γενικευμένης μεθόδου Wheeler, με χρήση TBATB ως μέσω βρωμίωσης [135]

Όσον αφορά την τρίτη μέθοδο σύνθεσης χαλκονών, αυτή της συμπύκνωσης κουμαρανονών με αρυλαλδεΰδες, αξίζει να αναφερθεί η εργασία των Hawkins et al. οι οποίοι χρησιμοποίησαν ιοντικό υγρό τόσο ως διαλυτικό μέσο, όσο και ως καταλύτη. Πιο συγκεκριμένα, η συμπύκνωση των κουμαρανονών με αυρλαδεΰδες έγινε με τη χρήση του βαθύ ευτηκτικού διαλύτη, χλωριδίου χολίνης και ουρίας, απουσία κάθε οξέος ή βάσης. Οι ήπιες της αντίδρασης θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή ωρονών με πιο ευαίσθητες λειτουργικές ομάδες. Η αντίδραση διήρκεσε για 24h, στους 80°Cκαι με απλή κονιορτοποίηση και ανακρυστάλλωση σε μεθανόλη, ήταν εφικτή η λήψη των καθαρών προϊόντων ωρόνης. [136]



Εικόνα 33: Σύνθεση ωρόνης με συμπύκνωση κουμαρανόνης με αρυλαλδεΰδη σε μίγμα ουρίας/χλωριδίου χολίνης [136]

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί η μέθοδος σύνθεσης ωρονών μέσω με τη χρήση χρυσού ως καταλύτη, η οποία δεν εμπίπτει σε καμία από τις παραπάνω μεθόδους και παρουσιάστηκε για πρώτη φορά από τον Harkat et al., το 2008. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος που προτάθηκε, αποτελείται από 3 βήματα: (1) αλκυνυλίωση της σαλικυλαλδεΰδης με φαινυλακετυλένιο για την παραγωγή 1 –(2 –υδρόξυφαινυλ) -3 –φαινυλπροπυνόλης, καταλυόμενη με χρυσό κυκλοποίηση της τελευταίας (2), και τέλος οξείδωση (3). Οι ωρόνες που παρασκευάσθηκαν με αυτόν τον τρόπο έφεραν μια πληθώρα υποκαταστατών τόσο στον A όσο και στο B δακτύλιο, και οι αποδόσεις που σημειώθηκαν ήταν μεταξύ 65-86%. [137]



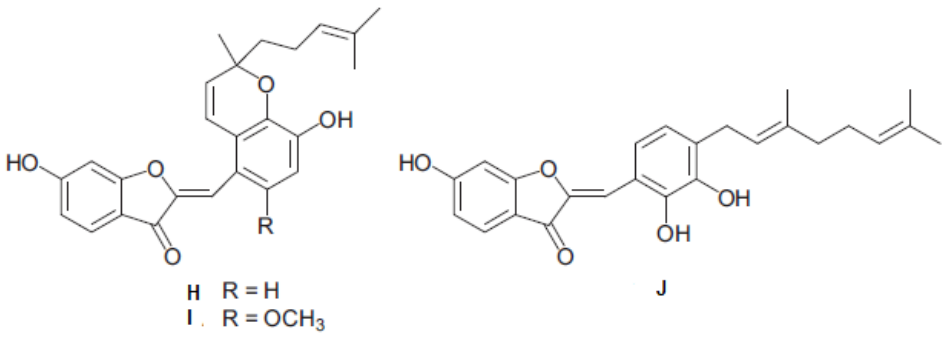
Εικόνα 34: Σύνθεση ωρονών σε 3 βήματα, καταλυόμενη από Au [137]

Φαρμακευτική χρήση των ωρονών

Αν και οι ωρόνες έχουν μελετηθεί λιγότερο από όλες τις υπόλοιπες κατηγορίες φλαβονοειδών, έχουν ήδη διαπιστωθεί οι πιθανές φαρμακευτικές τους ιδιότητες, παρόμοιες με των πρόδρομων ενώσεών τους των χαλκονών. Αυτές που έχουν πιστοποιηθεί έως τώρα είναι η ανθελονοσιακή, η αντιφλεγμονώδης και η αντικαρκινική τους δράση, καθώς και η δραστηριότητά τους ως αναστολείς της τυροσινάσης και της α-γλυκοζιδάσης.

Συγκεκριμένα για την αντιφλεγμονώδη δράση, έχει αποδειχθεί ότι η χορήγηση σουλφουρετίνης, ανεξαρτήτως δόσης, μειώνει την παραγωγή NO και PGE_2. Με αυτό ως δεδομένο, συντέθηκαν διάφορα παράγωγα ωρονών με στόχο να αποδειχθεί η καλύτερη ή όχι αντιφλεγμονώδης δράση τους, και η χαμηλότερη κυτταροτοξικότητα από τη σουλφουρετίνη. τα εν λόγω παράγωγα ωρονών συντέθηκαν έτσι ώστε να ισχυροποιήσουν την ικανότητα τους στην αναστολή των μεσολαβητών των φλεγμονών, NO και PGE_2. Η καταγραφή της δραστηριότητας των παραγώγων έγινε μέσω δόσης-απόκρισης και της μέτρησης του δείκτη IC_{50}. Γενικά, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι 6-υδρόξυ-ωρόνες παρουσίασαν μείωση της παραγωγής PGE_2, με ταυτόγχρονη μείωση της κυτταροτοξικότητας, σε σχέση με τη σουλφουρετίνη. Ενώ, οι 6-μεθόξυ-ωρόνες παρουσίασαν σχεδόν τριπλάσια ικανότητα αναστολής της παραγωγής NO. [127]

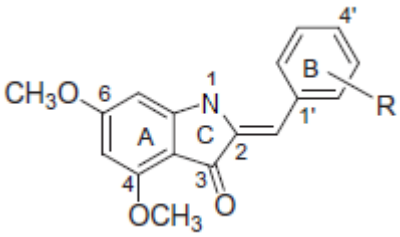
Εκτός από τις συνθετικές ωρόνες, ενθαρρυντικά αποτελέσματα ως προς τη φαρμακευτική τους χρήση έχουν δώσει και φυσικές ωρόνες, εκχυλίσματα από φυτά. Συγκεκριμένα, τα μεθανολικά εκχυλίσματα από το φυτό *Artocarpus altilis* (Moraceae) που εντοπιζεται στο Βιετνάμ, παρουσίασαν εξαιρετικά αποτελέσματα κατά την αναστολή της τυροσινάσης. Αυτά τα εκχυλίσματα περιείχαν τις ωρόνες αλτισιλίνη H, I και J και η τιμή του δείκτη IC_{50} ήταν τόσο χαμηλή (41.2 και 18.5 μg/ml για αναστολή τυροσινάσης και α-γλυκοζιδάσης αντίστοιχα), που αφήνει περιθώρια περαιτέρω αντι-γηραντικής και αντι-διαβητικής χρήσης τους. [138]



Εικόνα 35: Φυσικές ωρόνες αλτισιλίνη H, I και J από την Artocarpus altilis, με εξαιρετική αναστολή της τυροσινάσης [138]

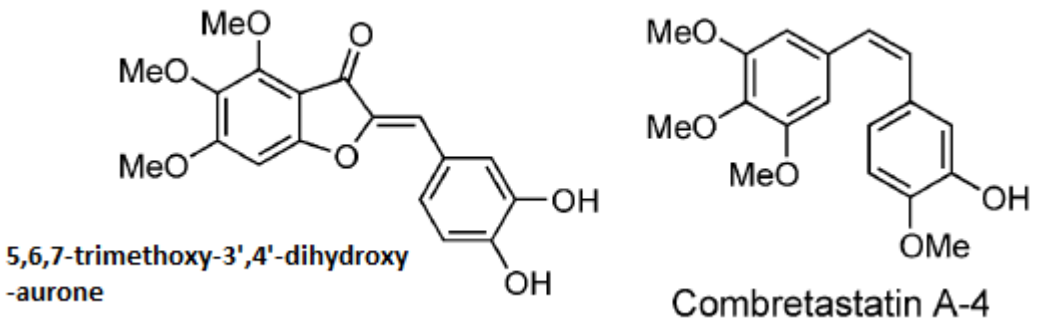
Οι φυσικές ωρόνες εκτός των άλλων έχουν δείξει και καλή αντιβακτηριακή δράση, γεγονός που οδήγησε την έρευνα στραφεί στη σύνθεση νέων αναλόγων και τον έλεγχό τους κατά συγκεκριμένων στελεχών. Οι Pare et al. απομόνωσαν το συστατικό 'cephalocerone' από καλλιέργειες του φυτού *Cephalocereus senilis* (Cactaceae) και το προσέβαλαν με χιτίνη. Η φωτοευαίσθητη, ερυθρή χρωστική που προέκυψε ήταν εν τέλει το φυσικό προϊόν 4,5 –μεθυλενοδιόξυ -6 –υδροξυ –ωρόνη, η οποία ήταν δραστική απέναντι στους μικροοργανισμούς *Escerichia coli* και *Pseudomonas aeruginosa.* [1]

Οι Souard et al. συνέθεσαν μια σειρά αναλόγων ωρονών και την εξέτασαν ως προς την in vitro αντιπλασμωδιακή τους δράση, κατά του στελέχους *Plasmodium falciparum.* Τα αποτελέσματα των σχέσων δομής –δράσης έδειξαν συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά των ωρονών που προωθούν την ανθελονοσιακή τους δράση. Ειδικότερα, η 4,6-διμεθοξυλίωση έδωσε πολύ καλά αποτελέσματα, όπως και η παρουσία μια υδρόφοβης ομάδας στον Β δακτύλιο. Επεκτείνοντας αυτές τις παρατηρήσεις, οι Souard et al. αντικατέστησαν το ενδοκυκλικό άτομο οξυγόνου με ένα ισοστερικό ανάλογο, μια ομάδα N-H, δημιουργώντας έτσι ανάλογα αζαωρονών τα οποία είχαν ακόμα καλύτερα αποτελέσματα από τα μητρικά τους μόρια. [139]



Εικόνα 36:Γενική δομή αζαωρονών [139]

Τέλος, έχουν γίνει έρευνες για τον εντοπισμό πιθανής χρήσης αναλόγων ωρονών ως αντικαρκινικοί φορείς. Έχοντας ως οδηγό τη φυσική 5,6,7-τριμεθόξυ-3′,4′-υδρόξυ-ωρόνη από το φυτό *Uvaria hamilotonii*, λόγω της δομικής της ομοιότητας με τον αντικαρκινικό φορέα κομπρεταστατίνη Α-4, παρασκευάστηκε μια σειρά αναλόγων , προς εξέταση της πιθανής αντικαρκινικής τους δράσης. Από τα αποτελέσματα σχέσης δομής δράσης, φάνηκε ότι οι 5,6,7,4′-τετραμεθόξυ-ωρόνες είχαν καλύτερη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης από ότι τα 4,5,6-τριμεθόξυ ισομερή τους και τη φυσική ωρόνη. [140]



Εικόνα 37:Η φυσική 5,6,7-τριμεθόξυ-3′,4′-διϋδρόξυ-ωρόνη, δομικά όμοια στην κομπρεστατίνη Α-4, ως αντικαρκινικός φορέας [140]

Κεφάλαιο 2
Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

Εισαγωγή

Ελεύθερη ρίζα ορίζεται κάθε είδος που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species – ROS) είναι ένας συλλογικός όρος που περιλαμβάνει τόσο τις ρίζες οξυγόνου, όπως ρίζες υπεροξείδιου ($O_2^{\cdot -}$), υδροξυλίου ($OH^{\cdot}$), περοξυλίου ($RO^{\cdot}$), και υδροπεροξυλίου ($RO_2^{\cdot}$), όσο και συγκεκριμένου μη-ριζικούς οξειδωτικούς παράγοντες, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το υποχλωρικό οξύ (HOCl) και το όζον (O_3), οι οποίοι μπορούν να μετατραπούν εύκολα σε ρίζες. Τα ROS εμπλέκονται στην παθογένεση πλήθους κυτταρικών καταστρεπτικών διαδικασιών και ασθενειών. Ωστόσο, παράγονται και κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού μεταβολισμού και εμπλέκονται στις ενζυμικές αντιδράσεις, τη μεταφορά μιτοχονδριακών ηλεκτρονίων, τη μεταγωγή σήματος, την ενεργοποίηση των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων την έκφραση γονιδίων και την αντιμικροβιακή δράση των ουδετερόφιλων και των μακροφάγων.

Γενικά, το αναγωγικό περιβάλλον στο εσωτερικό του κυττάρου εμποδίζει τις βλάβες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες. Αυτό το αναγωγικό περιβάλλον υποστηρίζεται από τη δράση αντι-οξειδωτικών ενζύμων και ουσιών, όπως η δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD), η καταλάση, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η γλουταθειόνη, το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), η α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E) και η θειοredοξίνη. Μεταβολές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου και εξάντληση των αντιοξειδωτικών μετά από έκθεση σε οξειδωτικά, οδηγούν σε οξειδωτικό στρες και επακόλουθη οξειδωτική βλάβη.

Το μοριακό οξυγόνο (O_2) χρησιμοποιείται από όλους τους αερόβιους οργανισμούς για την παραγωγή ATP, της χημικής ενέργειας για τη διατήρηση της ζωής. Η πρόσληψή, μεταφορά και κατανομή του μοριακού οξυγόνου στους ιστούς έχει συμβάλει στην εξέλιξη των οργανισμών, λόγω των ιδιοτήτων του: είναι διαθέσιμο παντού, μπορεί να διαχυθεί εύκολα στις βιολογικές μεμβράνες και συνδέει τα μόρια της αίμης στις πρωτεΐνες (αιμογλοβίνη και κυτόχρωμα).

Χημικά, θεωρείται ρίζα επειδή, στη θεμελιώδη κατάστασή του, διαθέτει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Ωστόσο, από κβαντομηχανική σκοπιά, η αντιδράσεις μεταξύ του μοριακού οξυγόνου και σταθερών οργανικών μορίων (όπως τα κυτταρικά συστατικά) δεν είναι εφικτή, εξαιτίας περιορισμών λόγω spin. Έτσι, με

την πρόσληψη ηλεκτρονίων από το μόριο του οξυγόνου, ένα ανά τη φορά, και την προσθήκη τους, δημιουργούνται τα ROS. Με την πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου από το μόριο του οξυγόνου, δημιουργείται το $O_2^{\cdot-}$, το οποίο διαθέτει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Το υπεροξείδιο από μόνο του έχει περιορισμένη δραστικότητα, αλλά είναι ικανό να απενεργοποιεί άμεσα μερικά ένζυμα. Το σύμπλεγμα NADPH (ανηγμένο φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο) της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι ένα από τα ένζυμα- στόχους για την προσβολή από το $O_2^{\cdot-}$.

Η απομάκρυνση του περισσεύοντος $O_2^{\cdot-}$ από τη SOD είναι ένας σημαντικός μηχανισμός άμυνας στους αερόβιους οργανισμούς. Οι ισομορφές της SOD μετατρέπουν το $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2:

$$2\ O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2 \quad (1)$$

Το υπεροξείδιο είναι ένας ασθενής οξειδωτικός παράγοντας, αντίθετα όμως με το $O_2^{\cdot-}$, διαπερνά εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες. Δεν διαθέτει ασύζευκτα ηλεκτρόνια, οπότε δεν θεωρείται ρίζα, αλλά μπορεί να λειτουργήσει ως μεταβολικό σήμα κάτω από ορισμένες περιστάσεις, πιθανόν οξειδώνοντας θειολικές ομάδες συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Το υπεροξείδιο μπορεί να απομακρυνθεί από τη δράση των καταλασών, μέσω μιας αντίδρασης όπου σχηματίζονται ένα μόριο οξυγόνου και δύο νερού, και των περοξειδασών, μέσω της αναγωγής του υπεροξειδίου σε δύο μόρια νερού με τη χρήση διαφόρων αναγωγικών μέσων (πχ ασκορβικό οξύ, γλουταθειονόνη, NAD κ.ά.).

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} 2\ H_2O + O_2 \quad (2)$$

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{Peroxidase}} H_2O \quad (3)$$

Συνολικά, το $O_2^{\cdot-}$ και το H_2O_2 έχουν περιορισμένη χημική δραστικότητα, αλλά μπορούν να παράξουν υψηλής δραστικότητας ρίζες υδροξυλίου ($OH^{\cdot}$). Τα μέταλλα μετάπτωσης, δισθενής σίδηρος Fe(II) και μονοσθενής χαλκός Cu(I), αντιδρούν με το υπεροξείδιο του υδρογόνου και παράγουν ρίζες υδροξυλίου, μέσω της αντίδρασης Fenton.

$$Fe\ (II) + H_2O_2 \longrightarrow HO^{\cdot} + OH^- + Fe\ (III) \quad (4)$$

Και το $O_2^{\cdot-}$ αναγάγει τον τρισθενή σίδηρο Fe(III) και το δισθενή χαλκό Cu(II):

$$Fe\ (III) + O_2^{\cdot-} \longrightarrow Fe\ (II) + O_2 \quad (5)$$

Το άθροισμα των αντιδράσεων 2 και 3 είναι:

$$O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \xrightarrow{Fe/Cu} HO^{\cdot} + OH^{-} + O_2 \quad (6)$$

η λεγόμενη καταλυόμενη από μέταλλο μετάπτωσης Haber –Weiss αντίδραση. Αυτή η αντίδραση φαίνεται να συμβάλλει τουλάχιστον μερικώς για τις βλάβες που προκαλούνται στα ζωντανά κύτταρα, από την υπερβολή παραγωγή ROS. Οι ρίζες υδροξυλίου αντιδρούν σχεδόν με κάθε μόριο εντός των ζωντανών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων του DNA, λιπιδίων μεμβράνης και υδατάνθρακες.

Η ρίζα υδροξυλίου μπορεί επίσης να αποσπάσει άτομα υδρογόνου από αρκετά βιολογικά μόρια, συμπεριλαμβανομένων των θειολών.

$$R\text{–}SH + HO^{\cdot} \longrightarrow RS^{\cdot} + H_2O \quad (7)$$

Οι προκύπτουσες ρίζες θείου (θειυλικές ρίζες) διαθέτουν αρκετές ενδιαφέρουσες χημικές ιδιότητες, μία από τις οποίες είναι η ικανότητά τους να συνδέονται με οξυγόνο και να παράγουν οξυσουλφουρικά ριζικά, όπως $RSO_2^{\cdot}$ και $RSO^{\cdot}$, τα οποία βλάπτουν τα βιολογικά μόρια.

Τέλος, είναι δυνατόν να παραχθούν μονήρη οξυγόνα από μοριακά, με την εφαρμογή ενέργειας και την ανακατανομή των ηλεκτρονίων. Και στις δύο μορφές του μονήρους οξυγόνου, ο περιορισμός του spin αποσύρεται και η οξειδωτική ικανότητα αυξάνεται θεαματικά· τα μονήρη ηλεκτρόνια μπορούν να οξειδώσουν πρωτεΐνες, DNA και λιπίδια. [141], [142], [143]

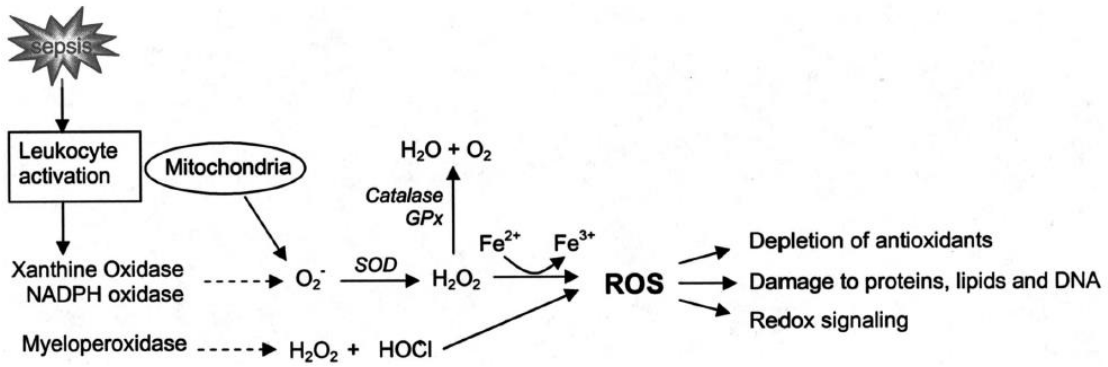
Πηγές των ROS

Ένα πλήθος ενζυμικών και μη ενζυμικών διεργασιών είναι δυνατό να προκαλέσουν την παραγωγή των ROS στα ζωϊκά κύτταρα. Μεταξύ των πιο σημαντικών πηγών είναι οι καταλυόμενες αντιδράσεις από τα ένζυμα NADPH οξειδάση, οξειδορεντουκτάση της ξανθίνης (XOR) και μυελοπεροξειδάση (MPO).

Η NADPH οξειδάση είναι ένα σύμπλεγμα πολλαπλών υπομονάδων που παράγει $O_2^{\cdot -}$ στην αναγωγή του οξυγόνου (ενός ηλεκτρονίου), χρησιμοποιώντας ηλεκτρόνια από την NADPH. Αν και η NADPH οξειδάση των λευκοκυττάρων είναι

ανενεργή κάτω από συνθήκες ανάπαυσης, με την εφαρμογή διαφορετικών ερεθισμάτων, όπως λιποπολυσακχαρίτες ή διάφοροι προφλεγμονώδεις μεσολαβητές (παράγοντας –α νέκρωσης όγκων, ιντερλευκίνη -1β και ιντερλευκίνη -6), ενεργοποιείται. Διέγερση των λευκοκυττάρων οδηγεί στη μετατόπιση των κυτταροπλασματικών υπομονάδων της NADPH οξειδάσης και στη μαζική παραγωγή $O_2^{\cdot-}$. Η NADPH οξειδάση είναι κρίσιμη για την εξολόθρευση των μικροοργανισμών με τη δημιουργία ROS στα λευκοκύτταρα. Επίσης, είναι παρούσα και σε μη γαφοκυτταρικά κύτταρα, όπως τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα των λείων μυών και τους ινοβλάστες.

Η XOR είναι ευρέως διαδεδομένη στους ζωϊκούς ιστούς, αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα. Διαθέτει δύο αλληλομετατρέψιμες μορφές, την αφυδρογονάση της ξανθίνης (XDH) και την οξειδάση της ξανθίνης (XO). Και οι δύο μπορούν να αναγάγουν το οξυγόνο σε $O_2^{\cdot-}$, αλλά η XDH έχει μεγαλύτερη συγγένεια στην NAD. Η μετατροπή της XOR είναι εφικτή μέσω δύο δρόμων. Αφ' ενός, η μεταχείριση της XDH με πρωτεάσες τη μετατρέπει σε XO, αναντίστρεπτα. Αφ' ετέρου, η αντιστρεπτή μετατροπή της XO σε XDH υφίσταται λόγω των συνθηκών που οξειδώνουν κρίσιμες κυστεΐνες. Αν και η βασική έκφραση της ανθρώπινης XOR είναι χαμηλή, διάφοροι παράγοντες όπως η υποξία, οι λιποπολυσακχαρίτες, προφλεγμονώδεις μεσολαβητές, στεροειδή και η προλακτίνη, επιταχύνουν τη μεταγραφή της. Αντίθετα, η υπεροξία αναστέλλει τη μεταγραφή της XOR και ελαττώνει τη δράση της, εμποδίζοντας τη φωσφορυλίωσή της.



Εικόνα 38: Ενζυμικές και μη ενζυμικές διεργασίες για την παραγωγή ROS, στο εσωτερικό των ζωϊκών κυττάρων [141]

Η MPO καταλύει την οξείδωση του χλωριώδους σε υποχλωριώδες, παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου στα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα, και ως εκ τούτου παράγει μία σειρά από υψηλής δραστικότητας οξειδωτικά. Οι αντιδράσεις του υποχλωριώδους με $O_2^{\cdot-}$ και σίδηρο οδηγούν σε περαιτέρω σχηματισμό ROS.

Το υποχλωριώδες οξύ επίσης αντιδρά με το ανιόν νιτρώδους για να δώσει το προϊόν της νίτρωσης και της χλωρίωσης, το νιτρυλοχλωρίδιο.

$$HOCl + O_2^{\cdot -} \longrightarrow HO^{\cdot} + O_2 + Cl^- \quad (8)$$

$$HOCl + Fe(II) \longrightarrow HO^{\cdot} + Fe(III) + Cl^- \quad (9)$$

$$HOCl + NO_2^- \longrightarrow NO_2Cl + OH^- \quad (10)$$

Εκτός από τε ενζυμικά μονοπάτια που αναφέρθηκαν, έχει αποδειχθεί ότι και τα μιτοχόνδρια αποτελούν πηγή παραγωγής ROS. Περισσότερο από το 90% του κυτταρικού οξυγόνου ανάγεται σε νερό μέσω των φορέων ηλεκτρονίων της μιτοχονδριακής αλυσίδας αναπνοής. Απομονωμένα μιτοχόνδρια παράγουν $O_2^{\cdot -}$ υπό την παρουσία αναστολέων της μεταφοράς ηλεκτρονίων. Συνεπώς, κάτω από βασικές συνθήκες, τα μιτοχόνδρια έχουν θεωρηθεί ο κυριότερη πηγή ριζών $O_2^{\cdot -}$ εντός των κυττάρων.

Άλλες πιθανές ενδοκυτταρικές πηγές παραγωγής ROS είναι ο μεταβολισμός του κυτοχρώματος P450 (CYP –υποκατηγορία των αιμοπρωτεϊνών), τα υπεροξειδιοσώματα του κυτταροπλάσματος που φέρουν την καταλάση, τα μικροσώματα του ενδοπλασματικού δικτύου, η ενεργοποίηση των φλεγμονωδών κυττάρων, το σύστημα της μονοξυγενάσης, η συνθάση του νιτρικού οξειδίου και άλλα ένζυμα που εμπλέκονται στις φλεγμονώδεις διαδικασίες. [141], [143]

Μοριακοί Στόχοι των ROS

Τα ROS που παράγονται μέσω των ανωτέρω αντιδράσεων, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με ένα πλήθος κυτταρικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων του DNA, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών. Η οξειδωτική βλάβη του DNA μπορεί να αναλυθεί σε βλάβη των βάσεων του DNA, θραύσεις του μονού κλώνου του DNA, διασυνδέσεις DNA –πρωτεϊνών, και παραγωγή DNA χωρίς βάσεις (AP sites).

Η ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία των πλευρικών αλυσίδων των πολύ-ακόρεστων λιπαρών οξέων στα φωσφολιπίδα της μεμβράνης. Τα πολύ-ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι ευαίσθητα σε επιθέσεις ελευθέρων ριζών, οι οποίες μπορεί να ενεργοποιήσουν την λιπιδική υπεροξείδωση. Διαφορετικά ROS, όπως το $OH^{\cdot}$, μπορούν να εκκινήσουν τη λιπιδική υπεροξείδωση. Μόλις δημιουργηθούν οι ρίζες λιπιδίων, αναμειγνύονται με το διαλυμένο οξυγόνο των μεμβρανών και σχηματίζουν ρίζες υπεροξυλίου, οι οποίες επιτίθενται στις πρωτεΐνες των μεμβρανών και τα γειτονικά πολυ-ακόρεστα λιπαρά οξέα, προωθώντας τη λιπιδική υπεροξείδωση της μεμβράνης. Η προστασία

απέναντι στη λιπιδική υπεροξείδωση είναι εφικτή με την εκκαθάριση των ριζών υπεροξυλίου μέσω λιπο-διαλυτών αντιοξειδωτικών (βιταμίνη Ε και ουβικινόλη) ή τη μείωση των λιπιδικών υδροπεροξειδίων με υπεροξειδάση της γλουταθειόνης.

Πολλοί παράγοντες, όπως το H_2O_2, HOCl, τα μέταλλα μετάπτωσης, ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, τα ένζυμα οξειδοαναγωγάσες και παραπροϊόντα της λιπιδικής οξείδωσης, μπορούν να οδηγήσουν σε οξείδωση των πρωτεϊνών. Υπάρχουν πάρα πολλοί τρόποι οξειδωτικής μορφοποίησης των πρωτεϊνών. Οι πιο κοινοί είναι η οξείδωση της θειόλης των πρωτεϊνών και ο σχηματισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Η προσβολή των πρωτεϊνών από ελεύθερες ρίζες καταλήγει στην οξείδωση των θειολικών ομάδων. Τα αμινοξέα που περιέχουν θείο, δηλαδή η κυστεΐνη και η μεθειονίνη, είναι πιθανώς οι πιο επιρρεπείς στην οξειδωτική προσβολή. Όλες οι οξειδωτικές ουσίες μπορούν να επιφέρουν τροποποιήσεις στην κυστεΐνη και τη μεθειονίνη. Η οξείδωση της κυστεΐνης δημιουργεί θειυλικές ρίζες και δισουλφίδια. Η οξείδωση της μεθειονίνης οδηγεί στο σχηματισμό σουλφοξειδίων της μεθειονίνης. Οι οξειδωτικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών οδηγούν εν τέλει στην αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας και πρόσδεσης.

Επιπλέον στις επιβλαβείς συνέπειες των ROS, συγκαταλέγεται και η ενεργοποίηση ενός πλήθους ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών, κυρίως εκείνων που συνδέονται με το μεταγραφικό παράγοντα nF-κB. [144], [142]

Το οξειδοαναγωγικό παράδοξο

Τα ROS παρουσιάζουν ένα παράδοξο κατά τη βιολογική τους λειτουργία: από τη μία, εμποδίζουν την ανάπτυξη ασθενειών υποβοηθώντας το ανοσοποιητικό σύστημα, μεσολαβώντας στην κυτταρική σηματοδότηση και παίζοντας κύριο ρόλο στη διαδικασία της απόπτωσης. Από την άλλη, είναι ικανά να βλάψουν σημαντικά μακρομόρια ενδοκυτταρικά και να παίξουν ρόλο στην καρκινογένεση και τις καρδιαγγειακές ασθένειες.

Ιστορικά, η παραγωγή των ROS θεωρούνταν τυχαία, και στόχοι τους οι πρωταρχικοί παράγοντες ασθενειών και γήρατος. Επίσης, η έρευνα έχει δείξει ότι η παραγωγή των ROS αποτελεί κανονική φυσιολογική διαδικασία, ειδικά για τη σωστή ανοσοπροστασία σε συνεργασία με ένα πλήθος σηματοδοτικών, μεταγωγικών μονοπατιών.

Ο σχηματισμός των ROS είναι φυσική απόρροια του αερόβιου μεταβολισμού και αναπόσπαστο τμήμα για τη διατήρηση της ομοιόστασης του οξυγόνου στους ιστούς. Η ομοιόσταση του οξυγόνου –η ισορροπία μεταξύ των συστατικών οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών –διατηρείται μέσω μιας φυσιολογικής

σειράς οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, που περιλαμβάνουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ δύο χημικών ειδών: εκείνων που χάνουν ηλεκτρόνια (οξειδώνονται) και εκείνων που προσλαμβάνουν (ανάγονται). Όταν η ομοιόσταση του οξυγόνου διαταραχθεί, το κυτταρικό περιβάλλον γίνεται οξειδωτικά φορτισμένο. Η ενδοκυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση καθορίζεται πρωταρχικά από τη γλουταθειόνη (GSH) και τη θειορεδοξιδίνη (TRH). Το οξειδοαναγωγικό ζεύγος της γλουταθειόνης (GSSH/2GSH) αποτελεί το κύριο οξειδοαναγωγικό ρυθμιστικό του κυττάρου και συνεπώς έναν αντιπροσωπευτικό δείκτη της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του.

Περίπου 1-3% του οξυγόνου που καταναλώνεται από ένα οργανισμό μετατρέπεται σε ROS. Παροδικές διακυμάνσεις των επιπέδων των ROS επηρεάζουν τη δραστηριότητα των σηματοδοτικών, μεταγωγικών μονοπατιών, οδηγώντας σε πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ή απόπτωση και νέκρωση, αναλόγως τη δόση και τη διάρκεια των ROS και τον τύπο του κυττάρου. Τυπικά, χαμηλές δόσεις ROS είναι μιτογονικές, όταν μεσαίες δόσεις οδηγούν σε προσωρινή ή μόνιμη διακοπή της ανάπτυξης (κυτταρική γήρανση), και υψηλές δόσεις συνήθως καταλήγουν σε κυτταρικό θάνατο (λόγω απόπτωσης ή νέκρωσης). Αν και η νέκρωση και η απόπτωση θεωρούνται αρνητικά φαινόμενα δεδομένου της απώλειας κυττάρων, αυτές οι διαδικασίες μπορούν να έχουν και θετικό ρόλο στη ρύθμιση προς το ελάχιστο των ανοσοποιητικών αποκρίσεων και τον περιορισμό των μετασχηματισμένων κυττάρων (καταστολή των όγκων). [142], [145], [146]

Ωφέλειες των ROS

Η παραγωγή των ROS στα κύτταρα δεν οδηγεί απαραίτητα σε καταστροφικά αποτελέσματα. Εναλλαγές στον οξειδωτικό μεταβολισμό του κυττάρου έχουν παρατηρηθεί κατή τη διάρκεια της διαφοροποίησής και της ανάπτυξής τους. Η ανακάλυψη συγκεκριμένων γονιδίων και κυτταρικών, σηματοδοτικών αντιδράσεων που επηρεάζονται από τα οξειδωτικά οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα ROS λειτουργούν ως υποκυτταρικοί αγγελιοφόροι στη ρύθμιση των γονιδίων και τα σηματοδοτικά, μεταγωγικά μονοπάτια.

Για παράδειγμα, το σηματοδοτικό, μεταγραφικό μονοπάτι του NF-κB, ενός από τους πιο βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες, διαθέτει συστατικά ευαίσθητα στα ROS. Έτσι, απουσία σηματοδοτικής δραστηριότητας από τον NF-κB, τα ROS ενεργοποιούν την ανασταλτική υπομονάδα IκB στην οποία προσδένεται ο NF-κB. Έτσι, ο ενεργοποιημένος NF-κB μεταφέρεται στον πυρήνα, προσδένεται στο DNA

και ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων στόχων που κωδικοποιούν τις κυτοκίνες, τους αυξητικούς παράγοντες, την iNOS κ.ά. [147], [146]

Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι τα ROS παίζουν σημαντικό ρόλο στη σωστή λειτουργία της σύμφυτης φυσικής ανοσοαπόκρισης, την ενεργοποίηση της αντίστοιχης προσαρμοσμένης, όπως και τη ρύθμιση των φλεγμονών και της δράσης του ανοσοποιητικού συστήματος. Ακριβής ρύθμιση της παραγωγής των ROS και της δράσης τους αποτελεί κλειδί και για τη ρύθμιση της ανοσοαπόκρισης – αδυναμία στα ανωτέρω μπορεί να καταλήξει σε παρατεταμένες φλεγμονές, οι οποίες θα αποτελέσουν παράγοντας παθολογικών συνθηκών.

Πιο συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της πρώτης απόκρισης κατά την εισβολή κάποιου παθογόνου, η ενεργοποίηση της σύμφυτης φυσικής προστασίας, η οποία χαρακτηρίζεται από την παραγωγή ROS στα φαγοκύτταρα (μακροφάγα και ουδετερόφιλα), αποτελεί κρίσιμο σημείο για την έναρξη της φαγοκυττάρωσης και της επικείμενης καταστροφής των μικροοργανισμών. Για παράδειγμα, απαιτείται η παραγωγή υψηλών επιπέδων ανιόντων υπεροξειδίου και περοξειδίου του υδρογόνου από την NADPH οξειδάση,για την καταστροφή των παθογόνων.

Εκτός όμως από τη σύμφυτη φυσική ανοσία, τα ROS προωθούν και την προσαρμοσμένη επειδή προάγουν τη σύνθεση έτερων ανοσοπροστατευτικών ουσιών. Επιπλέον, τα ROS παρέχουν μία σύνδεση μεταξύ της σύμφυτης και των προσαρμοσμένων ανοσοαποκρίσεων. Στα αρχικά στάδια των λοιμώξεων, τα επίπεδα αντιγόνων συχνά είναι αναντίστοιχα με τα βέλτιστα για την ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων Ωστόσο, η επιβίωση του φορέα του παθογόνου συχνά εξαρτάται από την έγκαιρη εκκίνηση των ανοσοποιητικών αποκρίσεων πριν επιτευχθούν τα βέλτιστα επίπεδα αντιγόνων. Η παραγωγή των ROS και η ακόλουθη δράση τους στα Τ λεμφοκύτταρα είναι δυνατό να επιτρέψουν μια έγκαιρη και σύσσωμη ανοσοαπόκριση, ακόμα και σε χαμηλά επίπεδα των αντιγόνων. [147]

Ασθένειες και ROS

Δράσεις των ROS έχουν εμπλακεί σε ασθένειες όπως ο διαβήτης, η νόσος του Alzheimer και άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, αλλά και στον καρκίνο και τις καρδειαγγειακές νόσους, κυρίως με τέτοιο τρόπο που η παραγωγή τους γίνεται ανεξέλεγκτη. Μεγάλο τμήμα της έρευνας έχει εστιάσει στο ρόλο των ROS στον καρκίνο και τις καρδειαγγεικές νόσους, και στο κατά πόσο η χορήγηση

αντιοξειδωτικών είναι ωφέλιμη για την παρεμπόδιση ή τη θεραπεία αυτών. Συνεπώς, η κατανόηση των ακριβών μοριακών αποτελεσμάτων των ROS σε διάφορους παράγοντες κινδύνου του καρκίνου και της καρδειαγγειακής νόσου θα αποτελέσει μεταίχμιο για την αξιολόγηση του ρόλου των αντιοξειδωτικών στη βελτίωση αυτών των ασθενειών και μπορεί να συμβιβάσει τα –πολλές φορές – αντφάσκοντα δεδομένα που προκύπτουν από διάφορες επιδημιολογικές μελέτες.

