



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ Ι ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΝΕΑ ΥΒΡΙΔΙΚΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΚΟΥΜΑΡΙΝΩΝ-ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΜΕ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΔΡΑΣΗ



ΣΠΟΥΔΑΣΤΗΣ:
ΣΧΟΙΝΑ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:
ΔΕΤΣΗ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ,
ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2015

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική, μου έδωσε τη δυνατότητα να ασχοληθώ και να γνωρίσω ένα μικρό κομμάτι του θαυμαστού κόσμου της Οργανικής Συνθετικής Χημείας. Το κυριότερο ωστόσο όφελος μου ήταν η εμπειρία που απέκτησα αλλά και η δυνατότητα ανάπτυξης της κριτικής επιστημονικής σκέψης.

Όπως κάθε ολοκληρωμένη επιστημονική εργασία, και η παρούσα μελέτη απαιτήσε την επίβλεψη και καθοδήγηση ορισμένων ανθρώπων τους οποίους θα ήθελα να αναφέρω και να ευχαριστήσω.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα, Δρ. Αναστασία Δέτση, Επίκουρο Καθηγήτρια ΕΜΠ, η οποία μου πρόσφερε την ευκαιρία να ασχοληθώ με την έρευνα, σε εργαστηριακό επίπεδο, στο πεδίο της σύνθεσης οργανικών μορίων. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την εμπιστοσύνη που μου επέδειξε και την πολύτιμη καθοδήγηση της καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής αυτής εργασίας, τόσο σε γνωστικό όσο και σε εργαστηριακό επίπεδο. Χωρίς τη βοήθεια και τις πολύτιμες υποδείξεις της, η εργασία αυτή δε θα μπορούσε να ολοκληρωθεί.

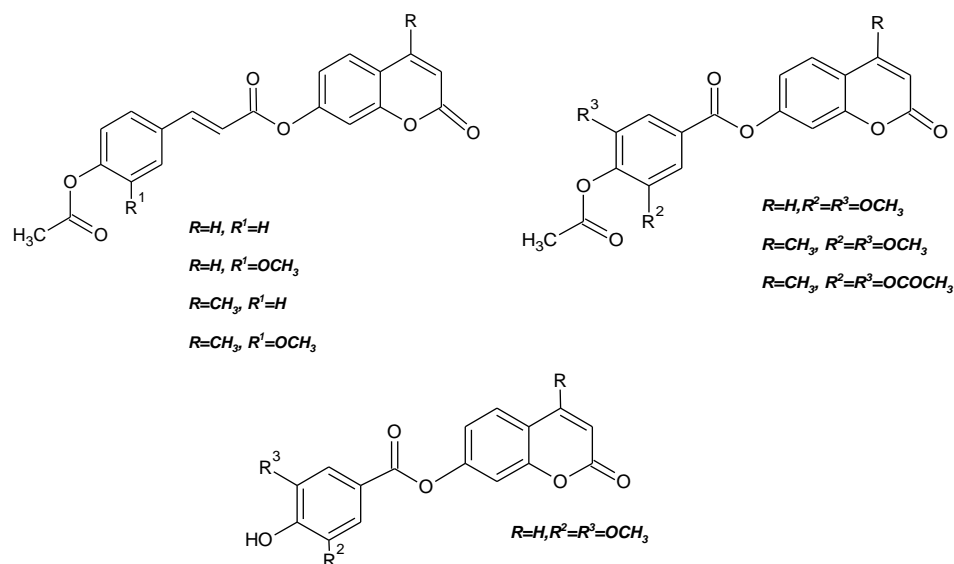
Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στην Ελένη Καβέτσου, Υποψήφια Διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ΕΜΠ, για την στήριξη της τόσο σε επιστημονικό όσο και σε ανθρώπινο επίπεδο. Την ευχαριστώ για τη συνεχή παρότρυνσή της και το ενδιαφέρον της, την ηθική στήριξή της, τις γνώσεις που μου μετέδωσε και την άψογη συνεργασία μας.

Θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω επιπλέον τους, Ανδρομάζη Τζάνη, Υποψήφια Διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ΕΜΠ, και Ζαμπία Κατσανεβάκη ΕΕΔΙΠ (II) του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας του ΕΜΠ, για την σημαντική βοήθεια και υποστήριξη που μου παρείχαν και για την πραγματικά φιλική ατμόσφαιρα που δημιούργησαν καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος από τα βάθη της καρδιάς μου, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς και στα αδέρφια μου για την αγάπη, την υποστήριξη, την προτροπή και την αισιοδοξία τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η σύνθεση υβριδικών μορίων που περιέχουν το δομικό σκελετό δύο φαρμακοφόρων ενώσεων. Ως αποτέλεσμα, τα υβριδικά μόρια που συντέθηκαν συνδυάζουν το δομικό σκελετό των κουμαρινικών ενώσεων 7-υδροξυκουμαρίνη και 4-μεθυλο 7-υδροξυκουμαρίνη και μιας σειράς από τα πιο διαδεδομένα φυσικά φαινολικά οξέα, του p-κουμαρικού, φερουλικού, συριγγικού και γαλλικού οξέος, με μεγάλη πιθανότητα να παρουσιάζουν ισχυρή συνδυασμένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση συγκριτικά με τα πρόδρομα μόρια.



Οι κουμαρίνες αποτελούν παράγωγα των α-βενζοπυρανίων και έχουν σημαντικό συνθετικό ενδιαφέρον λόγω της βιολογικής δραστηρότητάς τους. Η βασική δομή τους είναι χαρακτηριστική σε πλήθος φυσικών προϊόντων και συνθετικών αναλόγων που παρουσιάζουν βιολογική δράση. Τα φαινολικά οξέα είναι δευτερογενείς αρωματικοί μεταβολίτες ευρέως διαδεδομένοι στο φυτικό βασίλειο. Τα ανάλογα των φαινολικών οξέων έχουν μελετηθεί κυρίως ως προς την προστατευτική δράση τους απέναντι στις οξειδωτικές βλάβες που οδηγούν σε πλήθος εκφυλιστικών ασθενειών, όπως οι φλεγμονές και ο καρκίνος.

Τα μόρια που συντέθηκαν μελετήθηκαν για την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση τους σε τρεις *in vitro* δοκιμασίες: ι) αλληλεπίδραση των ενώσεων με την ελεύθερη σταθερή ρίζα του 1,1-διφαινυλο-πικρυλυδραζυλίου (DPPH), ιι) αναστολή της λιπιδικής

υπεροξειδωσης του λινολεϊκού οξέος η οποία προκαλείται από τη ρίζα AAPH και ιι) αναστολή της δράσης του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια.

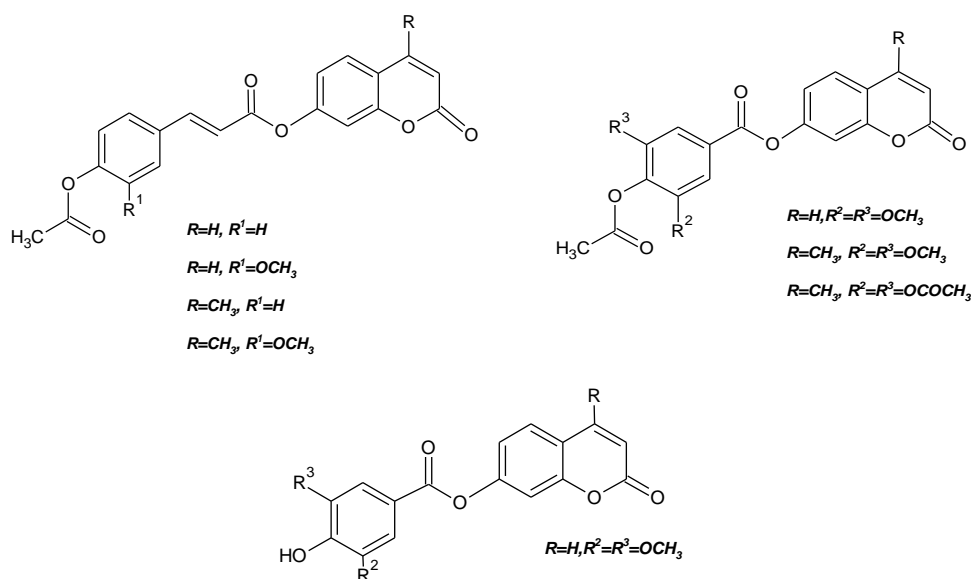
Η βιοδραστικότητα των υβριδικών παραγώγων αποδείχθηκε σημαντικά βελτιωμένη σε σχέση με τις πρόδρομες ενώσεις, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η σύνθεση υβριδικών αναλόγων κουμαρινών-φαινολικών οξέων αποτελεί ενδιαφέρουσα προσέγγιση για την ανάπτυξη νέων ενώσεων με συνδυασμένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.

Επιστημονική περιοχή: Οργανική σύνθεση βιοδραστικών αναλόγων φυσικών προϊόντων

Λέξεις Κλειδιά: Οργανική Σύνθεση ◦ Κουμαρίνες ◦ Φαινολικά οξέα ◦ Αντιοξειδωτική δράση ◦ Αντιφλεγμονώδης δράση

ABSTRACT

The present thesis aims at the synthesis of hybrid molecules, containing the structural features of two pharmacophoric molecules, namely coumarin and a series of the most widespread natural phenolic acids, such as p-coumaric, ferulic, syringic and gallic acid. The hybrid compounds could possibly possess combined antioxidant and anti-inflammatory activity as compared to precursors.



Coumarins are a-benzopyran derivatives and have considerable synthetic interest due to their biological activities. Their basic structure is typical in many natural products and synthetic analogs which exhibit biological activity. Phenolic acids are aromatic secondary metabolites widely distributed in the plant kingdom. Analogs of phenolic acids have been studied primarily for their protective activity against the oxidative damage, leading to a number of degenerative diseases, including inflammation and cancer.

The molecules synthesized in this study, were tested *in vitro* for their antioxidant and anti-inflammatory activity using three assays: i) interaction of the compounds with the stable free radical 1,1-diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH), ii) inhibition of lipid peroxidation of linoleic acid caused by AAPH radical and iii) inhibition of the activity of soybean lipoxygenase.

The bioactivity of the hybrid derivatives was significantly improved compared to the precursors, which suggests that the synthesis of hybrid analogues is an interesting approach for developing new compounds with combined antioxidant and anti-inflammatory activity.