Αρχικά, σχετικά με τον καρκίνο, είναι απαραίτητα τα εξής στοιχεία ώστε να προκύψει καρκινογένεση: αυτάρκεια στα σήματα ανάπτυξης, αναισθησία στα σήματα καταστολής της ανάπτυξης, αποφυγή της απόπτωσης, απεριόριστο δυναμικό αντιγραφής, παρατεταμένη αγγειογένεση και εισβολή ιστών και μετάσταση. Τα ROS συμμετέχουν σε όλες αυτές τις διεργασίες, τόσο συμβάλλοντας στην ανάπτυξη του καρκίνου όσο παίζοντας και σημαντικό ρόλο στις ενδογενείς άμυνες, για τον περιορισμό και τον έλεγχο των μετασχηματισμένων κυττάρων.

Ένα πρώτο βήμα για την έναρξη της καρκινογένεσης είναι η μεταλλαξογόνος αλλοίωση του DNA και η επικείμενες συνέπειες στην έκφραση και λειτουργία γονιδίων, κυρίως των ογκοκατασταλτικών και των πρωτο-ογκογονιδίων. Οι αλλοιώσεις στο DNA μπορούν να προκύψουν τόσο από την άμεση αλληλεπίδραση των ROS με τα το σκελετό του DNA ή τις βάσεις, ή να προκληθούν από αντιδραστικά συστατικά που παρήχθησαν από οξειδωμένα λιπίδια. Ένα παράδειγμα αλλοιώσεων του DNA είναι η οξείδωση των υπολειμμάτων γουανίνης, η οποία προκαλεί αμφιμετατροπές των βάσεων G:C και T:A, και σχετίζεται με τον καρκίνο του μαστού και με χρόνια φλεγμονώδεις παθήσεις οι οποίες δυνητικά θα οδηγήσουν σε καρκίνο, όπως η ηπατίτιδα και η κίρρωση του ήπατος.

Η ανώμαλη ρύθμιση των επιπέδων των ROS θεωρείται ότι παίζει ρόλο στην καρκινογένεση, επίσης. Έχουν εκτιμηθεί διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές με παραδόξως υψηλά επίπεδα περοξειδίου του υδρογόνου, ενώ άλλες κυτταρικές σειρές έχουν παρουσιάσει μειωμένη καταλάση και περοξειδάση της γλουταθειόνης, προδίδοντας ανικανότητα στην αποτοξίνωση του περοξειδίου του υδρογόνου. Επιπλέον, αυτές οι ανωμαλίες στο μεταβολισμό των ROS έχουν και λειτουργικές συνέπειες καθώς επηρεάζουν και την ογκογονικότητα. Για παράδειγμα, μια αύξηση στη δισμουτάση του υπεροξειδίου αντιστοιχεί σε μείωση του ανιόντος υπεροξειδίου και αύξηση του περοξειδίου του υδρογόνου, μεταβολές που έχουν συσχετιστεί με την κακοήθεια των κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού.

Εκτός από την τροποποιημένη ρύθμιση των ενζυμικών συστημάτων που εμπλέκονται στην παραγωγή και την αποτοξίνωση των ROS, πολλά φυσιολογικά χαρακτηριστικά των όγκων σχετίζονται με την παραγωγή των ROS, όπως η στέρηση γλυκόζης, η υποξία και οι φλεγμονές που προκύπτουν από τα μακροφάγα που διεισδύουν. Πιο συγκεκριμένα, η στέρηση γλυκόζης, ως αποτέλεσμα ενός όγκου που έχει ξεπεράσει την παροχή αίματος, προκαλεί οξειδωτικό στρες σε

καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων του μαστού. Ή, σε όγκους που έχουν ξεπεράσει την παροχή αίματος, η χαοτική αγγειογένεση προκαλεί κύκλους υποξίας και επαναιμάτωσης, παράγοντας ROS. Ένα κυτταρικό περιβάλλον στο οποίο η παραγωγή και η αποτοξίνωση των ROS δεν ρυθμίζεται σωστά μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη ρύθμιση μοριακών αντιδράσεων, οι οποίες θα επηρεάσουν αντίστοιχα τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και τη μετακίνηση των κυττάρων με αρνητικά αποτελέσματα για τη διάδοση του καρκίνου.

Επιπλέον, επιδράσεις των ROS στον κυτταρικό κύκλο, όπως η αναστολή της απόπτωσης, το γήρας, η επιδιόρθωση του DNA και η προαγωγή της αγγειογένεσης, προωθούν τη διαδικασία της καρκινογένεσης. Το οξείδιο του αζώτου (NO) έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τη δραστηριότητα των επιδιορθωτικών ενζύμων του DNA, καταλήγοντας σε αυξημένη γενοτοξική επιβάρυνση για το κύτταρο. Όπως επίσης, το οξείδιο του αζώτου εμπλέκεται και στη διαδικασία της απόπτωσης, η οποία είναι σχεδιασμένη στην εξάλειψη των μετασχηματισμένων κυττάρων.

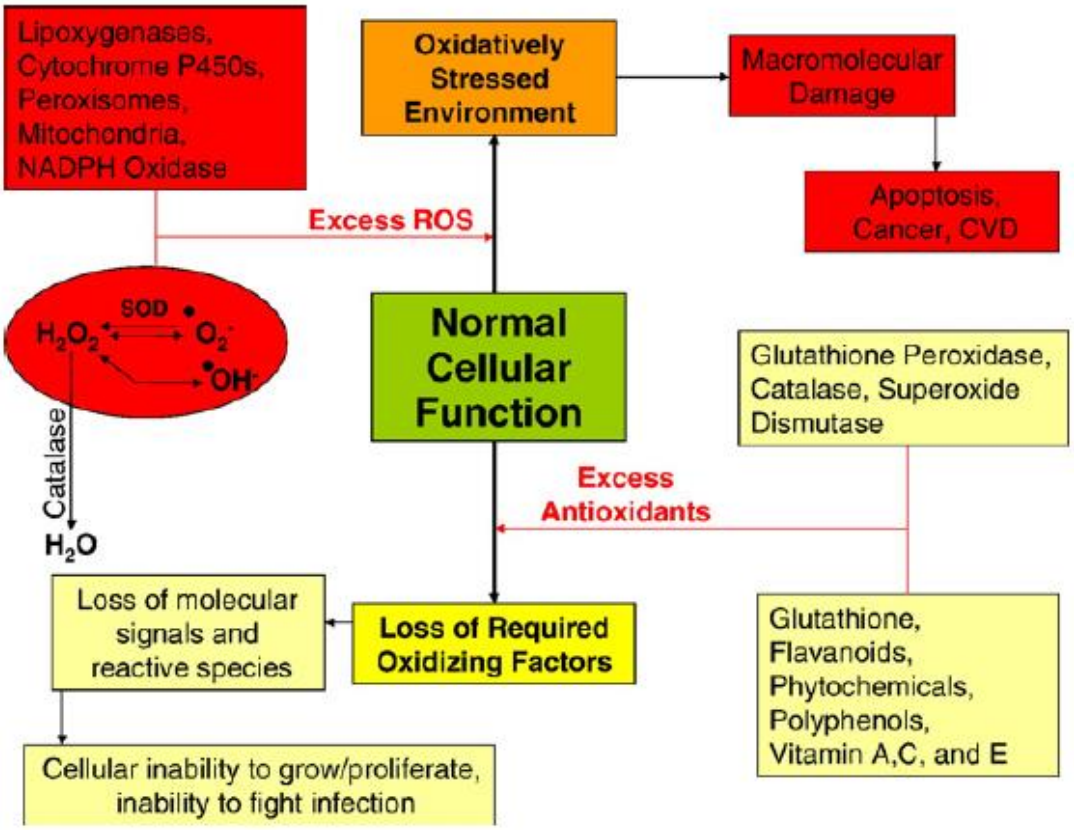
Οι πολλαπλοί (και καμιά φορά αντιφατικοί) ρόλοι των ROS στην έναρξη, πρόοδο και μετάσταση του καρκίνου αντικατοπτρίζονται στα αποτελέσματα κλινικών μελετών που εξετάζουν τη χρήση των αντοξειδωτικών στη θεραπεία και την πρόληψη του καρκίνου. Για να επιτευχθεί η σωστή ισορροπία μεταξύ κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κυτταρικού θανάτου, τα επίπεδα των ROS πρέπει να είναι απόλυτα ρυθμισμένα: υπερβολική χορήγηση αντιοξειδωτικών είναι δυνατό θεωρητικά να επηρεάσει αυτή την ισορροπία και δυνητικά να οδηγήσει σε μη επιθυμητά αποτελέσματα.

Εκτός από τον καρκίνο, οι καρδειαγγειακές νόσοι, συμπεριλαμβανομένων της αθηροσκλήρωσης και των ακόλουθων αγγειακών ανωμαλιών, αποτελούν τις κύριες αιτίες θανάτου στις ανεπτυγμένες χώρες. Αγγειακές προσβολές, όπως το κάπνισμα, ο σακχαρώδης διαβήτης και η υπέρταση, μπορούν να προκαλέσουν μια φλεγμονώδη απόκριση στα αγγεία. Η καθιέρωση αυτής φλεγμονώδους κατάστασης, μερικώς προερχόμενη από τα ROS, καταλήγει σε βλάβες στο αγγειακό ενδοθήλιο και στα κύτταρα των λείων μυών. Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, που χαρακτηρίζεται από αλλαγές στις αντιπηκτικές, αντιφλεγμονώδεις και αγγειοχαλαρωτικών ιδιοτήτων των ενδοθηλιακών κυττάρων, προωθεί την παραγωγή μακροφάγων, παραγόντων ανάπτυξης και κυτταρικής υπερτροφίας, συμβάλλοντας έτσι στη δημιουργία αθηροματικών πλακών. Σε όλες τις παραπάνω δράσεις εμπλέκονται άμεσα και τα ROS.

Η ρύθμιση των ενδοθηλιακών ιδιοτήτων αγγειοδιαστολής και αγγειοχαλάρωσης προσφέρει ένα παράδειγμα άμεσου αποτελέσματος ενός ROS, του οξειδίου του αζώτου, στην αγγειακή λειτουργία. Λανθασμένη ρύθμιση αυτών των διαδικασιών είναι χαρακτηριστικό της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, και βασικό βήμα για την

παθογένεση καρδειαγγειακών νόσων, όπως αθηροσκλήρωση, υπέρταση και καρδιακή ανεπάρκεια. Το οξείδιο του αζώτου είναι ο ενδοθηλιακός χαλαρωτικός παράγοντας που ρυθμίζει την αγγειοδιαστολή, και η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία προκύπτει από την απώλεια βιοδιαθεσιμότητάς του στα αγγειακά τοιχώματα. Το αοξείδιο του αζώτου μπορεί να απενεργοποιηθεί από το ανιόν υπεροξειδίου και να σταθεροποιηθεί από την προσθήκη της δισμουτάσης υπεροξειδίου. Έτσι, αύξηση των επιπέδων ανιόντων του υπεροξειδίου από την NADPH οξειδάση οδηγεί σε απώλεια του οξειδίου του αζώτου, και συνεπώς σε αλλοίωση των ιδιοτήτων αγγειοδιαστολής και αγγειοχαλάρωσης του ενδοθηλίου, συμβάλλοντας στη δημιουργία αγγειακής νόσου.

Συμπληρωματικά στις άμεσες συνέπειες του οξειδίου του αζώτου στα αγγειακά τοιχώματα, τα ROS συμμετέχουν στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης μέσω της ιδιότητάς τους να λειτουργούν ως δευτερεύοντες αγγελιοφόροι στα σηματοδοτικά μεταγωγικά μονοπάτια, και ως τελεστές στη γονιδιακή μεταγραφή. Επιπλέον, τα ROS έχουν τη διπλή ικανότητα να προωθούν την ανάπτυξη των αγγειακών κυττάρων των λείων μυών και των ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά και να την καταστέλλουν και να προκαλούν απόπτωση. Εν τέλει, η επιλογή της λειτουργίας των ROS ως πολλαπλασιαστικό σήμα ή ως αναστολέας ανάπτυξης, εξαρτάται από τη δόση και τη διάρκεια έκθεσης των ROS. Μελέτες έχουν δείξει, ότι έκθεση των αγγειακών κυττάρων λείων μυών σε χαμηλό οξειδωτικό στρες για μικρή περίοδο οδηγεί σε ανάπτυξη αυτών, ενώ έκθεση σε μεγάλες δόσεις για μεγαλύτερη διάρκεια προκαλεί κυτταρικό θάνατο. Εκεί ίσως να στηρίζεται και η ικανότητα των κυττάρων να αποτοξινώνουν και να προστατεύονται έναντι των ROS, με το ανιόν του υπεροξειδίου να οδηγεί σε κυτταρική ανάπτυξη και το περοξείδιο του υδρογόνου σε κυτταρικό θάνατο. [147]



Εικόνα 39: Κυτταρικές οξειδωτικές αλληλεπιδράσεις [147]

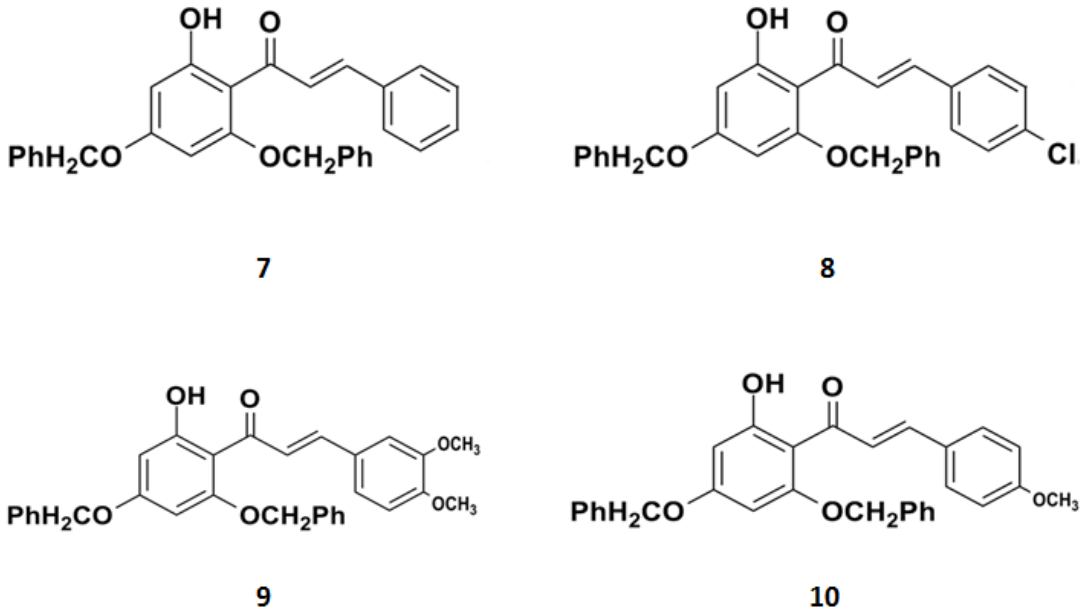
Κεφάλαιο 3
Σχεδιασμός και σύνθεση νέων χαλκονών και ωρονών με βενζυλόξυ –υποκαταστάτες

Εισαγωγή

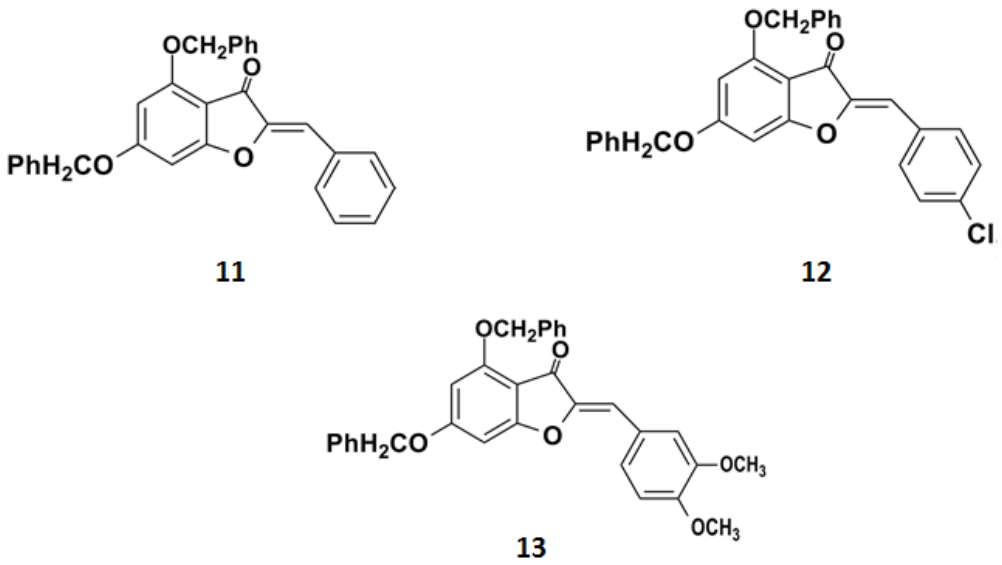
Όπως αναλύθηκε στο Κεφ. 1, τα βενζυλιωμένα φλαβονοειδή, αν και σπάνια στη φύση, έχουν παρουσιάσει ενδιαφέρουσα και αυξημένη φαρμακευτική δράση. Ωστόσο, λόγω της σπανιότητάς τους δεν έχουν τύχει ευρείας ερευνητικής μελέτης όπως άλλα υποκατεστημένα φλαβονοειδή, με αποτέλεσμα να υπάρχει ακόμα ευρύ πεδίο πειραματισμού σχεδιασμού και σύνθεσης βενζυλιωμένων αναλόγων.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η σύνθεση νέων αναλόγων χαλκονών και ωρονών (Εικόνα 40, Εικόνα 41), οι οποίες φέρουν βενζυλόξυ –ομάδες στις θέσεις 4′ και 6′ του Α δακτυλίου. Επίσης, δεδομένου ότι η θέση των υποκαταστατών του Β δακτυλίου και η δράση τους ως δότες ή δέκτες ηλεκτρονίων επηρεάζει τη σχέση δομής –δράσης των χαλκονών, τα νέα ανάλογα χαλκονών διαθέτουν διάφορους υποκαταστάτες στις θέσεις 3 και 4 του Β δακτυλίου.

Τα νέα μόρια θα αξιολογηθούν ως προς την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση τους.



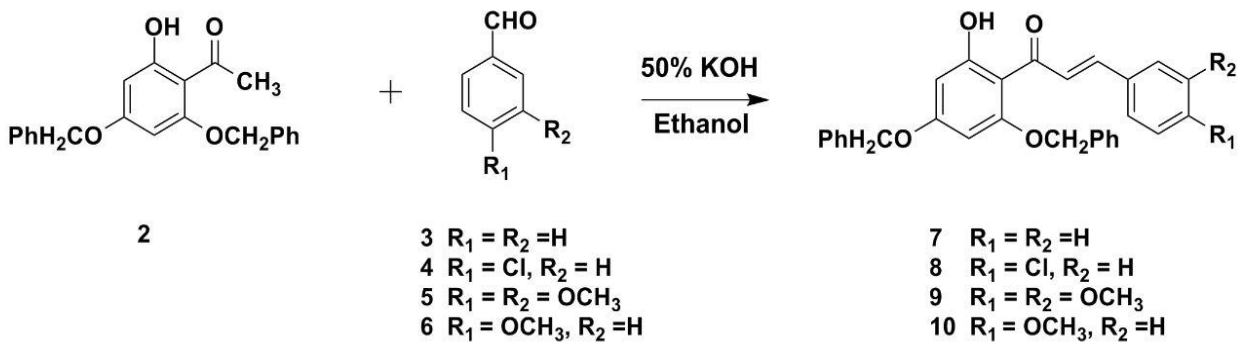
Εικόνα 40: 4',6' –διβενζυλόξυ -2' –υδρόξυ –χαλκόνες που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία.



Εικόνα 41: 4,6 –διβενζυλόξυ-ωρόνες που συντέθηκαν στην παρούσα εργασία

Σύνθεση χαλκονών

Στην παρούσα εργασία η σύνθεση χαλκονών έγινε μέσω της αντίδρασης Claisen – Schmidt, με βασικό καταλύτη το KOH, σύμφωνα με τη γενική αντίδραση:



Σχήμα 9: Γενική αντίδραση σύνθεσης χαλκονών

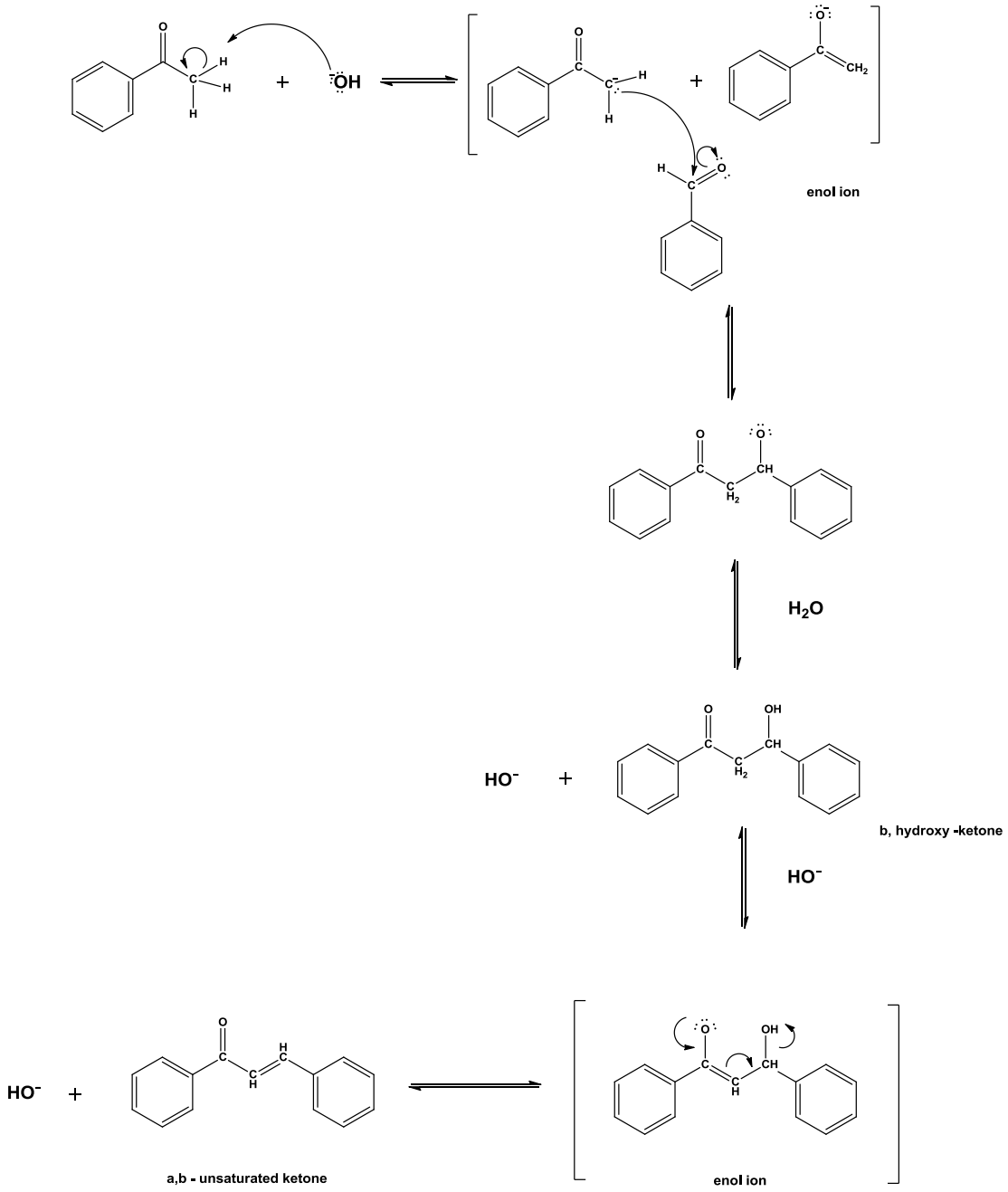
Συγκεκριμένα, η σύνθεση των χαλκονών γίνεται μέσω της συμπύκνωσης Claisen – Schmidt μεταξύ της 2′ –υδρόξυ -4′,6′ –διβενζυλόξυ –ακετοφαινόνης και μιας υποκατεστημένης βενζαλδεΰδης σε πάρα- και όρθο-θέση. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε βασικό περιβάλλον (υδατικό δ/μα KOH 50% v/v), σε διαλύτη αιθανόλη. Τα αντιδρώντα 2′ –υδρόξυ -4′,6′ –διβενζυλόξυ –ακετοφαινόνη, 3,4 –βενζαλδΰδη και 50% v/v διάλυμα KOH προστίθενται σε γραμμομοριακή αναλογία 1:1,5:3. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία δωματίου, για 24 ώρες υπό ανάδευση.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα ψύχεται σε δοχείο με πάγο και κατόπιν οξινίζεται με προσθήκη διαλύματος HCl 10% v/v, έως ότου καταβυθιστεί κίτρινο ίζημα. Στη συνέχεια, το κίτρινο ίζημα διηθείται υπό κενό και ξηραίνεται. Τέλος, για την παραλαβή του καθαρού προϊόντος, γίνεται ανακρυστάλλωση του ξηρού ιζήματος με εν θερμώ διάλυση σε εξάνιο και την προσθήκη οξικού αιθυλεστέρα στάγδην. Το διάλυμα αποθηκεύεται στο ψυγείο μέχρι την καταβύθιση των καθαρών κρυστάλλων του προϊόντος, οι οποίοι και παραλαμβάνονται με διήθηση υπό κενό. Η καθαρότητα του ανακρυσταλλωμένου προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ^{1}H και ^{13}C NMR.

Ο μηχανισμός που ακολουθείται κατά τη συμπύκνωση Claisen –Schmidt περιγράφεται γραφικά από το Σχήμα 9, και περιλαμβάνει σε πρώτο στάδιο την απόσπαση ενός όξινου α –υδρογόνου από το –CH3 της 2′ –υδρόξυ -4′,6′ –διβενζυλόξυ –ακετοφαινόνης από το ισχυρά βασικό ανιόν υδροξυλίου του καταλύτη. Έτσι σχηματίζεται το ενολικό ανιόν, το οποίο πρόκειται για ένα υβρίδιο

δύο δομών συντονισμού. Το ενολικό ιόν, λόγω του αρνητικού του φορτίου καθίσταται πολύ καλό πυρηνόφιλο, προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα της καρβονυλομάδας της βενζαλδεΰδης σε μια αντίδραση πυρηνόφιλης προσθήκης, για να σχηματιστεί ένα τετραεδρικό ιόν αλκοξειδίου ως ενδιάμεσο.

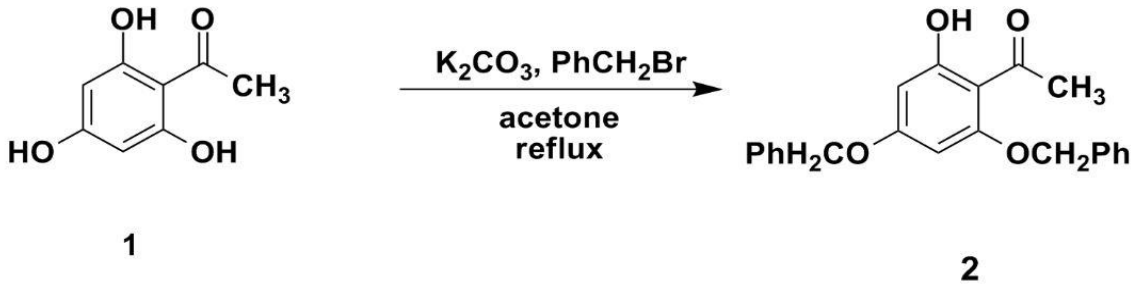
Στη συνέχεια, το ενδιάμεσο ιόν αλκοξειδίου πρωτονιώνεται προς το αλδολικό προϊόν, μια β –υδρόξυ κετόνη, και αναγεννάται ο καταλύτης. Η β –υδρόξυ κετόνη που έχει πλέον δημιουργηθεί, μπορεί εύκολα να αφυδατωθεί προς μία χαλκόνη (συζυγιακή ενόνη), που είναι και το επιθυμητό προϊόν. Συγκεκριμένα, κατά τη συμπύκνωση, αποσπάται ένα όξινο α –υδρόγονο λόγω του βασικού περιβάλλοντος, σχηματίζοντας ένα ενολικό ιόν. Το ενολικό ιόν αποβάλλει την αποχρούσα ομάδα –OH, με αποτέλεσμα να σχηματιστεί η 2′ –υδρόξυ -4′,6′ –διβενζυλόξυ –χαλκόνη με υποκαταστάτες στον Β δακτύλιο τους αντίστοιχους *meta* και *ortho* υποκαταστάτες της βενζαλδεΰδης και ένα νερό. [148]



Σχήμα 10: Μηχανισμός συμπύκνωσης Claisen-Schmidt για τη σύνθεση χαλκονών

Η αρχική 2′ –υδρόξυ -4′,6′ –διβενζυλόξυ –ακετοφαινόνη δεν ήταν εμπορικά διαθέσιμη, οπότε χρειάστηκε να παρασκευαστεί μέσω της βενζυλίωσης της εμπορικά διαθέσιμης 2,4,6 –υδρόξυ –ακετοφαινόνης με βενζυλοβρωμίδιο, παρουσία ανθρακικού καλίου (K_2CO_3) σε ακετόνη. Τα αντιδρώντα 2,4,6 –υδρόξυ –ακτοφαινόνη, βενζυλοβρωμίδιο και K_2CO_3 προστίθενται σε αναλογία 1:3:2,4. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 68°C υπό ανάδευση για 24 ώρες και η πορεία της ελέγχεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα με TLC. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα διηθείται για την απομάκρυνση του αδιάλυτου K_2CO_3 και ακολουθούν

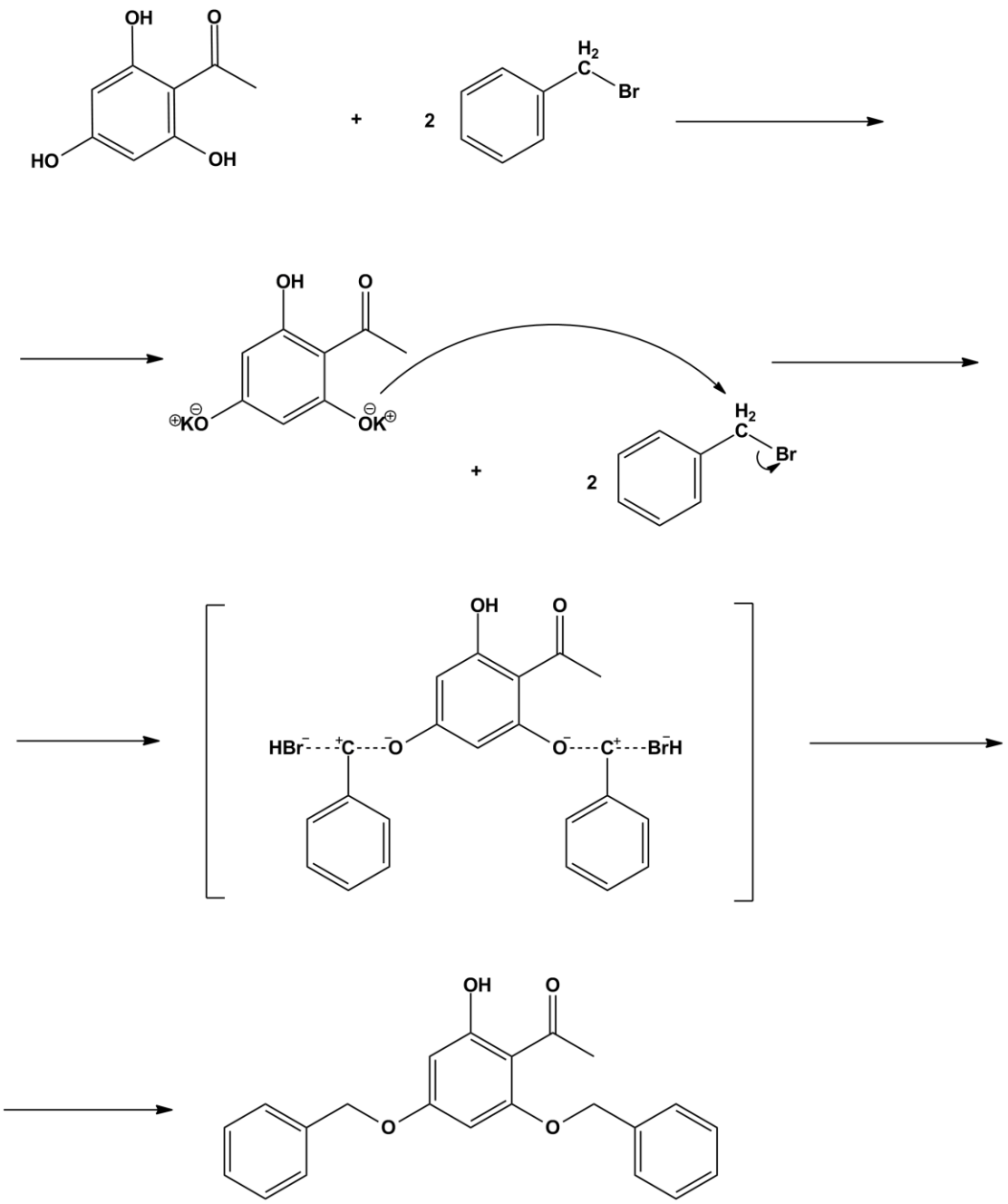
εκπλύσεις με ακετόνη και εξάτμιση του διαλύτη. Επειδή το στερεό προϊόν που παραλαμβάνεται από την εξάτμιση δεν είναι καθαρό, διενεργείται χρωματογραφική στήλη για την παραλαβή των πλέον καθαρών κλασμάτων προϊόντος. Για τη χρωματογραφική στήλη χρησιμοποιείται σύστμα διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα και οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 8:2, ενώ λόγω της αδυναμίας διάλυσης του στερεού προϊόντος σε αυτό το σύστημα διαλυτών, έχει προηγηθεί dry packing σε μίγμα μεθανόλης/ διχλωρομεθανίου. Ο έλεγχος της πορείας της χρωματογραφικής στήλης γίνεται με TLC. Τέλος, τα πλέον καθαρά κλάσματα της στήλης οδηγούνται προς εξάτμιση του διαλύτη και παραλαβή της καθαρής 2′ –υδρόξυ -4′,6′ –διβενζυλόξυ –ακετοφαινόνης.



Σχήμα 11: Σύνθεση της 2′ –υδρόξυ -4′,6′ –διβενζυλόξυ -ακετοφαινόνης

Η αντίδραση σύνθεσης της 2′ –υδρόξυ -4′,6 –διβενζυλόξυ –ακετοφαινόνης πραγματοποιείται με μηχανισμό πυρηνόφιλης υποκατάστασης SN2, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 11. Χαρακτηριστικό του μηχανισμού SN2 είναι ότι η αντίδραση πραγματοποιείται σε ένα μόνο στάδιο, χωρίς ενδιάμεσα, όπου το εισερχόμενο πυρηνόφιλο προσβάλει το υπόστρωμα από μία κατεύθυνση εντελώς αντίθετη από εκείνη της αποχωρούσας ομάδας. Καθώς το πυρηνόφιλο πλησιάζει από τη μια πλευρά του μορίου και συνδέεται με τον άνθρακα, το ανιόν του αλογόνου αποχωρεί από την άλλη.

Το πυρηνόφιλο αλκοξείδιο χρησιμοποιεί το μονήρες ζεύγος ηλεκτρονίων του για να προσβάλει τον άνθρακα του βενζυλοβρωμιδίου, από μια κατεύθυνση 180° σε σχέση με το απομακρυνόμενο βρώμιο. Αυτό οδηγεί σε μια μεταβατική κατάσταση με έναν εν μέρει σχηματισμένο δεσμό άνθρακα –αλκοξειδίου κι έναν εν μέρει διασπασμένο δεσμό άνθρακα – βρωμίου. Τελικά, σχηματίζεται ο νέος δεσμός του βενζυλικού άνθρακα και του οξυγόνου του αλκοξειδίου, ενώ το ανιόν του βρωμίου αποχωρεί μαζί με το ηλεκτρονιακό ζεύγος του πρώην δεσμού άνθρακα –βρωμίου. [148]

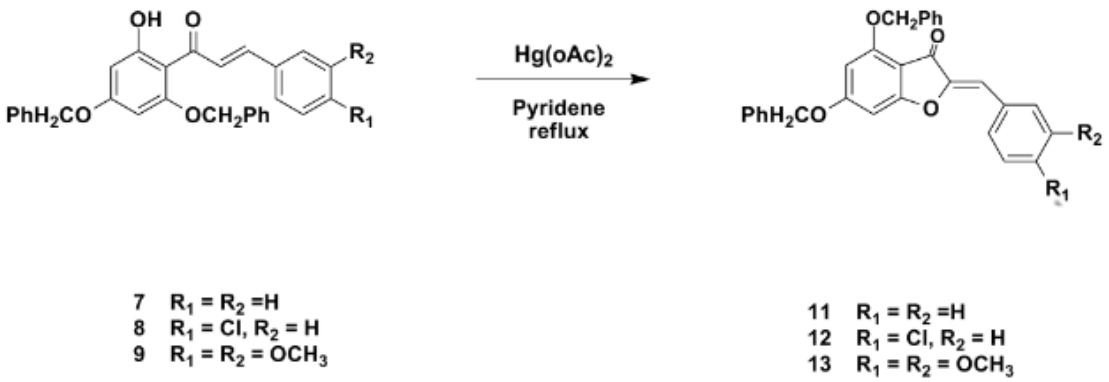


Σχήμα 12: Μηχανισμός αλδολικής συμπύκνωσης για τη σύνθεση της ακετοφαινόνης.

Όλες οι βενζαλδεΰδες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εμπορικά διαθέσιμες.

Σύνθεση Ωρονών

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, για τη σύνθεση των βενζυλιωμένων ωρονών στην παρούσα εργασία, επιλέχθηκε η μέθοδος οξειδωτικής κυκλοποίησης των αντίστοιχων χαλκονών με οξικό υδράργυρο, σε διαλύτη πυριδίνη, σύμφωνα με τη γενική αντίδραση:



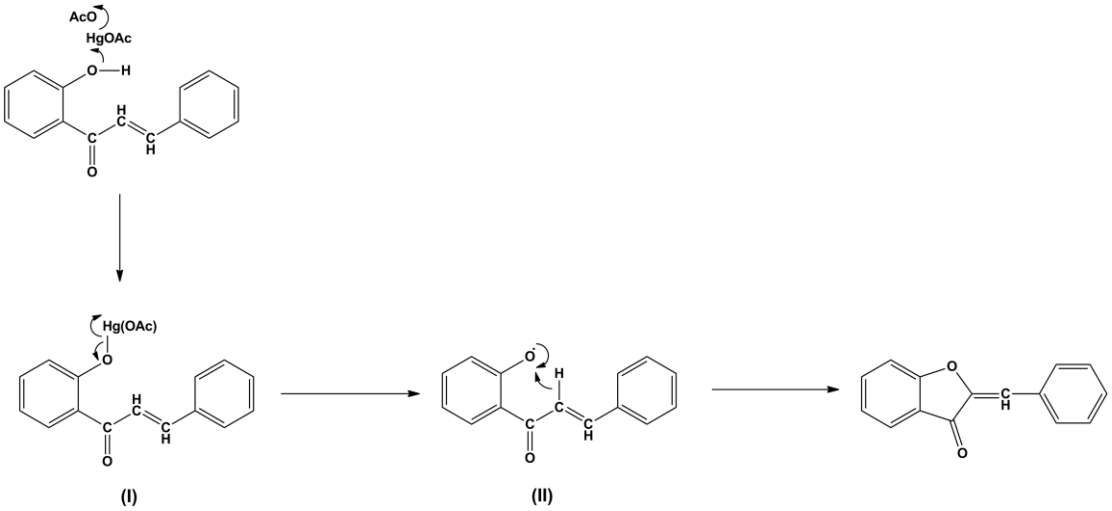
Σχήμα 13: Γενική αντίδραση σύνθεσης ωρονών

Τα αντιδρώντα, η εκάστοτε χαλκόνη και ο οξικός υδράργυρος προστίθενται σε γραμμομοριακή αναλογία 1:1,5, παρουσία διαλύτη πυριδίνης. Η αντίδραση επιτυγχάνεται με θέρμανση –reflux στους 110°C, υπό ανάδευση, για 2,5 -3,5 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης μελετάται με TLC ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το αντιδρόν μίγμα ψύχεται σε δοχείο με πάγο και κατόπιν οξινίζεται με προσθήκη HCl 10% v/v, έως ότου καταβυθιστεί στερεό. Εκτός από το στερεό προϊόν, ίχνη ωρονών βρίσκονται και στο οξινισμένο διήθημα τα οποία απομονώνονται με εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο, στο οποίο είναι διαλυτά. Η οργανική φάση ξηραίνεται σε άνυδρο θειικό νάτριο για την απομάκρυνση της υγρασίας, και το προϊόν παραλαμβάνεται με εξάτμιση υπό κενό του ξηρανθέντος διαλύματος.

Από την παραπάνω αντίδραση και επεξεργασία, οι ωρόνες που παραλαμβάνονται δεν έχουν την επιθυμητή καθαρότητα. Για να την αποκτήσουν, ανακρυσταλλώνονται με εν θερμώ διάλυση σε μεθανόλη. Η πλήρης καταβύθιση του προϊόντος επιτυγχάνεται έπειτα από παραμονή του διαλύματος στο ψυγείο, για τουλάχιστον 24h. Η παραλαβή των ωρονών γίνεται με διήθηση υπό κενό του μίγματος. Η καθαρότητα των ανακρυσταλλωμένων ωρονών ελέγχεται με φασματοσκοπία ^{1}H NMR.

Ο μηχανισμός της αντίδρασης της οξειδωτικής κυκλοποίησης των χαλκονών προς παρασκευή ωρονών περιγράφεται στο παρακάτω Σχήμα 14, και περιλαμβάνει: Στο

πρώτο στάδιο της αντίδρασης σχηματίζεται το οργανοϋδραργυρικό ενδιάμεσο (I). Η ομολυτική διάσπαση του O –Hg οδηγεί στο σχηματισμό ρίζας Ar –O˙ (II) και οξικού υδραργύρου. Η ρίζα προσβάλλει το δεσμό C –H της α –θέσης του διπλού δεσμού προς το σχηματισμό του πενταμελούς δακτυλίου της ωρόνης.



Σχήμα 14: Μηχανισμός της οξειδωτικής κυκλοποίησης των χαλκονών προς σχηματισμό ωρονών

Κεφάλαιο 4
Μέθοδοι αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης

Κατόπιν της σύνθεσης των βενζυλιωμένων αναλόγων χαλκονών και ωρονών, επιχειρήθηκε να μελετηθεί η in vitro αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράσης τους. Για τη μελέτη αυτών, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω μέθοδοι.

Μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο DPPH

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον στις αντιοξειδωτικές ουσίες, και κυρίως σε εκείνες που τείνουν να αποτρέπουν τα καταστροφικά αποτελέσματα των ελεύθερων ριζών στο ανθρώπινο σώμα, και να εμποδίζουν την την αποσύνθεση των λιπών και άλλων συστατικών στις τροφές. Και στις δύο περιπτώσεις, προτιμώνται αντιοξειδωτικά από φυσικές πηγές αντί για συνθετικές. Συνεπώς, υπάρχει μια παράλληλη αύξηση της χρήσης μεθόδων που υπολογίζουν την ικανότητα αυτών των ουσιών ως αντιοξειδωτικά.

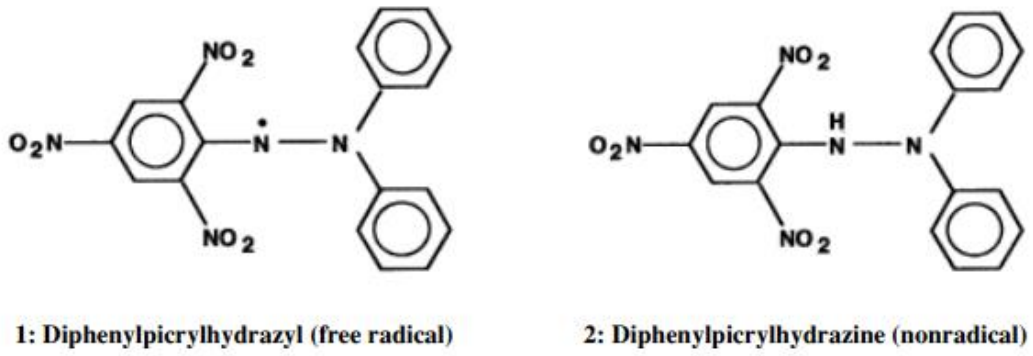
Μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους στηρίζεται στη χρήση της σταθερής ελεύθερης ρίζας του διφαίνυλ –πικρυλυδραζυλίου (DPPH). Το μόριο 1,1 –διφαίνυλ -2 –πικρυλ –υδραζύλιο (α,α –διφαίνυλ –β –πικρυλυδραζύλιο (DPPH) χαρακτηρίζεται από μία σταθερή ελεύθερη ρίζα λόγω της απομάκρυνσης ενός ελεύθερου ηλεκτρονίου από το άνω μέρος του μορίου, έτσι ώστε τα μόρια να μη διμερίζονται (που είναι και το πιο συχνό φαινόμενο των ελεύθερων ριζών). Η απομάκρυνση επίσης εκδηλώνεται με την εμφάνιση ιώδους χρώματος, λόγω του φάσματος απορρόφησης σε διάλυμα αιθανόλης στα 520nm.

Όταν ένα διάλυμα DPPH αναμειγνύεται με μία ουσία η οποία μπορεί να προσφέρει ένα άτομο υδρογόνου, τότε προκύπτει η ανηγμένη του μορφή η οποία εκδηλώνεται με την απώλεια του ιώδους χρώματος (αν και αναμένεται να παραμείνει ένα ωχρό χρώμα στο διάλυμα λόγω της παρουσίας της πικρυλικής

ομάδας). Συμβολίζοντας τη ρίζα DPPH με $Z^{\bullet}$ και το μόριο δότη με AH, η αρχική αντίδραση είναι:

$$Z^{\bullet} + AH = ZH + A^{\bullet} \quad (11)$$

Όπου ZH η ανηγμένη μορφή του DPPH και $A^{\bullet}$ η ελεύθερη ρίζα που δημιουργείται από το πρώτο βήμα. η τελευταία ρίζα θα υποβληθεί σε διάφορες αντιδράσεις που ελέγχουν τη συνολική στοιχειομετρία, η οποία ουσιαστικά είναι ο αριθμός των μορίων του ανηγμένου DPPH (αποχρωματισμένου) από ένα μόριο αναγωγικού.



Εικόνα 42: Σταθερή και ανηγμένη μορφή του DPPH (με ελεύθερη ρίζα και χωρίς, αντίστοιχα)

Συνεπώς, η αντίδραση (11) στοχεύει στο να υποδείξει τη σχέση μεταξύ των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα σε ένα οξειδωτικό σύστημα, όπως η αυτοοξείδωση ενός λιπιδίου ή άλλης ακόρεστης ουσίας. Το μόριο $Z^{\bullet}$ του DPPH συμβολίζει όλες τις ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται μέσα στο σύστημα, η δράση των οποίων καταστέλλεται από το μόριο AH. [149]

Μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της λιπιδικής υποροξείδωσης με AAPH

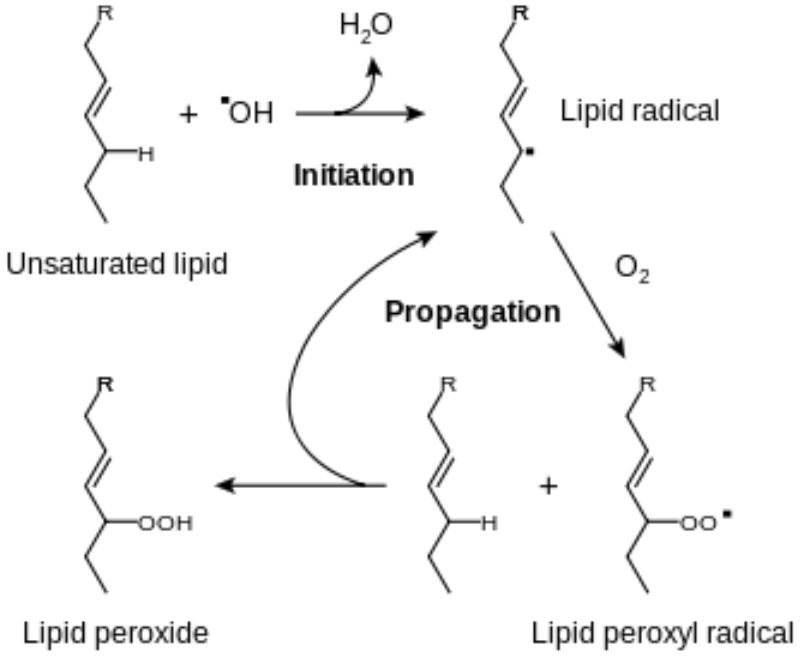
Η μελέτη της λιπιδικής υποροξείδωσης έχει συγκεντρώσει μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια λόγω του ρόλου της στις διεργασίες ασθενειών. Τα λιπίδια των μεμβρανών είναι ιδιαίτερα επιρρεπή στη λιπιδική υποροξείδωση εξαιτίας της παρουσίας πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Δεδομένου ότι οι μεμβράνες δομούν τη βάση για πολλά κυτταρικά οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια, οι μεμβράνες του πλάσματος, το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα λυσοσώματα κ.λ.π., η ζημία που

προκαλείται από τη λιπιδική υπεροξείδωση είναι ιδιαιτέρως κρίσιμη για τη λειτουργία του κυττάρου και την επιβίωσή του. Πειραματικά και κλινικά στοιχεία αποδεικνύουν ότι η λιπιδική υπεροξείδωση και τα παράγωγά της παίζει σημαντικό ρόλο στην τοξικότητα του ήπατος, του πνεύμονα και του εγκεφάλου και σχετίζεται με ασθένειες όπως η αθηροσκλήρωση, ο καρκίνος, η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Parkinson, ο διαβήτης κ.ά. [150]

Η λιπιδική υπεροξείδωση πρόκειται για μία αλυσωτή αντίδραση, η οποία χαρακτηρίζεται από τρία στάδια: την εκκίνηση, τη διάδοση και τον τερματισμό. Η έναρξη της πρώτης αλυσίδας υπεροξείδωσης σε μία μεμβράνη ή ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ ξεκινάει από την επίθεση οποιουδήποτε είδους που διαθέτει αρκετή δραστικότητα ώστε να αποσπάσει ένα άτομο υδρογόνου ($H^{\bullet}$) από μία ομάδα μεθυλενίου (-CH2-). Επειδή το άτομο του υδρογόνου διαθέτει μόνο ένα ηλεκτρόνιο, η απόσπαση αυτή αφήνει πίσω ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στον άνθρακα, $-^{\bullet}CH2-$. Η παρουσία ενός διπλού δεσμού στο λιπαρό οξύ εξασθενεί το δεσμό C–H στο άτομο του άνθρακα, οπότε εκεί συντελείται η απομάκρυνση του $H^{\bullet}$. Συνεπώς, οι πλευρικές αλυσίδες των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στην υπεροξείδωση.

Η νέα ρίζα με κέντρο τον άνθρακα που δημιουργήθηκε υποβάλλεται σε μοριακή αναδιάταξη ώστε να σχηματιστεί ένα συζευγμένο διένιο, το οποίο στη συνέχεια συνδέεται με οξυγόνο ώστε να παραχθεί μία ρίζα υπεροξυλίου η οποία είναι ικανή να αποσπάσει πλέον μόνη της ένα άτομο υδρογόνου από ένα έτερο λιπαρό οξύ. Συνεπώς, μόνο μία περίπτωση έναρξης μπορεί να οδηγήσει στη μετατροπή δεκάδων πλευρικών αλυσίδων λιπαρών οξέων σε λιπιδικά υδροϋπεροξείδια.

Το μήκος της διάδοσης της αλυσωτής αντίδρασης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων την αναλογία λιπιδίου –πρωτεΐνης σε μία μεμβράνη (η πιθανότητα αντίδρασης μιας ρίζας με μία μεμβρανική πρωτεΐνη είναι μεγαλύτερη όσο η περιεκτικότητα της μεμβράνης σε πρωτεΐνη αυξάνεται), τη σύνθεση του λιπαρού οξέος, τη συγκέντρωση οξυγόνου και την παρουσία εντός της μεμβράνης αντιοξειδωτικών που παρεμβαίνουν στην αλυσίδα της αντίδρασης.



Εικόνα 43: Μηχανισμός λιπιδικής υπεροξείδωσης

Ο τερματισμός της υπεροξείδωσης σημαίνει όταν ένα αντιοξειδωτικό (AH), όπως η βιταμίνη Ε, επεμβαίνει στην αλυσίδα και προσφέρει ένα εύκολα-αποσπάσιμο άτομο υδρογόνο στη ρίζα υπεροξυλίου.

$$AH + LOO^{\bullet} \longrightarrow LOOH + A^{\bullet} \quad (12)$$

Η ρίζα αντιοξειδωτικού που προκύπτει ($A^{\bullet}$) μπορεί να αντιδράσει με ένα άλλο μόριο $LOO^{\bullet}$, μπορεί να εξαφανιστεί χωρίς να προκαλέσει κάποια βλάβη (μέσω διμερισμού σε A_2), ή μπορεί να μετατραπεί πάλι σε A –H με αντίδραση με κάποιο άλλο μόριο.

Είδη τα οποία μπορούν να αποσπάσουν το πρώτο άτομο υδρογόνου ώστε να ξεκινήσει η αλυσωτή αντίδραση είναι η ρίζα υδροξυλίου ($^{\bullet}OH$), η ρίζα αλκοξυλίου ($RO^{\bullet}$), η ρίζα υπεροξυλίου ($ROO^{\bullet}$). Τα προϊόντα των αλυσωτών αυτών αντιδράσεων είναι μία ποικιλία από υδροϋπεροξείδια και κυκλικά υπεροξείδια. Ανηγμένα σύμπλοκα μετάλλων (όπως Fe (II) ή Cu (I)) αντιδρούν με τα λιπιδικά υπεροξείδια (LOOH) και δίνουν ρίζες αλκοξυλίου.

$$LOOH + M^{n} \longrightarrow LO^{\bullet} + M^{(n+1)+} + OH^{-} \quad (13)$$

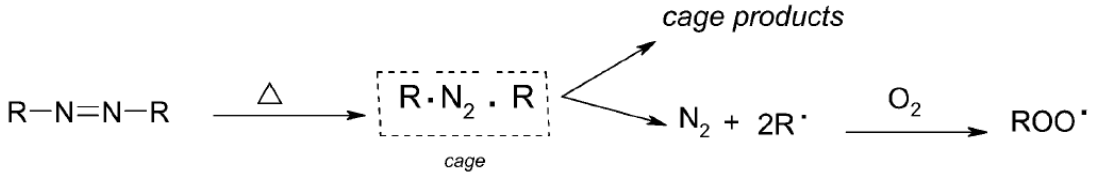
Ενώ τα οξειδωμένα σύμπλοκα μετάλλων (όπως Fe (III) ή Cu (II) αντιδρούν πιο αργά και παράγουν ρίζες υπεροξυλίου και αλκοξυλίου. Και οι δύο συμμετέχουν την

αλυσίδα της λιπιδικής υπεροξείδωσης αποσπώντας περισσότερα άτομα υδρογόνου.

Η εμφάνιση της λιπιδικής υπεροξείδωσης σε βιολογικές μεμβράνες προκαλεί βλάβες στις λειτουργίες της μεμβράνης, αλλαγές στη ρευστότητα, απενεργοποίηση των μεμβρανικών υποδοχέων και ενζύμων και προκαλεί μη ειδική διαπερατότητα σε ιόντα όπως Ca^{2+}. [151], [152]

Για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης των φαρμάκων χρησιμοποιείται η μέθοδος οξείδωσης με εκκινητή την υδρόφιλη, ελεύθερη ρίζα του 2,2' –αζωδις (-αμιδινοπροπανικό) διϋδροχλωρίδιο (AAPH). Το APPH συχνά χρησιμοποιείται στις βιοχημικές έρευνες για τη μελέτη της λιπιδικής υπεροξείδωσης και την αναστολή της. Τα αζω- συστατικά έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ως εκκινητές ριζών. Αν και ο μηχανισμός αποσύνθεσης των αζω –εκκινητών δεν έχει πλήρως διασαφηνιστεί, είναι αναμενόμενο να παραχθούν κατά τη θερμόλυση ρίζες αλκυλίου, αλκοξυλίου και υπεροξυλίου.

Οι ρίζες των ανθρακικών μορίων σχηματίζονται ανά ζεύγη σε κοντινή απόσταση, και ενώ κάποιες ανασυνδυάζονται και δίνουν μη δραστικά, σταθερά προϊόντα, πολλές από αυτές διαλύονται μέσα σε κλωβούς του διαλύτη και αντιδρούν ταχύτατα με μόρια οξυγόνου δίνοντας δραστικές ρίζες υπεροξυλίου. Επειδή το AAPH είναι διαλυτό στο νερό, προσφέρεται για την μελέτη της λιπιδικής υπεροξείδωσης η χρήση υδατικών διαλυμάτων. Το μοντέλο διάλυσης επιτρέπει τη εναλλαγή των συνθηκών αντίδρασης όπως η στοιχειομετρική αναλογία, το pH, η θερμοκρασία και συνεπώς η ταχύτητα της αντίδρασης.



Εικόνα 44: Μονομοριακή αποσύνθεση του αζω –εκκινητή και δημιουργία ελεύθερης ρίζας

Για τη χρήση της μεθόδου του εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH απαιτείται η ύπαρξη ενός λιπόφιλου υποστρώματος (π.χ. λινολεϊκό οξύ), ένα αντιοξειδωτικό και οξυγόνο. [153]

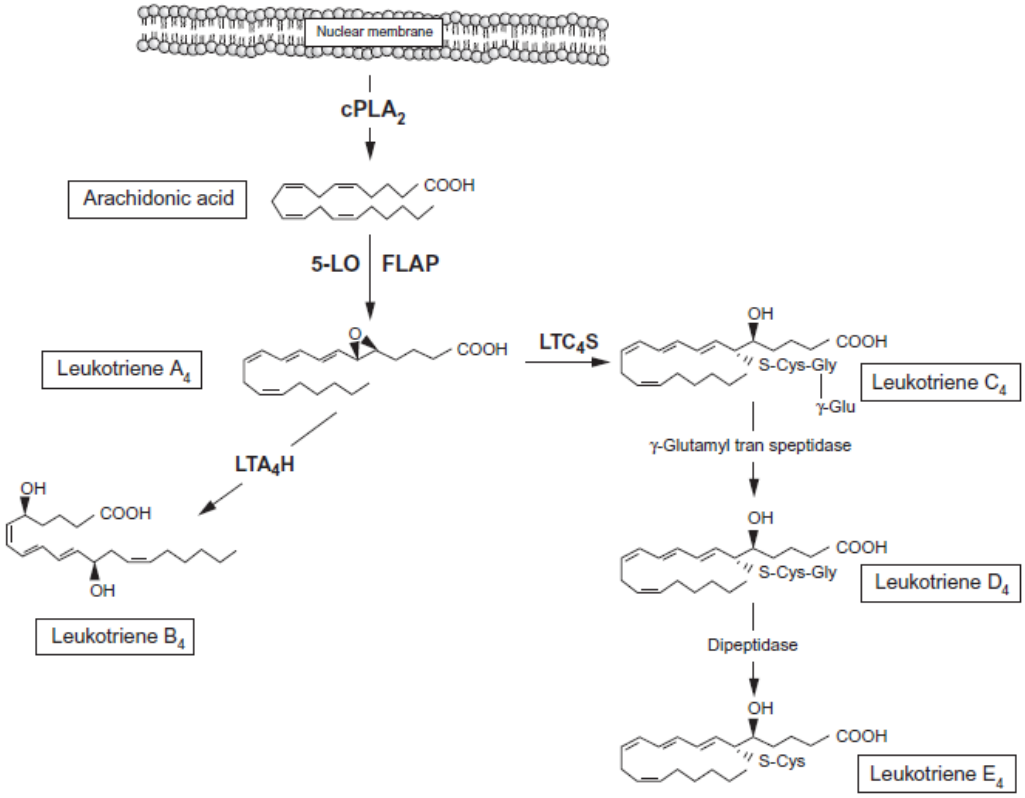
Μελέτη αντιφλεγμονώδους δράσης μέσω της ικανότητας αναστολής του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια

Η φλεγμονώδης αντίδραση είναι μία φυσιολογική, προστατευτική απόκριση στον τραυματισμό των ιστών, από φυσικά τραύματα, επιβλαβείς χημικές ουσίες και μικροβιολογικούς παράγοντες. Οι μηχανισμοί της φλεγμονώδους αντιδράσεις περιλαμβάνει μία σειρά από γεγονότα στα οποία το αραχιδονικό οξύ παίζει σημαντικό ρόλο. Οι προσταγλανδίνες συμμετέχουν στη σύθνετη διαδικασία της φλεγμονής και είναι υπεύθυνες για το αίσθημα του πόνου. Είναι δυνατόν να μεταβολιστεί μέσω του μονοπατιού κυκλοοξυγονάσης (COX) σε προσταγλανδίνες και θρομβοξάνη A_2, ή μέσω του μονοπατιού της λιποξυγονάσης (LOX) σε υδροπεροξυλ –εικοσατετραενοϊκά οξέα (HPETE's) και λευκοτριένια (LT), τα οποία συναντώνται ως σημαντικοί, βιολογικοί, ενεργοί παράγοντες σε μια πληθώρα φλεγμονωδών εκδηλώσεων. [154]

Οι λιποξεγενάσες (LOs) αποτελούν μία οικογένεια διοξυγενασών οι οποίες καταλύουν την οξυγόνωση των ελεύθερων και εστεροποιημένων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που περιέχουν ένα (1Z,4Z) –πεντα-1,4-διενικό σύστημα προς την παραγωγή των αντίστοιχων υδροπερόξυ παραγώγων. Είναι μονομερείς πρωτεΐνες που περιέχουν ένα άτομο μη-αιμικού σιδήρου ανά mole στην ενεργή πλευρά του ενζύμου, ο οποίος στη θεμελιώδη κατάσταση είναι δισθενής Fe(II) ενώ στη ενεργοποιημένη τρισθενής Fe(III). Οι λιποξυγονάσες κατηγοριοποιούνται με βάση την εξειδίκευση θέσεως στη οξυγόνωση του αραχιδονικού οξέος (AA), και έχω αναγνωριστεί 6 οικογένειες λιποξυγονάσης: 5-LOs, 8-LOs, 9-LOs, 11-LOs, 12-LOs και 15-LOs. [155]

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η δράση της λιποξυγονάσης οδηγεί στο σχηματισμό των λευκοτριενίων. Το πρώτο βήμα για τη βιοσύνθεση των LT είναι η μετατροπή του απελευθερωμένου AA από την 5-LO. Αυτή η διαλυτή διοξυγονάση ενσωματώνει μοριακό οξυγόνο στη θέση C-5 του λιπαρού οξέος, παράγοντας 5-HPETE το οποίο στη συνέχεια μεταβολίζεται από την 5-LO στο ασταθές εποξείδιο λευκοτριένιο A_4 (LTA_4). Η μοίρα του LTA_4 εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου και τα υπάρχοντα ένζυμα: αφ' ενός το LTA_4 μπορεί να μετατραπεί σε LTB_4 από την LTA_4 υδρολάση, και αφ' ετέρου είναι δυνατόν το LTA_4 να συζευχθεί με τη γλουταθειόνη αποδίδοντας LTC_4, μέσω της LTC_4 συνθάσης και των ενζύμων μεταβολισμού της γλουταθειόνης (MAPEG). Η απελευθέρωση του LTC_4 στο εξωκυτταρικό περιβάλλον και η διάσπαση διαδοχικών αμινοξέων αποδίδει τα LTD_4 και LTE_4. Εναλλακτικά, τα αρχικά LTA_4 μπορούν να μεταφερθούν σε γειτονικά κύτταρα που είναι ανίκανα να παράξουν δικά του LTA_4, ωστόσο μπορούν να

εκφράσουν LTA_4 ή LTC_4/MAPEG, επιτρέποντας συνεπώς την παραγωγή LTB_4 ή LTC_4. Τέλος, η συνδυασμένη δράση των 5-LO και 12-LO ή 15-LO μπορεί να οδηγήσει στις λιποξίνες (LX), οι οποίες είναι βιοδραστικοί, τριϋδρόξυτετραενικοί λιπιδικοί μεσολαβητές οι οποίοι λειτουργούν ως σήματα τερματισμού για φλεγμονώδεις αποκρίσεις και προωθούν την αποκατάσταση και επούλωση των τραυμάτων.



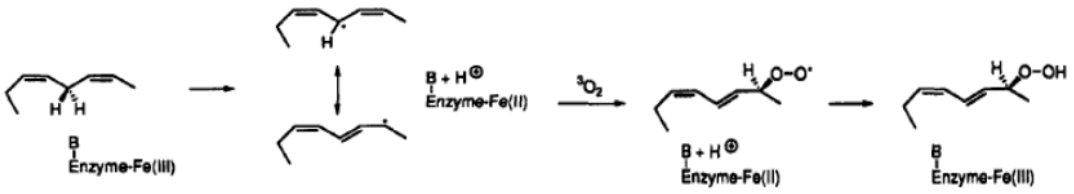
Εικόνα 45: Το ενζυμικό μονοπάτι της 5 –λιποξυγονάσης [153]

Η έκφραση της 5-LO είναι αυστηρά ρυθμισμένη. Έτσι, η 5-LO είναι κυρίως παρούσα σε ώριμα λευκοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των κοκκιοκυττάρων, μονοκυττάρων/μακροφάγων, μαστοκυττάρων και Β –λεμφοκυττάρων, και η ικανότητα των κυττάρων να εκφράσουν την 5-LO αποκτάται κατά την ωρίμανσή τους.

Σχετικά με τη δομή της 5-LO, αποτελείται από ένα C –τερματικό καταλυτικό τομέα και ένα N –τερματικό (β κυλινδρικής τριτοταγούς δομής) τομέα , με συγκεκριμένες λειτουργίες. Ο καταλυτικός τομέας περιέχει ένα άτομο μη –αιμικού σιδήρου στην ενεργή πλευρά, ο οποίος λειτουργεί ως δέκτης ή δότης ηλεκτρονίων κατά τη διάρκεια της κατάλυσης.

Ο σίδηρος της ανενεργούς 5-LO είναι σε σιδηρούχο μορφή (Fe^{2+}) ενώ η καταλυτικά ενεργή 5-LO απαιτεί μετατροπή του σιδήρου στη σιδηρική του μορφή (Fe^{3+}), η οποία επιτυγχάνεται με οξείδωση των λιπιδικών υδροπεροξειδίων. Ο N –

τερματικός τομέας έχει ρυθμιστική λειτουργικότητα, η οποία εκφράζεται από την ικανότητά του να συνδέεται με διάφορα λιπίδια (π.χ. γλυκερίδια και λιπιδικές μεμβράνες) και να ενεργοποιεί ιόντα Ca^{2+} ή Mg^{2+} (2 ανά μόριο 5-LO). Τόσο το Ca^{2+} όσο και τα γλυκερίδια αυξάνουν την 5-LO κατάλυση και συνεπώς μειώνουν την απαίτηση για ενεργοποίησης λιπιδικών υδροπεροξειδίων.



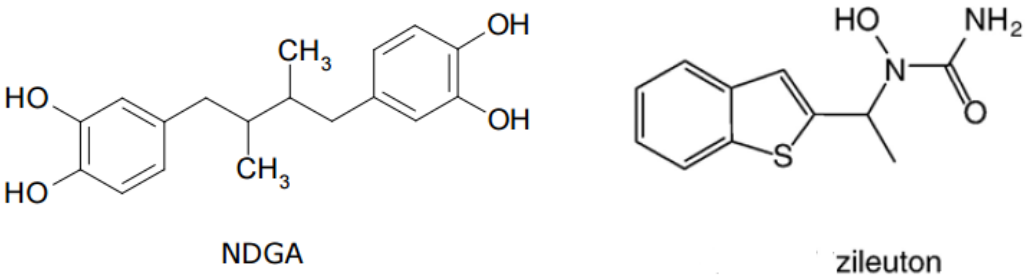
Εικόνα 46: Αναγωγή του σιδήρου στο ένζυμο της λιποξυγονάσης

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η δράση της λιποξυγονάσης προκαλεί τη δημιουργία ριζών υπεροξειδίου, οι οποίες στη συνέχεια ανάγονται σε υδροϋπεροξείδια, αλλά μπορούν και να αλληλεπιδράσουν με άλλα υποστρώματα και να προκαλέσουν βλάβη, εφόσον οι ενώσεις που δημιουργούνται μπορούν να αποτελέσουν, εν δυνάμει, πηγές ελευθέρων ριζών. Και πράγματι, η έκφραση της 5-LO όπως και η παρουσία των λευκοτριενίων συνδέονται με ένα πλήθος ασθενειών, οι οποίες έχουν ως βάση τις φλεγμονώδεις αποκρίσεις (π.χ. άσθμα, αθηροσκλήρωση, καρδιαγγειακές παθήσεις κ.λ.π.).

Στα πλαίσια της φαρμακευτικής, η άμεση αναστολή της δράσης της 5-LO θεωρείται η πλέον υποσχόμενη προσέγγιση για την καταστολή της βιοσύνθεσης των λευκοτριενίων, εφόσον είναι εφικτή η παρεμπόδιση της σύνθεσης των LTB_4 και 5-HPETE. Οι άμεσοι αναστολείς της 5-LO μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σύμφωνα με τη μοριακή μέθοδο δράσης τους ως οξειδοαναγωγικά δραστικού αναστολείς, αναστολείς του συνδέσμου σιδήρου και αναστολείς μη οξειδοαναγωγικού τύπου.

Οι οξειδοαναγωγικά δραστικοί αναστολείς της 5-LO περιλαβάνουν λιποφιλικούς, αναγωγικούς παράγοντες όπως το νορδιϋδρογουαϊαρετικό οξύ (NDGA), το καφεϊκό οξύ, φλαβονοειδή, κουμαρίνες ή και συστατικά όπως η φαινιδόνη. Τα εν λόγω φάρμακα δρουν ανάγοντας την ενεργή πλευρά του σιδήρου, διαζευγνύοντας συνεπώς τον καταλυτικό κύκλο του ενζύμου και αποτελούν πολύ αποτελεσματικοί αναστολείς των παραγώγων της 5-LO, τόσο in vitro όσο και in vivo. Ωστόσο, διαθέτουν χαμηλή εκλεκτικότητα για την 5-LO και προκαλούν σημαντικές παρενέργειες, λόγω της παρεμβολής τους με άλλα βιολογικά, οξειδοαναγωγικά συστήματα ή με την παραγωγή δραστικών μορφών ριζών.

Οι αναστολείς του συνδέσμου σιδήρου αντιπροσωπεύουν υδροξαμικά οξέα ή παράγωγα της N-υδρόξυουρίας, τα οποία δημιουργούν χηλικό σύμπλοκο με την ενεργή πλευρά του σιδήρου και ταυτόγχρονα διαθέτουν ασθενείς αναγωγικές ιδιότητες. Παράδειγμα του εν λόγω αναστολέα είναι το υδρολυτικό σταθερό παράγωγο της N-υδροξυουρίας, zileuton. Τέλος, οι αναστολείς μη οξειδοαναγωγικού τύπου αναγωνίζονται με το αραχιδονικό οξύ για τη σύνδεση με την 5-LO, και διαθέτουν δομικά ποικίλα μόρια τα οποία είναι πιθανοί και ισχυροί εκλεκτικοί αναστολείς της 5-LO. [156], [157]



Εικόνα 47: Παραδείγματα αναστολέων της 5-LO, το NDGA βάσει οξειδοαναγωγής και το zileuton βάσει δημιουργίας χηλικού συμπλόκου με το μόριο του σιδήρου στο ενεργό κέντρο του ενζύμου

Η καθιέρωση νέων in vitro συστημάτων ελέγχων έχει εγείρει την αναθεώρηση των φυτών, προκειμένου να βρεθούν δομικοί 'οδηγοί' για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων με αντι-φλεγμονώδη δράση. Το φυτικό μονοπάτι της λιποξυγονάσης είναι σε πολλά σημεία αντίστοιχο με το ζωικό, που στηρίζεται στον μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος. Γι' αυτό, η in vitro αναστολή της λιποξυγονάσης από σόγια θεωρείται ένα καλό μοντέλο για τη μελέτη του αντιφλεγμονώδους χαρακτήρα σε νέα φάρμακα. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και για τα ανάλογα χαλκονών και ωρονών που παρασκευάσθησαν στην παρούσα εργασία. [154]

Κεφάλαιο 5
Πειραματικό Μέρος

Όργανα και Συσκευές

- Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (^{1}H NMR) έχουν καταγραφεί με τα εξής όργανα:
  - Varian Gemini 300MHz
  - Varian 600MHz

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

  - s (singlet, απλό)
  - d (doublet, διπλό)
  - t (triplet, τριπλό)
  - q (quartet, τετραπλό)
  - m (multiplet, πολλαπλό)
  - br (broad, ευρύ)

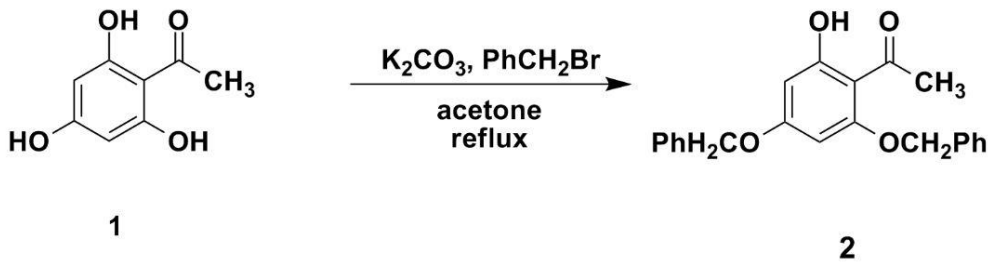
  Οι σταθερές συζεύξεως J δίνονται σε Hz.

- Τα φάσματα μάζας έχουν καταγραφεί στο όργανο LC –ESI/MS (VARIAN LC/ ESI – MS^n)

- Τα σημεία τήξεως έχουν ληφθεί σε συσκευή Gallenkamp και δεν έχουν διορθωθεί.