Scientific area: Organic synthesis of bioactive analogues of natural products

KEYWORDS: Organic Synthesis ◦ Coumarins ◦ Phenolic acids ◦ Antioxidant activity ◦ Anti-inflammatory activity

Πίνακας περιεχομένων

Μέρος Πρώτο – Εισαγωγή

1 Φαινολικά οξέα - Κουμαρίνες	14
1.1 Φαινολικές ενώσεις.....	14
1.2 Φαινολικά οξέα	14
1.3 Κουμαρίνες (C ₆ -C ₃)	19
1.4 Κατηγοριοποίηση φυσικών κουμαρινικών αναλόγων.....	23
1.4.1 Υδροξυκουμαρίνες	23
1.4.2 Φουρανοκουμαρίνες.....	23
1.4.3 Πυρανοκουμαρίνες	23
1.4.4 Κουμαρίνες υποκατεστημένες στον πυρανικό δακτύλιο	24
1.5 Βιοδραστικότητα κουμαρινικών αναλόγων.....	26
1.5.1 Κουμαρινικά ανάλογα με αντιφλεγμονώδη δράση.....	26
1.5.2 Κουμαρίνες με αντιπηκτική δράση.....	27
1.5.3 Κουμαρίνες με αντιβακτηριακή δράση	29
1.5.4 Κουμαρίνες με αντιμυκητική δράση	33
1.5.5 Κουμαρίνες με αντι-ική δράση	34
1.5.6 Κουμαρίνες με αντικαρκινική δράση.....	36
1.5.7 Κουμαρίνες με αντιυπερτασική δράση	38
1.5.8 Κουμαρίνες με αντιφυματική δράση.....	39
1.5.9 Κουμαρίνες με αντι επιληπτική-αντισπασμωδική δράση.....	40
1.5.10 Κουμαρίνες με αντιοξειδωτική δράση	41
2 Κουμαρίνες και μέθοδοι σύνθεσης	43
2.1 Μέθοδος Perkin	44
2.2 Προσθήκη Micheal.....	45
2.3 Αντίδραση Knoevenagel	45
2.4 Αντίδραση Pechmann	46
2.5 Αντίδραση Reformatsky.....	47
2.6 Αντίδραση Witting	48
2.7 Αντίδραση Kostanecki-Robinson	49

Μέρος Δεύτερο – Σχεδιασμός, σύνθεση και ταυτοποίηση δομής νέων κουμαρινικών αναλόγων

3	Σχεδιασμός και σύνθεση των νέων παραγώγων	52
3.1	Σύνθεση ακετυλο- φαινολικών οξέων	56
3.1.1	Ακετυλίωση υδροξυλομάδας	56
3.1.2	Μηχανισμός ακετυλίωσης	58
3.1.3	ΣΕΙΡΑ Α: Ακετυλο φαινολικά παράγωγα	59
3.2	Σύνθεση χλωριδίων ακετυλο- φαινολικών οξέων	60
3.2.1	Μηχανισμός σύνθεσης ακετυλοχλωριδίων	61
3.2.2	ΣΕΙΡΑ Β: Χλωρίδια ακετυλο φαινολικών παραγώγων.....	62
3.3	Σύνθεση εστέρων των φαινολικών οξέων με την 7-υδροξυ και την 4-μεθυλο 7-υδροξυ κουμαρίνη	63
3.3.1	Μηχανισμός αντίδρασης	64
3.3.2	ΣΕΙΡΑ Γ: Εστέρες των φαινολικών οξέων με την 7-υδροξυ κουμαρίνη	65
3.3.3	ΣΕΙΡΑ Δ: Εστέρες των φαινολικών οξέων με την 4- μεθυλο 7-υδροξυ κουμαρίνη	66
3.4	Απομάκρυνση της ακετυλο-προστατευτικής ομάδας	68

Μέρος Τρίτο –Πειραματικό

4	Γενικό Πειραματικό- Οργανολογία	71
4.1	Συνθετική πορεία ακετυλο-φαινολικών οξέων.....	72
4.1.1	Γενική μέθοδος σύνθεσης ακετυλο-φαινολικών οξέων (3a-6a)	72
4.2	Συνθετική πορεία χλωριδίων ακετυλο-φαινολικών οξέων (3b-6b)	74
4.2.1	Γενική μέθοδος παρασκευής χλωριδίων φαινολικών οξέων (3b-6b)..	75
4.3	Συνθετική πορεία εστέρων των φαινολικών οξέων με την 7-υδροξυ κουμαρίνη (7,8,11)	76
4.3.1	Γενική μέθοδος παρασκευής των εστέρων των φαινολικών οξέων με την 7-υδροξυ κουμαρίνη (7,8,11)	77
4.4	Συνθετική πορεία των εστέρων των φαινολικών οξέων με την 4-μεθυλο-7-υδροξυ κουμαρίνη (9,10,12,13)	80
4.4.1	Γενική μέθοδος παρασκευής των εστέρων των φαινολικών οξέων με την 4-μεθυλο-7-υδροξυ κουμαρίνη (9,10,12,13)	81
4.5	Συνθετική πορεία του συριγγικού 2-οξο-2H-χρωμεν 7-υλ εστέρα (11a)	83
4.6	Χαρακτηρισμός δομής νέων κουμαρινικών αναλόγων	84

4.6.1 ΣΕΙΡΑ Γ: p-ακετυλοξυ κουμαρικός 2-οξο-2H-χρωμεν-7-υλ εστερας (7)	85
4.6.2 ΣΕΙΡΑ Δ: p-ακετυλοξυ κουμαρικός 4 μεθυλο 2-οξο-2H-χρωμεν-7-υλ εστερας (9)	87
4.6.3 φαινυλοξυ συριγγικός 2-οξο-2H-χρωμεν-7-υλ εστέρας (11a)	89

Μέρος Τέταρτο – Αποτελέσματα-Συζήτηση

5 Αποτελέσματα Βιολογικής Δράσης	92
5.1 Βιολογικές- Φαρμακοχημικές μελέτες <i>in vitro</i>	92
5.1.1 Προσδιορισμός της αναγωγής της σταθερής ρίζας DPPH	92
5.1.2 Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης	94
5.1.3 Αντιφλεγμονώδης δράση των ενώσεων- προσδιορισμός της ικανότητας αναστολής της δράσης του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια	99
5.2 Συμπεράσματα – Συζήτηση	101
5.3 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	106
Μέρος Πέμπτο – Βιβλιογραφία	108
Παραρτημα φασμάτων	114

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Παράγωγα κινναμμωμικού οξέος	15
Σχήμα 2: Παράγωγα βενζοϊκού οξέος	15
Σχήμα 3: Χημική δομή του χλωρογενικού οξέος (5-Ο-καφεοϋλοκινικό οξύ).....	18
Σχήμα 4: Δομή βενζο-α-πυρόνης (κουμαρίνες) vs Δομή βενζο-γ-πυρόνης (φλαβονοειδή)	22
Σχήμα 5: Δομή απλής κουμαρίνης(1), Φουρανοκουμαρίνης-imperatorin (2) και Esculetin. Κουμαρινικά παράγωγα με αντιφλεγμονώδη δράση.	27
Σχήμα 6: (Dicoumarol)-κουμαρινικό παράγωγο με αντιπηκτική δράση	27
Σχήμα 7: Το κουμαρινικό ανάλογο Βαρφαρίνη (warfarin) και ο κύκλος της βιταμίνης Κ.....	28
Σχήμα 8: Δομές των κουμαρικών ενώσεων,ammosesinol(5),ostruthin(6),Anthogenol (7), Grandivittin (8), agasyllin (9), aegelinol βενζοϊκό (10), osthole (11), Felamidin (12), με αξιόλογη αντιβακτηριακή δράση	31
Σχήμα 9: Δομές των κουμαρικών ουσιών νοβοβιοκίνη (13) και κουμερμικίνη, με αξιόλογη αντιβακτηριακή δράση και προερχόμενα από μικροβιακές πηγές	32
Σχήμα 10: Δομή της κουμαρινικής ουσίας Chartreusin (15) , με αξιόλογη αντιβακτηριακή δράση και προερχόμενη από μικροβιακή πηγή.	32
Σχήμα 11: Δομή του κουμαρινικού αναλόγου ψωραλένιο (16) , με αποτελεσματική αντιμυκητική δράση	33
Σχήμα 12: Χημική δομή των κουμαρινικών αναλόγων Inophyllum A (17), inophyllum B (18), inophyllum C (19), inophyllum E (20), inophyllum P (21), inophyllum G1 (22), και inophyllum G2 (23), με αντι-HIV δράση.....	35
Σχήμα 13: Χημική δομή των κουμαρινικών αναλόγων (+) - calanolide A (24), (-) - calanolide B (25), (-) - dihydrocalanolide B (26) ,(+) - dihydrocalanolide A (27) με αντι-ιικές ιδιότητες.....	36
Σχήμα 14: Χημική δομή των πυρανοκουμαρινών pseudocordatolide C (28) και calanolide F, με ανιχνευμένη αντι-HIV δραστηριότητα.....	36
Σχήμα 15: Χημική δομή των Fraxin (30) και 3 ¹ - Demethylchartreusin (31)	38
Σχήμα 16: Κουμαρινικές δομές των Dihydromammea C / OB (32), Scopoletin (33), Visnadine (34), Khellactone (35) με αντιυπερτασική δράση.	39
Σχήμα 17: Χημικές δομές κουμαρινικών αναλόγων με αντιφυματική δράση. Ουμπελιφερόνη (36), Φελοδενόλη A (37), Ψωραλένιο (16) Σκοπολετίνη (33), Μπεργκαπτένη (38), (+) - (S) -Μαρμεσίνη (39), (+) - (S) -Ρουταρετίνη (40) και Ξανθολετίνη (41).	40
Σχήμα 18: Απεικόνιση της αντιοξειδωτικής δράσης των κουμαρινών συναρτήση των δομικών τους χαρακτηριστικών	42
Σχήμα 19: Σύνθεση κουμαρίνης μέσω αντίδρασης Perkin	44
Σχήμα 20: Συμπύκνωση με προσθήκη Michael	45
Σχήμα 21: Σύνθεση κουμαρίνης μέσω αντιδράσεως Knoevenagel	46
Σχήμα 22: Σύνθεση κουμαρίνης μέσω αντιδράσεως Pechmann	46
Σχήμα 23: Σύνθεση κουμαρίνης μέσω της αντίδρασης Reformatsky	48
Σχήμα 24: Σύνθεση κουμαρίνης μέσω της τροποποιημένης αντίδρασης Reformatsky	48

Σχήμα 25: Σύνθεση της κουμαρίνης μέσω της αντίδρασης Wittig	49
Σχήμα 26: Σύνθεση κουμαρίνης μέσω ενδομοριακής κυκλοποίησης Wittig	49
Σχήμα 27: Σύνθεση κουμαρίνης μέσω της αντιδράσεως Kostanecki – Robinson.....	50
Σχήμα 28: Κουμαρινικά ανάλογα με αξιόλογη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση. 7υδροξυ-κουμαρίνη-umbelliferone (1)/4 μεθυλο-7 υδροξυ-κουμαρίνη(2) ..	52
Σχήμα 29: Μηχανισμός ακετυλίωσης φαινολικού οξέος (4-υδροξυβενζοϊκού οξέος) από οξικό ανυδρίτη	58
Σχήμα 30: Γενικός μηχανισμός σύνθεσης χλωριδίων ακετυλο-φαινολικών οξέων ...	61
Σχήμα 31: Μηχανισμός αντίδρασης προς τον σχηματισμό των εστέρων των φαινολικών οξέων	64
Σχήμα 32: Η δομή του DPPH.....	93
Σχήμα33: Μηχανισμός αντίδρασης της 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) με αντιοξειδωτική ουσία.R: H = αντιοξειδωτικό δέσμευσης ριζών, R = αντιοξειδωτική ρίζα.....	94
Σχήμα 34: Η χημική δομή του NDGA.....	94
Σχήμα 35: Μηχανισμός λιπιδικής υπεροξειδωσης	95
Σχήμα 36: Εκκινήτης ελευθέρων ριζών, 2,2'-διαζω-2-αμιδινοπροπανίου (AAPH)	95

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Ποικιλία ενώσεων υδροξυβενζοϊκού οξέος ,ανάλογα με τη θέση των υποκαταστατών και των αριθμό των υδροξυλίων, επί του αρωματικού δακτυλίου .	16
Πίνακας 2: Ποικιλία ενώσεων υδροξυκιναμωμικού οξέος , ανάλογα με τη θέση των υποκαταστατών και των αριθμό των υδροξυλίων, επί του αρωματικού δακτυλίου .	17
Πίνακας3: Ταξινόμηση φυσικών κουμαρινών, κύρια κουμαρινικά είδη, δομικά χαρακτηριστικά και παραδείγματα	24
Πίνακας 4: Αναλυτική ταξινόμηση φυσικών κουμαρινών, κύρια κουμαρινικά είδη, δομικά χαρακτηριστικά με παραδείγματα και αντίστοιχες φαρμακευτικές εφαρμογές	26
Πίνακας 5: Συνθετική πορεία ακετυλίωσης, χλωρίωσης και εστεροποίησης p-κουμαρικού/φερουλικού οξέος	54
Πίνακας 6: Συνθετική πορεία ακετυλίωσης, χλωρίωσης και εστεροποίησης συριγγικού/γαλλικού οξέος, και απακετυλίωσης συριγγικού οξέος.....	55
Πίνακας 7: Χημικές δομές των ακετυλιωμένων φαινολικών οξέων p-κουμαρικό(3a), συριγγικό (5a), φερουλικό(4a),γαλλικό(6a)	59
Πίνακας 8: Συνθετική πορεία ακετυλίωσης των φαινολικών οξέων p-κουμαρικό, φερουλικό.....	59
Πίνακας 9: Συνθετική πορεία ακετυλίωσης των φαινολικών οξέων συριγγικό, γαλλικό	60
Πίνακας 10: Χημικές δομές των ακυλοχλωριδίων p-κουμαρικό(3b), συριγγικό (5b), φερουλικό (4b), γαλλικό(6b)	62
Πίνακας 11: Συνθετική πορεία χλωρίωσης του p-κουμαρικού και φερουλικού οξέος	62
Πίνακας 12: Συνθετική πορεία χλωρίωσης του συριγγικού και γαλλικού οξέος	63
Πίνακας 13: Χημικές δομές των εστέρων των φαινολικών οξέων με την 7-υδροξυ κουμαρίνη	65
Πίνακας 14: Συνθετική πορεία εστεροποίησης του χλωριδίου του ακετυλο p-κουμαρικού και φερουλικού οξέος	66