Πειραματικό Μέρος

2 –υδρόξυ -4,6 –διβενζυλόξυ –ακετοφαινόνη **(2)**



Σχήμα 15: Αντίδραση σύνθεσης της 2-υδρόξυ-4,6-διβενζυλόξυ-ακετοφαινόνης

Σε σφαιρική φιάλη των 250 mL, όπου προσαρμόζονται κάθετος ψυκτήρας και μπαλονάκι αζώτου, προστίθενται παρουσία διαλύτη ακετόνης τα αντιδρώντα 2,4,6 –τριυδρόξυ –ακετοφαινόνη **(1)**, άνυδρο K_2CO_3 και βενζυλοβρωμίδιο, σε γραμμομοριακή αναλογία 1:3:2,4. Πιο συγκεκριμένα, σε 100 mL ακετόνης προστίθενται 5,9 mmol (1 gr) 2,4,6 –τριυδρόξυ –ακετοφαινόνης, 17,7 mmol (2,4 gr) άνυδρου K_2CO_3 και 14,16 mmol (1,7 mL) βενζυλοβρωμιδίου.

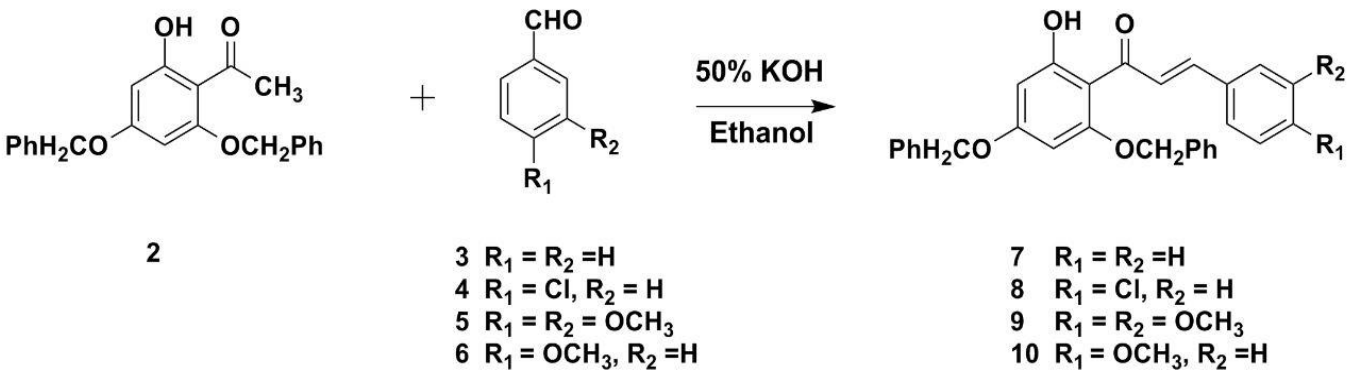
Το αντιδρόν μίγμα θερμαίνεται στου 68° C υπό ανάδευση για 24 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα με TLC. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα διηθείται για την απομάκρυνση του αδιάλυτου K_2CO_3, γίνονται εκπλύσεις με ακετόνη και ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη υπό κενό. Επειδή το στερεό προϊόν που παραλαμβάνεται μετά την εξάτμιση δεν είναι καθαρό, διενεργείται χρωματογραφική στήλη για τον καθαρισμό του.

Η χρωματογραφική στήλη πραγματοποιείται σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα και οξικού αιθυλεστέρα, σε αναλογία 8:2. Επειδή το προϊόν της αντίδρασης δεν είναι διαλυτό σε αυτό το σύστημα, προηγήθηκε dry packing σε μίγμα μεθανόλης/ διχλωρομεθανίου.

Ο έλεγχος των κλασμάτων της στήλης γίνεται με τη χρήση TLC. Τα πλέον καθαρά εξ αυτών, οδηγούνται προς συμπύκνωση. Τελικά, παραλαμβάνεται 1,24 g λευκού στερεού. Ο έλεγχος της καθαρότητας, επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία ^{1}H NMR.

Απόδοση: 60%

Γενική μέθοδος σύνθεσης χαλκονών

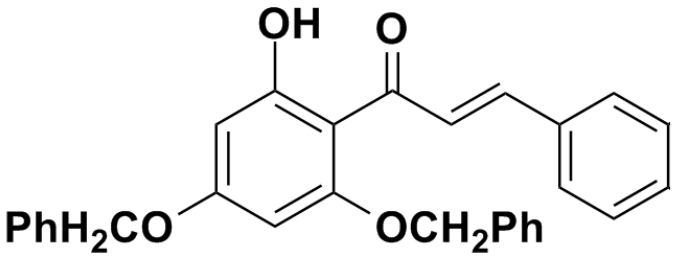


Σχήμα 16: Γενική μέθοδος σύνθεσης των χαλκονών

Σε σφαιρική φιάλη των 50 mL, προστίθενται παρουσία διαλύτη αιθανόλης τα αντιδρώντα 2' –υδρόξυ -4',6' –διβενζυλόξυ –ακετοφαινόνη **(2)**, 3,4 –βενζαλδεΰδη και 50% v/v διάλυμα KOH σε γραμμομοριακή αναλογία 1:1,5:3. Το αντιδρόν μίγμα αφήνεται για ανάδευση για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα με τη χρήση TLC. Όταν τελειώσει η αντίδραση, η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε δοχείο με πάγο, και προστίθεται διάλυμα HCl 10% v/v μέχρι το pH να εξισωθεί με 1 και να καταβυθιστεί κίτρινο ίζημα. Στη συνέχεια το ίζημα διηθείται υπό κενό, και ακολουθεί ξήρανση.

Για τον καθαρισμό του στερεού προϊόντος χρησιμοποιείται η μέθοδος της ανακρυστάλλωσης. Το ίζημα διαλύεται εν θερμώ σε εξάνιο, με την προσθήκη οξικού αιθυλεστέρα στάγδην. Το θερμό μίγμα αποθηκεύεται σε ψύξη, έως ότου καταβυθιστούν οι κρύσταλλοι του προϊόντος. Τέλος, για την παραλαβή του ανακρυσταλλωμένου προϊόντος, ακολουθεί διήθηση υπό κενό. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ^{1}H NMR.

4’,6’ –διβενζυλόξυ -2’ –υδρόξυ –χαλκόνη **(7)**



Σχήμα 17: Χημικός τύπος της 4',6' -διβενζυλόξυ-2' -υδρόξυ-χαλκόνης

Συγκεκριμένα σε 8 mL αιθανόλης προστίθενται 1,26 mmol (437 mg) της 2 –υδρόξυ -4,6 –διβενζυλόξυ –ακετοφαινόνης **(2)**, 1,88 mmol (200 mg) της βενζαλδεΰδης **(3)** και 0,4 mL υδατικού διαλύματος KOH 50% w/v. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια που περιγράφεται στη γενική μέθοδο.

Λαμβάνονται 191,4 mg πορτοκαλί στερεού με τη μορφή κρυστάλλων σε ανακρυσταλλωμένο προϊόν. Η ανακρυστάλλωση έγινε με την εν θερμώ διάλυση του παραγώγου σε εξάνιο, και την προσθήκη οξικού αιθυλεστέρα στάγδην. Το θερμό μίγμα αποθηκεύεται σε ψύξη για 48 h, και τέλος ακολουθεί διήθηση υπό κενό για την παραλαβή του ανακρυσταλλωμένου προϊόντος. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ^{1}H NMR.

Σημείο Τήξης: 107 -114° C (σ.τ. βιβλ. 119° C [158])

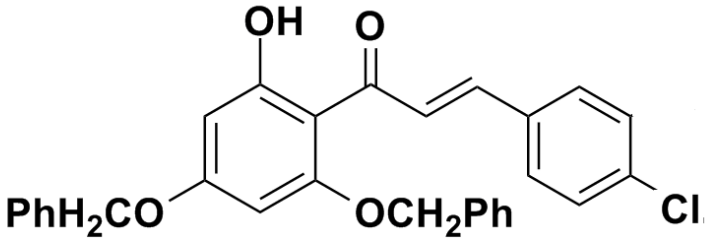
Απόδοση: 35%

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ ppm: 14,57 (s, 1H, 2’ –OH), 7,89 (d, J=15,6 Hz, 1H, H_β), 7,71 (d, J=15,6 Hz, 1H, H_α), 7,51-7,40 (m, 10H, αρωματικά H των βενζυλόξυ –υποκαταστατών), 7,21 (d, J=7,5 Hz, 2H, 3 –H και 5 –H), 7,08 (d, J=7,5 Hz, 2H, 2 –H και 6 –H), 7,17 (s, 1H, 4’ –H), 6,23 (d, J=2,4 Hz, 1H, 3’ –H), 6,10 (d, J=2,4 Hz, 1H, 5’ –H), 5,11 (s, 2H, OCH_2Ph), 5,07 (s, 2H, OCH_2Ph)

M.B.: 436,50

MS (ESI$^+$): m/z: 471$[M+H]^+$, 459$[M+Na]^+$

4’,6’ –διβενζυλόξυ -2’ –υδρόξυ -4 –χλώρο –χαλκόνη **(8)**



Σχήμα 18: Χημικός τύπος της 4’,6’ –διβενζυλόξυ -2’ –υδρόξυ -4 –χλώρο –χαλκόνης

Συγκεκριμένα σε 7,5 mL διαλύτη αιθανόλης, προστίθενται 1,15 mmol (400 mg) της 2 –υδρόξυ -4,6 –διβενζυλόξυ –ακετοφαινόνης **(2)**, 1,72 mmol (242 mg) της p –χλώρο –βενζαλδεΰδης **(4)** και 0,4 mL υδατικού διαλύματος KOH 50% w/v. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια που περιγράφεται στη γενική μέθοδο.

Λαμβάνονται 165 mg κίτρινου στερεού με τη μορφή λεπτόκοκκης σκόνης σε ανακρυσταλλωμένο προϊόν. Η ανακρυστάλλωση έγινε με την εν θερμώ διάλυση του παραγώγου σε εξάνιο, και την προσθήκη οξικού αιθυλεστέρα στάγδην. Το θερμό μίγμα αποθηκεύεται σε ψύξη για 5 d, και τέλος ακολουθεί διήθηση υπό κενό για την παραλαβή του ανακρυσταλλωμένου προϊόντος. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ^{1}H NMR.

Σημείο Τήξης: 127,3 -129° C

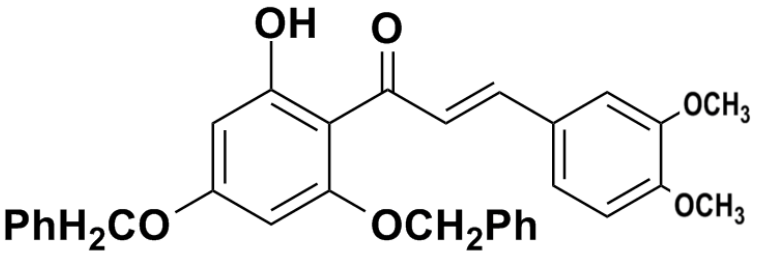
Απόδοση: 30%

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ ppm: 14,52 (s, 1H, 2’ –OH), 7,83 (d, J=15,6 Hz, 1H, H_{β}), 7,62 (d, J=15,6 Hz, 1H, H_{α}), 7,51-7,35 (m, 10H, αρωματικά H των βενζυλόξυ –υποκαταστατών), 7,14 (d, J=8,4 Hz, 2H, 3 –H και 5 –H), 6,94 (d, J=8,7 Hz, 2H, 2 –H και 6 –H), 6,23 (d, J=2,1 Hz, 1H, 3’ –H), 6,18 (d, J=2,1 Hz, 1H, 5’ –H), 5,11 (s, 2H, OCH_2Ph), 5,05 (s, 2H, OCH_2Ph)

M.B.: 470,94

MS (ESI) $^{+}$: m/z: 471[M+H] $^{+}$, 473[M+H+2] $^{+}$, 493[M+Na] $^{+}$, 495[M+Na+2] $^{+}$

4’,6’ –διβενζυλόξυ -2’ –υδρόξυ -3,4 –διμεθόξυ –χαλκόνη **(9)**



Σχήμα 19: Χημικός τύπος της 4’,6’ –διβενζυλόξυ -2’ –υδρόξυ -3,4 –διμεθόξυ –χαλκόνης

Συγκεκριμένα σε 8,2 mL διαλύτη αιθανόλης, προστίθενται 1,3 mmol (450 mg) της 2 –υδρόξυ -4,6 –διβενζυλόξυ –ακετοφαινόνης **(2)**, 1,94 mmol (462 mg) της 3,4 –διμεθόξυ –βενζαλδεΰδης **(5)** και 0,45 mL υδατικού διαλύματος KOH 50% w/v. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια που περιγράφεται στη γενική μέθοδο.

Λαμβάνονται 189,3 mg πορτοκαλοκίτρινου και σκούρου καφέ στερεού με τη μορφή κόκκων σε ανακρυσταλλωμένο προϊόν. Η ανακρυστάλλωση έγινε με την εν θερμώ διάλυση του παραγώγου σε εξάνιο, και την προσθήκη οξικού αιθυλεστέρα στάγδην. Το θερμό μίγμα αποθηκεύεται σε ψύξη για 5 d, και τέλος ακολουθεί διήθηση υπό κενό για την παραλαβή του ανακρυσταλλωμένου προϊόντος. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ^{1}H NMR.

Σημείο Τήξης: 138,2 -143° C

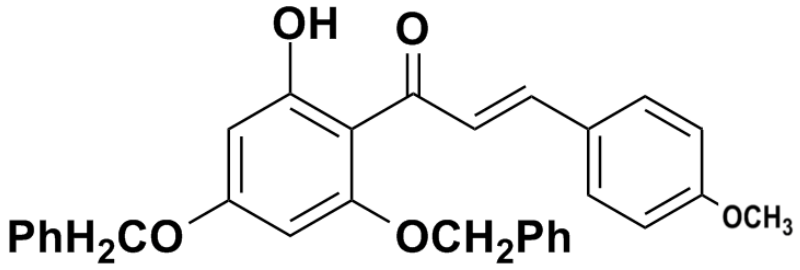
Απόδοση: 29%

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ ppm: 7,8 (d, J=15,6 Hz, 1H, H_β), 7,72 (d, J=15,6 Hz, 1H, H_α), 7,46-7,3 (m, 10H, αρωματικά H των βενζυλόξυ –υποκαταστατών), 6,82 (d, J=1,8 Hz, 1H, 5 –H), 6,71 (d, J=8,4 Hz, 2H, 2 –H και 6 –H), 6,23 (d, J=2,4 Hz, 1H, 3’ –H), 6,17 (d, J=2,1 Hz, 1H, 5’ –H), 5,1 (s, 2H, OCH_2Ph), 5,06 (s, 2H, OCH_2Ph), 3, 91 (s, 3H, OCH_3), 3,62 (s, 3H, OCH_3)

M.B.: 496,55

MS (ESI) $^{+}$: m/z: 467[M+H] $^{+}$

4’,6’ –διβενζυλόξυ -4 –μεθόξυ -2’ –υδρόξυ –χαλκόνη **(10)**



Σχήμα 20: Χημικός τύπος της 4’,6’ –διβενζυλόξυ -4 –μεθόξυ -2’ –υδρόξυ –χαλκόνης

Συγκεκριμένα σε 8 mL διαλύτη αιθανόλης, προστίθενται 1,27 mmol (442 mg) της 2 –υδρόξυ -4,6 –διβενζυλόξυ –ακετοφαινόνης **(2)**, 1,9 mmol (259 mg) της ανισαλδεΰδης **(6)** και 0,4 mL υδατικού διαλύματος KOH 50% w/v. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια που περιγράφεται στη γενική μέθοδο.

Λαμβάνονται 37,6 mg σκούρου πορτοκαλί στερεού με τη μορφή κόκκων σε ανακρυσταλλωμένο προϊόν. Η ανακρυστάλλωση έγινε με την εν θερμώ διάλυση του παραγώγου σε εξάνιο, και την προσθήκη οξικού αιθυλεστέρα στάγδην. Το θερμό μίγμα αποθηκεύεται σε ψύξη για 5 d, και τέλος ακολουθεί διήθηση υπό κενό για την παραλαβή του ανακρυσταλλωμένου προϊόντος. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ^{1}H NMR.

Σημείο Τήξης: 128 -130,1^o C (σ.τ. βιβλι. 138° C [159])

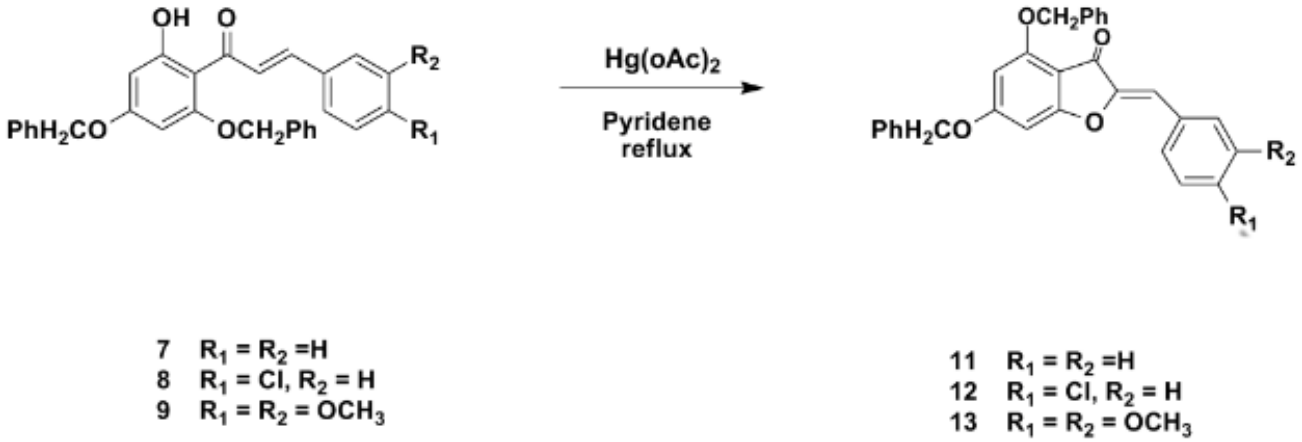
Απόδοση: 6%

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ ppm: 7,8 (d, J=15,6 Hz, 1H, H_β), 7,7 (d, J=15,6 Hz, 1H, H_α), 7,52-7,37 (m, 10H, αρωματικά H των βενζυλόξυ –υποκαταστατών), 7,03 (d, J=9 Hz, 2H, 3 –H και 5 –H), 6,71 (d, J=8,7 Hz, 2H, 2 –H και 6 –H), 6,22 (d, J=2,4 Hz, 1H, 3’ –H), 6,17 (d, J=2,1 Hz, 1H, 5’ –H), 5,1 (s, 2H, OCH_2Ph), 5,06 (s, 2H, OCH_2Ph), 3,83 (s, 3H, OCH_3)

M.B.: 466,52

MS (ESI) $^+$: m/z: 497[M+H] $^+$

Γενική μέθοδος σύνθεσης ωρονών



Σχήμα 21: Γενική μέθοδος σύνθεσης των ωρονών

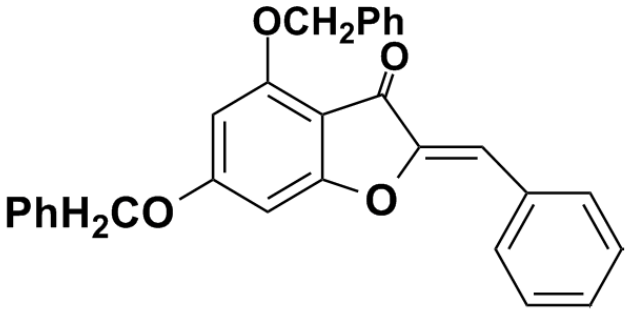
Σε σφαιρική φιάλη των 25 mL στην οποία προσαρμόζονται κάθετος ψυκτήρας και μπαλονάκι αζώτου, προστίθενται παρουσία διαλύτη πυριδίνης τα εξής αντιδρώντα: η χαλκόνη **(7)–(9)** και ο οξικός υδράργυρος σε γραμμομοριακή αναλογία 1:1,5. Το αντιδρόν μίγμα θερμαίνεται υπό ανάδευση στους 110° C, για χρονική διάρκεια 2,5 -3,5 ωρών. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται τακτικά με τη χρήση TLC. Όταν τελειώσει η αντίδραση, η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε δοχείο με πάγο, και προστίθεται διάλυμα HCl 10% v/v μέχρι το pH να εξισωθεί με 1 και να καταβυθιστεί ίζημα. Στη συνέχεια το διφασικό πλέον μίγμα διηθείται υπό κενό, για την παραλαβή του στερεού προϊόντος, το οποίο αφήνεται προς ξήρανση.

Επειδή ίχνη προϊόντος έχουν παραμείνει και στο οξινισμένο διήθημα, αυτό εκχυλίζεται τρεις φορές με διχλωρομεθάνιο και κρατείται η οργανική φάση. Έπειτα, η οργανική φάση ξηραίνεται σε άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4), το οποίο διηθείται, και το προϊόν παραλαμβάνεται κατόπιν εξάτμισης του ξηρανθέντος διαλύματος, σε στερεή μορφή.

Από την παραπάνω αντίδραση και επεξεργασία του προϊόντος, οι ωρόνες που παραλαμβάνονται δεν είναι επαρκώς καθαρές, οπότε υφίστανται περαιτέρω καθαρισμό με ανακρυστάλλωση. Για την ανακρυστάλλωση, το στερεό προϊόν διαλύεται εν θερμώ σε μεθανόλη. Το θερμό μίγμα αποθηκεύεται σε ψύξη, έως ότου καταβυθιστούν οι κρύσταλλοι του προϊόντος. Τέλος, για την παραλαβή του ανακρυσταλλωμένου προϊόντος,

ακολουθεί διήθηση υπό κενό. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ^{1}H NMR.

4,6 –διβενζυλόξυ –ωρόνη **(11)**



Σχήμα 22: Χημικός τύπος της 4,6 –διβενζυλόξυ –ωρόνης

Συγκεκριμένα σε 2,2 mL διαλύτη πυριδίνης, προστίθενται 0,23 mmol (101,2 mg) της 4′,6′ –διβενζυλόξυ -2′ –υδρόξυ –χαλκόνης **(7)** και 0,35 mmol (110,8 mg) οξικού υδράργυρου. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια που περιγράφεται στη γενική μέθοδο.

Λαμβάνονται 87,1 mg μπεζ στερεού με τη μορφή σκόνης σε ανακρυσταλλωμένο προϊόν. Η ανακρυστάλλωση έγινε με την εν θερμώ διάλυση του παραγώγου σε μεθανόλη. Το θερμό μίγμα αποθηκεύεται σε ψύξη για 48 h, και τέλος ακολουθεί διήθηση υπό κενό για την παραλαβή του ανακρυσταλλωμένου προϊόντος. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ^{1}H NMR.

Σημείο Τήξης: 111-120° C

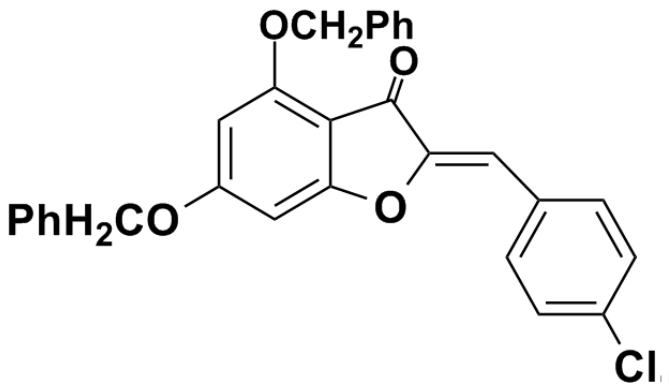
Απόδοση: 86%

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ ppm: 7,21 (d, J=7,5 Hz, 2H, 2′ –H και 6′ –H), 7,49 έως 7,26 (m, 10H, αρωματικά H των βενζυλόξυ –υποκαταστατών), 6,90 (s, 1H, 4′ –H), 6,74 (s, 1H, βινυλικό H), 6,43 (s, 1H, 6 –H), 6,25 (s, 1H, 4 –H), 5,29 (s, 2H, OCH_2Ph), 5,11 (s, 2H, OCH_2Ph)

M.B.: 434,48

MS (ESI) $^+$: m/z: 435$[M+H]^+$, 457$[M+Na]^+$

4,6 –διβενζυλόξυ -4’ –χλώρο –ωρόνη **(12)**



Σχήμα 23: Χημικός τύπος της 4,6 –διβενζυλόξυ -4’ –χλώρο –ωρόνης

Συγκεκριμένα σε 2,3 mL διαλύτη πυριδίνης, προστίθενται 0,24 mmol (111,3 mg) της 4’,6’ –διβενζυλόξυ -2’ –υδρόξυ -4 –χλώρο –χαλκόνης **(8)** και 0,35 mmol (113 mg) οξικού υδράργυρου. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια που περιγράφεται στη γενική μέθοδο.

Λαμβάνονται 86,3 mg λευκού και ωχρού στερεού με τη μορφή σκόνης σε ανακρυσταλλωμένο προϊόν. Η ανακρυστάλλωση έγινε με την εν θερμώ διάλυση του παραγώγου σε μεθανόλη. Το θερμό μίγμα αποθηκεύεται σε ψύξη για 48 h, και τέλος ακολουθεί διήθηση υπό κενό για την παραλαβή του ανακρυσταλλωμένου προϊόντος. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ^{1}H NMR.

Σημείο Τήξης: στους 120°C άλλαξε το χρώμα του στερεού, οπότε σε εκείνη τη θερμοκρασία θεωρούμε ότι έγινε decomposition της ωρόνης.

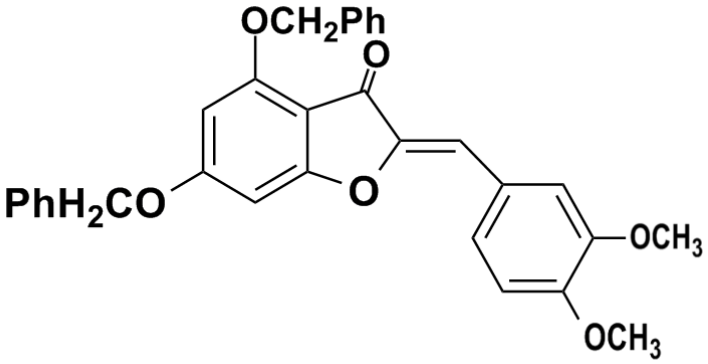
Απόδοση: 78%

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ ppm: 7,79 (d, J=8,4 Hz, 2H, 2’ –H και 6’ –H), 7,48 (d, J=7,8 Hz, 2H, 3’ –H και 5’ –H), 7,41 έως 7,26 (m, 10H, αρωματικά H των βενζυλόξυ –υποκαταστατών), 6,70 (s, 1H, βνυλικό υδρογόνο), 6,46 (s, 1H, 6 –H), 6,25 (s, 1H, 4 –H), 5,28 (s, 2H, OCH_2Ph), 5,12 (s, 2H, OCH_2Ph)

M.B.: 468,93

MS (ESI) $^{+}$: m/z: 469[M+H] $^{+}$, 471[M+H+2] $^{+}$, 491[M+Na] $^{+}$, 493[M+Na] $^{+}$

4,6 –διβενζυλόξυ -3’,4’ –διμεθόξυ –ωρόνη **(13)**



Σχήμα 24: Χημικός τύπος της 4,6 –διβενζυλόξυ -3’,4’ –διμεθόξυ –ωρόνης

Συγκεκριμένα σε 2 mL διαλύτη πυριδίνης, προστίθενται 0,21 mmol (100,8 mg) της 4’,6’ –διβενζυλόξυ -2’ –υδρόξυ -3,4 –διμεθόξυ –χαλκόνης **(9)** και 0,31 mmol (97 mg) οξικού υδράργυρου. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθείται είναι η ίδια που περιγράφεται στη γενική μέθοδο.

Λαμβάνονται 84,4 mg κίτρινου στερεού με τη μορφή σκόνης σε ανακρυσταλλωμένο προϊόν. Η ανακρυστάλλωση έγινε με την εν θερμώ διάλυση του παραγώγου σε μεθανόλη. Το θερμό μίγμα αποθηκεύεται σε ψύξη για 48 h, και τέλος ακολουθεί διήθηση υπό κενό για την παραλαβή του ανακρυσταλλωμένου προϊόντος. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ^{1}H NMR.

Σημείο Τήξης: 105 -113,8^{o}C

Απόδοση: 84%

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ ppm: 7,87 (d, J=7,8 Hz, 2H, 2’ –H και 6’ –H), 7,49 έως 7,22 (m, 10H, αρωματικά H των βενζυλόξυ –υποκαταστατών), 7,83 (s, 1H, 5’ –H), 6,77 (s, 1H, βινυλικό υδρογόνο), 6,46 (s, 1H, 6 –H), 6,25 (s, 1H, 4 –H), 5,28 (s, 2H, OCH_2Ph), 5,11 (s, 2H, OCH_2Ph), 5,06 (s, 3H, OCH_3), 5,03 (s, 3H, OCH_3)

M.B.: 494,53

MS (ESI) $^{+}$: m/z: 495[M+H] $^{+}$, 457[M+Na] $^{+}$

Κεφάλαιο 6
Αποτελέσματα και συζήτηση

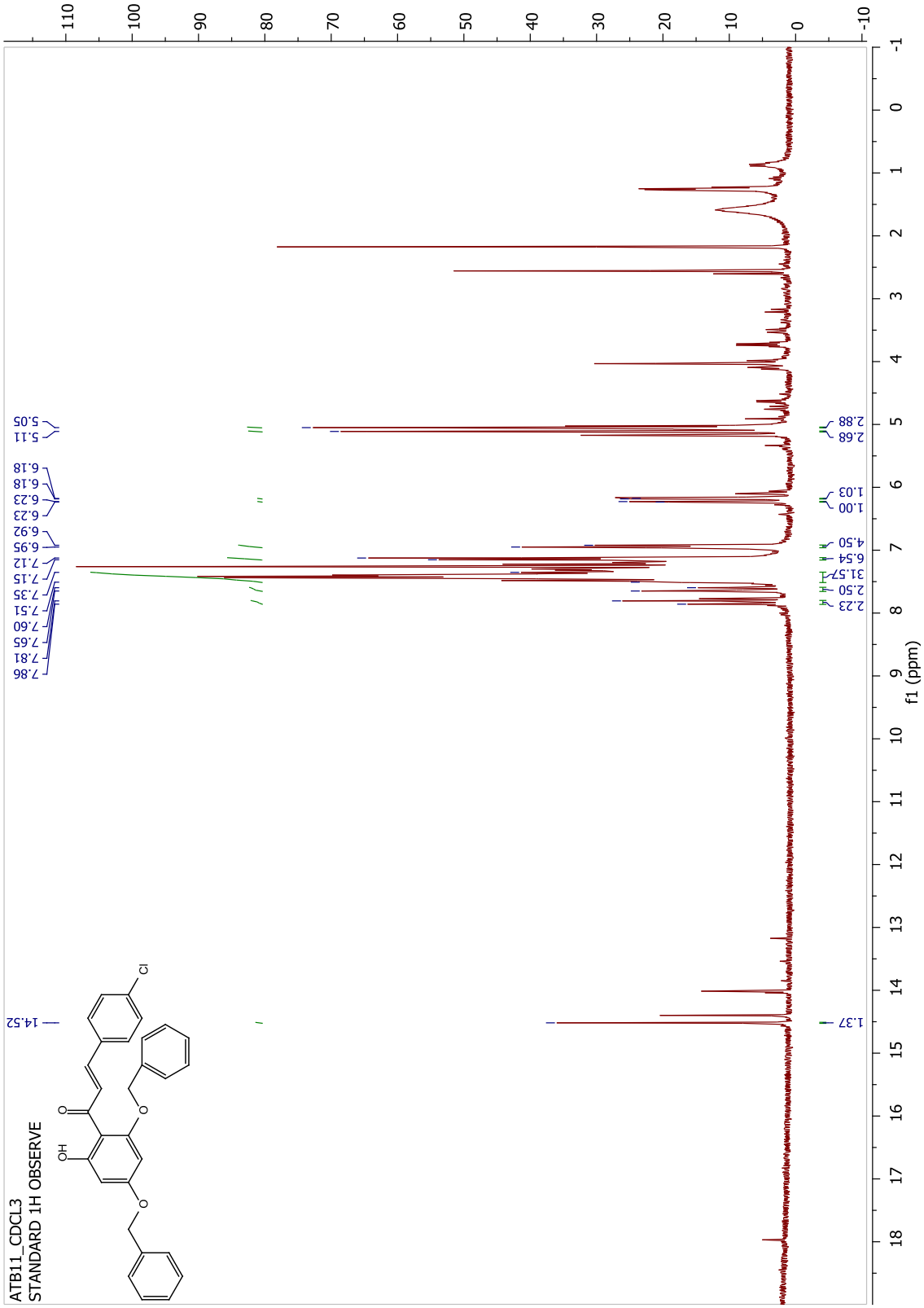
Φασματοσκοπική μελέτη NMR ^{1}H

Χαλκόνες

Η δομή των χαλκονών που παρασκευάστηκαν ταυτοποιήθηκε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητισμού ^{1}H NMR. Τα φάσματα ελήφθησαν σε φασματογράφο 300 MHz , σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.

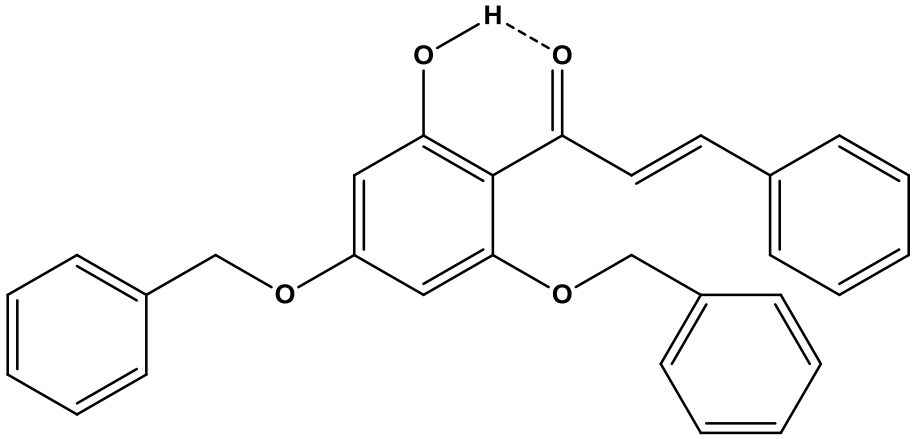
Τα φάσματα ^{1}H NMR των χαλκονών παρουσιάζουν ορισμένα βασικά χαρακτηριστικά, τα οποία είναι ενδεικτικά για την ταυτοποίηση των ενώσεων αυτών. Συγκεκριμένα πρόκειται για την παρουσία του ενολικού υδροξειδίου, των βινυλικών υδρογόνων στις θέσεις α –β του μορίου και των αρωματικών υδρογόνων του δακτυλίου Α, που αποτελούν τα βασικά χαρακτηριστικά των φασμάτων ^{1}H NMR των χαλκονών και συναντώνται σε συγκεκριμένες θέσεις του πεδίου.

Για τις ανάγκες της λεπτομερούς επεξήγησης όλων των χαρακτηριστικών υδρογόνων ενός φάσματος χαλκόνης, θα χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο παράδειγμα το φάσμα της χαλκόνης **8**. Με βάση αυτό ταυτοποιήθηκαν και τα φάσματα των υπολοίπων χαλκονών **7**, **9** και **10**.



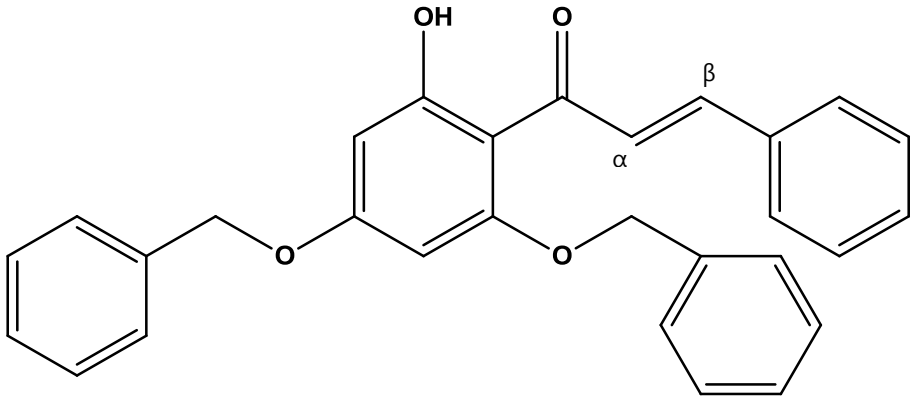
*Εικόνα 48: Φάσμα 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της χαλκόνης **(8)***

Κατ' αρχάς, το πρώτο βασικό χαρακτηριστικό των χαλκονών είναι το ενολικό υδροξύλιο που εμφανίζεται σε πολύ χαμηλό πεδίο, γεγονός που οφείλεται στο σχηματισμό ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ του υδρογόνου του υδροξυλίου της θέσης 2' και του οξυγόνου του καρβονυλίου. Ο δεσμός υδρογόνου σταθεροποιεί την ενολική μορφή και μειώνει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα γύρω από το πρωτόνιο, μετατοπίζοντας έτσι την απορρόφηση σε χαμηλότερο πεδίο. Επιπλέον, η παρουσία του ενολικού υδροξυλίου σε χαμηλό πεδίο αποδίδεται και στην ύπαρξη των βενζυλόξυ –υποκαταστατών στις θέσεις 4' και 6' του δακτυλίου Α. Οι υποκαταστάτες αυτοί λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων στο δεσμό υδρογόνου, με αποτέλεσμα να τον καθιστούν ισχυρότερο και κατά συνέπεια να συμβάλουν και αυτοί στη μετατόπιση του ενολικού υδροξυλίου σε χαμηλότερο πεδίο. Το χαρακτηριστικό σήμα που αποδίδεται για το ενολικό υδροξύλιο εμφανίζεται στην περιοχή 14 -14, 5 ppm ως απλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο.