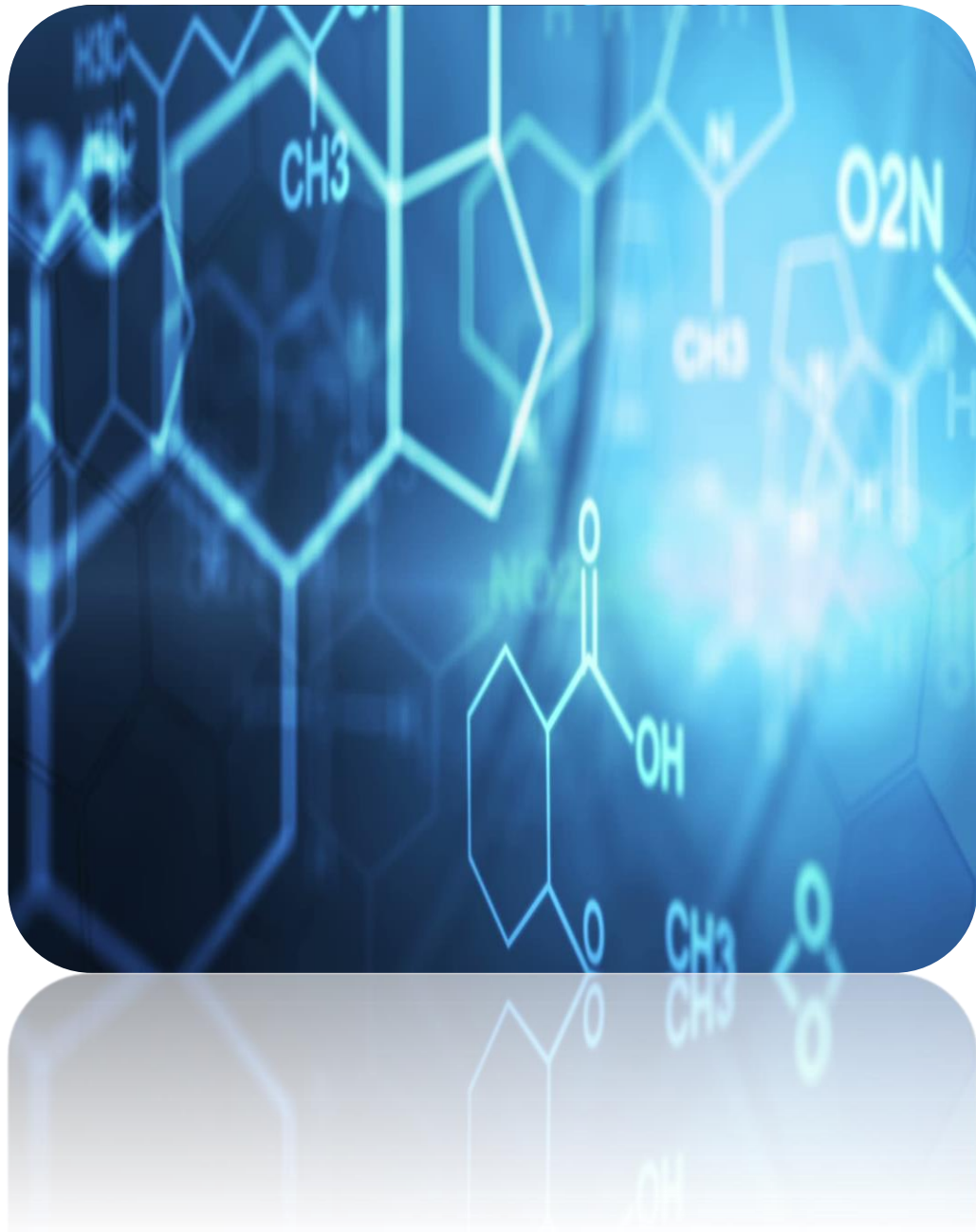
Πίνακας 15: Συνθετική πορεία εστεροποίησης του χλωριδίου του ακετυλοσυριγγικού οξέος	66
Πίνακας 16: Χημικές δομές των εστέρων των φαινολικών οξέων με την 4-μεθυλο 7-υδροξυ κουμαρίνη	67
Πίνακας 17: Συνθετική πορεία εστεροποίησης του χλωριδίου του ακετυλοσυριγγικού και γαλλικού οξέος	67
Πίνακας 18: Συνθετική πορεία εστεροποίησης του χλωριδίου του ακετυλοσυριγγικού και γαλλικού οξέος	68
Πίνακας 19: Χημική δομή του συριγγικού 2-οξο-2H-χρωμεν-7-υλ εστέρα.....	68
Πίνακας 20: Συνθετική πορεία απομάκρυνσης της ακετυλο-προστατευτικής ομάδας του συριγγικού 2-οξο-2H-χρωμεν-7-υλ εστέρα	69
Πίνακας 21: Χημικές δομές των ακετυλιωμένων φαινολικών οξέων p-κουμαρικό(3a), συριγγικό (5a), φερουλικό(4a),γαλλικό(6a)	72
Πίνακας 22: Χημικές δομές των ακυλοχλωριδίων p-κουμαρικό(3b), συριγγικό (5b), φερουλικό (4b), γαλλικό(6b)	74
Πίνακας 23: Χημικές δομές των εστέρων των φαινολικών οξέων με την 7-υδροξυ κουμαρίνη	77
Πίνακας 24: Χημικές δομές των εστέρων των φαινολικών οξέων με την 4-μεθυλο 7-υδροξυ κουμαρίνη	80
Πίνακας 25: Χημική δομή του συριγγικού 2-οξο-2H-χρωμεν-7-υλ εστέρα.....	83
Πίνακας 26: Αντιοξειδωτική δράση των νέων κουμαρινικών παραγώγων 9-11-13...97	
Πίνακας 27: Ικανότητα νέων μορίων να αναστέλλουν τη φυτική λιποξυγονάση (soybean LOX) 11-9-13.....	100
Πίνακας 28: Παρουσίαση των ακέτυλο φαινολικών οξέων που παρήχθησαν.....	103
Πίνακας 29: Παρουσίαση των εστέρων των φαινολικών οξέων με την 7-υδροξυ κουμαρίνη και την 4-μεθυλο 7-υδροξυ κουμαρίνη, που παρήχθησαν.....	104

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Rutaceae, Umbelliferae, Clusiaceae, guttiferae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Nyctaginaceae, and Apiaceae family plant	21
Εικόνα 2: Ενδεικτική μορφή του παθογόνου <i>Rhizoctonia solani</i>	33
Εικόνα 3: Ακετυλομάδα	56
Εικόνα 4: Φάσμα ¹ H NMR της ένωσης 7 (DMSO, 300MHz)	85
Εικόνα 5: Φάσμα ¹ H NMR της ένωσης 9 (DMSO, 300MHz)	87
Εικόνα 6: Φάσμα ¹ H NMR της ένωσης 11a (DMSO, 300MHz)	89
Εικόνα 7 : Φάσμα πρωτονίου ¹ H NMR (DMSO, 300MHz) της κουμαρίνης 13	105
Εικόνα 8: Φάσμα πρωτονίου ¹ H NMR (DMSO, 300MHz) της κουμαρίνης 11	113
Εικόνα 9: Φάσμα πρωτονίου ¹ H NMR (DMSO, 300MHz) της κουμαρίνης 12	114
Εικόνα 10: Φάσμα πρωτονίου ¹ H NMR (DMSO, 300MHz) της κουμαρίνης 8	115
Εικόνα 11: Φάσμα πρωτονίου ¹ H NMR (DMSO, 300MHz) της κουμαρίνης 10	116

Μέρος Πρώτο

Εισαγωγή



1

Φαινολικά οξέα - Κουμαρίνες

1.1. Φαινολικές Ενώσεις

Τα αγγειώδη φυτά είναι σε θέση να συνθέτουν φυτοχημικά ένα πλήθος οργανικών μορίων, που αναφέρονται ως “δευτερογενείς μεταβολίτες”. Αυτά τα μόρια εμπλέκονται σε μια ποικιλία από ρόλους κατά τη διάρκεια ζωής των φυτών, από δομικούς μέχρι και προστατευτικούς. Οι φαινολικές ενώσεις είναι μία τέτοια ομάδα, η οποία συντίθενται από τα φυτά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τους, και ανάλογα με τις συνθήκες, όπως μόλυνση, τραυματισμό, υπεριώδη ακτινοβολία, κλπ.^[1]

Περίπου 8000 φυσικές ενυπάρχουσες ενώσεις ανήκουν στην κατηγορία των φαινολικών, οι οποίες όλες μοιράζονται ένα κοινό δομικό χαρακτηριστικό: έναν αρωματικό δακτύλιο συνδεδεμένο άμεσα με έναν τουλάχιστον υποκαταστάτη υδροξυλίου.

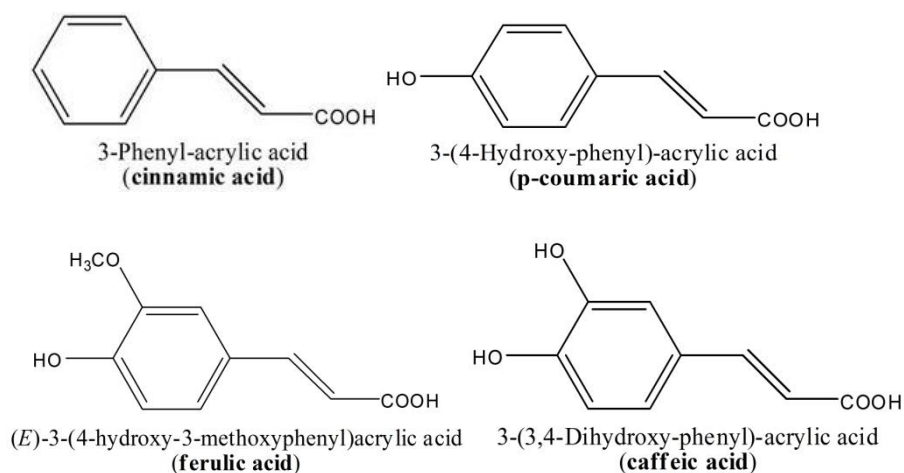
Μια απλή ταξινόμηση διαιρεί την ευρεία κατηγορία των φαινολικών σε απλές φαινόλες και πολυφαινόλες, βασιζόμενη αποκλειστικά στον αριθμό των φαινολικών υπομονάδων. Έτσι, ο όρος "φυτό-φαινολικά" περιλαμβάνει από απλές φαινόλες, φαινολικά οξέα, κουμαρίνες, флаβονοειδή, στυλβένια, μέχρι υδρολυόμενες και συμπυκνωμένες τανίνες, λιγνάνες και λιγνίνες.^[1]

Οι ενώσεις αυτές αποτελούν ιδιαίτερα δραστικές ουσίες, λόγω του όξινου χαρακτήρα των υδροξυλικών ομάδων και των πυρηνόφιλων ιδιοτήτων των φαινολικών δακτυλίων.^[3]

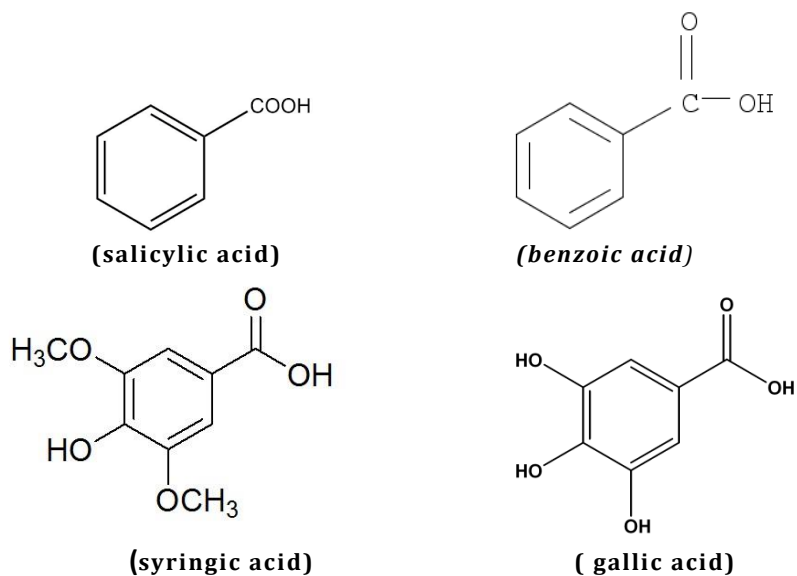
1.2. Φαινολικά Οξέα

Τα **φαινολικά οξέα** αποτελούν την δεύτερη πιο διαδεδομένη ομάδα των φαινολικών ενώσεων, ενώ διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες, στα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος και στα παράγωγα του κινναμμικού οξέος.

Παρακάτω παρουσιάζονται τέσσερις από τις πιο χαρακτηριστικές δομές κάθε κατηγορίας, (Σχήμα1,Σχήμα2), αλλά και αναλυτικός πίνακας με τους πιθανούς υποκαταστάτες και την ονομασία των αντίστοιχων χαρακτηριστικών οξέων. (Πίνακας 1,2)



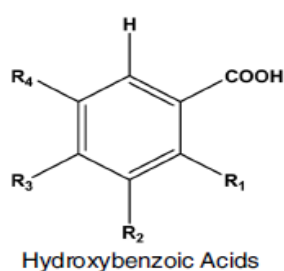
Σχήμα 1. Παράγωγα κινναμικού οξέος



Σχήμα 2. Παράγωγα βενζοϊκού οξέος

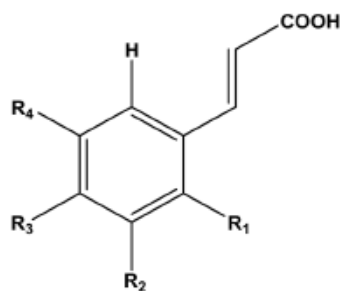
Τα Φαινολικά οξέα είναι αρωματικοί δευτερογενείς μεταβολίτες που προέρχονται από τα φυτά και κατανέμονται ευρέως σε όλο το φυτικό βασίλειο. Ο

όρος «φαινολικά οξέα», γενικά, ορίζει φαινόλες που κατέχουν την λειτουργικότητα ενός καρβοξυλικού οξέος. Ωστόσο, όταν μιλάμε για μεταβολίτες φυτών, γίνεται αναφορά σε μια ξεχωριστή ομάδα των οργανικών οξέων. Αυτά τα φυσικά απαντώμενα φαινολικά οξέα περιέχουν δύο ξεχωριστά ανθρακικά πλαίσια, όπως ήδη αναφέρθηκε, τις υδροξυκιναμικές και υδροξυβενζοϊκές δομές. Αν και ο βασικός σκελετός παραμένει ο ίδιος, οι αριθμοί και οι θέσεις των ομάδων υδροξυλίου επί του αρωματικού δακτυλίου κάνουν τη διαφορά και δημιουργούν την ποικιλία των ενώσεων. [1]



Name	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Benzoic acid	H	H	H	H
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	H	H	OH	H
Vanillic acid	H	OCH ₃	OH	H
Gallic acid	H	OH	OH	OH
Protocatechuic acid	H	OH	OH	H
Syringic acid	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Gentisic acid	OH	H	H	OH
Veratric acid	H	OCH ₃	OCH ₃	H
Salicylic acid	OH	H	H	H

Πίνακας 1. Ποικιλία ενώσεων υδροξυβενζοϊκού οξέος, ανάλογα με τη θέση των υποκαταστατών και των αριθμό των υδροξυλίων, επί του αρωματικού δακτυλίου.



Hydroxycinnamic Acids

Name	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Cinnamic acid	H	H	H	H
<i>o</i> -Coumaric acid	OH	H	H	H
<i>m</i> -Coumaric acid	H	OH	H	H
<i>p</i> -Coumaric acid	H	H	OH	H
Ferulic acid	H	OCH ₃	OH	H
Sinapic acid	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Caffeic acid	H	OH	OH	H

Πίνακας 2. Ποικιλία ενώσεων υδροξυκινναμικού οξέος, ανάλογα με τη θέση των υποκαταστατών και των αριθμό των υδροξυλίων, επί του αρωματικού δακτυλίου.

Από δομική άποψη οι κύριες διαφορές μεταξύ αυτών των ενώσεων αφορούν στον αριθμό και τη θέση των υδροξυ- ή/και μεθοξυ- υποκαταστατών καθώς και στα χαρακτηριστικά της πλευρικής αλυσίδας. Η παρουσία δεύτερης υδροξυ- ομάδας σε ορθο- ή παρα- θέση ως προς το φαινολικό υδροξύλιο παίζει καθοριστικό ρόλο στην ικανότητα απόδοσης ατόμου υδρογόνου τόσο της απλής φαινόλης όσο και των μονο- υδροξυβενζοϊκών οξέων. Επιπλέον οι υδροξυ- ομάδες επηρεάζουν την αντιοξειδωτική ικανότητα των μορίων, ανάλογα με τη σχετική θέση τους ως προς τους υπόλοιπους υποκαταστάτες. Για παράδειγμα, η παρουσία τρίτης υδροξυ- ομάδας σε ορθο- θέση θεωρείται ως το αποτελεσματικότερο δομικό χαρακτηριστικό φαινολών και υδροξυβενζοϊκών οξέων αφού τόσο η πυρογαλλόλη όσο και το γαλλικό οξύ είναι οι ισχυρότεροι παρεμποδιστές οξείδωσης μέσα στις αντίστοιχες τάξεις ενώσεων. Αντίθετα, η παρουσία υδροξυ-ομάδων σε μετα-θέση δεν παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική ικανότητα αφού δεν επηρεάζεται το ηλεκτρονικό φορτίο του ατόμου οξυγόνου του φαινολικού OH. Περισσότεροι από τρεις υδροξυ- υποκαταστάτες δεν ενισχύουν τη δραστηριότητα των ενώσεων. Σε ότι αφορά τη σημασία της απόστασης της καρβοξυλικής ομάδας από το φαινολικό δακτύλιο, είναι γενικά αποδεκτή η άποψη ότι τα υδροξυκινναμικά οξέα είναι

ισχυρότεροι παρεμποδιστές οξείδωσης σε σχέση με τα αντίστοιχα υδροξυβενζοϊκά οξέα. [4- 8]

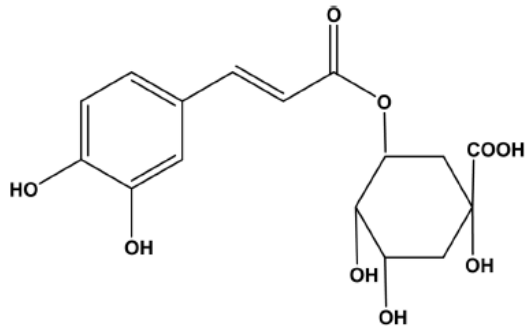
Η μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα των υδροξυκιναμμικών αποδίδεται αφενός στην παρουσία διπλού δεσμού στην πλευρική ανθρακική αλυσίδα ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$) που επιτρέπει τη σταθεροποίηση της φαινοξυ- ρίζας με περισσότερες δομές συντονισμού και αφετέρου στην ασθενέστερη ηλεκτραρνητική ισχύ της $-\text{COOH}$ ομάδας λόγω μεγαλύτερης απόστασής της από τον αρωματικό δακτύλιο.

Επίσης, τα υδροξυκιναμμικά είναι δραστικότερα από τα αντίστοιχα υδροξυβενζοϊκά οξέα, με το συριγγικό να εμφανίζει ακόμα και προοξειδωτική δράση. [8]

Από μελέτες κυτταροτοξικής δράσης σε ορισμένα καρκινικά κύτταρα έχει φανεί ότι τα πυρογαλλολικά παράγωγα είναι περισσότερο αποτελεσματικά από τα αντίστοιχα κατεχολικά, αν και γενικά η δράση διαφοροποιείται ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου [9]

Έχει αναφερθεί μάλιστα ότι η παρουσία μεθοξυ- ομάδων επιφέρει δραματική μείωση της κυτταροτοξικότητας. Η παρουσία διπλού δεσμού στην πλευρική αλυσίδα των υδροξυκιναμμικών οξέων θεωρείται περισσότερο ευνοϊκή για τέτοιου τύπου δράση. [10] Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι η κυτταροτοξική δράση ενισχύεται σημαντικά με εστεροποίηση της καρβοξυλικής ομάδας. [11] Σε τέτοια συστήματα, η αποτελεσματικότητα των εστέρων εξαρτάται από το μήκος της πλευρικής ανθρακικής αλυσίδας που επηρεάζει την κατανομή των ενώσεων στις διεπιφάνειες λιπιδίων/νερού.

Σε ότι αφορά την **φυσική** τους προέλευση, το καφεϊκό, p-κουμαρικό, βανιλικό, φερουλικό και πρωτοκατεχουϊκό, είναι οξέα που υπάρχουν σε όλα σχεδόν τα φυτά. Άλλα οξέα βρίσκονται σε επιλεγμένες φυσικές πηγές (π.χ., γεντισικό, συριγγικό). Εξέχουσα θέση μεταξύ των κιναμμικών οξέων, είναι το χλωρογενικό οξύ (5-O-καφεοϋλοκινικό οξύ) το οποίο ουσιαστικά πρόκειται για το καφεϊκό οξύ εστεροποιημένο με κινικό οξύ. (Σχήμα 3)



Σχήμα 3. Χημική δομή του χλωρογενικού οξέος (5-Ο-καφεοϋλοκινικό οξύ)

Τα υδροξυκιναμικά οξέα απαντούν επιπλέον σε όλα τα φρούτα σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις. Μεταξύ αυτών των οξέων, το *p*-κουμαρικό, φερουλικό, καφεϊκό και σιναπικό είναι τα περισσότερο διαδεδομένα, αν και σπανίως απαντούν σε ελεύθερη μορφή. Επικρατέστερες είναι οι εστερικές μορφές και στη συνέχεια οι γλυκοζιτικές ή αμιδικές. Είναι χαρακτηριστικό επίσης ότι όλες οι μορφές τους διαθέτουν ελεύθερες υδροξυ- ομάδες. [12-14]

Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα θεωρούνται απλούστερα φαινολικά οξέα. Η περιεκτικότητα των φυτών σε τέτοιες ενώσεις είναι φτωχότερη αν και χαρακτηριστικά μέλη π.χ. τα *p*-υδροξυβενζοϊκό, βανιλλικό, πρωτοκατεχικό και συριγγικό οξύ απαντούν με τη μορφή εστέρων ή γλυκοζιτών σε όλα τα φυτικά είδη. Εξαίρεση αποτελεί και πάλι το γαλλικό οξύ και τα παράγωγά του (ελλαγικό οξύ, υδρολυόμενες ταννίνες, εστέρες κινικού οξέος) που αποτελούν κύρια συστατικά φυτών όπως τα φύλλα τσαγιού, τα μούρα, οι φράουλες κ.ά [15]

1.3. Κουμαρίνες (C₆-C₃)