Σχήμα 25: Δεσμός υδρογόνου μεταξύ του υδροξυλίου της θέσης 2' και του καρβονυλικού οξυγόνου στις χαλκόνες

Το δεύτερο χαρακτηριστικό στα φάσματα ^{1}H NMR των χαλκονών είναι τα βινυλικά υδρογόνα, τα οποία εμφανίζονται με μία διπλή κορυφή το καθένα. Επίσης παρουσιάζουν μεγάλες σταθερές σύζευξης (J = 15 -16 Hz), ενδεικτικό του σχηματισμού ενός ισομερούς Ε γεωμετρίας, το οποίο προκύπτει από τη σύνθεση των χαλκονών. Ειδικότερα, οι τιμές των τιμών σύζευξης υποδεικνύουν το σχηματισμό ενός μόνο Ε –ισομερούς, όπου δηλαδή τα βινυλικά υδρογόνα βρίσκονται σε αντίθετες πλευρές εκατέρωθεν του διπλού δεσμού.



Σχήμα 26: Απεικόνιση των θέσεων α και β στο διπλό δεσμό άνθρακα των χαλκονών

Στα φάσματα των χαλκονών που μελετήθηκαν, η διπλή κορυφή του H_β εμφανίζεται πάντα σε χαμηλότερο πεδίο από τη διπλή κορυφή του H_α. Αυτό το φαινόμενο βρίσκεται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία και εξηγείται λόγω της πόλωσης που δημιουργείται στο διπλό δεσμό άνθρακα, εξαιτίας της ύπαρξης της καρβονυλικής ομάδας η οποία καθιστά ηλεκτρονιακά πιο πυκνό τα άτομα της θέσης α. [160]

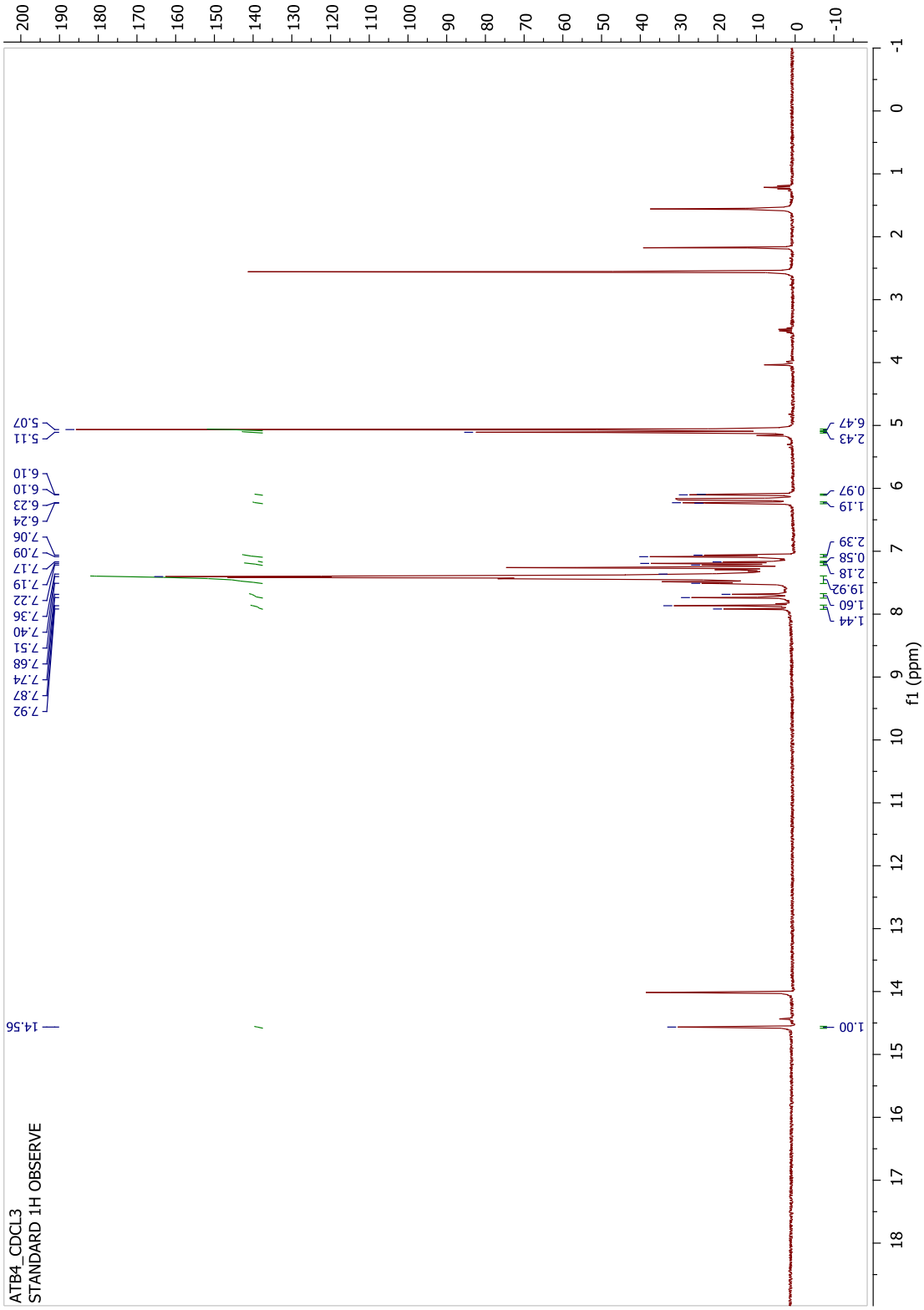
Τόσο αυτό το φαινόμενο όσο και τις χαρακτηριστικές υψηλές τιμές σύζευξης J επιβεβαιώνονται και από τις τέσσερις χαλκόνες που παρασκευάστηκαν στα πλαίσια αυτής της εργασίας και παρουσιάζονται στον παρακάτω *Πίνακας 1*.

Πίνακας 1: Χημικές μετατοπίσεις και σταθερές σύζευξης για τα βινυλικά υδρογόνα των χαλκονών **(7)-(10)**

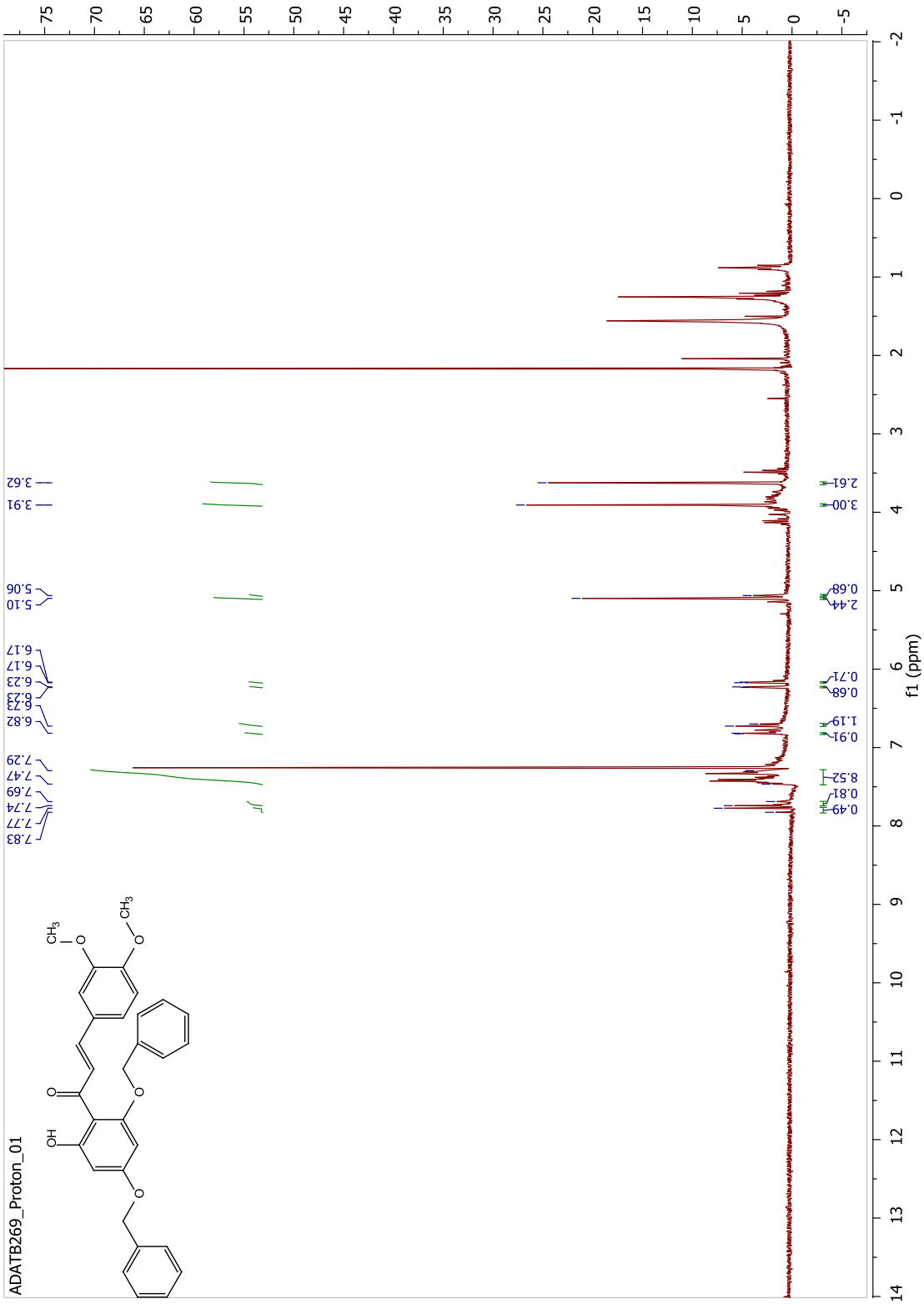
	Βινυλικό Υδρογόνο H_α		**Βινυλικό Υδρογόνο H_β**	
Προϊόν	**Μετατόπιση δ(ppm)**	**Στ. Σύζευξης J(Hz)**	**Μετατόπιση δ(ppm)**	**Στ. Σύζευξης J(Hz)**
7	7,711	15,6	7,892	15,6
8	7,623	15,6	7,832	15,6
9	7,715	15,6	7,8	15,6
10	7,701	15,6	7,8	15,6

Τέλος, τα αρωματικά υδρογόνα του δακτυλίου Α εμφανίζονται σε ασυνήθιστα υψηλό πεδίο. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [148] τα αρωματικά υδρογόνα βρίσκονται συνήθως στα 7 ppm, ωστόσο στις παρασκευασθείσες χαλκόνες τα αρωματικά υδρογόνα του δακτυλίου Α βρίσκονται στα 6,095 -6,236 ppm. Ο λόγος αυτής της μετατόπισης είναι η ύπαρξη των βενζυλόξυ –υποκαταστατών στις θέσεις 4′ και 6′ του δακτυλίου Α, οι οποίοι ως δότες ηλεκτρονίων τον καθιστούν πλούσιο

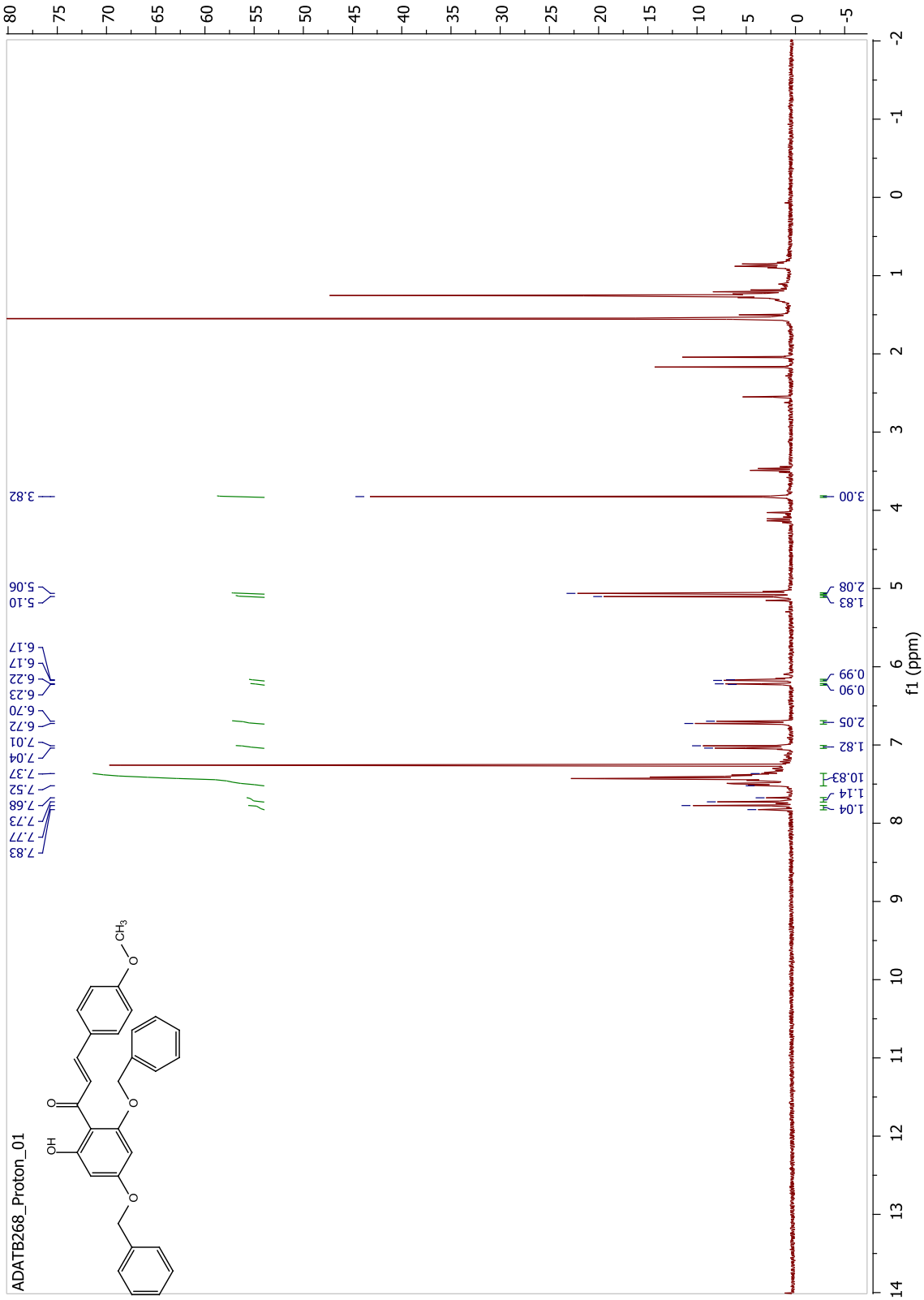
ηλεκτρονιακά. Συνεπώς τα αρωματικά υδρογόνα στις θέσεις 3′ και 5′ εμφανίζονται πιο προστατευμένα από το συνηθισμένο.



*Εικόνα 49: Φάσμα 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της χαλκόνης **(7)***



*Εικόνα 50: Φάσμα 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της χαλκόνης **(9)***



*Εικόνα 51: Φάσμα 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της χαλκόνης **(10)***

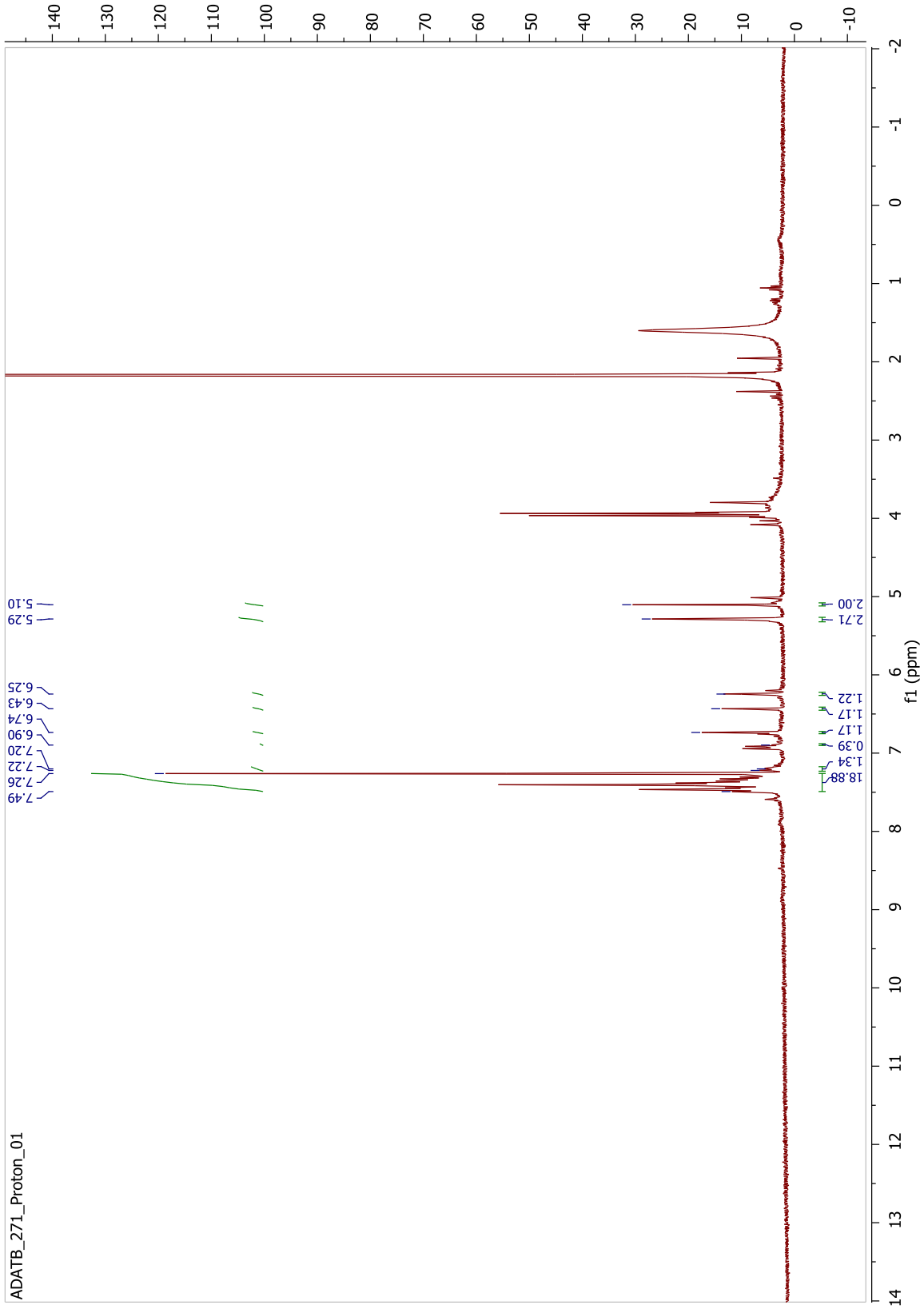
Ωρόνες

Και για τη μελέτη των παραγόμενων ωρονών χρησιμοποιήθηκε η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Πρωτονίου (^{1}H NMR). Τα δεδομένα που προκύπτουν από τα φάσματα ^{1}H NMR των ωρονών που παρασκευάσθηκαν, αποδεικνύουν ότι τα ισομερή που προέκυψαν μέσω της οξειδωτικής κυκλοποίησης των χαλκονών είναι μόνο Z γεωμετρίας. Ο λόγος γίνεται, δεδομένου ότι στη φύση απαντώνται ωρόνες με δύο γεωμετρικά ισομερή, Z και E αντίστοιχα.

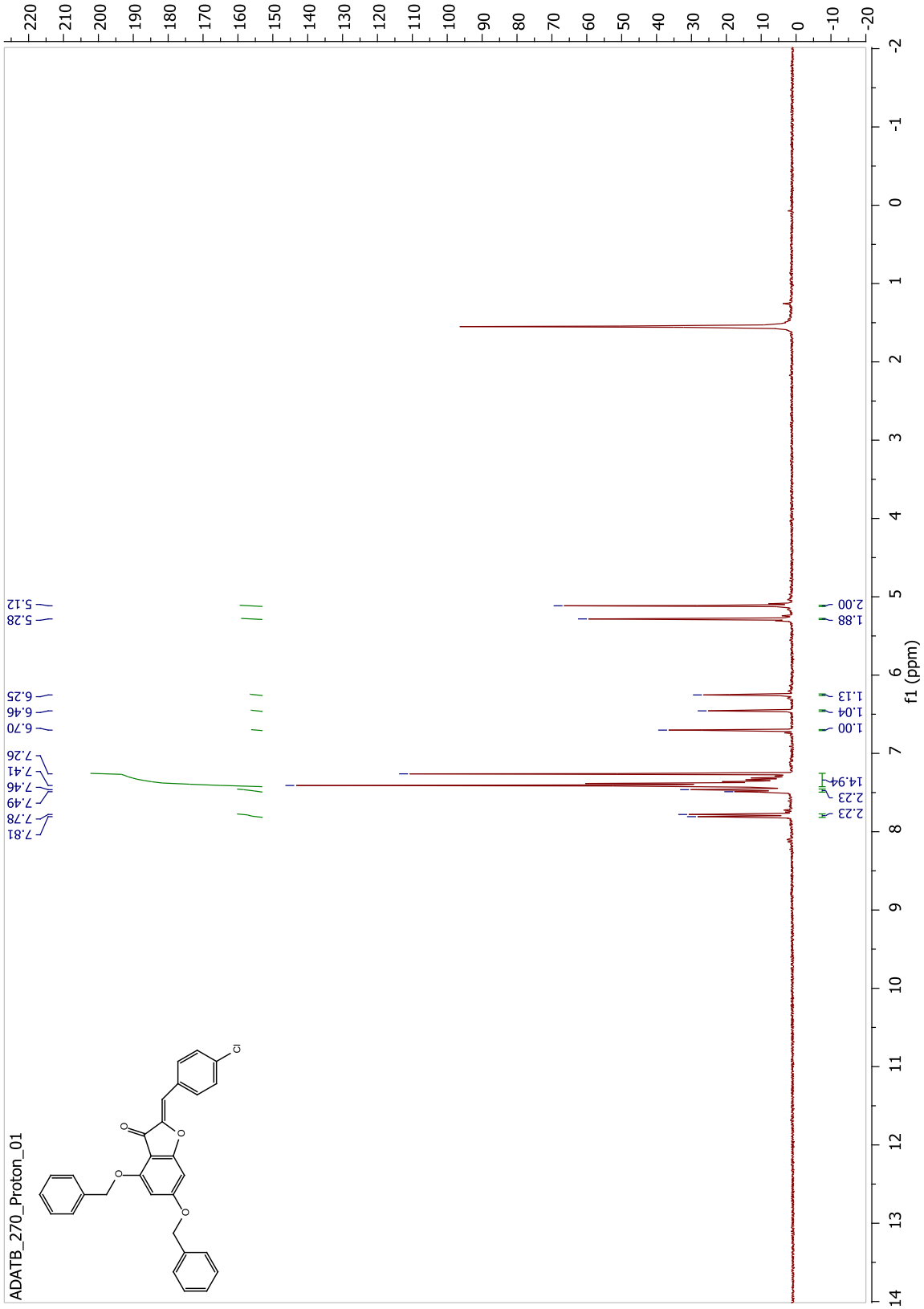
Αυτές οι δύο γεωμετρίες είναι δυνατό να επαληθευθούν μέσω των κορυφών ^{1}H NMR των ωρονών, και συγκεκριμένα από την απλή κορυφή του βινυλικού πρωτονίου. Ειδικότερα, το χαρακτηριστικό των φασμάτων NMR πρωτονίου των χαλκονών είναι μία απλή κορυφή κοντά στην περιοχή 7 ppm, η οποία αποδίδεται στο βινυλικό πρωτόνιο. Ωστόσο, το πόσο κοντά στα 7 ppm είναι η χαρακτηριστική κορυφή του βινυλικού πρωτονίου καθορίζεται από τους υποκαταστάτες των δακτυλίων των ωρονών, καθότι επηρεάζουν τις χημικές μετατοπίσεις του. Ετσι, πυρηνόφιλοι υποκαταστάτες όπως οι βενζυλόξυ –υποκαταστάτες του A δακτυλίου προκαλούν μετατόπιση του βινυλικού πρωτονίου σε υψηλότερο πεδίο. Επιπλέον η φύση και η θέση των υποκαταστατών του B δακτυλίου, επηρεάζουν περαιτέρω τη χημική μετατόπιση του βινυλικού πρωτονίου. [161], [162]

Τα ανωτέρω επαληθεύονται από τις χημικές μετατοπίσεις των βινυλικών πρωτονίων των ωρονών **(11) –(13).** Έτσι, όπως είναι αναμενόμενο, και για τις τρεις ωρόνες η χημική μετατόπιση του βινυλικού πρωτονίου εμφανίζεται κάτω από τα 7 ppm. Πιο συγκεκριμένα, για την 4,6 –διβενζυλόξυ –ωρόνη **(11)** το βινυλικό πρωτόνιο έχει χημική μετατόπιση στα 6,74 ppm, για την 4,6 –διβενζυλόξυ -4' –χλώρο –ωρόνη **(12)** στα 6,70 ppm και για την 4,6 –διβενζυλόξυ -3',4' –διμεθόξυ –ωρόνη **(13)** στα 6,74 ppm.

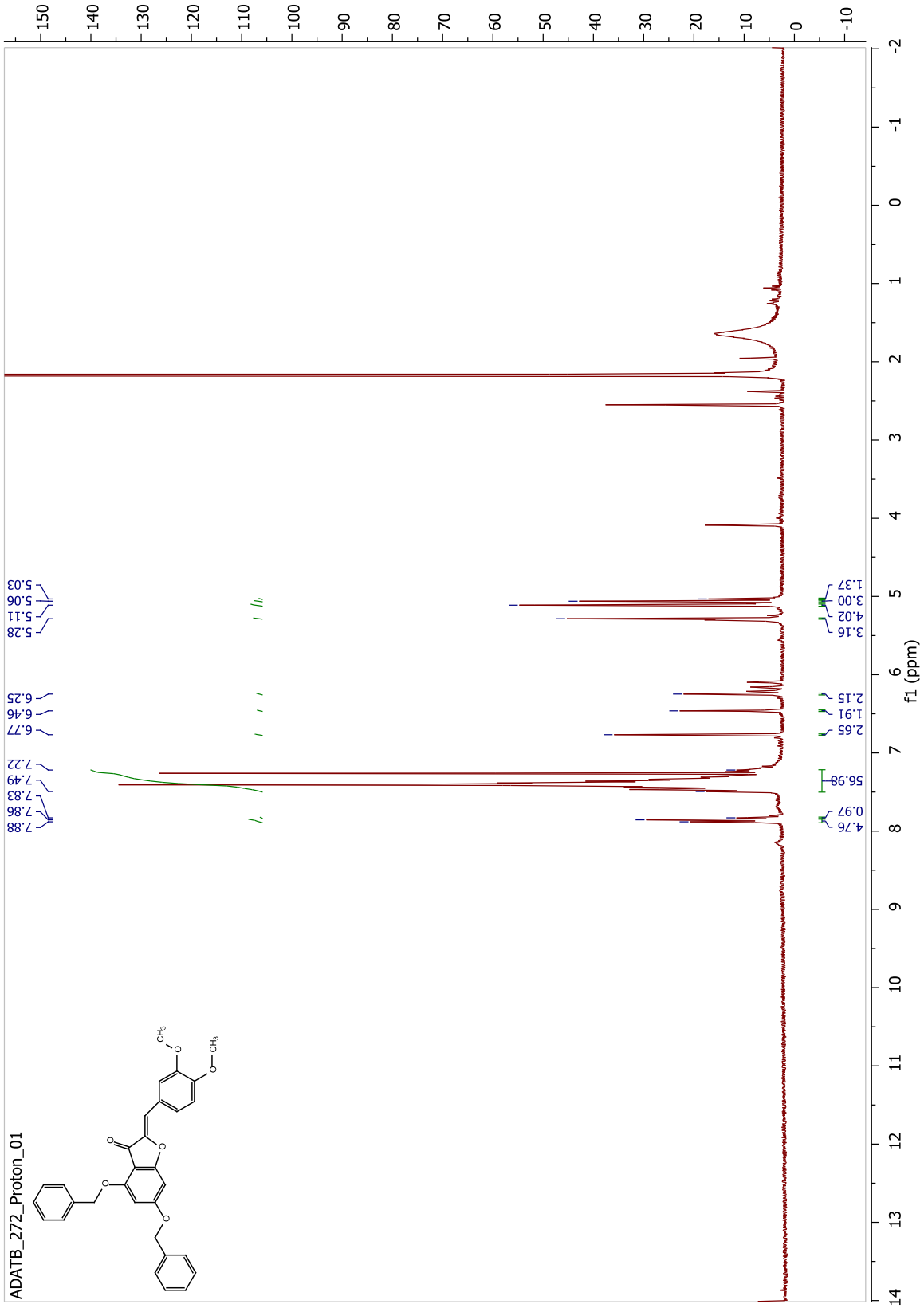
Επιστρέφοντας λοιπόν στη φασματοσκοπική διαφοροποίηση των Z/E διαμορφώσεων των ωρονών, είχε υποστηριχθεί ότι το βινυλικό πρωτόνιο των E γεωμετρικών ισομερών έχει χημική μετατόπιση δ της τάξης των 7,01 ppm ενώ των Z ισομερών της τάξης των 6,70 ppm. Η θέση αυτή είχε στηριχθεί στη θεώρηση ότι το βινυλικό πρωτόνιο των E ισομερών αποπροστατεύεται σε μεγαλύτερο βαθμό από το αντίστοιχο των Z ισομερών , και συνεπώς έχει μεγαλύτερη χημική μετατόπιση. Η θέση αυτή καταρρίφθηκε από τους Sim et al., οι οποίοι συνέθεσαν μια σειρά 4,6 –διμεθόξυ –ωρονών στις οποίες πραγματοποίησαν φασματοσοκοπικές και κρυσταλλογραφικές αναλύσεις, και κατέληξαν ότι στο σύνολό τους ήταν Z γεωμετρικά ισομερή. [163]



*Εικόνα 52: Φάσμα 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της ωρόνης **(11)***



*Εικόνα 53: Φάσμα 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της ωρόνης **(12)***



*Εικόνα 54: Φάσμα 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της ωρόνης **(13)***

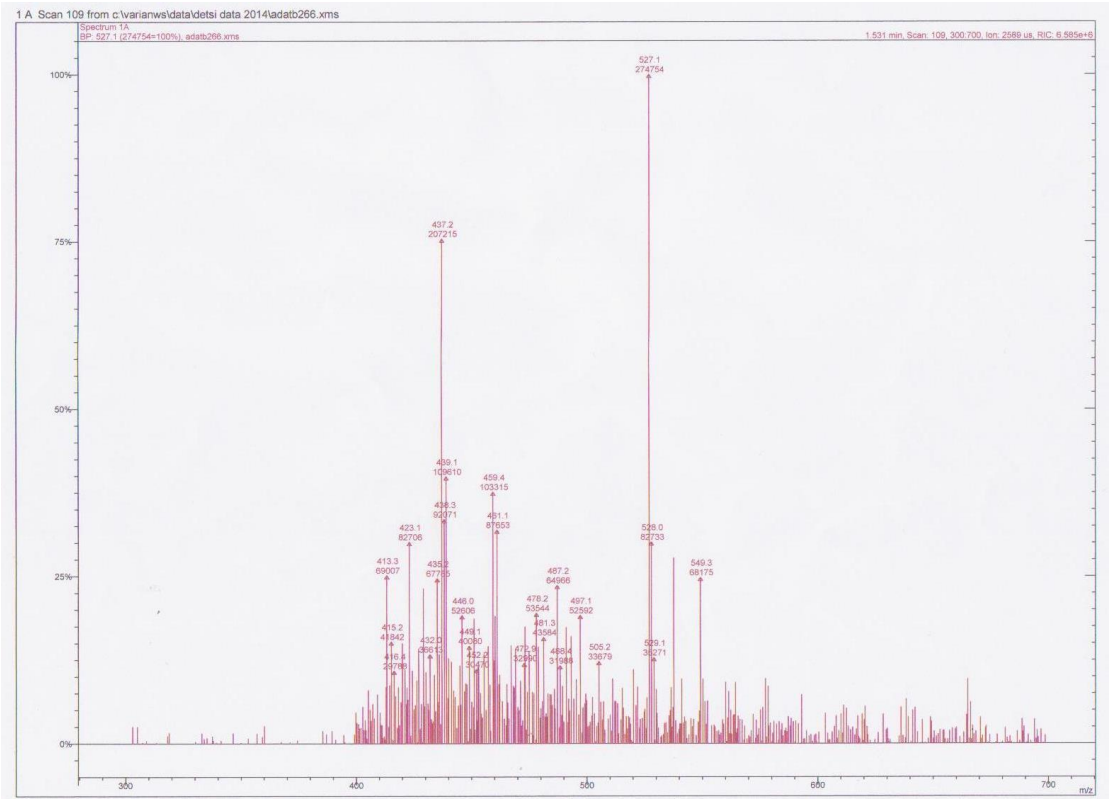
Φασματοσκοπική μελέτη ESI –MS

Χαλκόνες

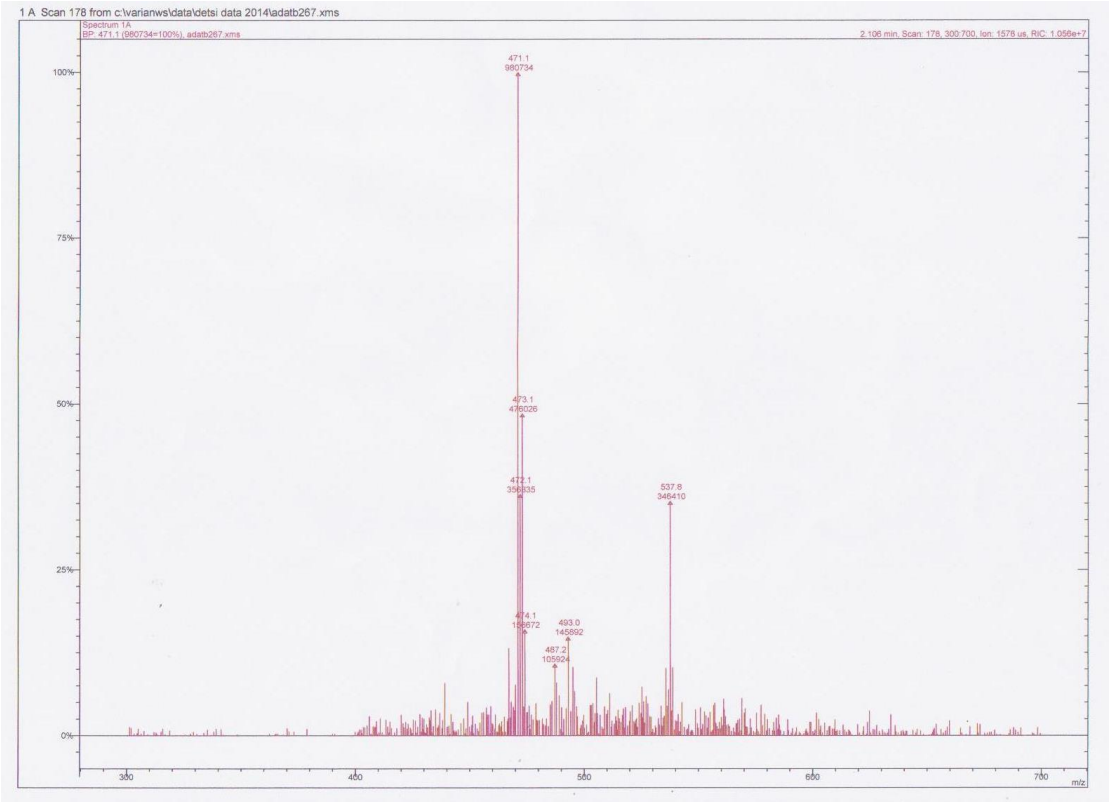
Για την περαιτέρω μελέτη της δομής και ταυτοποίηση των παρασκευασθέντων μορίων των χαλκονών, εφαρμόστηκε και φασματοσκοπία μάζας (ESI –MS) στα προϊόντα **7-10**. Για τον ιονισμό των μορίων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization), μια ήπια σχετικά μέθοδος θραυσματοποίησης, η οποία προτιμάται για ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους γιατί δεν οδηγεί στην άμεση διάσπαση των μορίων.

Τα μοριακά ιόντα των τεσσάρων χαλκονών που εξετάστηκαν είναι παρόντα και στα αντίστοιχα MS φάσματα, γεγονός που δείχνει ότι οι χαλκόνες παρασκευάστηκαν πλήρως. Συγκεκριμένα, εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι οι κορυφές των **8, 9, 10** είναι στο 100%, ενώ της χαλκόνης **7** στο 75%, το οποίο πιθανόν να οφείλεται στην ύπαρξη διαλύτη στα μόρια της χαλκόνης. Επίσης η χαλκόνη **8** εμφανίζει κορυφή βάσης 100% για μοριακό βάρος 471, και 75% για μοριακό βάρος 473. Και οι δύο εντάσεις ανήκουν στα μοριακά ιόντα, και η διαφοροποίησή τους σχετίζεται με την ύπαρξη του ατόμου χλωρίου στο εν λόγω μόριο, η οποία εκδηλώνεται με την ισοτοπική αναλογία.