Οι κουμαρίνες είναι μια ιδιαίτερα σημαντική κατηγορία φαινολικών ενώσεων, οι οποίες βρίσκονται συχνά στο φυτικό βασίλειο, είτε σε ελεύθερη κατάσταση, είτε με τη μορφή παραγώγων τους με σάκχαρα. Η μελέτη τους άρχισε περισσότερο από 200 χρόνια πριν. Το όνομα αυτής της χημικής οικογένειας εξάγεται από το *Coumarouna odorata* Aube (*Dipteryx odorata*), από το οποίο απομονώθηκε για πρώτη φορά, το απλούστερο μέλος αυτής της κατηγορίας, η απλή κουμαρίνη. [16] Η κουμαρίνη είναι ένας ευρέως εμφανιζόμενος δευτερογενής μεταβολίτης που

απαντάτε φυσικά σε αρκετές οικογένειες φυτών και αιθέριων ελαίων, όπως το έλαιο κασσίας(87,300ppm), το έλαιο κανέλας(7,000ppm) και το έλαιο λεβάντας, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί και ως άρωμα σε τρόφιμα και καλλυντικά προϊόντα. [16], [17]

Μέχρι σήμερα περισσότερες από 1300 κουμαρίνες έχουν ταυτοποιηθεί ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά, τα βακτήρια και τους μύκητες καθώς η παρουσία τους έχει ανιχνευθεί πέρα από το φυτικό βασίλειο και σε μικροοργανισμούς και ζωικές πηγές. [18]

Αρχικά οι κουμαρίνες βρέθηκαν στα φασόλια tonka bean (*Dipteryx odorata wild*) και πλέον αναφέρονται σε περίπου 150 διαφορετικά είδη κατανεμημένα σε 30 διαφορετικές οικογένειες φυτών, εκ των οποίων κάποιες σημαντικές από αυτές είναι οι :Rutaceae, Umbelliferae, Clusiaceae, guttiferae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Nyctaginaceae, και Apiaceae (Εικόνα 1) [18]



Εικόνα 1: Rutaceae, Umbelliferae, Clusiaceae, guttiferae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Nyctaginaceae, and Apiaceae family plant

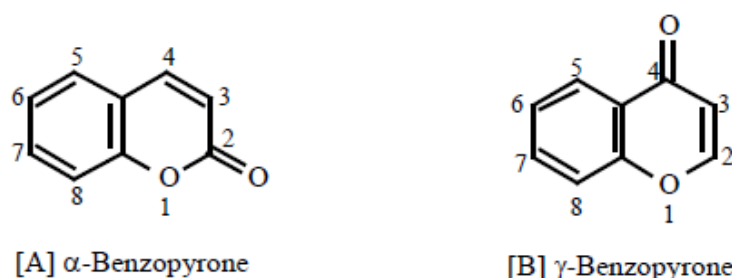
Αν και διανέμονται σε όλα τα μέρη του φυτού, οι κουμαρίνες απαντώνται σε υψηλότερα επίπεδα, στα φρούτα [Bae (*Aegle marmelos*) , *Tetrapleura tetraptera* Taub (*Mimosaceae*), μύρτιλλο, βατομουριά], στους σπόρους [*Tonka*, *Calophyllum Cerasiferum* Vesque και *Calophyllum Inophyllum* Linn], στις ρίζες [*Ferulago campestris*], στα φύλλα [*Murraya paniculata*, *phellodendron amurense*], στο γαλάκτωμα του τροπικού δέντρου *Calophyllum teysmannii* var. *inophylloide*, στο πράσινο τσάι και σε άλλα τρόφιμα, όπως τα ραδίκια. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες και εποχιακές αλλαγές επηρεάζουν τη συχνότητα εμφάνισης των κουμαρινών σε ποικίλα μέρη του φυτού.

Από **χημική άποψη**, οι κουμαρίνες είναι παράγωγα των α-βενζοπυρανίων και έχουν σημαντικό συνθετικό ενδιαφέρον λόγω της βιολογικής δραστηρότητάς τους. Η

απλούστερη κουμαρίνη , απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1820 από τον Vogel, ενώ παρασκευάστηκε συνθετικά το 1868 από τον Perkin. [3],[16]

Οι βενζοπυρόνες είναι μια ομάδα ενώσεων τα μέλη των οποίων περιλαμβάνουν τις κουμαρίνες και τα Φλαβονοειδή. Η Διατροφική έκθεση σε βενζοπυρόνες είναι πολύ σημαντική, καθώς οι εν λόγω ενώσεις, βρίσκονται στα λαχανικά, τα φρούτα, τους σπόρους, τους ξηρούς καρπούς, τον καφέ, το τσάι και το κρασί. Εκτιμάται ότι η μέση δυτική διατροφή περιέχει περίπου 1g / ημέρα μικτών βενζοπυρονών. Για το λόγο αυτό η εκτεταμένη έρευνα σε ότι αφορά τις φαρμακολογικές και θεραπευτικές ιδιότητες τους, είναι σε εξέλιξη εδώ και πολλά χρόνια. [17]

Οι βενζοπυρόνες υποδιαιρούνται στις βενζο-α-πυρόνες όπου ανήκουν οι κουμαρίνες και στις βενζο-γ-πυρόνες, εκ των οποίων τα φλαβονοειδή αποτελούν βασικά μέλη. (Σχήμα 4)



Σχήμα 4. Δομή βενζο-α-πυρόνης (κουμαρίνες) vs Δομή βενζο-γ-πυρόνης(φλαβονοειδή)

Οι κουμαρίνες επομένως συνιστούν λακτόνες φαινυλοπροπανοειδών [3] ,αποτελούνται δηλαδή δομικά από έναν βενζολικό δακτύλιο ενωμένο, μέσο συμπύκνωσης, με μια πυρόνη(εξαμελής ετεροκυκλικός δακτύλιος με ένα άτομο οξυγόνου και πέντε άτομα άνθρακα που συνδέονται με δεσμούς sp^2).

Η πρωτότυπη ένωση είναι γνωστή ως 1,2-βενζοπυρόνη της οποίας η συστηματική ονοματολογία συστάθηκε από την IUPAC, ή, λιγότερο συχνά, ως ο-υδροξυκινναμωμικό οξύ και λακτόνη. [3],[18]

Ο έλεγχος της δομής την απλής κουμαρίνης υποδεικνύει την δυνατότητα υποκατάστασης σε πολλές θέσεις. Αυτό εξηγεί και την ύπαρξη των πολλών διαφορετικών τύπων κουμαρινών στη φύση που προσφέρονται από την υποκατάσταση και τη σύζευξη.

Ωστόσο, οι περισσότερες από τις φαρμακολογικές και βιοχημικές μελέτες έχουν γίνει σχετικά με την απλή κουμαρίνη και τον κύριο μεταβολίτη της, την 7-υδροξυκουμαρίνη. [19]

1.4. Κατηγοριοποίηση φυσικών κουμαρινικών αναλόγων

Η δομική ποικιλομορφία αυτής της οικογένειας οδήγησε στη διαίρεση των κουμαρινών σε διάφορες κατηγορίες [17],[20],[21]

1.4.1 Υδροξυκουμαρίνες

Οι υδροξυκουμαρίνες ή αλλιώς οι απλές κουμαρίνες (π.χ. coumarin, 7-hydroxycoumarin and 6,7- dihydroxycoumarin), είναι τα υδροξυλιωμένα, αλκοξυλιωμένα και αλκυλιωμένα παράγωγα της μητρικής ένωσης, της κουμαρίνης, μαζί με τους γλυκοζίτες τους.

1.4.2 Φουρανοκουμαρίνες

Οι φουρανοκουμαρίνες αποτελούνται από ένα πενταμελή δακτύλιο φουρανίου συμπυκνωμένο στον πυρήνα της κουμαρίνης, τον βενζολικό δακτύλιο. Οι ενώσεις αυτές διαιρούνται σε γραμμικούς ή γωνιακούς τύπους, με υποκαταστάτες σε μία ή και τις δύο από τις εναπομείναντες βενζοϊκές θέσεις.

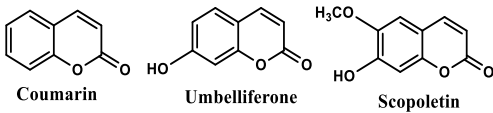
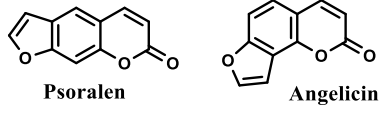
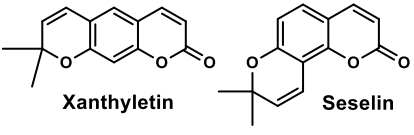
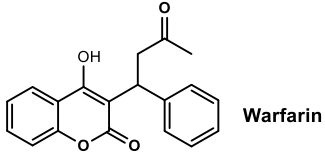
1.4.3 Πυρανοκουμαρίνες

Τα πυρανοκουμαρικά μέλη είναι ανάλογα των φουρανοκουμαρινών, αλλά περιέχουν έναν εξαμελή δακτύλιο. Χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός συμπυκνωμένου πυρανικού δακτυλίου, ο οποίος ανάλογα με τη θέση στην οποία βρίσκεται διακρίνει τις φουρανοκουμαρίνες σε δομή γραμμική όπως η ξανθολετίνη είτε γωνιακή όπως η σεσελίνη.

1.4.4 Κουμαρίνες υποκατεστημένες στον πυρανικό δακτύλιο

Παραδείγματα αυτής της κατηγορίας είναι η 4-υδροξυκουμαρίνη και οι 3-μεθυλο-4- υδροξυκουμαρίνες. Η συνθετική ένωση, βαρφαρίνη, ανήκει σε αυτόν τον κουμαρινικό τύπο. Γενικά περιλαμβάνονται οι υποκατεστημένες κουμαρίνες στην 3-ή στην 4-θέση ή και στις δύο θέσεις, καθώς και οι 3,4-συμπυκνωμένες κουμαρίνες.

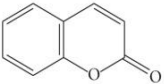
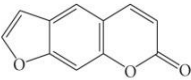
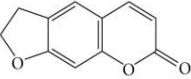
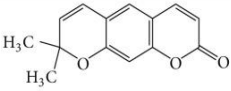
Λόγο της διάρθρωσης και της απλότητας της δομής της η κουμαρίνη θεωρείτε επικεφαλής των βενζο-α-πυρονών, ωστόσο είναι γενικά αποδεκτό ότι η 7-υδροξυκουμαρίνη αποτελεί την μητρική ένωση από τις πιο πολύπλοκες κουμαρίνες, σε οποιαδήποτε κατηγορία και αν ανήκουν αυτές. (Πίνακας 3)

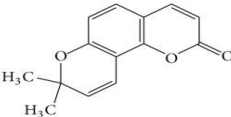
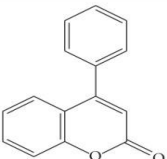
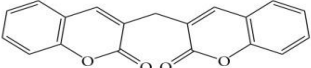
Κατηγορίες	Χαρακτηριστικά	Παραδείγματα ενώσεων
Απλές κουμαρίνες	Υδροξυλιωμένα, αλκοξυλιωμένα και αλκυλιωμένα παράγωγα της μητρικής ένωσης, του βενζοϊκού δακτυλίου	 Coumarin Umbelliferone Scopoletin
Φουρανοκουμαρίνες	Πενταμελής φουρανικός δακτύλιος συμπυκνωμένος σε βενζοϊκό δακτύλιο. Γραμμικός ή γωνιακός τύπος	 Psoralen Angelicin
Πυρανοκουμαρίνες	Εξαμελής πυρανικός δακτύλιος συμπυκνωμένος σε βενζοϊκό δακτύλιο. Γραμμικός ή γωνιακός.	 Xanthyletin Seselin
Κουμαρίνες υποκατεστημένες στον πυρανικό δακτύλιο	Συμπυκνωμένες στον πυρανικό δακτύλιο, συνήθως στην 3-C ή 4-C θέση	 Warfarin

Πίνακας 3. Ταξινόμηση φυσικών κουμαρινών, κύρια κουμαρινικά είδη, δομικά χαρακτηριστικά και παραδείγματα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο παρακάτω πίνακας στον οποίον πραγματοποιείται αναλυτικότερη κατηγοριοποίηση των φυσικών κουμαρινών σε έξι τύπους με βάση τη χημική δομή των ενώσεων, ενώ αναφέρονται και οι

φυσικοχημικές ιδιότητες και θεραπευτικές εφαρμογές των φυσικών κουμαρινών που εξαρτώνται από τη μορφή της υποκατάστασης.

Sl no.	Type of coumarin	General chemical structure	Example with reference	Pharmacological activity
1	Simple coumarins		Coumarin [17]	Anti-inflammatory Anti-inflammatory Anticancer
			Esculetin [18]	Antiadipogenic Antioxidant Neuroprotective
			Ammoresinol [19]	Antibacterial
			Ostruthin [19]	Antibacterial Antifungal
			Osthole [20]	Antibacterial Antifungal Anticancer Anticonvulsant Antioxidant
			Novobiocin [21]	Antibacterial
			Coumermycin [22]	Antibacterial
			Chartreusin [23]	Antibacterial Antitumor
			Fraxin [24]	Antiadipogenic Antioxidant
			Umbelliferone [25]	Antitubercular
			Fraxidin [26]	Antiadipogenic Antihyperglycemic
			Phellodenol A [8]	Antitubercular
			Esculin, fraxetin [27] Murrayatin [28] Auraptene [29]	Antiadipogenic,
2	Furano coumarins		Imperatorin [17]	Anti-inflammatory Antibacterial Antifungal Antiviral Anticancer Anticonvulsant
			Psoralen [11]	Antifungal Anti-TB
			Bergapten [25]	Anti-TB
			Methoxsalen [30]	Cytochrome P450 inhibitor
			Marmalde, marmelosin [29]	
3	Dihydrofurano coumarins		Anthogenol [31] Felamidin [6] Marmesin, rutaretin [25]	Antibacterial Antibacterial Anti-TB Anti-TB
4	Pyrano coumarins are of two types			
4a	Linear type		Grandivittin [32] Agasyllin [32] Aegelinol benzoate [32] Xanthyletin [25]	Antibacterial Antibacterial Antibacterial Anti-TB

4b	Angular type		Inophyllum A, B, C, E, P, G ₁ , and G ₂ [33] Calanolide A, B, and F [34] (+)-Dihydrocalanolide A and B [35] Pseudocordatolide C [36]	Antiviral Antiviral Antiviral Antiviral
5	Phenyl coumarins		Isodispar B, dispardiol B, mammae A/AB cyclo E, mammae A/AB dioxalanocyclo F, disparinol D, disparpropylinol B [37]	
6	Bicoumarins		Dicoumarol [38]	Anticoagulant

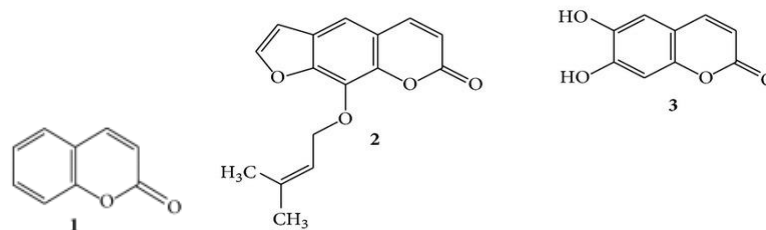
Πίνακας 4. Αναλυτική ταξινόμηση φυσικών κουμαρινών, κύρια κουμαρινικά είδη, δομικά χαρακτηριστικά με παραδείγματα και αντίστοιχες φαρμακευτικές εφαρμογές.

1.5. Βιοδραστικότητα κουμαρινικών αναλόγων

1.5.1. Κουμαρινικά ανάλογα με αντιφλεγμονώδη δράση

Οι απλές Κουμαρίνες (1) εμφανίζουν αντι-φλεγμονώδη δράση και χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του οιδήματος με αφαίρεση της πρωτεΐνης και του οιδηματικού υγρού, από τον τραυματισμένο ιστό. Αυτή η διεργασία πραγματοποιείται μέσω της διέγερσης της φαγοκυττάρωσης, της παραγωγής του ενζύμου και έτσι της πρωτεόλυσης. Ένα τέτοιο παράδειγμα απλής κουμαρίνης αποτελεί η *Esculetin*. Η *Esculetin* (3) είναι μια φυσική λακτόνη που προκύπτει από την ενδομοριακή κυκλοποίηση ενός παραγώγου κινναμικού οξέος. Εμφανίζει αντι-φλεγμονώδη δραστηριότητα, αναστέλλοντας τις κοιλιακές συσπάσεις που προκαλούνται μετά τη χορήγηση τρινιτροβενζολοσουλφονικού οξέος, σε ποντίκια, αναστέλλοντας τα ένζυμα κυκλοοξυγονάσης και λιποξυγονάσης.

Μια άλλη ένωση, η φουρανοκουμαρίνη *imperatorin* (2) παρουσιάζει επίσης αντι-φλεγμονώδη δραστηριότητα σε λιποπολυσακχαρικά-διεγερμένα μακροφάγα ποντικού *in vitro* και αναστολή του πελματικού οιδήματος (του ποντικού) που προκαλείται από την χορήγηση καραγεννίνης, *in vivo*.^[18]



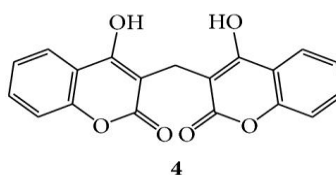
Σχήμα 5 . Δομή απλής κουμαρίνης(1), Φουρανοκουμαρίνης-*imperatorin* (2) και *Esculetin*. Κουμαρινικά παράγωγα με αντιφλεγμονώδη δράση.

1.5.2 Κουμαρίνες με Αντιπηκτική Δράση

Υπάρχουν δύο τάξεις αντιθρομβωτικών παραγόντων, οι αντιπηκτικοί που εμποδίζουν την δημιουργία θρομβίνης και το σχηματισμό των θρόμβων και οι αντιαιμοπεταλιακοί παράγοντες που σταματούν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων^[18-22]

Η *Δικουμαρόλη*, η οποία παρασκευάζεται κατά την συμπύκνωση της 4 υδροξυκουμαρίνης με φορμαλδεΐδη, εμφανίζει ισχυρή αντιθρομβωτική δράση (ανταγωνιστική της βιταμίνης K) και χρησιμοποιείται στη θεραπευτική επί φραγμάτων και μετεγχειρητικών θρομβώσεων. Η *Δικουμαρόλη* απαντά σε αλλοιωμένο τριφύλλι και είναι υπεύθυνη για τις παρατηρούμενες ανωμαλίες σε ζώα που διατρέφονται με τέτοιο τριφύλλι.

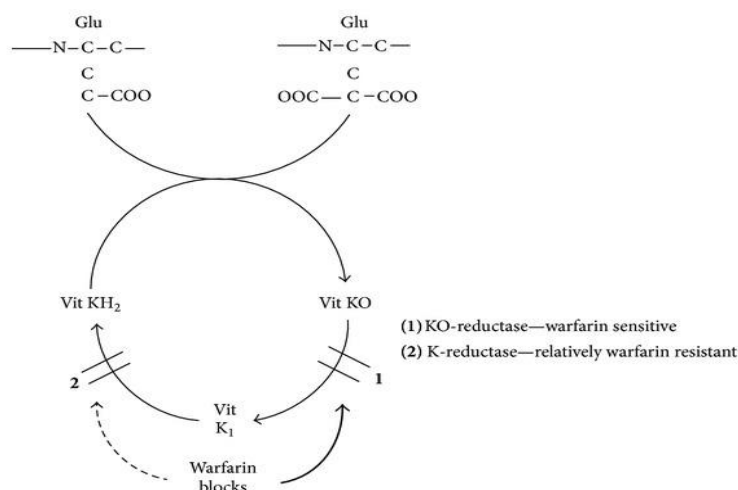
Η χημική δομή της *Δικουμαρόλης* (*Dicoumarol*) (4) που βρέθηκε στο γλυκό τριφύλλι και φέρεται να παρουσιάζει αντιπηκτική δράση:



Σχήμα 6 . (*Dicoumarol*)-κουμαρινικό παράγωγο με αντιπηκτική δράση

Οι Κουμαρίνες είναι ανταγωνίστριες της βιταμίνης K και παρουσιάζουν την αντιπηκτική τους δράση, παρεμβαίνοντας, με την κυκλική αλληλομετατροπή της βιταμίνης K και των 2,3 εποξειδίων της (εποξειδία βιταμίνης K). Η βιταμίνη K είναι ένας συν-παράγοντας για την μετα-μεταφραστική καρβοξυλίωση των γλουταμικών

υπολειμμάτων σε γ-καρβοξυγλουταμάδες επί των N-τερματικών περιοχών των Κ-εξαρτώμενων πρωτεϊνών (Σχήμα 7)



Σχήμα 7 . Το κουμαρινικό ανάλογο Βαρφαρίνη (warfarin) και ο κύκλος της βιταμίνης Κ.

Αυτοί οι παράγοντες πήξης απαιτούν γ-καρβοξυλίωση για τη βιολογική τους δραστηριότητα. Οι Κουμαρίνες προάγουν την αντιπηκτική-αντιθρομβωτική τους δράση μέσω της αναστολής του κύκλου-μετατροπέα της βιταμίνης Κ, προκαλώντας έτσι την ηπατική παραγωγή μερικώς καρβοξυλιωμένων και αποκαρβοξυλιωμένων πρωτεϊνών με μειωμένη προπηκτική δραστηριότητα. Εκτός από την αντιπηκτική δράση τους, οι ανταγωνιστές της βιταμίνης Κ αναστέλλουν την καρβοξυλίωση των ρυθμιστικών αντιπηκτικών πρωτεϊνών C , S και ως εκ τούτου έχουν τη δυνατότητα να ασκήσουν μια επίδραση προπηκτική.

Με την παρουσία ιόντων ασβεστίου, η καρβοξυλίωση προκαλεί μια διαμορφωτική αλλαγή στις πρωτεΐνες πήξης, που προωθεί την σύνδεση με συμπράγοντες σε επιφάνειες των φωσφολιπιδίων. Η αντίδραση της καρβοξυλίωσης απαιτεί την μειωμένη μορφή της βιταμίνης Κ (βιταμίνη ΚΗ₂), του μοριακού οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα, και συνδέεται με την οξείδωση της βιταμίνης ΚΗ₂, σε εποξείδιο της βιταμίνης Κ. Το εποξείδιο της βιταμίνης Κ στη συνέχεια ανακυκλώνεται σε βιταμίνη ΚΗ₂ μέσω δύο ενζυμικών σταδίων. Στο πρώτο στάδιο, το οποίο είναι ευαίσθητο στους ανταγωνιστές της βιταμίνης Κ, ελαττώνει

το εποξείδιο της βιταμίνης K προς τον σχηματισμό της βιταμίνης K1 (η φυσική μορφή της βιταμίνης K1 στα τρόφιμα), ενώ στο δεύτερο στάδιο, το οποίο είναι σχετικά ευαίσθητο σε ανταγωνιστές της βιταμίνης K, ελαττώνεται η βιταμίνη K1 σε βιταμίνη K_{H2}.

Η θεραπεία με τους ανταγωνιστές της βιταμίνης K οδηγεί στην εξάντληση της βιταμίνης K_{H2}, περιορίζοντας έτσι τη γ-καρβοξυλίωση των εξαρτώμενων πρωτεϊνών με πηκτική δράση, από την βιταμίνη K. Η επίδραση των κουμαρινών μπορεί να εξουδετερωθεί από τη βιταμίνη K1 (η οποία προσλαμβάνεται με την τροφή ή μπορεί να χορηγηθεί θεραπευτικά), επειδή το δεύτερο στάδιο είναι σχετικά “αναίσθητο” στους ανταγωνιστές της βιταμίνης K ^[18](Σχήμα 7).