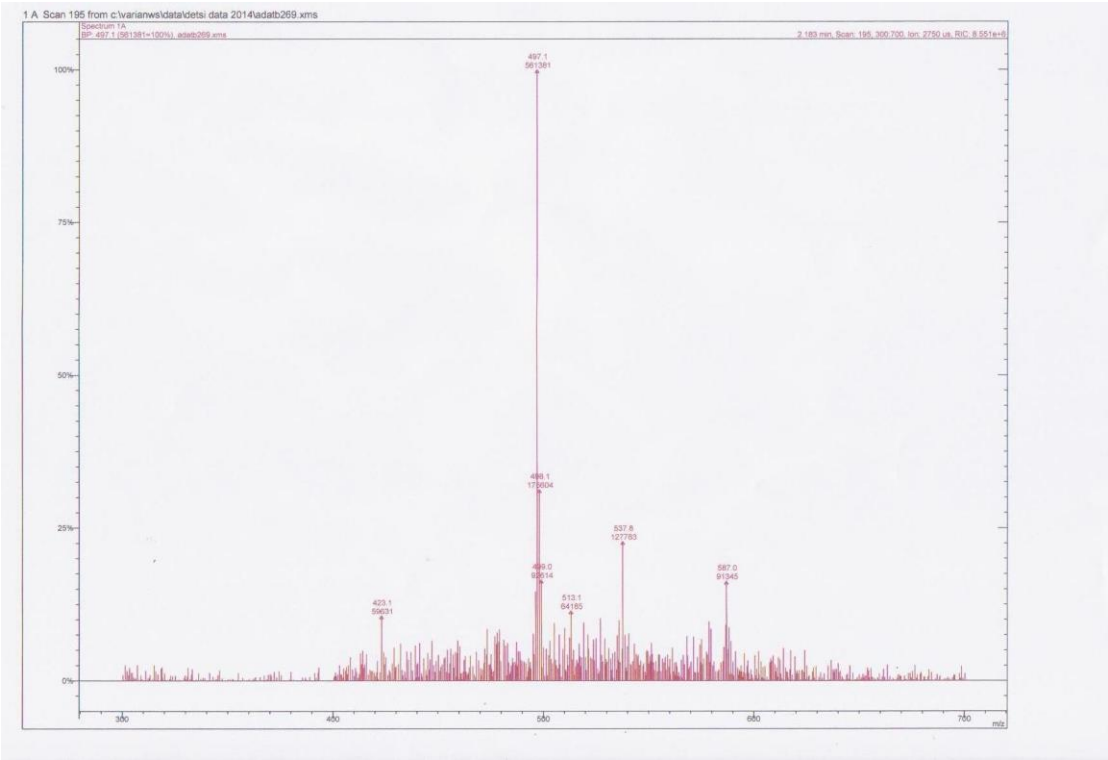
Τέλος, για τις χαλκόνες **7** και **8** παρατηρούνται και οι εντάσεις $[M+23]^+$, λόγω του κατιόντος νατρίου.



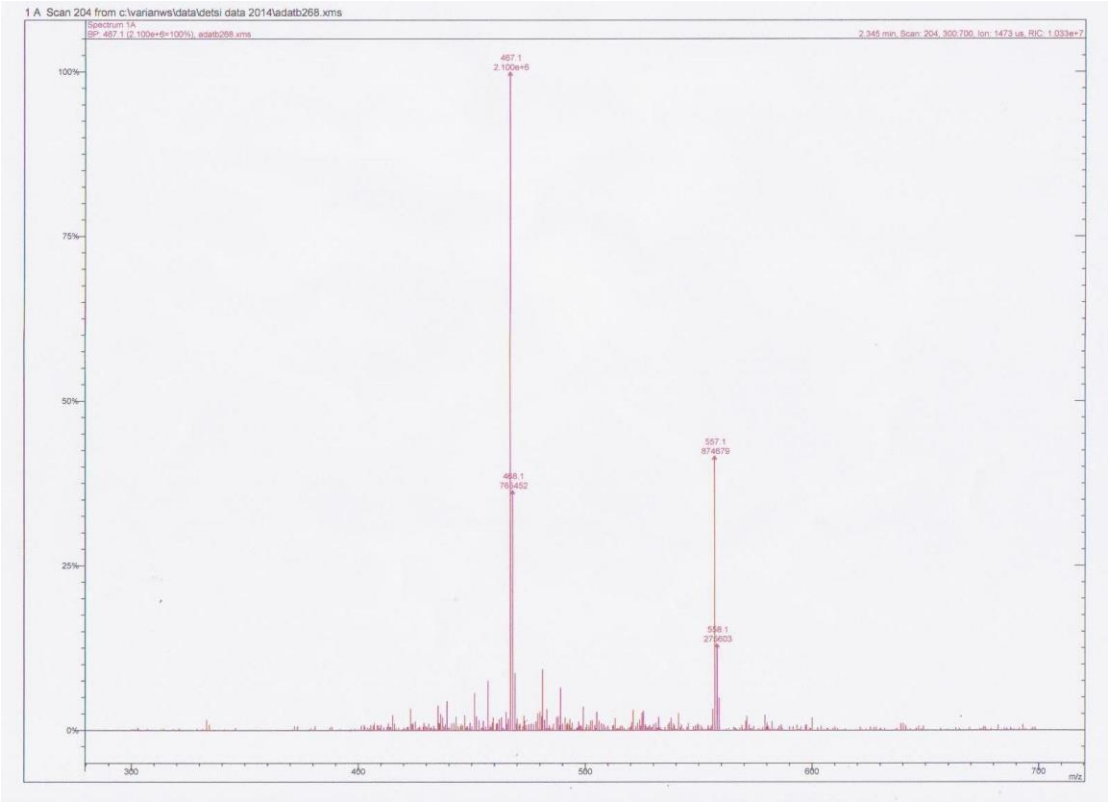
*Εικόνα 55: ESI –MS φάσμα της χαλκόνης **(7)***



*Εικόνα 56: ESI –MS φάσμα της χαλκόνης **(8)***



*Εικόνα 57: ESI –MS φάσμα της χαλκόνης **(9)***

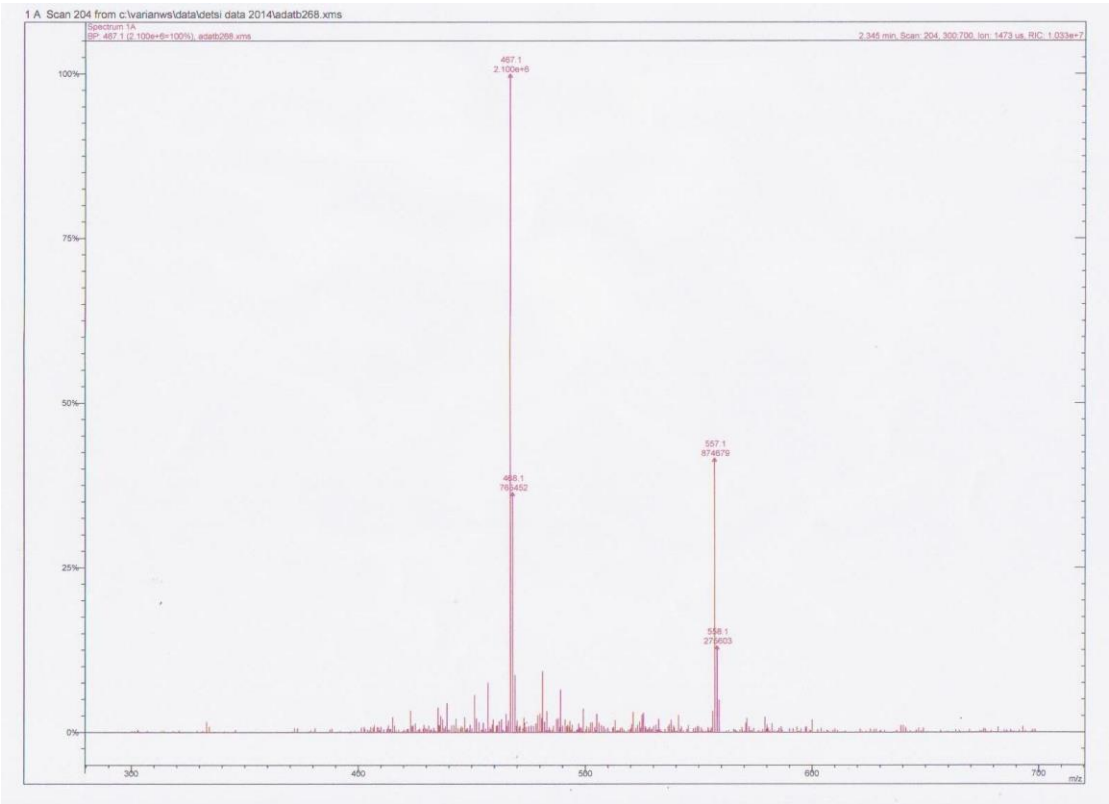


*Εικόνα 58: ESI –MS φάσμα της χαλκόνης **(10)***

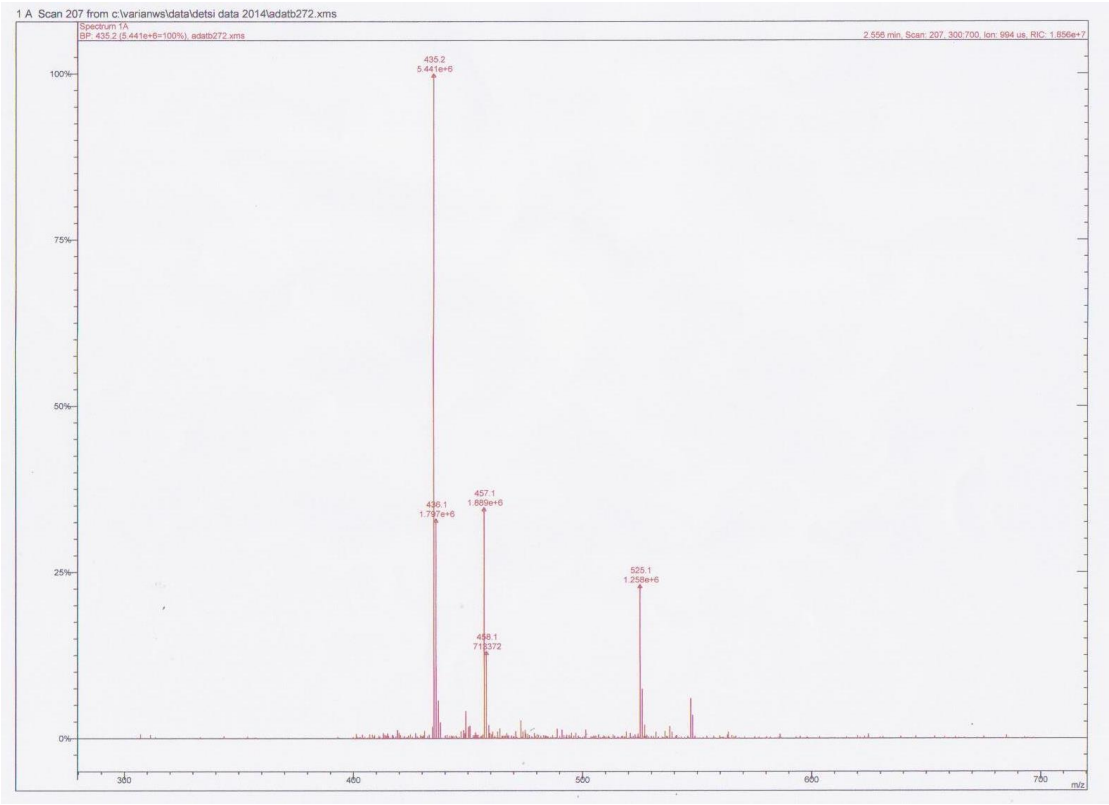
Ωρόνες

Όπως για τις χαλκόνες, έτσι και για τις ωρόνες **11 -13** εφαρμόστηκε φασματοσκοπία μάζας (ESI –MS) για την περαιτέρω μελέτη της δομής τους.

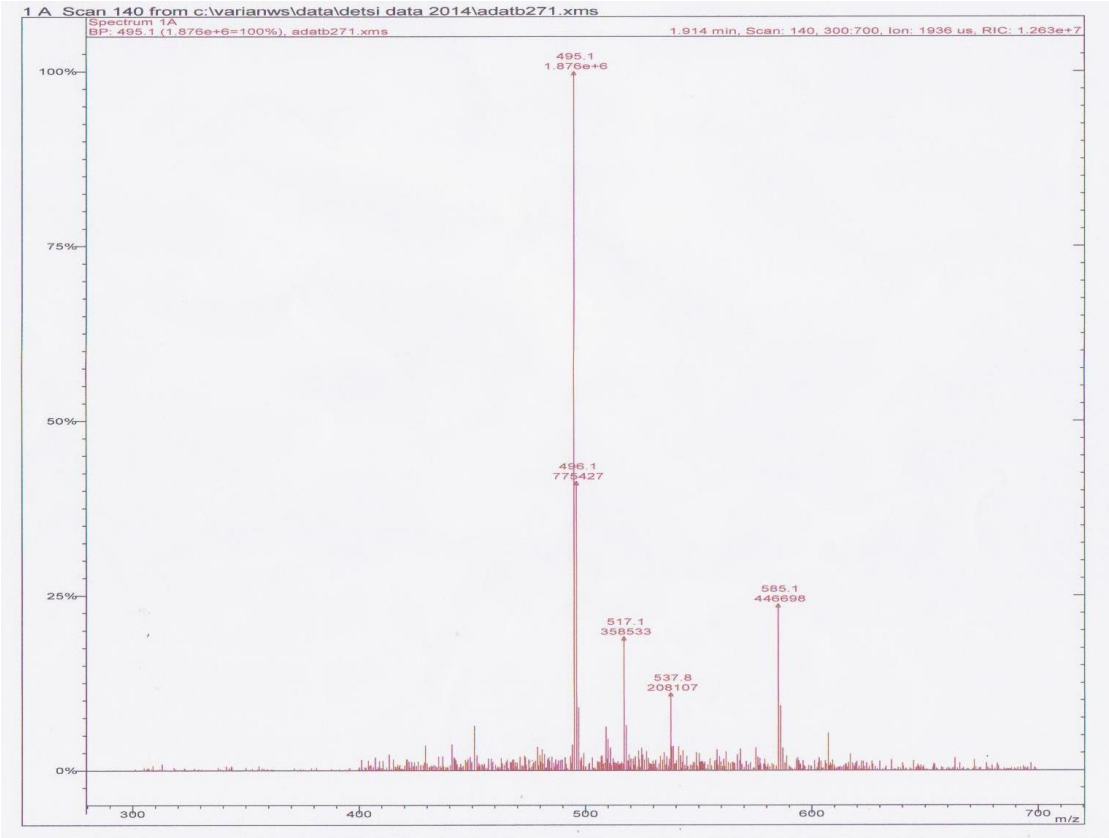
Τα μοριακά ιόντα των ωρονών είναι εμφανή στα αντίστοιχα MS φάσματα, γεγονός που επιβεβαιώνει την επιτυχή σύνθεσή τους. Παρατηρείται ότι οι εντάσεις των μοριακών ιόντων και για τις τρεις ωρόνες συμπίπτουν με τις κορυφές βάσης των αντιστοίχων φασμάτων. Επίσης, και για τις τρεις ωρόνες είναι εμφανείς και οι εντάσεις $[M+23]^+$. Τέλος, για την ωρόνη **12**, όπως είναι αναμενόμενο παρατηρείται η ισοτοπική αναλογία λόγω του ατόμου του χλωρίου τόσο για τα μοριακά ιόντα $[M+1]^+$ και $[M+1+2]^+$, αλλά και για τα ιόντα $[M+23]^+$ και $[M+23+2]^+$.



*Εικόνα 59: ESI –MS φάσμα της ωρόνης **(11)***



Εικόνα 60: ESI –MS φάσμα της ωρόνης (12)



*Εικόνα 61: ESI –MS φάσμα της ωρόνης **(13)***

Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης

Όλα τα ανάλογα των χαλκονών και των ωρονών που παρασκευάστηκαν, αξιολογήθηκαν in vitro ως προς την αντιοξειδωτική και την αντιφλεγμονώδη τους δράση. Συγκεκριμένα για την αντιοξειδωτική δράση, εξετάστηκε η ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τα μόρια ελευθέρων ριζών του DPPH και η ικανότητά τους να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξείδωση, ενώ για την αντιφλεγμονώδη μετρήθηκε το ποσοστό αναστολής της λιποξυγονάσης και της λιπιδικής υπεροξείδωσης. Στόχος αυτών των μετρήσεων ήταν να εξαχθεί ένα πρώτο συμπέρασμα σχετικά με τη βιολογική συμπεριφορά των βενζυλιωμένων αναλόγων χαλκονών και ωρονών.

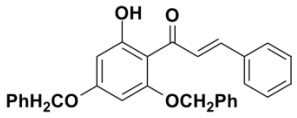
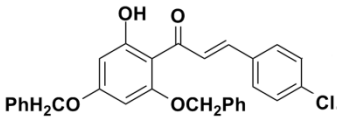
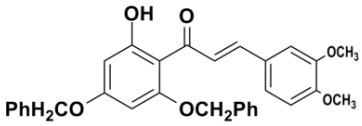
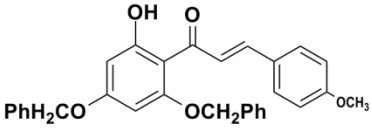
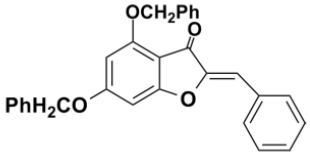
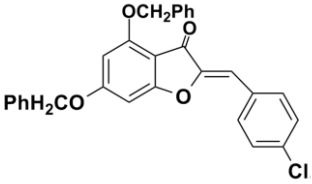
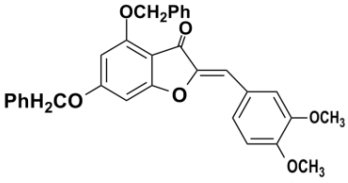
Ως ενώσεις αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν το νορδιϋδρογουαϊαρετικό οξύ (NDGA) και το υδατοδιαλυτό ανάλογο της βιταμίνης E, Trolox.

Στους παρακάτω πίνακες παρατίθενται τα αποτελέσματα:

Πίνακας 2: Αποτελέσματα οξείδωσης του DPPH, σε διάστημα 20min και 60min

% DPPH (0.1 mM)		
Προϊόν	**20 min**	**60 min**
7	4	2
8	3	15
9	10	4
10	1	1
11	2	2
12	8	5
13	3	2
NDGA	87	91

Πίνακας 3: Αποτελέσματα αναστολής της φυτικής λιποξυγονάσηςαπό σόγια (LO) και της λιπιδικής υπεροξείδωσης (LP)

	% LO αναστολή (0.1mM) και % LP αναστολή (0.1mM)		
Προϊόν	**Δομή προϊόντος**	**% LO IC_{50} μM**	**% LP (0.1mM)**
7		52.5 μM	87
8		50 μM	74
9		68 μM	85
10		47.5 μM	64
11		-	68
12		57 μM	88
13		57.5 μM	92
NDGA		55 μM	
Trolox			72

Από τα παραπάνω παρατηρούμε τα εξής:

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση, αυτή παρουσιάζεται πολύ χαμηλή. Ως αποτέλεσμα όμως ήταν αναμενόμενο, διότι οι ελεύθερες ρίζες του DPPH εξουδετερώνονται από μόρια με ελεύθερες υδροξυλομάδες. Μεταξύ των μορίων **7-**

13, εκείνα που έχουν ελεύθερη υδροξυλομάδα είναι οι χαλκόνες **7-10**, οι οποίες πράγματι εμφανίζουν σχετικά καλύτερα αντιοξειδωτικά αποτελέσματα από τις αντίστοιχες ωρόνες. Ωστόσο η θέση του υδροξυλίου στις χαλκόνες στο C-6′, δε διευκολύνει την αντιοξειδωτική δράση, γιατί πιθανόν παρεμποδίζεται από τα ογκώδη ηλεκτρονιακά νέφη των βενζυλόξυ υποκαταστατών στους C-2′ και C-4′. Σε καμία περίπτωση όμως, αυτές οι τιμές δεν είναι συγκρίσιμες με εκείνη του δείγματος αναφοράς NDGA, και γι'αυτό δε θα πρέπει να μας απασχολήσουν περαιτέρω.

Ωστόσο, η αντιοξειδωτική δράση των προϊόντων μελετήθηκε και με τη μέθοδο της αναστολής της λιπιδικής υπεροξείδωσης με χρήση του AAPH ως εκκινητή ριζών. Συγκρίνοντας τώρα τα ποσοστά αναστολής της λιπιδικής υπεροξείδωσης (%LP), παρατηρούμε ότι σχεδόν όλες οι ενώσεις που εξετάστηκαν έχουν καλύτερο αποτέλεσμα από την ένωση αναφοράς, εκτός από τα προϊόντα **10** και **11**, την 4-μεθόξυ-χαλκόνη και τη φυσική ωρόνη αντίστοιχα. Την καλύτερη συμπεριφορά την έχει η ωρόνη **13** με τους 3′,4′ –διμεθόξυ υποκαταστάτες, δηλαδή εδώ παίζει σημαίνοντα ρόλο των πλήθος των υποκαταστατών και η θέση τους στο B δακτύλιο, *meta* και *para*. Οι υπόλοιπες δομές παρουσιάζουν ποσοστά αναστολής της λιπιδικής υπεροξείδωσης χαμηλότερα από την ωρόνη **13**, αλλά και πάλι καλύτερα από αυτά της ένωσης αναφοράς.

Όσον αφορά την ικανότητα των ενώσεων να αναστέλλουν τη δράση της φυτικής λιποξυγονάσης, συνολικά όλα τα παράγωγα εμφανίζουν παρόμοια ή και ελαφρώς καλύτερη συμπεριφορά από την ένωση αναφοράς. Πιο συγκεκριμένα, σχετικά με το ποσοστό αναστολής της λιποξυγονάσης (LO), την καλύτερη συμπεριφορά έχει το προϊόν **10**, η 4-μεθόξυ-χαλκόνη. Σε αντίθεση με τη χαλκόνη **9**, που περιέχει 2 μεθόξυ υποκαταστάτες, και παρουσιάζει τη χαμηλότερη αναστολή λιποξυγονάσης σε σχέση με τις υπόλοιπες χαλκόνες. Αυτό πιθανόν υποδεικνύει ότι μάλλον δεν παίζει τόσο ρόλο ο αριθμός των υποκαταστατών αλλά κυρίως η θέση τους στο B δακτύλιο, και δη στη θέση *para*.

Επίσης, εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι αν και η φυσική χαλκόνη **7** παρουσιάζει παρόμοια αναστολή με το δείγμα αναφοράς, η προκύπτουσα ωρόνη **11** δεν έχει καμία επίδραση απέναντι στη λιποξυγονάση. Τέλος παρατηρούμε ότι όλες οι χαλκόνες έχουν καλύτερες τιμές IC_{50} από την ένωση αναφοράς, σε αντίθεση με καμία από τις ωρόνες που εξετάστηκαν.

Από τα παραπάνω συνάγεται ότι γενικά οι δομές **7-9** παρουσιάζουν καλή αντιφλεγμονώδη συμπεριφορά, εφόσον αναστέλλουν τη δράση της λιποξυγονάσης σε καλύτερο ποσοστό από αυτό της ένωσης αναφοράς. Επίσης, οι δομές **7, 8, 10, 12, 13** καταδεικνύουν καλύτερη αντιοξειδωτική συμπεριφορά για την αναστολή της λιπιδικής υπεροξείδωσης, σε σχέση με την ένωση αναφοράς Trolox.

Συνδυαστικά, την καλύτερη συμπεριφορά παρουσίασε η φυσική χαλκόνη **7**.

Συμπεράσματα

Στην παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και η μελέτη της βιολογικής δράσης δύο κατηγοριών χημικών ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα, επετεύχθη η σύνθεση τεσσάρων χαλκονών και τριών ωρονών, οι οποίες και μελετήθηκαν για την ενδεχόμενη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση τους.

Οι μεθοδολογίες σύνθεσης των παραπάνω ενώσεων είναι σχετικά απλές και διέπονται από ικανοποιητικές αποδόσεις, ενώ οι απαιτούμενες για την παρασκευή τους πρώτες ύλες είτε είναι εμπορικά διαθέσιμες, είτε παρασκευάζονται εύκολα στο εργαστήριο. Επιπλέον, από συνθετική άποψη, οι ενώσεις αυτές ανήκουν στις «προνομιούχες δομές», δηλαδή πρόκειται για ενώσεις που μπορούν να τροποποιηθούν δομικά με μεγάλη ποικιλία υποκαταστατών. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση της βιολογικής τους δράσης και την εξαγωγή συμπερασμάτων για τη σχέση δομής –βιολογικής δραστικότητας. Από τα παραπάνω πλεονεκτήματα συνάγεται ότι οι χαλκόνες και οι ωρόνες αποτελούν ελκυστικές ενώσεις –στόχοι για την παρασκευή μεγάλου αριθμού αναλόγων (βιβλιοθήκες μορίων) και τη μελέτη της σχέσης δομής –δράσης.

Όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση όλων των προϊόντων, κανένα δεν είχε ικανοποιητική συμπεριφορά στη μέθοδο DPPH. Πρόκειται όμως για ένα μάλλον αναμενόμενο συμπέρασμα δεδομένου ότι για τη μέθοδο DPPH απαιτούνται ελεύθερες υδροξυλομάδες. Τα μόνα παρασκευασθέντα ανάλογα που περιείχαν υδροξυλομάδα ήταν οι χαλκόνες στη θέση C-2′, η οποία δύσκολα προσέδιδε αντιοξειδωτικό χαρακτήρα στα μόρια λόγω της ηλεκτρονιακής παρεμπόδισης από τις ογκώδεις βεζυλόξυ-ομάδες στου C-4′ και C-6′.

Σχετικά με την αντιφλεγμονώδη δράση, όλα τα προϊόντα εκτός από τη φυσική ωρόνη έδειξαν ικανοποιητική δράση, και συγκεκριμένα οι χαλκόνες εξαιρετική. Την μεγαλύτερη αναστολή της λιποξυγονάσης παρουσίασε η χαλκόνη **10**, η οποία διαθέτει μεθόξυ υποκαταστάτες στις θέσεις *meta,* ενώ τη μεγαλύτερη αναστολή της λιπιδικής υπεροξείδωσης η ωρόνη **13**, με 3′,4′ -διμεθόξυ υποκαταστάτες.

Συνδυαστικά τη καλύτερη σχέση δομής –δράσης την παρουσίασε η φυσική χαλκόνη **7**.

Μελλοντικά βήματα

Οι χαλκόνες και οι ωρόνες αποτελούν εν γένει μόρια πολλά υποσχόμενα, δεδομένου της ενδιαφέρουσα βιολογικής τους δράσης και της ευκολίας σύνθεσής τους. Ωστόσο, τα βενζυλιωμένα ανάλογά τους σπάνια έχουν αποτελέσει το επίκεντρο της ερευνητικής δραστηριότητας, με αποτέλεσμα να διαθέτουν ακόμα μεγάλο πεδίο συνθετικού πειραματισμού.

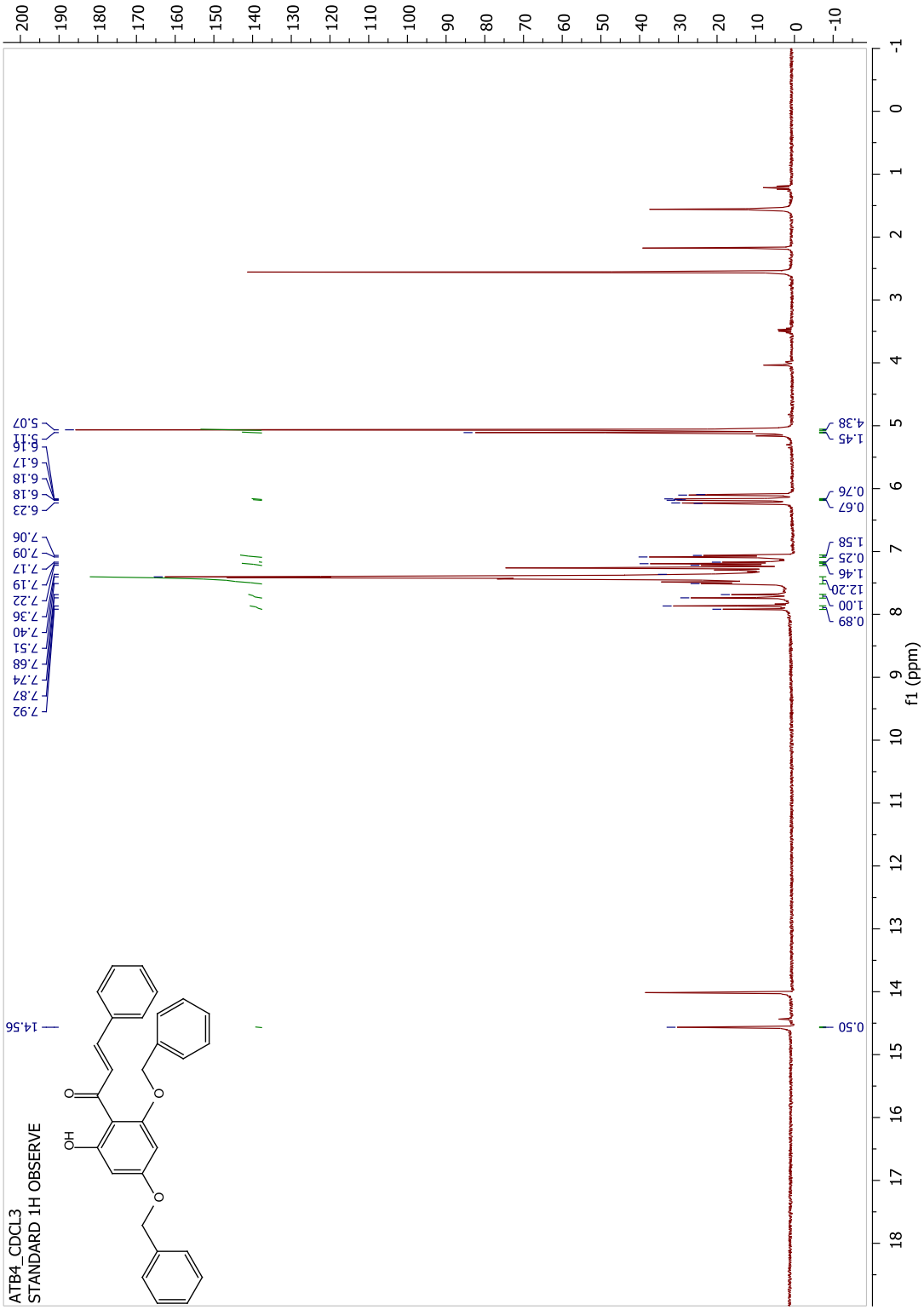
Μέσα από αυτή την εργασία επιχειρήθηκε ένα άνοιγμα προς αυτή την κατηγορία χαλκονών και ωρονών, με σκοπό την αποτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης τους. Τα ικανοποιητικά αποτελέσματα των βιολογικών ελέγχων, καθώς και η σταθεροποίηση των συνθηκών παρασκευής των βενζυλιωμένων μορίων, αφήνει περιθώρια για περαιτέρω έρευνα ώστε να συνταχθεί μια βιβλιοθήκη μορίων και να εμπλουτιστεί με τα αποτελέσματα των μοριακών και βιολογικών ελέγχων.

Πιο συγκεκριμένα, αρχικά προτείνεται η δομική τροποποίηση των υποκαταστατών στο Β δακτύλιο. Η προσθήκη υποκαταστατών που έχουν την τάση να έλκουν ή να παρέχουν ηλεκτρόνια, σε διάφορες θέσεις του Β δακτυλίου, εναλλάσσοντας το είδος, το πλήθος και τη θέση τους, μπορεί να οδηγήσει νέα βιοδραστικά μόρια με βελτιωμένη φαρμακευτική δράση. Ενδεικτικά, προτείνεται:

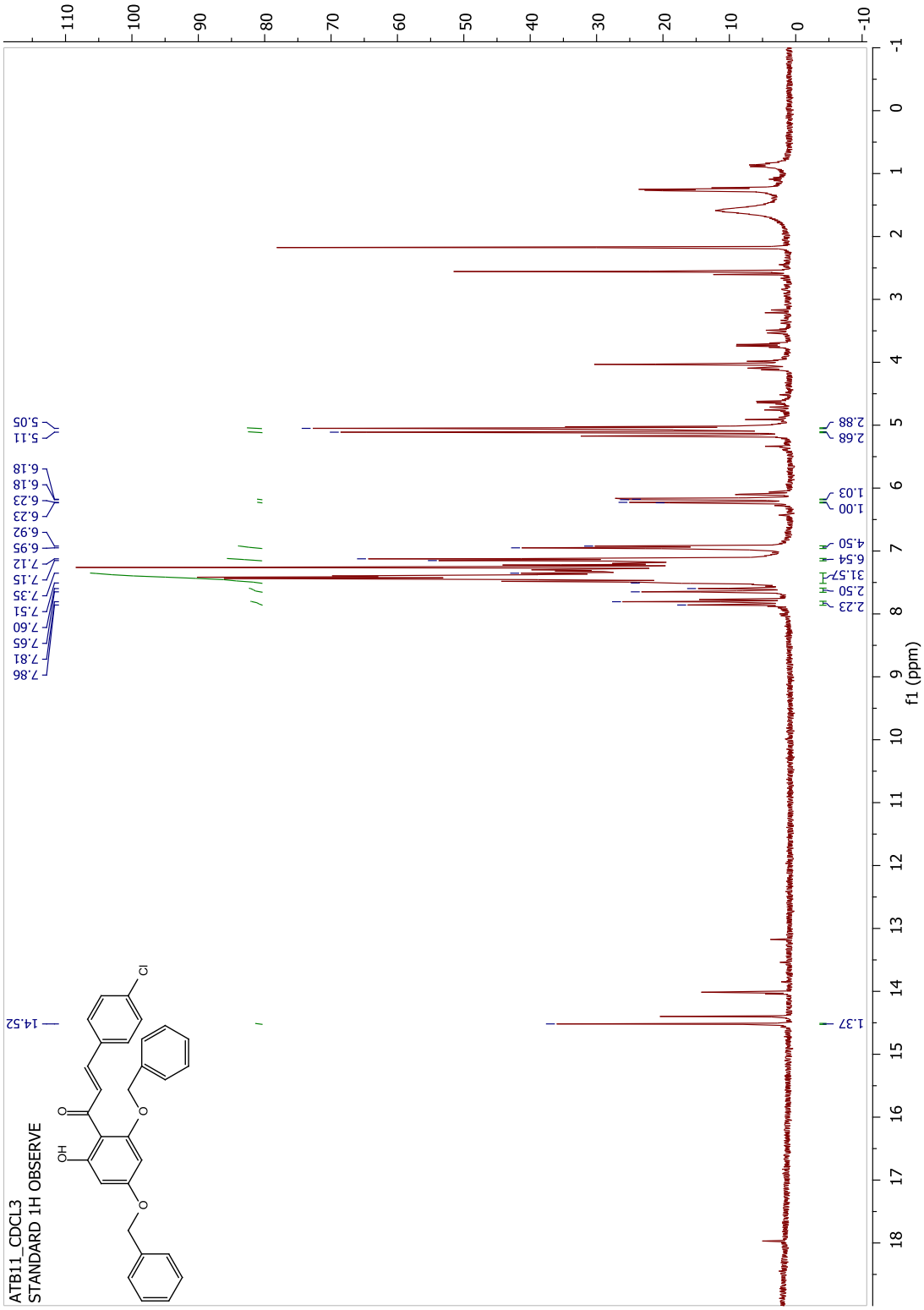
- Η αποπροστασία του δακτυλίου Β τόσο των χαλκονών όσο και των ωρονών, με την προσθήκη υδροξυλομάδων, και η αποτίμηση της βιολογικής τους δράσης. Βιβλιογραφικά, η ύπαρξη ελεύθερων υδροξυλομάδων οδηγεί σε αυξημένο ανιοξειδωτικό χαρακτήρα, οπότε θα έχει ενδιαφέρον να ταυτοποιηθεί αυτός και για τα βεζυλιωμένα ανάλογα, αλλά και να συνδυαστεί με ένα πιθανό αντιφλεγμονώδη.
- Η τροποποίηση των αναλόγων με προσθήκη υποκαταστατών με ετεροάτομα σε διάφορες θέσεις του Β δακτυλίου. Ειδικότερα, υπάρχει μια πληθώρα ηλεκτρονιόφιλων υποκαταστατών με ετεροάτομα (π.χ. αμινομάδα, νιτρομάδα, ακόμα άτομο βρωμίου) η οποία θα μπορούσε να αποτελέσει αντικείμενο σύνθεσης για νέα, πιο βιοδραστικά μόρια.
- Η μελέτη του πλήθους και της θέσης των παραπάνω υποκαταστατών και η διαφοροποίηση στη φαρμακευτική τους δράση.

Επιπλέον, δεδομένου ότι σπανίζουν τα στοιχεία για τις φυσικές ιδιότητες των βενζυλιωμένων χαλκονών και ωρονών (μοριακό βάρος, σ. τήξης, κορυφές 2D NMR –COSY, NOESY-, κορυφές IR), η συμπλήρωση αυτών για τη σύνταξη μια βιβλιοθήκης μορίων θα ήταν πολύ χρήσιμη για τη μελλοντική έρευνα.

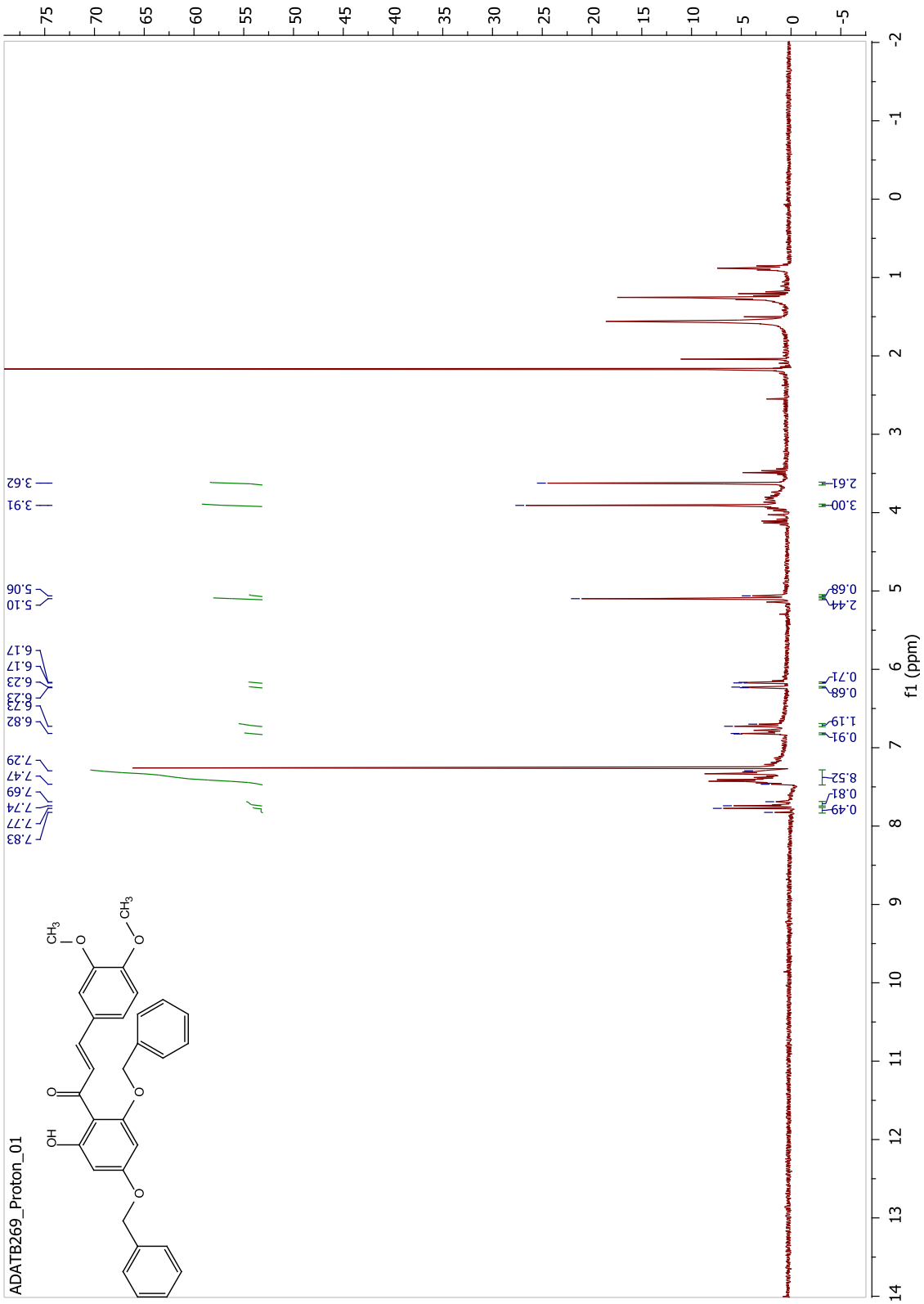
Παράρτημα



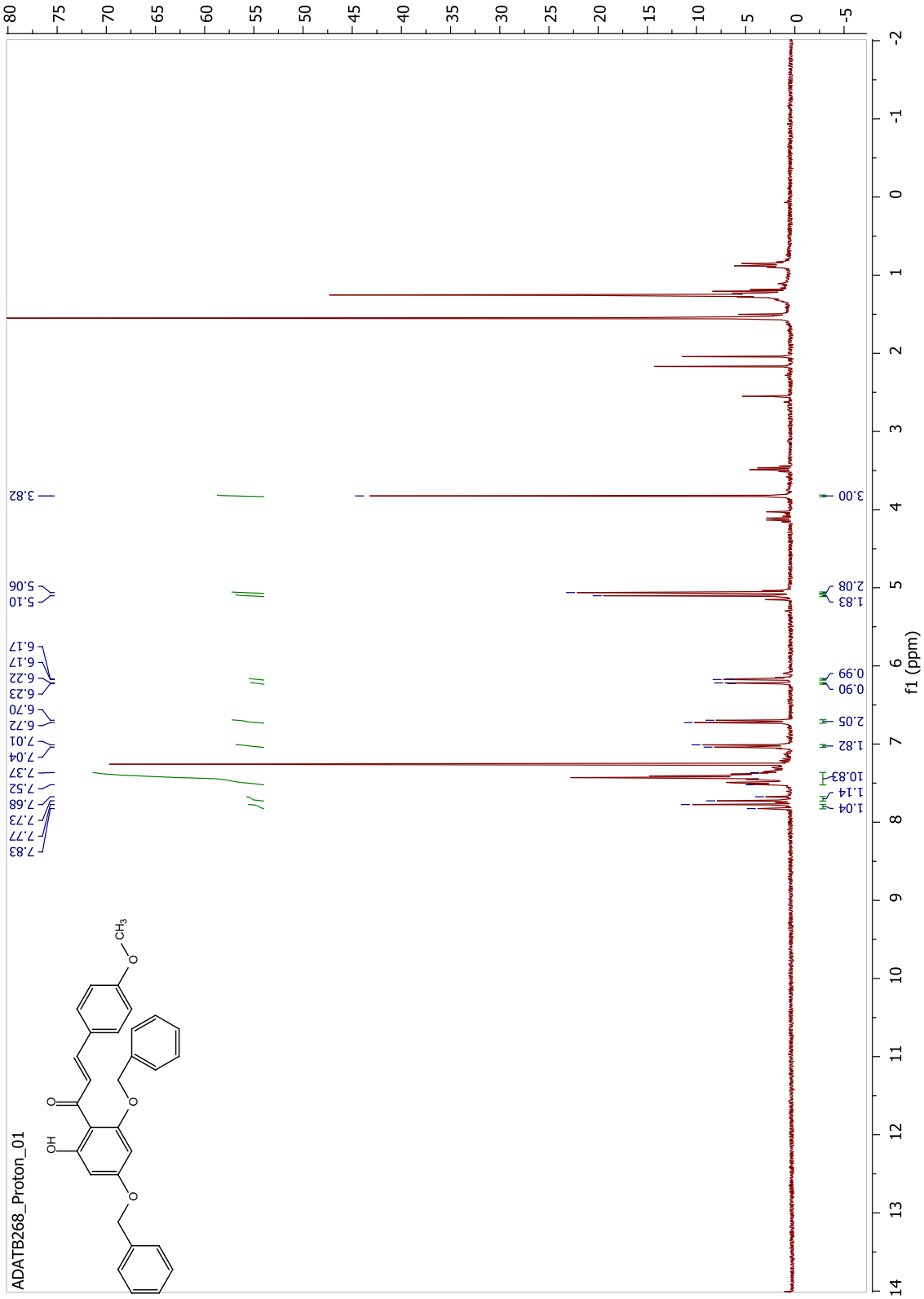
*Εικόνα 62: Φάσμα ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της χαλκόνης **(7)***



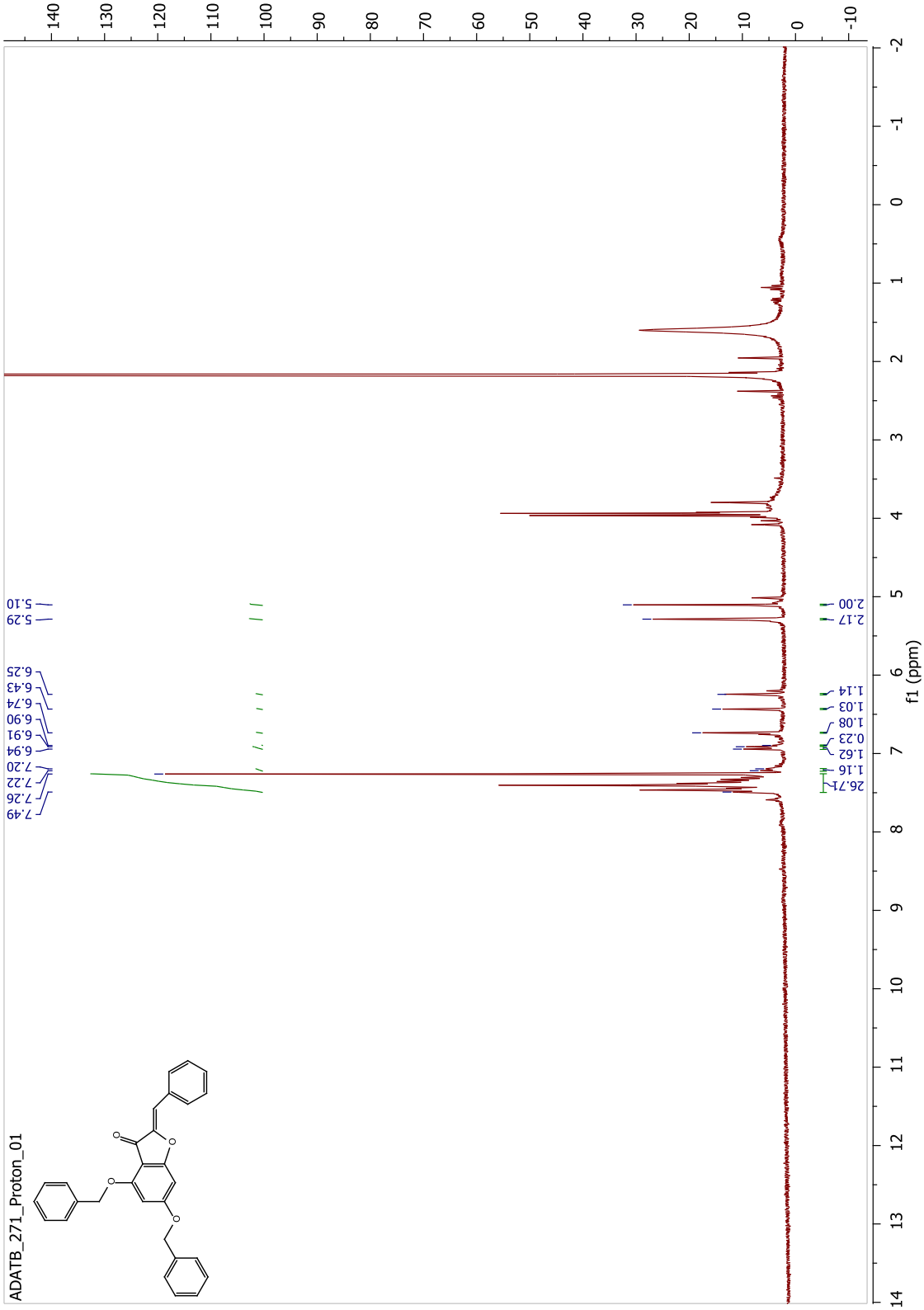
*Εικόνα 63: Φάσμα ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της χαλκόνης **(8)***



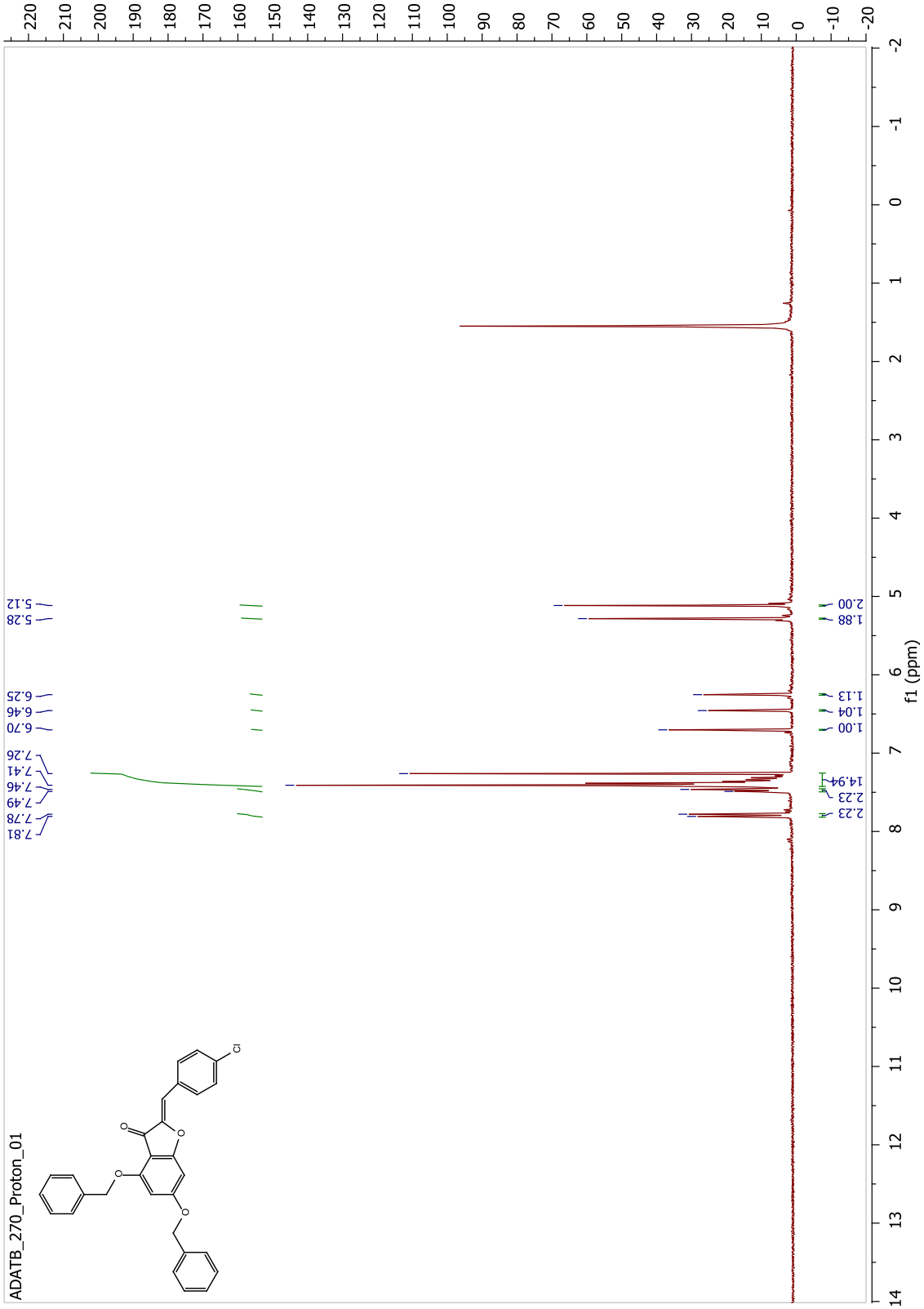
*Εικόνα 64: Φάσμα ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της χαλκόνης **(9)***



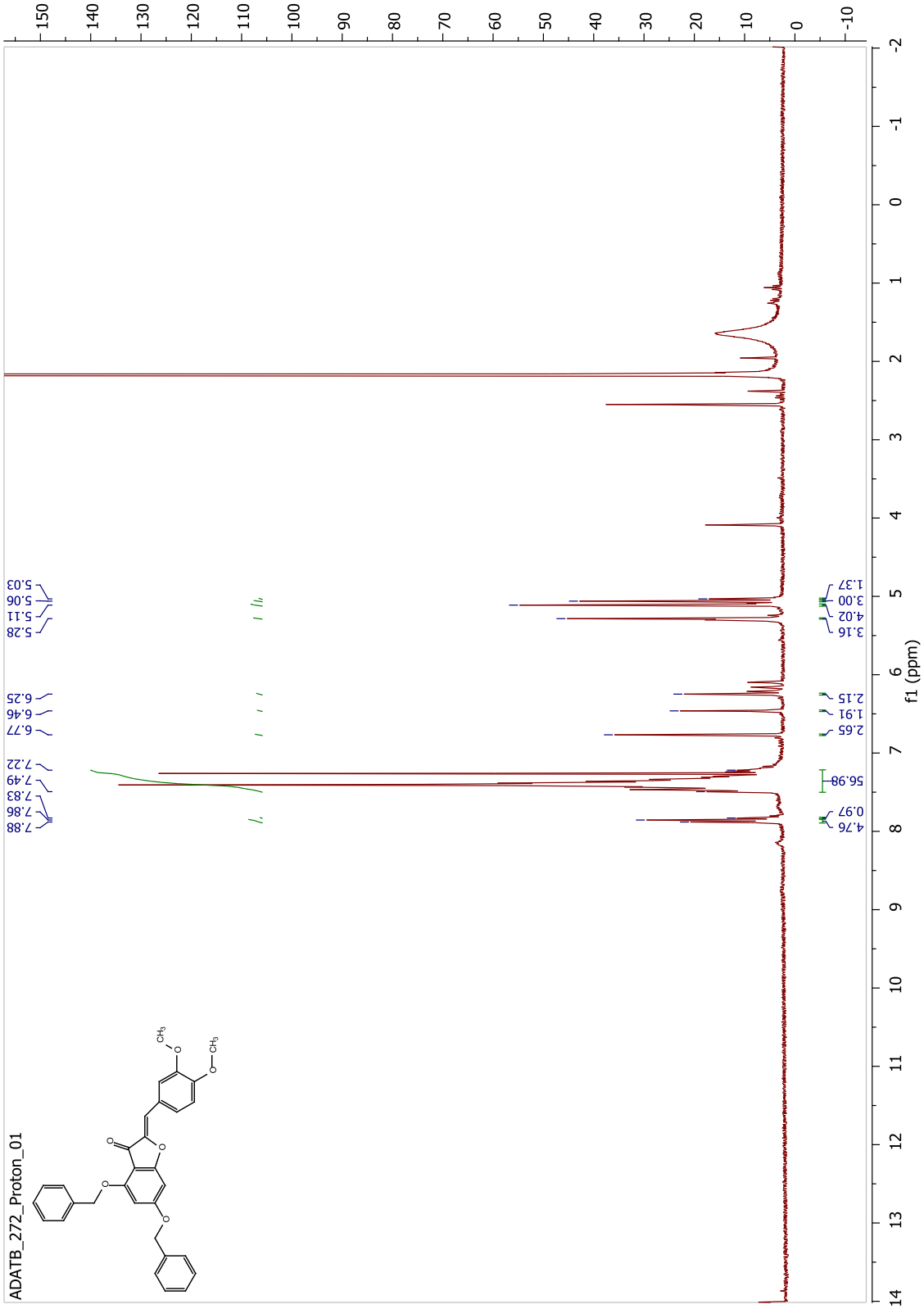
*Εικόνα 65: Φάσμα ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της χαλκόνης **(10)***



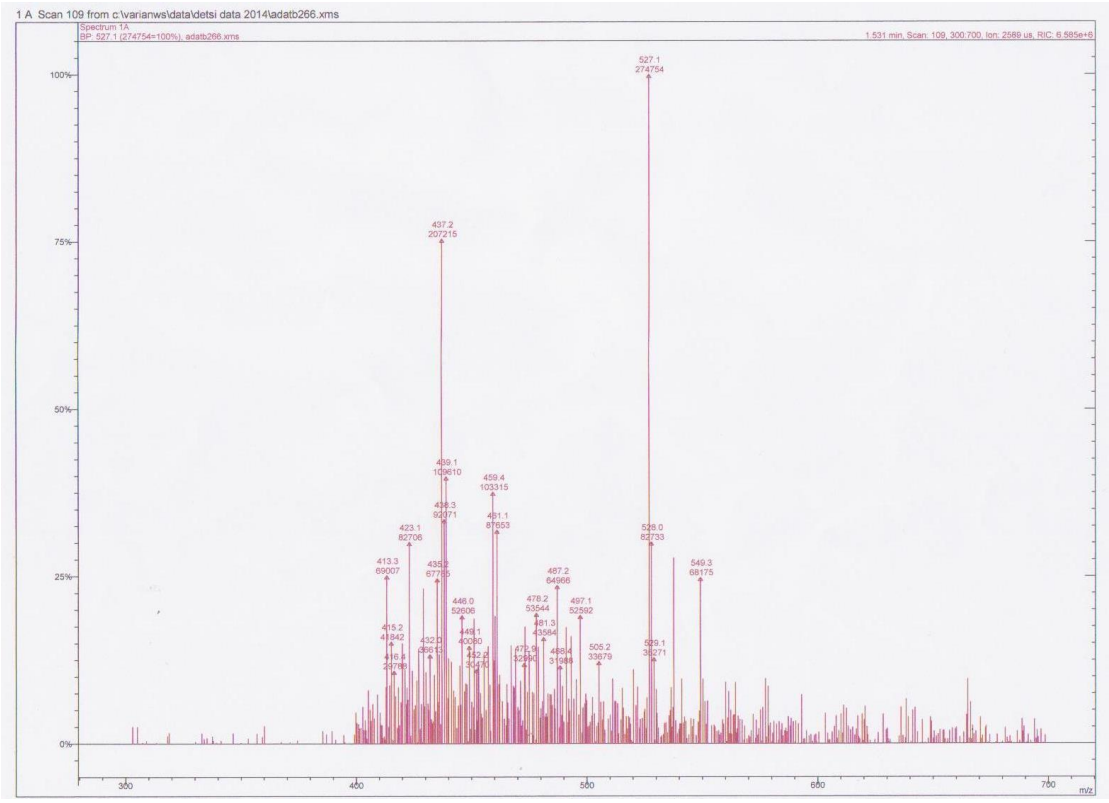
*Εικόνα 66: Φάσμα ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της ωρόνης **(11)***



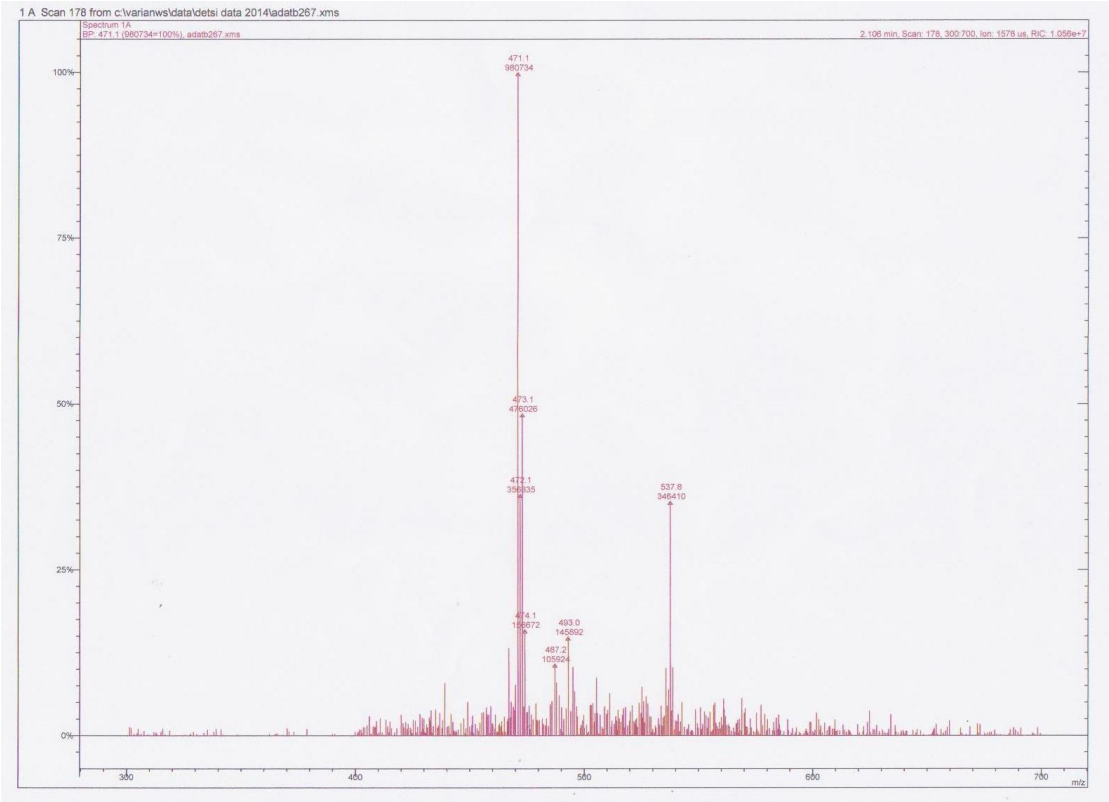
*Εικόνα 67: Φάσμα ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της ωρόνη **(12)***



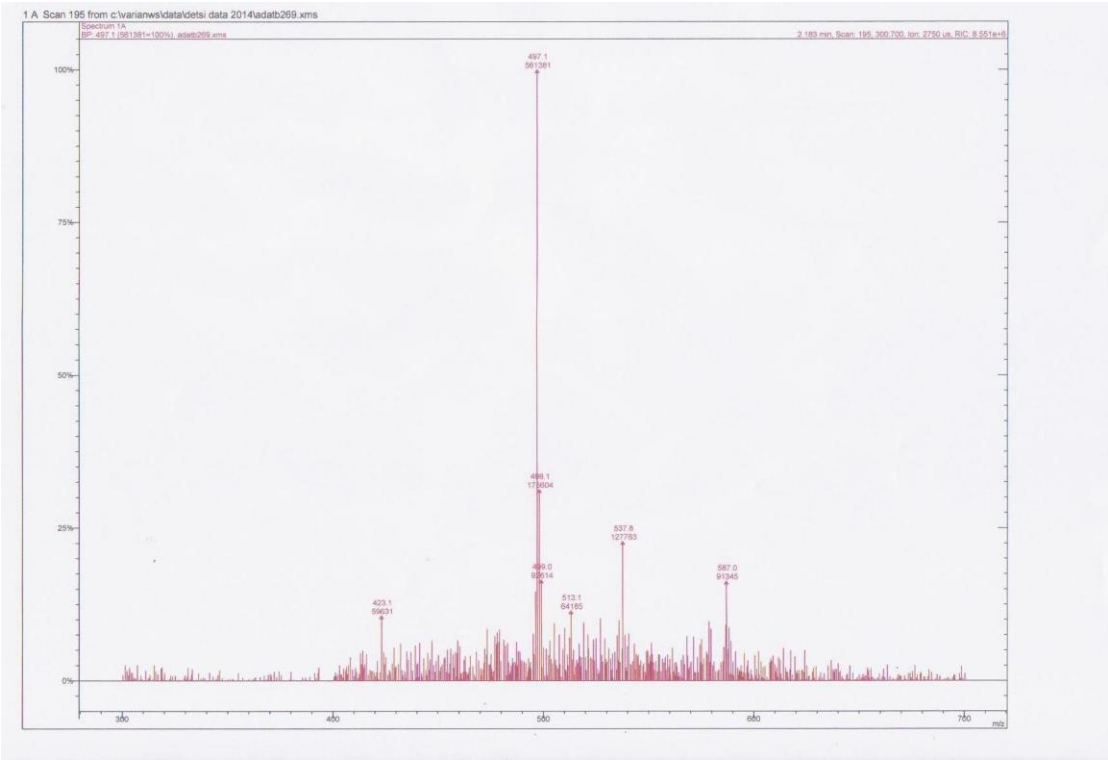
*Εικόνα 68: Φάσμα ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) της ωρόνη **(13)***



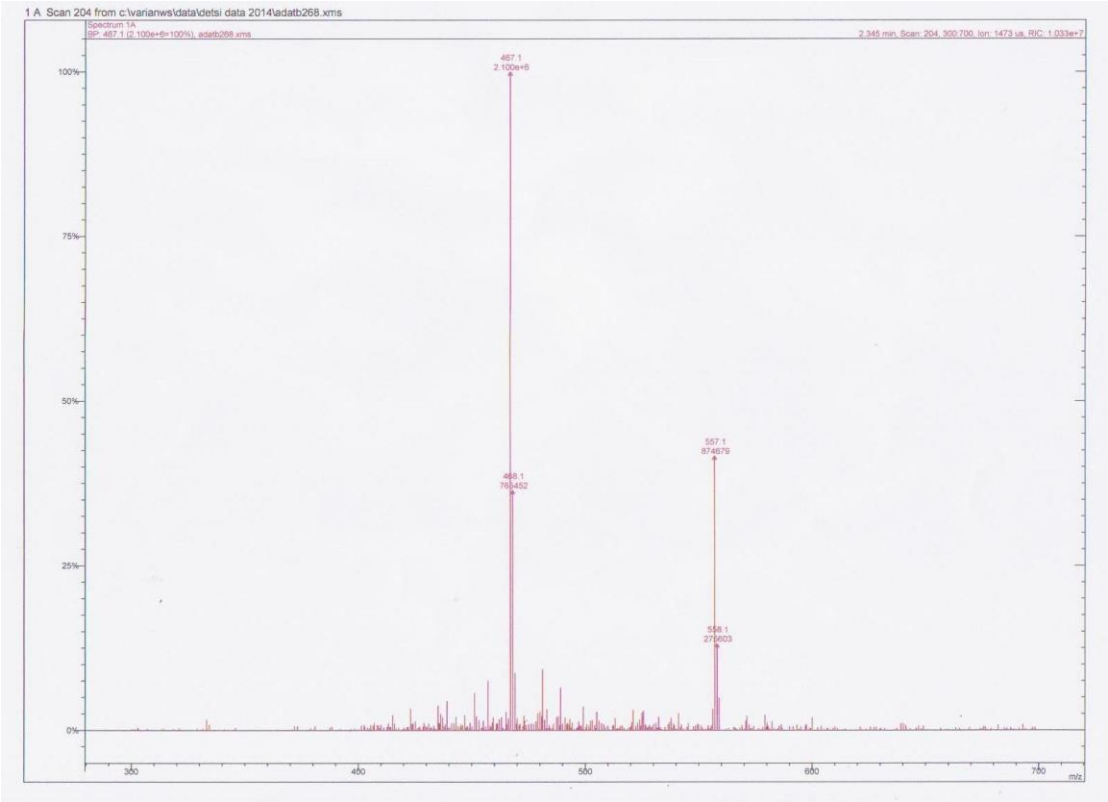
*Εικόνα 69: ESI –MS φάσμα της χαλκόνης **(7)***



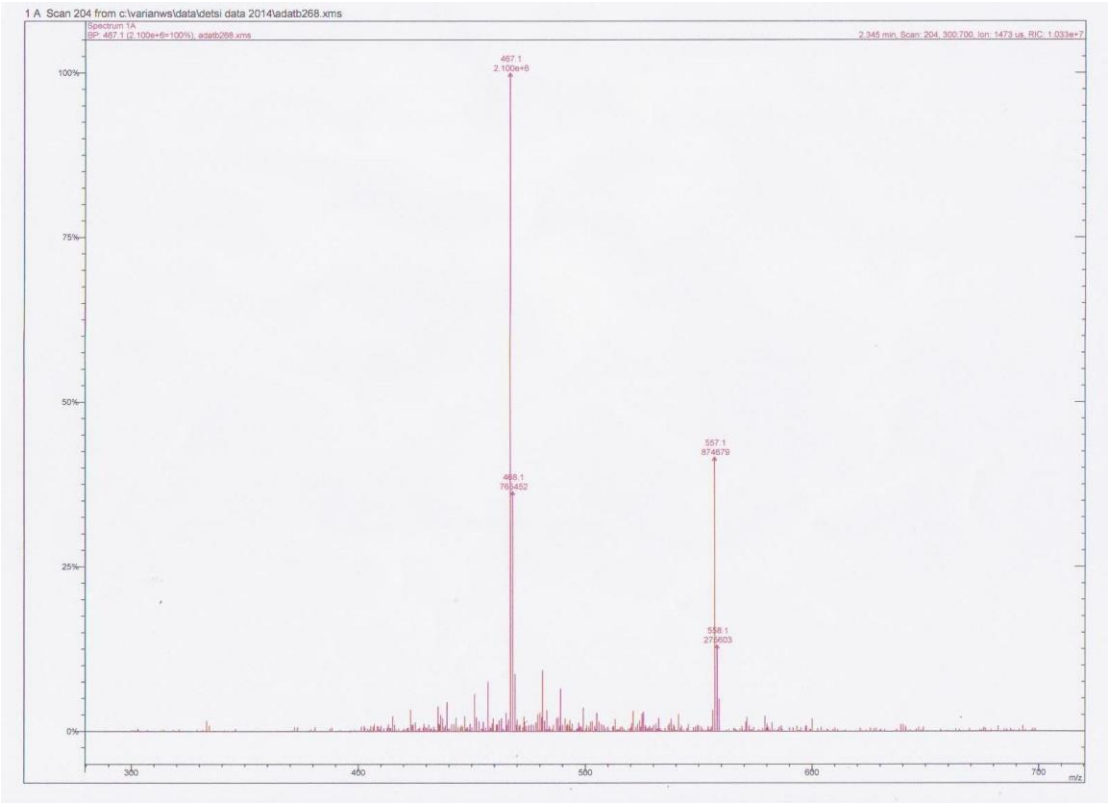
*Εικόνα 70: ESI –MS φάσμα της χαλκόνης **(8)***



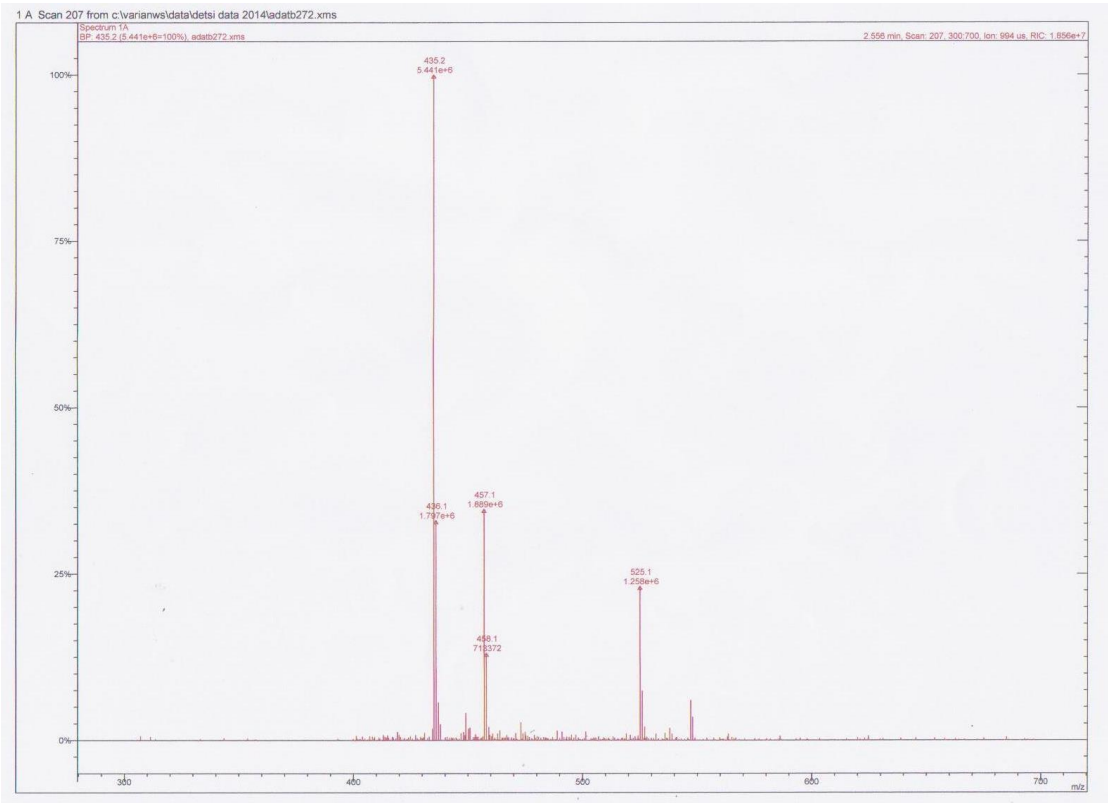
*Εικόνα 71: ESI –MS φάσμα της χαλκόνης **(9)***



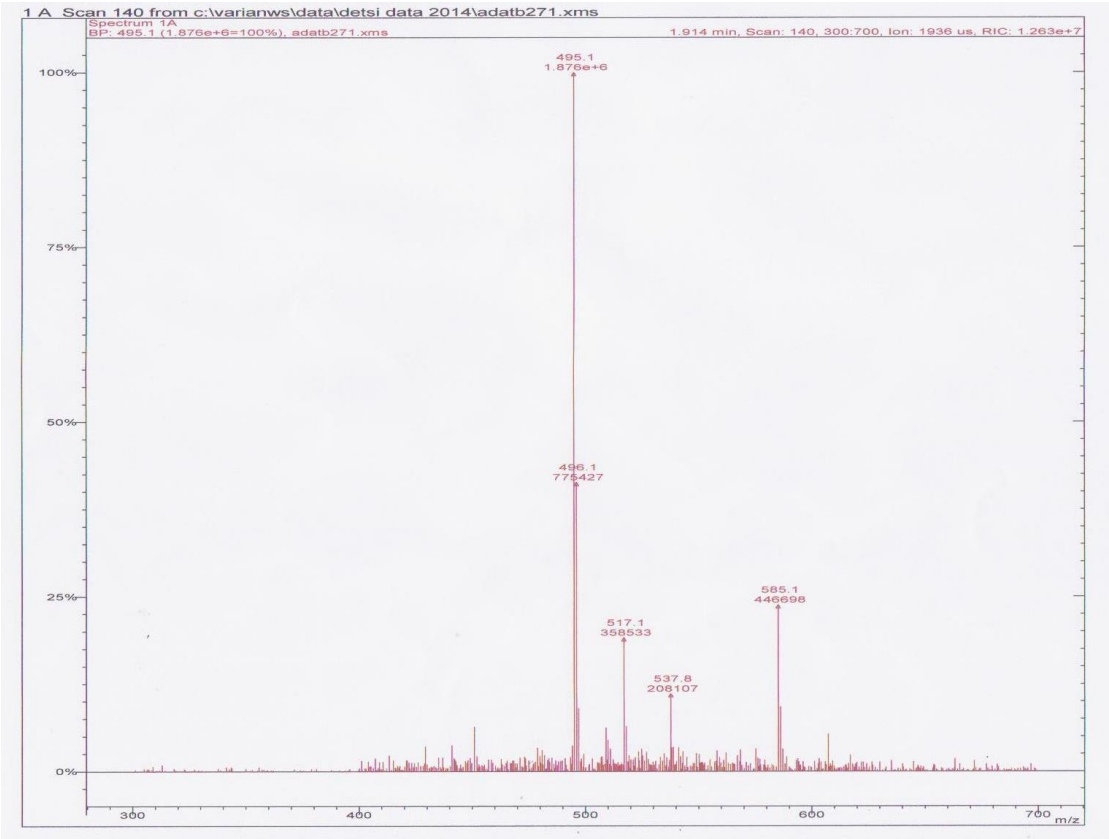
*Εικόνα 72: ESI –MS φάσμα της χαλκόνης **(10)***



*Εικόνα 73: ESI –MS φάσμα της ωρόνης **(11)***



*Εικόνα 74: ESI –MS φάσμα της ωρόνης **(12)***



*Εικόνα 75: ESI –MS φάσμα της ωρόνης **(13)***

Βιβλιογραφία

[1] B. A. Bohm, Introduction to Flavonoids, CRC Press, 1998.