Η *Βαρφαρίνη (Warfarin)* (3-(α-ακετοτυλοβενζυλο)-4-υδροξυκουμαρίνη) αποτελεί την κύρια αντιπηκτική θεραπεία παγκοσμίως πάνω από είκοσι χρόνια. Αποτελεί συνθετικό παράγωγο της *Δικουμαρόλης*, και είναι από τα παλαιότερα και αποτελεσματικότερα αντιθρομβωτικά που κυκλοφορούν ^[23]. Με τη μορφή του άλατός του με νάτριο αποτελεί το δραστικό συστατικό του εμπορικού φαρμάκου κουμαδίνη (*Coumadin*) και είναι το πιο γνωστό, καθώς είναι ευρέως διαδεδομένο σε όλο τον αγγλοσαξονικό κόσμο. Χρησιμοποιείται ευρέως σε περιπτώσεις φλεβικού θρομβοεμβολισμού ^[24], αλλά και μετά από ένα έμφραγμα του μυοκαρδίου, για την πρόληψη ενός δεύτερου.

Η *Ασενοκουμαρόλη* είναι ένα αντιπηκτικό που δρα ως ανταγωνιστής της βιταμίνης K (όπως η βαρφαρίνη) και διατίθεται στο εμπόριο με τις εμπορικές ονομασίες Sintrom και Sinthrome. Βιοχημικά οι δύο ουσίες δρουν με παρόμοιο τρόπο, αλλά διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το χρόνο έναρξης και τη διάρκεια της δράσης τους. ^[25]

1.5.3 Κουμαρίνες με αντιβακτηριακή δράση

Η παραδοσιακή αντιβακτηριακή θεραπεία περνάει εν μέσω κρίσης εξαιτίας της όλο ένα αυξανόμενης αντίστασης των υπαρχόντων στελεχών. Το γεγονός αυτό έχει στρέψει τα τελευταία χρόνια τις έρευνες στο βασίλειο των φυτών, το οποίο

αποτελεί πηγή νέων χημικών ουσιών, σημαντικών για την πιθανή τους χρήση στην ιατρική.

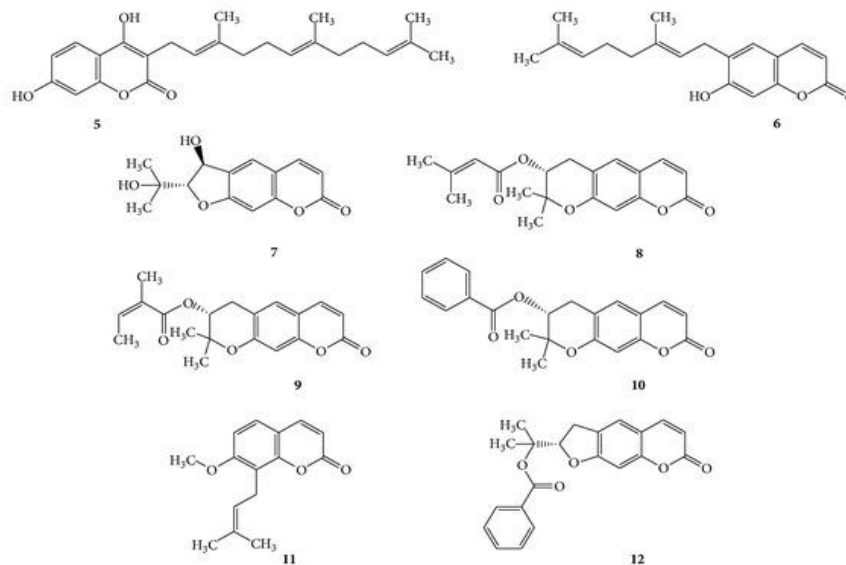
Οι κουμαρίνες ως δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών παρουσιάζουν σημαντική βιολογική δραστικότητα η οποία ποικίλει ανάλογα με το είδος και τη θέση των υποκαταστατών.

Οι υποκατεστημένες 4-(1-piperaziny) κουμαρίνες εμφανίζουν αντιαμοπεταλιακή δραστικότητα συσσωμάτωσης, τα 8-υποκατεστημένα παράγωγα της 7-γερανυλοξικουμαρίνης -geranyloxycoumarin (ιδιαίτερα τα παράγωγα 8-μεθόξυ και 8-ακετόξυ) παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δραστικότητα και η 8-υποκατεστημένες 7-μεθοξικουμαρίνες φέρεται να έχουν ισχυρά αποτελέσματα αντι-καρκινικής δράσης. (2)

Η απλή κουμαρίνη έχει χαμηλή αντιβακτηριακή δραστικότητα, ωστόσο οι ενώσεις που έχουν μακριές αλυσίδες υποκατεστημένων υδρογονανθράκων όπως η Ammoresinol(5) και η Ostruthin(6) παρουσιάζουν δραστικότητα σε ένα ευρύ φάσμα των Gram -θετικών βακτηρίων όπως είναι οι Bacillus megaterium, Micrococcus luteus, Micrococcus lysodeikticus, και Staphylococcus aureus. Μια άλλη κουμαρινική ένωση η Anthogenol (7) παρουσιάζει δράση κατά του Enterococcus, ενώ η φουρανοκουμαρίνη Imperatorin (2) παρουσιάζει δραστικότητα έναντι της Shigella dysenteriae.

Τα παρακάτω κουμαρινικά παράγωγα Grandivittin (8), Agasyllin (9), Aegelinol Benzoate(10) και Osthole (11) που έχουν απομονωθεί από τις ρίζες του Ferulago campestris (Apiaceae), όπως και η Felamidin (12) που απομονώθηκε από το φυτό Ferulago campestris [6], παρουσιάζουν επίσης αντιβακτηριακή δράση.

Η Aegelinol και Agasyllin έδειξαν σημαντική αντιβακτηριακή δραστικότητα έναντι των κλινικώς απομονωμένων Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηριακών στελεχών όπως Staphylococcus aureus, Salmonella typhi, Enterobacter cloacae και Enterobacter aerogenes.



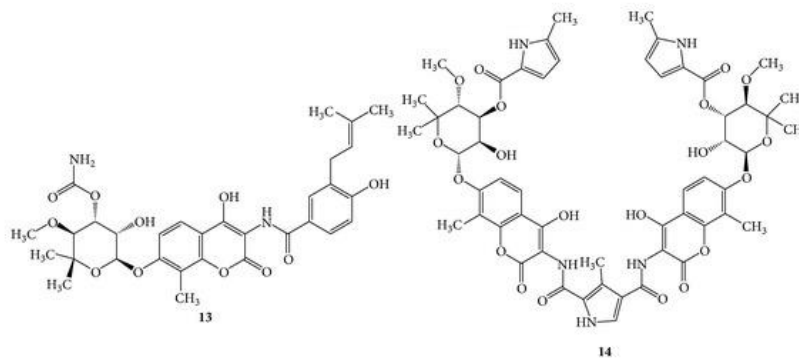
Σχήμα 8 . Δομές των κουμαρικών

ενώσεων, *Ammoresinol* (5), *Ostruthin* (6), *Anthogenol* (7), *Grandivittin* (8), *Agasyllin* (9), *Aegelinol* (10), *Osthole* (11), *Felamidin* (12), με αξιόλογη αντιβακτηριακή δράση

Πολλές από τις φυσικές κουμαρίνες έχουν απομονωθεί από τα φυτά όπως έχει ήδη αναφερθεί. Ωστόσο ορισμένες από αυτές έχουν ανακαλυφθεί και σε μικροοργανισμούς. Τα σημαντικότερα κουμαρινικά μέλη που προέρχονται από μικροβιακές πηγές είναι η *Νοβοβιοκίνη* (νονοβιοσίνη), η *Κουμερμυκίνη* (coumermycin) και η *σαρτεουσίνη* (chartreusin).

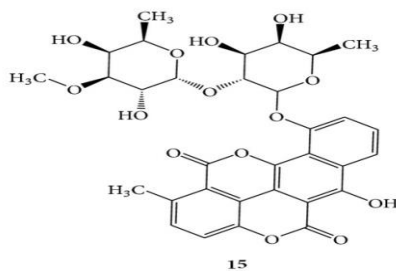
Η **Νοβοβιοκίνη** (νονοβιοσίνη) (13) έχει απομονωθεί ως μεταβολίτης από τον μύκητα *Streptomyces niveus* και *Streptomyces spheroides*, έχοντας επιδείξει ένα ευρύ φάσμα αντιβακτηριακής δραστηριότητας έναντι των Gram-θετικών οργανισμών (*Corinebacterium diphtheria*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces pneumoniae*, και *Streptomyces pyogenes*) και έναντι των Gram-αρνητικών μικροοργανισμών (*Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, και *Pasteurella*). Τέλος αξίζει να αναφερθεί και η αποτελεσματική δράση της στην αναστολή γήρανσης του DNA.

Η **Κουμερμυκίνη** (14), η οποία είναι δομικά παρόμοια με την Νοβοβιοκίνη είναι σχεδόν 50 φορές πιο ισχυρή σε δραστηριότητα , έναντι της *Escherichia coli* και του *Staphylococcus aureus*. Ωστόσο παράγει μια βακτηριοστατική δράση στην οποία ο οργανισμός σταδιακά αναπτύσσει αντίσταση. (Σχήμα 9)



Σχήμα 9 . Δομές των κουμαρικών ουσιών *Νοβοβιοκίνη* (13) και *Κουμερμικίνη*, με αξιόλογη αντιβακτηριακή δράση και προερχόμενα από μικροβιακές πηγές.

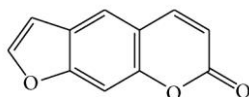
Η *Chartreusin* (15) έχει απομονωθεί από το μικροβιακό στέλεχος *Streptomyces chartreusis* . Έχει ασυνήθιστη δομή και είναι κυρίως ενεργή έναντι των Gram-θετικών βακτηριδίων. Ωστόσο λόγω της τοξικότητάς της, η ένωση δεν έχει δοκιμαστεί για θεραπευτική εφαρμογή. [18]



Σχήμα 10 . Δομή της κουμαρινικής ουσίας *Chartreusin* (15) , με αξιόλογη αντιβακτηριακή δράση και προερχόμενη από μικροβιακή πηγή.

1.5.4 Κουμαρίνες με αντιμυκητική δράση

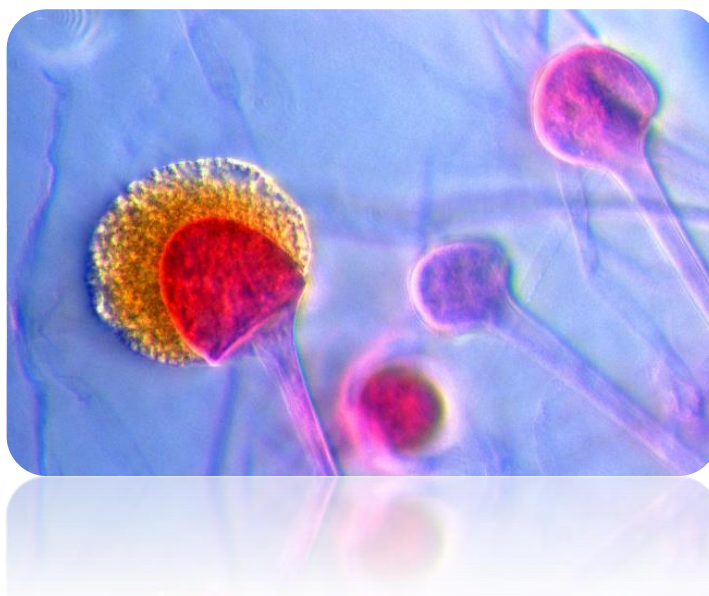
Ένας μεγάλος αριθμός κουμαρινικών αναλόγων έχουν ελεγχθεί για την αντιμυκητική τους δράση με τρία από αυτά να ενδείκνυνται για την αποτελεσματικότητά τους, το *Ψωραλένιο* (16), η *Imperatorin* (2), και η *Ostruthin* (6).



16

Σχήμα 11. Δομή του κουμαρινικού αναλόγου *Ψωραλένιο* (16), με αποτελεσματική αντιμυκητική δράση.