[2] A. Francisco και J. Harborne, the Flavonoids -Advances in research since 1986, Chapman & Hall, 1994.

[3] O. Andersen και K. Markham , Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications, CRC Press/Taylor & Francis Group, 2005.

[4] E. Grotewold, The Science of Flavonoids, Springer, 2006.

[5] G. Di Carlo, N. Mascolo , A. Izzo και F. Capasso, «Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs,» *Life Sciences,* αρ. 65, pp. 337-353, 1999.

[6] E. Riboli και T. Norat, «Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk,» *American Journal of Clinical Nutrition,* αρ. 78, pp. 559S-569S, 2003.

[7] H. Liu, W. Jiang και M. Xie , «Flavonoids: recent advances as anticancer drugs,» *Recent Patents on Anticancer Drug Discovery,* αρ. 76, pp. 152-164, 2010.

[8] S. Prasad, K. Phromnoi , V. Yadav , M. Chaturvedi και B. Aggarwal, «Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer,» *Planta Medica,* αρ. 76, pp. 1044-1063, 2010.

[9] J. Gonzalez-Gallego, M. Garcia-Mediavilla, S. Sanchez-Campos και M. Tunon, «Fruit polyphenols, immunity and inflammation,» *British Journal of Nutrition,* τόμ. 104, αρ. 3, pp. S15-S27, 2010.

[10] A. Lugasi, J. Hovari , K. Sagi και L. Biro, *Acta Biologica Szegediensis,* αρ. 47, pp. 119-125, 2001.

[11] N. Cotelle, *Current Topics of Medicinal Chemistry,* αρ. 1, pp. 569-590, 2001.

[12] B. Yang, A. Kotani, K. Arai και F. Kusu, *Analytical Science,* αρ. 17, pp. 599-604, 2001.

[13] C. Kaur και H. Kapoor, *International Journal of Food Science and Technology,* αρ. 36, pp. 703-725, 2001.

[14] W. Bors, W. Heller, C. Michel και M. Saran , *Methods in Enzymology,* αρ. 13, pp. 572-584, 2002.

[15] A. Verma και R. Pratap, *Natural Products Reports,* αρ. 27, pp. 1571-1593, 2010.

[16] A. Verri, T. Vicentini, M. Baracat, S. Georgetti, D. Cardoso , M. Cunha , H. Ferreira, Q. Cunha, J. Fonseca και R. Casagrande, «Flavonoids as Anti-Inflammatory and Analgesic Drugs: Mechanisms of Action and Perspectives in the Development of Pharmaceutical Forms,» *Bioactive Natural Products,* αρ. 36, pp. 297-330, 2012.

[17] S. Robbins , V. Kumar, A. Abbas, R. Cotran και N. Fausto, Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2010, pp. 43-78.

[18] D. Porath, C. Riegger, J. Drewe και J. Schwager, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,* αρ. 112, pp. 1172-1180, 2005.

[19] A. Bowie και L. O' Neill, *Biochemical Pharmacology,* αρ. 59, pp. 13-23, 2000.

[20] J. W. Verri , T. Cunha, C. Parada, S. Poole, F. Cunha και Ferreira S.H., *Pharmacology and Therapeutics,* αρ. 112, pp. 116-138, 2006.

[21] R. Casagrande , S. Georgetti, J. W. Verri, D. Dorta, A. Dos Santos και M. Fonseca, *Journal of Photochemistry and Photobiology,* αρ. B84, pp. 21-27, 2006.

[22] B. Li, T. Fu, W. Gong, N. Dunlop, H. Kung, Y. Yan, J. Kang και J. Wang, *Immunopharmacology,* αρ. 49, pp. 295-306, 2000.

[23] S. Prasad, K. Phromnoi, V. Yadav, M. Chaturvedi και B. Aggarwal, *Planta Medica,* αρ. 10, pp. 1131-1133, 2010.

[24] C. Chen, W. Peng, K. Tsai και S. Hsu, *Life Sciencs,* αρ. 81, pp. 1602-1614, 2007.

[25] F. Meotti, R. Senthilmohan, D. Harwood, F. Missau, M. Pizzolatti και A. Kettle, *Free Radical Biology and Medicine,* αρ. 44, pp. 109-120, 2008.

[26] C. Chen, M. Chow, W. Huang, Y. Lin και Y. Chang, *Molecular Pharmacology,* αρ. 66, pp. 683-693, 2004.

[27] B. Burnett , Q. Jia, Y. Zhao και R. Levy, *Journal of Medicinal Food,* αρ. 10, pp. 442-451, 2007.

[28] M. Alam, M. Alam, S. Ahmad, A. Najmi, M. Asif και T. Jahangir, *Toxicological Mechanisms and Methods,* αρ. 20, pp. 572-578, 2010.

[29] P. Vasconcelos, M. Andreo, W. Vilegas, C. Hiruma-Lima και C. Pellizzon, *Journal of Ethnopharmacology,* αρ. 131, pp. 146-153, 2010.

[30] E. Herlaar και Z. Brown, *Molecular Medicine Today,* αρ. 5, pp. 439-447, 1999.

[31] L. Kilpatrick, S. Sun, H. Li, T. Vary και H. Korchak, *Journal of Leukocyte Biology,* αρ. 87, pp. 153-164, 2010.

[32] K. Bisht, K.-H. Wagner και A. Bulmer, «Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds,» *Toxicology,* αρ. 278, pp. 88-100, 2010.

[33] J. Kowalski , A. Samojedny, M. Paul, G. Pietsz και T. Wiczok, «Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha genes in J774.2 macrophages,» *Pharmacological Reports,* αρ. 57, pp. 390-394, 2005.

[34] C. Nicholas, S. Batra , M. Vargo, O. Voss, M. Gavrilin, M. Wewers, D. Guttridge, E. Grotewold και A. Doseff, «Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality in vivo and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF-kappaB through the suppression of p65 phosphorylation,» *Journal of Imunology,* αρ. 179, pp. 7121-7127, 2007.

[35] E. Park, S. Kum, C. Wang, S. Park, B. Kim και G. Schullr-Levis, «Anti-inflammatory activity of herbal medicines: inhibition of nitric oxide production and tumor necrosis factor=alpha secretion in an activated macrophage-like cell line,» *American Journal of Chinese Medicine,* αρ. 33, pp. 415-424, 2005.

[36] A. Xagorari, A. Papapetropoulos, A. Mauromatis, M. Economou, T. Fotsis και C. Roussos, «Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokineproduction in macrophages,» *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,* αρ. 296, pp. 181-187, 2001.

[37] J. Calixto, M. Campos, M. Otuki και A. Santos, «Anti0inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules,» *Planta Medica,* αρ. 70, pp. 93-103, 2004.

[38] L. Benett, S. Rojas και T. Seefeldt, «Role of Antioxidants in the Prevention of Cancer,» *Journal of Experimental and Clinical Medicine,* τόμ. 4, αρ. 4, pp. 215-222, 2012.

[39] J. Klaunig και L. Kamendulis, «The role of oxidative stress in carcinogenesis,»

Annual Review of Pharmacology and Toxicology, αρ. 44, pp. 239-267, 2004.

[40] N. Khan, F. Afaq και H. Mukhtar, «Cancer chemoprevention through dietary anti-oxidants progress and promise,» *Antioxidants and Redox Signaling,* αρ. 10, pp. 475-510, 2008.

[41] M. Valko, D. Leibfritz και J. Moncol, «Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease,» *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology,* αρ. 39, pp. 44-84, 2007.

[42] Reuter S., S. Gupta και M. Chaturvedi, «Oxidative stress, inflammation and cancer: how are they linked?,» *Free Radical Biology and Medicine,* αρ. 49, pp. 1603-1616, 2010.

[43] H. Yao, W. Xu, X. Shi και Z. Zhang, «Dietary flavonoids as cancer prevention agents,» *Journal of Environmental Science and Health, Part C- Environmental Carcinogenesis &Ecotoxicology Reviews,* αρ. 29, pp. 1-31, 2009.

[44] S. Katiyar, «Green tea prevents non-melanoma skin cancer by enhancing DNA repair,» *Archive of Biochemistry and Biophysics,* αρ. 508, pp. 152-158, 2011.

[45] D. Hou και T. Kumamoto, «Flavonoids as protein kinase inhibitors for cancer chemoprevention: direct and molecular modeling,» *Antioxidants and Redox Signaling,* αρ. 13, pp. 691-719, 2010.

[46] K. Jomova και M. Valko, «Advances in metal-induced oxidative stress and human disease,» *Toxicology,* αρ. 283, pp. 65-87, 2011.

[47] M. Cabrera , S. Macarena, G. Falchi, M. Lavaggi, O. Piro, E. Castellano, A. Vidal, A. Azqueta, A. Monge, A. Lopez de Cerain, G. Sagrera , G. Seoanne, H. Cerecetto και M. Gonzalez, «Synthetic chalcones, flavanones and flavones as antitumoral agents: biological evaluation and structure-activity relationships,» *Bioorganic & Medicinal Chemistry,* αρ. 15, pp. 3356-3367, 2007.

[48] J. Duarte, F. Perez-Vizcaino, J. Jimenez, J. Tamargo και A. Zarzuelo, «Flavonoids and cardiovascular diseases,» *Bioactive Natural Products (Part F), Studies in Natural Products Chemistry,* αρ. 25, pp. 565-605, 2001.

[49] G. Sagrera και G. Seoane, «Acidic rearrangement of (Benzyloxy) chalcones: A short synthesis of chamanetin,» *Synthesis,* αρ. 24, pp. 4190-4202, 2009.

[50] C. Hufford και B. Oguntimein, «Dihydorchalcones form Uvaria Angolensis,» *Phytochemistry,* αρ. 19, pp. 2036-2038, 1980.

[51] H. Nkunya, H. Weenen, C. Renner, R. Waibel και H. Achenbach, «Benzylated Dihydrochalcones from Uvaria Leptocladon,» *Phytochemistry,* τόμ. 32, αρ. 5, pp. 1297-1300, 1993.

[52] J. W. Lasswell και C. Hufford, «Cytotoxic C-benzylated flavonoids from Uvaria chamae,» *Journal of Organic Chemistry,* τόμ. 42, αρ. 8, pp. 1295-1302, 1977.

[53] J. Cole, S. Torrance, R. Wiedhopf, S. Arora και R. Bates, «Uvaretin, a new antitumor agent from Uvaria acuminate (Annonaceae),» *Journal of Organic Chemistry,* τόμ. 41, αρ. 10, pp. 1852-1855, 1976.

[54] C. Hufford και J. W. Lasswell, «Antimicrobial activities of contituents of Uvaria chamae,» *Lloydia,* τόμ. 41, αρ. 2, pp. 156-160, 1978.

[55] J. Galle, M. Leti, S. Kim και A. Mandeau, «Unusual benzylated flavonoids from Mitrella mesnyi (Pierre) Ban,» *Biochemical Systematics and Ecology,* αρ. 48, pp. 9-11, 2013.

[56] D. Huong , D. Luong, T. Thao και T. Sung, *Pharmazie,* αρ. 60, p. 627, 2005.

[57] M. Leboeuf , A. Cavé, P. Bhaumik, B. Mukherjee και R. Mukherjee, *Phytochemistry,* αρ. 21, p. 2783, 1980.

[58] H. Nkunya, *Pure Applications of Chemistry,* αρ. 77, p. 1943, 2005.

[59] M. Rahman , N. Qais και M. Rashid, «A ne C-benzylated chalcone from Desmos chinensis,» *Fitoterapia,* αρ. 74, pp. 511-514, 2003.

[60] L. Wirasathien, T. Pengsuparp, M. Moriyasu, K. Kawanishi και R. Suttirsi, «Cytotoxic C-benzylated chalcone and other constituents of Ellipeiopsis cherrevensis,» *Archives of Pharmacal Research,* τόμ. 29, αρ. 6, pp. 497-502, 2006.

[61] I.-K. Lee, C. Kim, K. Song, H.-M. Kim, I.-D. Yoo, H. Koshino, Y. Esumi και M. Uramoto, «Two benzylated dihydroflavonoids from Cudrania tricuspidata,» *Journal of Natural Products,* αρ. 58, pp. 1614-1617, 1995.

[62] I.-K. Lee, C.-J. Kim, K.-S. Song, H. Kim, H. Koshino, Y. Esumi, M. Uramoto και I.-D. Yoo, «Cytotoxic benzyl dihydroflavonols from Cudrania tricuspidata,» *Phytochemistry,* αρ. 41, pp. 213-216, 1996.

[63] Y. Choi, H. Kim και H.-D. Kim, «Synthesis and cytotoxic activities of C-benzylated flavonoids,» *Archives of Pharmacal Research,* τόμ. 32, αρ. 1, pp. 59-63, 2009.

[64] Y.-W. Kim, J. Hackett και R. Brueggemeier, *Journal of Medicinal Chemistry,* αρ. 47, pp. 4032-4040, 2004.

[65] B. Su, J. Hackett, E. Diaz-Cruz, Y.-W. Kim και R. Brueggemeier, «Lead optimization of 7-benzyloxy 2-(4'pyridylmethyl) thio isoflavone aromataseinhibitors,» *Bioorganic & Medicinal Chemistry,* αρ. 13, pp. 6571-6577, 2005.

[66] A. Sharma, B. Chakravarti, M. Gupt, J. Siddqui, R. Konwar και R. Tripathi, «Synthesis and anti-breast cancer activity of biphenyl based chalcones,» *Bioorganic & Medicinal Chemistry,* αρ. 18, pp. 4711-4720, 2010.

[67] R. Bridges και C. Esslinger, «The excitatory amino acid transporters" pharmacological insights on substrate and inhibitor specificity of the EAAT subtypes,» *Pharmacology & Therapeutics,* αρ. 107, pp. 271-285, 2005.

[68] B. Lebrun, M. Sakaitami, K. Shimamoto, Y. Ysuda-Kamatani και T. Nakajima, «New β-hydroxyaspartase derivatives are competitive blockers for the bovine glutamate/aspartete transporter,» *Journal of Biological Chemistry,* αρ. 272, pp. 20336-20339, 1997.

[69] K. Shimamoto, B. Lebrun, Y. Yasuda-Kamatani, M. Sakaitani, Y. Shigeri και Yomoto N., «DL-threo-B-benzyloxyaspartate, a potent blocker of excitatory amino acid transporters,» *Molecular Pharmacology,* αρ. 53, pp. 195-201, 1998.

[70] K. Shimamoto , R. Sakai, K. Takaoka, N. Yumoto, T. Nakajima και S. Amara, «Characterization of novel L-threo-b-benzoxyaspartate derivatives, potent blockers of glutamate transporters,» *Molecular Pharmacology,* αρ. 65, pp. 1008-1015, 2004.

[71] Z. Nowakowska, «A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones,» *European Journal of Medicinal Chemistry,* αρ. 42, pp. 125-137, 2007.

[72] R. Prasath, P. Bhavana, S. Sarveswari, S. Weng Ng και R. Tiekink, «Efficient ultrasound-assisted synthesis, spectroscopic, crystallographic and biological investigations of pyrazole-apended quinolinyl chalcones,» *Journal of Molecular Structure,* αρ. 1081, pp. 201-210, 2015.

[73] V. Calvino, M. Picallo, A. Lopez-Peinado, R. Martin-Aranda και C. Duran-Valle, «Ultrasound accelerated Claisen-Schmidt condensation: A green route to chalcones,» *Applied Surface Science,* τόμ. 252, pp. 6071-6074, 2006.

[74] F. Dong, C. Jian, G. Zhenghao , G. Kai και L. Zuliang, «Synthesis of chalcones via Claisen-Schmidt condensation reaction catalyzed by acyclic ionic fluids,» *Catalysis Communications,* αρ. 9, pp. 1924-1927, 2008.

[75] K. Srivastava, «Ecofriendly microwave assisted synthesis of some chalcones,» *Rasayan Journal of Chemistry,* τόμ. 1, αρ. 4, pp. 884-886, 2008.

[76] M. Ahmad, V. Sastry, N. Bano και S. Anwar, «Synthesis of novel chalcone derivatives by conventional and microwave irradiation methods and their pharmacological activities,» *Arabian Journal of Chemistry,* 2011.

[77] S. Eddarir, N. Cotelle, Y. Bakkour και C. Rolando, «An efficient synthesis of chalcones based on the Suzuki reaction,» *Tetrahedron Letters,* αρ. 44, pp. 5359-5363, 2003.

[78] X.-S. Fan και Y.-M. Zhang, «A simple access to chalcones via modified Mukaiyama aldol condensation promoted by SmI3/TMSCl,» *Chinese Journal of Chemistry,* αρ. 20, pp. 198-201, 2002.

[79] S. Nielsen, M. Larsen, T. Boesen, K. Schonning και H. Kromann, *Journal of Medicinal Chemistry,* αρ. 48, pp. 2667-2677, 2005.

[80] S. Nielsen, T. Boesen, M. Larsen, K. Schonning και H. Kromann, *Bioorganic & Medicinal Chemistry,* αρ. 12, pp. 3047-3054, 2004.

[81] A. Joshi, X.-C. Li, A. Nimrod, H. El Sohly, L. Walker και A. Clark, *Planta Medica,* αρ. 67, pp. 186-188, 2001.

[82] T. Mashado, I. Leal, R. Kuster, A. Amaral, V. Kokis, M. de Silva και K. Santos, *Phytotherapy Research,* αρ. 19, pp. 519-525, 2005.

[83] G. Belofsky, D. Percivill, K. Lewis, G. Tegos και J. Ekart, *Journal of Natural Products,* αρ. 67, pp. 481-484, 2004.

[84] R. Tsukiyama, H. Katsura, N. Tokuriki και M. Kobayashu, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* αρ. 46, pp. 1226-1230, 2002.

[85] A. Friis-Moller, M. Chen, K. Fuursted, S. Christensen και A. Kharazmi, *Planta Medica,* αρ. 68, pp. 416-419, 2002.

[86] Y.-M. Lin, Y. Zhou, M. Flavin, L. Zhou, W. Nie και F.-C. Chen, *Bioorganic & Medicinal Chemistry,* αρ. 10, pp. 2795-2802, 2002.

[87] M. Chen, L. Zhai, S. Christensen, T. Theander και A. Kharazmi, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* αρ. 45, pp. 2023-2029, 2001.

[88] L. Zhai, M. Chen, J. Blom, T. Thender, S. Christensen και A. Kharazmi, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* αρ. 43, pp. 793-803, 1999.

[89] S. Nielsen, A. Kharazmi και S. Christensen, *Bioorganic & Medicinal Chemsitry,* αρ. 6, pp. 937-945, 1998.

[90] L. Troeberg, X. Chen, T. Flaherty, R. Morty, M. Cheng, H. Hua, C. Springer, J. McKerrow, G. Kenyon, J. Lonsdale-Eccles, T. Coetzer και J. Cohen, *Molecular Medicine,* αρ. 6, pp. 660-669, 2000.

[91] V. Ram, A. Saxena, S. Srivastana και S. Chandra, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,* αρ. 10, pp. 2159-2161, 2000.

[92] M. Liu, P. Wilairat, M.-L. Go και M. Liu , *Journal of Medicinal Chemotherapy,* αρ. 44, pp. 4443-4452, 2001.

[93] M.-L. Go, M. Liu, P. Wilairat, P. Rosenthal, K. Saliba και K. Kirk , *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* αρ. 48, pp. 3241-3245, 2004.

[94] J. Dominguez, C. Leon, J. Rodrigues, N. Gamboa de Dominguez, J. Gut και P. Rosenthal, *Journal of Medicinal Chemistry,* αρ. 48, pp. 3654-3658, 2005.

[95] M. Chen, S. Christensen, L. Zhai, M. Rasmussen, T. Theander, S. Frokjaer, B. Steffansen, J. Davidsen και A. Kharazmi, *Journal of Infectional Diseases,* αρ. 176, pp. 1327-1333, 1997.

[96] S. Frolich, C. Schubert, U. Bienzle και K. Jenett-Siems, *Journal of Antimicrobial Chemistry,* αρ. 55, pp. 883-887, 2005.

[97] R. Li , G. Kenyon , F. Cohen, X. Chen , B. Gong, J. Dominguez, E. Davidson, G. Kurzban, R. Miller, E. Nuzum, P. Rosenthal και J. McKerrow, *Journal of Medicinal Chemistry,* αρ. 38, pp. 5031-5037, 1995.

[98] S. Lopez, M. Castelli, S. Zacchino, J. Dominguez, G. Lobo, J. Charris, J. Coetrs, J. Ribas , C. Devia, A. Rodrigues και R. Enriz, *Bioorganic & Medicinal Chemistry,* αρ. 9, pp. 1999-2013, 2001.

[99] H. El Sohly, A. Joshi, A. Nimrod, L. Walker και A. Clark, *Planta Medica,* αρ. 67, pp. 87-89, 2001.

[100] L. Svetaz, A. Tapia, S. Lopez, R. Furlan, E. Petenatti, R. Pioli, G. Schmeda-Hirschmann και S. Zacchino, *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* αρ. 52, pp. 3297-3300, 2004.

[101] A. Okunade , D. Hufford, A. Clark και D. Lentz, *Phytotherapy Research,* αρ. 11, pp. 142-144, 1997.

[102] G. Sagrera, A. Bertucci, A. Vazquez και G. Seoane, «Synthesis and antinfungal activities of natural and synthetic biflavonoids,» *Bioorganic & Medicinal Chemsitry,* αρ. 19, pp. 3060-3073, 2011.

[103] J.-H. Wu, X.-H. Wang, Y.-H. Yi και K.-H. Lee, «Anti-AIDS agents 54. A potent Anti-HIV chalcone and flavonoids from Genus Desmos,» *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,* αρ. 13, pp. 1812-1815, 2003.

[104] K. Nakagawa-Goto και K.-H. Lee , «Anti-AIDS agents 68. The first total sytnhesis of a unique potent anti-HIV chalcone from genus Desmos,» *Tetrahedron Letters,* αρ. 47, pp. 8263-8266, 2006.

[105] H.-X. Xu, M. Wan, H. Dong, P. But και L. Foo, *Biological & Pharmaceutical Bulletin,* αρ. 23, pp. 1072-1076, 2003.

[106] G. Casano, A. Dumétre , C. Pannecouque, S. Hutter, N. Azas και M. Robin, «Anti-HIV and antiplasmodian activity of original flavonoid derivatives,» *Bioorganic & Medicinal Chemistry,* αρ. 18, pp. 6012-6023, 2010.

[107] J. Rojas, J. Dominquez, J. Charris, G. Lobo, M. Paya και M. Ferrandiz, *European Journal of Medicinal Chemsitry,* αρ. 37, pp. 699-705, 2002.

[108] J. Rojas, M. Paya, J. Dominguez και M. Ferrandiz, *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* αρ. 465, pp. 183-189, 2003.

[109] A. Daikonya, S. Katsuki και S. Kitanaka, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin,* αρ. 52, pp. 1326-1329, 2004.

[110] S. Vogel , M. Barbic, G. Jurgenliemk και J. Heilmann, «Synthesis, cytotoxicity, anti-oxidative and anti-inflammatory activity of chalcones and influence of A-ring modifications on the pharmacological effect,» *European Journal of MEdicinal Chemistry,* αρ. 45, pp. 2206-2213, 2010.

[111] E. Venkateswararao, K. Sharma, K.-C. Lee, N. Sharma , S.-H. Parks, Y. Kim και S. Jung, «A SAR study on a series of synthetic lipophilic chalcones as inhibitor of transcription factor NF-κB,» *European Journal of Medicinal Chemistry,* αρ. 54, pp.

379-386, 2012.

[112] A. Detsi, M. Majdalani, C. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina και P. Kefalas, «Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity,» *Bioorganic & Medicinal Chemistry,* αρ. 17, pp. 8073-8085, 2009.

[113] B. Bandgar , S. Patil, R. Gacche, B. Korbad, B. Hote, S. Kinkar και S. Jalde, «Synthesis and biological evaluation of nitrogen-containing chalcones as possible anti-inflammatory and antioxidant agents,» *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,* αρ. 20, pp. 730-733, 2010.

[114] H.-M. Yang, H.-R. Shin, S.-H. Cho, S.-C. Bang, G.-Y. Song, J.-H. Ju, M.-K. Kim, S.-H. Lee, J.-C. Ryu, Y. Kim και S.-H. Jung, «Structural requirement of chalcones for the inhibitory activity of interleukin-5,» *Bioorganic & Medicinal Chemistry,* αρ. 15, pp. 104-111, 2007.

[115] O. Nerya, R. Musa, S. Khatib, S. Tamir και J. Vaya, «Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers,» *Phytochemistry,* αρ. 65, pp. 1389-1395, 2004.

[116] S. Khatib, O. Nerya, R. Musa , M. Shmuel, S. Tamir και J. Vaya , «Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the importance of a 2,4-substituted moiety,» *Bioorganic & Mediicnal Chemistry,* αρ. 13, pp. 433-441, 2005.

[117] R. Anto, K. Sukumaran, G. Kuttan, M. Rao, V. Subbaraju και R. Kuttan, «Anticancer and antioxidant activity of synthetic chalcones and related compounds,» *Cancer Letters,* αρ. 97, pp. 33-37, 1995.

[118] B. Bandgar, S. Gawande, R. Bodade, j. Totre και C. Khobragade, «Synthesis and biological evaluation of simple methoxylated chalcones as anticancer, anti-inflammatory and antioxidant agents,» *Bioorganic & Medicinal Chemistry,* αρ. 18, pp. 1364-1370, 2010.

[119] M. Nagaraju, E. Gnana Deepthi, C. Ashwini , M. Vishnuvardhan, V. Lakshma Nayak, R. Chandra, S. Ramakrishna και B. Gawali, «Synthesis and selective cytotoxic activity of novel hybrid chalcones against prostate cancer cells,» *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,* αρ. 12, pp. 4314-4317, 2012.

[120] J. Mojzis, L. Varinska, G. Mojzisova, I. Kostova και L. Mirossay, «Antioangiogenic effects of flavonoids and chalcones,» *Pharmacological Research,* αρ. 57, pp. 259-

265, 2008.

[121] N. Nam, Y. Kim, Y. You, D. Hong, H. Kim και B. Ahn, «Cytotoxic 2',5'-dihydroxychalcones with unexpected antiangiogenic activity,» *European Journal of Medicinal Chemistry,* αρ. 38, pp. 179-187, 2003.

[122] E. Bertl, H. Becker, T. Eicher, C. Herhaus, G. Kapadia, H. Bartch και C. Gerhauser, «Inhibition of endothelial cell fnction by novel potential cancer chemopreventive agents,» *Biochemical and Biophysical Research,* αρ. 325, pp. 287-295, 2004.

[123] Y. Lee, S. Lim, K. Shin, Y. Kim, K. Ohuchi και S. Jung, «Antioangiogenic and anti-tumor activities of 2'-hydroxy-4'-methoxy-chalcone,» *Biological & Pharmaceutical Bulletin,* αρ. 29, pp. 1028-1031, 2006.

[124] X. Zhu, B. Xie, J. Zhou, G. Feng, Z. Liu, X. Wei, F. Zhang, M. Liu και Y. Zeng, «Blackade of vascular endothelial growth factor receptor signal pathway and antitumor activity of ON-III (2',4' -dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone), a component from Chinese herbal medicine,» *Molecular Pharmacology,* αρ. 67, pp. 1444-1450, 2005.

[125] B. Kupcewicz, A. Jarzecki, M. Malecka, U. Krajewska και M. Rozalski, «Cytotoxic activity of substituted chalcones in terms of molecular electronic properties,» *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,* αρ. 24, pp. 4260-4265, 2014.

[126] T. Nakayama, «Enzymology of Aurone Biosynthesis,» *Journal of Bioscience and Biotechnology,* τόμ. 94, αρ. 6, pp. 487-491, 2002.

[127] S. Shin , M. Shin , J.-C. Shin, K.-T. Lee και Y. Lee, «Synthesis of aurones and their inhibitory effects on nitric oxide and PGE2 productions in LPS-induced RAW 264.7 cells,» *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,* αρ. 21, pp. 4520-4523, 2011.

[128] M. Sousa, J. Berthet, S. Delbaere και P. Coelho, «One pot synthesis of aryl substituted aurones,» *Dyes and Pigments,* αρ. 92, pp. 537-541, 2011.

[129] R. Varma και M. Varma , «Alumina -mediated condensation. A simple synthesis of aurones,» *Tetrahedron Letters,* τόμ. 33, αρ. 40, pp. 5937-5940, 1992.

[130] D. Villemin, B. Martin και N. Bar, «Application microwave in organic synthesis. Dry synthesis of 2 -arylmethylene -3(2) -napthofuranones,» *Molecules,* αρ. 3, pp. 88-93, 1998.

[131] H. Sekizaki, «Synthesis of 2 -benzylidene - 3(2H) -benzofuran -3-ones (aurones) by oxidation of 2'-hydroxychalcones with mercury (II) acetate,» *Bulletin of Chemical Society of Japan,* αρ. 61, pp. 1407-1409, 1988.

[132] P. Thanigaimalai, H.-M. Yang, V. Sharma, Y. Kim και S.-H. Jung, «The scope of thallium nitrate oxidative cyclization of chalconesq synthesis and evaluation of isoflavone and aurone analogs for their inhibitory activity against interleukin-5,» *Bioorganic & Medicinal Chemistry,* αρ. 18, pp. 4441-4445, 2010.

[133] J. Donnelly, M. Fox και T. Sharma, «Generalisation of the Wheeler aurone synthesis,» *Tetrahedron,* αρ. 35, pp. 875-879, 1979.

[134] J. Donnelly και G. Emerson, «Amine -effected cyclization of chalcone dihalides to aurones,» *Tetrahedron,* τόμ. 46, αρ. 20, pp. 7227-7236, 1990.

[135] G. Bose , E. Mondal, A. Khan και M. Bordoloi, «An environmentally benign synthesis of aurones and flavones from 2' acetychalcones using n-tetrabutylammonium tribromide,» *Tetrahedron Letters,* αρ. 42, pp. 8907-8909, 2001.

[136] I. Hawkins και S. Handy, «Synthesis of aurones under neutral conditions using deep eutectic solvent,» *Tetrahedron,* αρ. 69, pp. 9200-9204, 2013.

[137] H. Harkat, A. Blanc , J.-M. Weibel και P. Pale, «Versatile and expeditious sunthesis of aurones via Au-catalysed cyclization,» *Journal of Organic Chemistry,* αρ. 73, pp. 1620-1623, 2008.

[138] N. Mai, N. Hai, D. Phu, P. Trong και N. Nhan , «Three new geranyl aurones from the leaves of Artocarpus altilis,» *Phytochemistry,* αρ. 5, pp. 947-650, 2012.

[139] F. Souard , S. Okombi , C. Beney , S. Chevalley, A. Valentin και A. Boumendjel, «1-Azaaurones derived from the naturally ocurring aurones as potential antimalarial drugs,» *Bioorganic & Medicinal Chemistry,* αρ. 18, pp. 5724-5731, 2010.

[140] N. Lawrence, D. Rennison , A. McGown και J. Hadfield , «The Total Synthesis of an Aurone Isolated from Uvaria hamiltonii: Aurones and Flavones as Anticancer Agents,» *Bioorganic & Medicinal Chemistry,* αρ. 13, pp. 3759-3763, 2003.

[141] H. Bayir, «Reactive Oxygen Species,» *Critical Care Medicine,* τόμ. 33, αρ. 12, pp. 498-501, 2005.

[142] B. Halliwell, «Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry,

and role in human disease,» *The American Journal of Medicine,* αρ. 91, pp. 14-22, 1991.

[143] G. Buonocore, S. Perrone και M.-L. Tataranno, «Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species,» *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine,* αρ. 15, pp. 186-190, 2010.

[144] A. Bast, G. Haenen και C. Doelman, «Oxidants and antioxidants: State of the Art,» *The American Journal of Medicine,* τόμ. 91, αρ. 2, pp. 2-13, 1991.

[145] S. H., «Oxidative stress: from basic research to clinical application,» *The American Journal of Medicine,* τόμ. 91, αρ. 3, pp. 31-38, 1991.

[146] L. Castro και B. Freeman, «Reactive oxygen species in human health and disease,» *Nutrition,* αρ. 17, pp. 161-165, 2001.

[147] H. Seifried, D. Andersen, E. Fisher και J. Milner, «A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species,» *Journal of Nutritional Biochemistry,* αρ. 18, pp. 567-579, 2007.

[148] J. McMurry, Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2013.

[149] P. Molineux, «The use of the stable free radical diphenylpicryl -hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity,» *Songklanakarin Journal of Science and Technology,* τόμ. 26, αρ. 2, pp. 211-219, 2004.

[150] B. Lakshmi, J. Tilak, S. Ahikari, T. Devasagayam και K. Janardhanan, «Inhibition of lipid peroxidation induced by γ -radiation and AAPH in rat liver and brain mitochondria by mushrooms,» *Current Science,* τόμ. 88, αρ. 3, pp. 484-488, 2005.

[151] M. Gutteridge , «Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage,» *Clinical Chemistry,* τόμ. 41, αρ. 12, pp. 1819-1828, 1995.

[152] B. Halliwell και S. Chirico, «Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance,» *The American Journal of Clinical Nutrition,* αρ. 57, pp. 715-725, 1993.

[153] S. Betigeri, A. Thakur και K. Raghavan, «Use if 2,2' -azobis (2 -amidinopropane) dihydrochloride as a reagent tool for evaluation of oxidative stability of drugs,» *Pharmaceutical Research,* τόμ. 22, αρ. 2, pp. 310-317, 2005.

[154] G. Leelaprakash, Rose J.C. και S. Dass, «In vitro anti-inflammatory activity of Mormodica Charantia by inhibition of lipoxygenase enzyme,» *International*

Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, τόμ. 4, αρ. 1, pp. 148-152, 2012.

[155] Pontiki E. και D. Hadjipavlou -Litina, «Synthesis and pharmacochemical evaluation of novel aryl-acetic acid inhibitors of lipoxygenase, antioxidants and anti-inflammatory agents,» *Bioorganic & Medicinal Chemistry,* αρ. 15, pp. 5819-5827, 2007.

[156] O. Werz και D. Steinhilber, «Therapeutic option for 5-lipoxygenase inhibitors,» *Pharmacology & Therapeutics,* αρ. 112, pp. 701-718, 2006.

[157] A. Di Gennaro και J. Haeggstrom, «ChapterTwo - The leukotrienes: Immune - modulating lipid mediators of disease,» *Advances in Immunology,* αρ. 116, pp. 51-92, 2012.

[158] S. Drewes και S. van Vuuren, «Antimicrobial acylphloroglucinols and dibenzyloxy flavonoida from flowers of Helichrysum gymnococum,» *Phytochemistry,* αρ. 69, pp. 1745-1749, 2008.

[159] M. Mizuno, H. Kojima, T. Tanaka, M. Iinuma, R. Kimura, M. Zhi-Da και H. Murata, «Phenolic constituents from seeds of Coptis Japonica var. Dissecta,» *Phytochemistry,* τόμ. 26, αρ. 7, pp. 2071-2074, 1987.

[160] G. Thirunarayanan, M. Gopalakrishnan και G. Vanangamudi, «IR and NMR spectral studies of 4 -bromo -1 -napthyl chalcones - assessment of substituent effects,» *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy,* αρ. 67, pp. 1106-1112, 2007.

[161] C. Beney, A.-M. Mariotte και A. Boumendjel, «An efficient synthesis of 4,6 - dimethoxyaurones,» *Heterocycles,* αρ. 55, pp. 967-972, 2001.

[162] K. Thakkar και M. Cushman, «A novel oxidative cyclization of 2' - hydroxychalcones to 4,5 -dialkoxyaurones by thallium (III) nitrate,» *Journal of Organic Chemistry,* αρ. 60, pp. 6499-6510, 2005.

[163] H.-M. Sim, C.-Y. Lee, P. Ee και M.-L. Gip, «Dimethoxyaurones: Potent inhibitors of ABCG2 (breast cancer resistance protein),» *European Journal of pharmaceutical sciences,* αρ. 35, pp. 293-306, 2008.