Η *Osthole* (11) είναι ένα βιοδραστικό παράγωγο κουμαρίνης, η οποία εκχυλίζεται από τα φαρμακευτικά φυτά *Angelica rubescens*, *Cnidium monnieri*, και *Peucedanum ostruthium*. Παραπάνω αναφέρθηκε η αντιβακτηριακή της δράση, ωστόσο παρουσιάζει και ένα ευρύ φάσμα αντιμυκητικής δραστηριότητας, έναντι σημαντικών παθογόνων των φυτών, όπως είναι οι *Rhizoctonia solani* (**Εικόνα 2**), *Phytophthora capsici*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, και *Fusarium graminearum*.^[18]



Εικόνα 2. Ενδεικτική μορφή του παθογόνου *Rhizoctonia solani*

1.5.5 Κουμαρίνες με αντι-ικική δράση

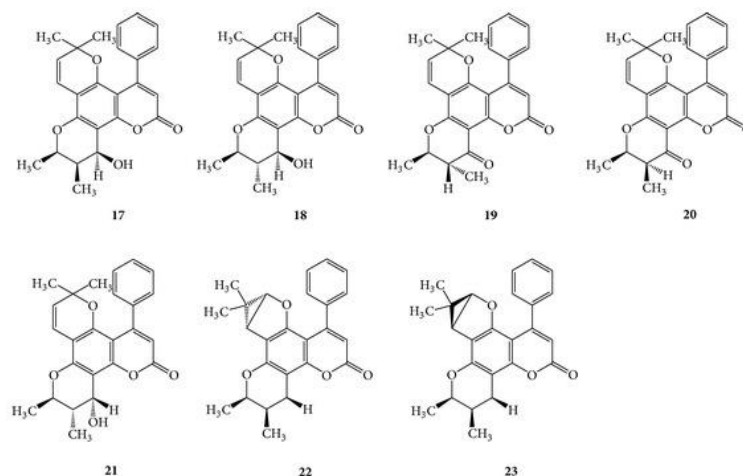
Το σύνδρομο επίκτητης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (AIDS), προκαλείται από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (HIV). Ο ιός αυτός οδηγεί στη λειτουργική βλάβη του ανοσοποιητικού συστήματος και τελικά στην καταστροφή του, καταστρέφοντας διαδοχικά την ικανότητα του οργανισμού να αμύνεται έναντι των μολυσματικών ασθενειών. [18]

Πολλές κουμαρινικές ενώσεις που απαντώνται στο φυτικό βασίλειο βρέθηκε ότι αναστέλλουν διάφορα στάδια του κύκλου αναπαραγωγής του HIV. Οι κουμαρίνες αυτές μπορεί να παρεμποδίζουν την προσβολή από τον ιό είτε να παρεμποδίζουν την αντιγραφή του είτε να αναστέλλουν ένζυμα όπως οι πρωτεάσες, ιντεγκράσες και οι αντίστροφες μεταγραφάσες, που καταλύουν ζωτικές για τον ιό ενζυμικές αντιδράσεις.

Μια μεγάλη ποικιλία από φυσικά προϊόντα που αποτελούν ενώσεις με κουμαρινικό πυρήνα και έχουν περιγραφεί ως αντι-HIV παράγοντες είναι οι παρακάτω.

Οι κουμαρινικές ενώσεις ,με αντι-HIV αναφορά *Inophyllum A* (17), *Inophyllum B* (18), *Inophyllum C* (19), *Inophyllum E* (20), *Inophyllum P* (21), *Inophyllum G1* (22), και *Inophyllum G2* (23) έχουν απομονωθεί από το γιγάντιο αφρικανικό σαλιγκάρι, *Achatina Fulica*. Πιο συγκεκριμένα ως προς την δράση τους οι *Inophyllums B* και *P* (18 και 21) ανιχνεύτηκαν με ανασταλτική δράση ως προς τον HIV αντίστροφης μεταγραφάσης (RT) με τιμές IC₅₀ 38 και 130 ηΜ, αντίστοιχα, ενώ και τα δύο βρέθηκαν δραστικά έναντι του HIV-1 σε κυτταρική καλλιέργεια (IC₅₀¹ του 1,4 και 1,6 μΜ). (Σχήμα 12)

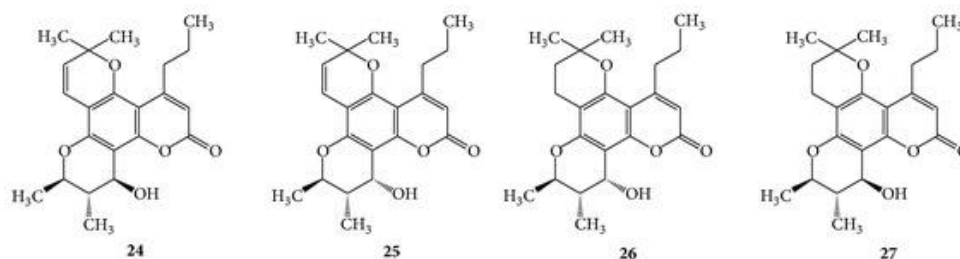
¹ Η ημιμέγιστη ανασταλτική συγκέντρωση (IC₅₀) είναι ένα μέτρο αποτελεσματικότητας μιας ουσίας, στην αναστολή μιας συγκεκριμένης βιολογικής ή βιοχημικής λειτουργίας.



Σχήμα 12. Χημική δομή των κουμαρινικών αναλόγων *Inorphyllum A* (17), *Inorphyllum B* (18), *Inorphyllum C* (19), *Inorphyllum E* (20), *Inorphyllum P* (21), *Inorphyllum G1* (22), και *Inorphyllum G2* (23), με αντι-HIV δράση.

Το 1992 ανακαλύφθηκαν και απομονώθηκαν τα κουμαρινικά παράγωγα, *Καλανολίδες* (τα δύο ισομερή, (+) - *calanolide A* (καλανολίδιο A) (24) και (-) - *calanolide B* (καλανολίδιο B) (25)), από το φυτό *Calorphyllum lanigerum*, οι οποίες είναι ενεργές έναντι του HIV-1, στο πρώιμο στάδιο της αναπαραγωγής του. Πρόκειται για τετρακυκλικές κουμαρίνες που ο C δακτύλιος τους περιέχει μια *gem*-διμεθυλο-ομάδα.

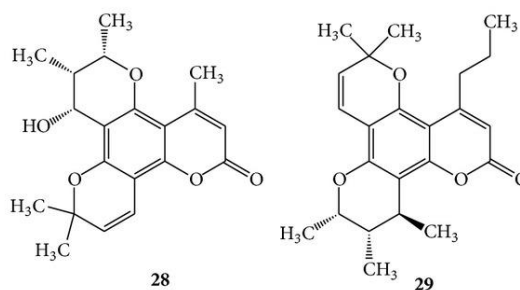
Το (+) - *calanolide A* είναι ένας μη νουκλεοζιτικός RT αναστολέας με ισχυρή δραστηριότητα κατά του HIV-1. Από την άλλη οι (-) - *calanolide B* και (-) - *dihydrocalanolide B* (26) διαθέτουν αντι-ικικές ιδιότητες παρόμοιες με εκείνες του (+) - *calanolide A*. Τόσο οι (+) - *calanolide A* και (+) - *dihydrocalanolide A* (27), είναι σταθερές σε ουδέτερο pH και επί του παρόντος, υπό ανάπτυξη για την θεραπεία των λοιμώξεων HIV. Ωστόσο, σε pH <2,0 και για 1 ώρα, τα πειραματικά αποτελέσματα ανέχνησαν ότι το 73% του (+) - *καλανολίδιο A* φέρεται να μετατρέπεται σε (+) - *καλανολίδιο B*, ενώ 83% από (+) - *dihydrocalanolide A* σε (+) - *dihydrocalanolide B*. [18] (Σχήμα 13)



Σχήμα 13. Χημική δομή των κουμαρινικών αναλόγων (+) - *calanolide A* (24), (-) - *calanolide B* (25), (-) - *dihydrocalanolide B* (26), (+) - *dihydrocalanolide A* (27) με αντι-ικικές ιδιότητες.

Οι πυρανοκουμαρίνες *Pseudocordatolide C* (28) και *Calanolide F* (29), απομονωμένες από τα εκχυλίσματα *Calophyllum lanigerum* και *Calophyllum teysmannii* με χημικές δομές όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα, έχουν επίσης παρουσιάσει αντι-HIV δραστηριότητα. (Σχήμα 14)

Η κουμαρινική ένωση *Imperatorin* (2) που την έχουμε συναντήσει και με άλλες βιοδραστικές ιδιότητες, αναστέλλει επίσης είτε τον ψευδότυπο ιό της φυσαλιδώδους στοματίτιδας ή το περίβλημα του ανασυνδυασμένου HIV-1 που προκαλεί λοίμωξη σε διάφορες T-κυτταρικές σειρές και σε κύτταρα HeLa².



Σχήμα 14. Χημική δομή των πυρανοκουμαρινών *Pseudocordatolide C* (28) και *Calanolide F*, με ανιχνευμένη αντι-HIV δραστηριότητα.

1.5.6 Κουμαρίνες με αντικαρκινική δράση

Η δράση μιας ποικιλίας κουμαρινικών ενώσεων πάνω στα καρκινικά κύτταρα, έχει γίνει αντικείμενο εκτενούς δράσης από τους ερευνητές που έχουν αποδείξει την εκλεκτικότητα τους, αλλά και την επίδραση τους στην ρύθμιση της

² Το κύτταρο HeLa, είναι ένας τύπος κυττάρου που ανήκει σε μια "αθάνατη" κυτταρική γραμμή που χρησιμοποιείται στην επιστημονική έρευνα. Είναι το παλαιότερο και πιο συχνά χρησιμοποιούμενο, στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά.

ανοσολογικής απόκρισης, της κυτταρικής ανάπτυξης και της διαφοροποίησης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι παρακάτω κουμαρινικές ενώσεις, κάποιες από τις οποίες έχουμε συναντήσει ήδη, χαρακτηριζόμενες και από άλλες βιοδραστικές ιδιότητες.

Η γραμμική φουρανοκουμαρίνη *Ιμπερατορίνη (Imperatorin (2))* έχει εμφανίσει αντικαρκινικές ιδιότητες, ενώ η *Οσθόλη(Osthole) (11)* φέρεται να δρά αποτελεσματικά στην αναστολή της μετανάστευσης και εισβολής καρκινικών κυττάρων του μαστού, επουλώνοντας τις πληγές. Οι δοκιμασίες με την λουσιφεράση³ και τη ζυμογραφία⁴ αποκάλυψαν ότι η *Οσθόλη (11)* αναστέλλει αποτελεσματικά τον υποκινητή της μήτρας της μεταλλοπρωτεϊνάσης και την ενζυμική δραστηριότητα, το οποίο θα μπορούσε να είναι και η αιτία που οδηγεί στην αναστολή της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων από την *Οσθόλη*.

Η Εσκουλετίνη (*Esculetin (3)*), έχει παρουσιάσει αντικαρκινική δράση ενώ φέρεται να διασώζει αποτελεσματικά καλλιεργημένους πρωτογενείς νευρώνες, εκτεθειμένους στην τοξικότητα της Ν -μέθυλο -ασπαρτάτης (methyl-D-aspartate).

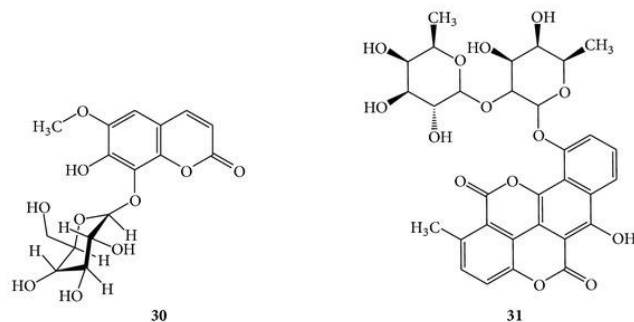
Η *Φραξίνη (Fraxin (30))*, έχει επιδείξει προστατευτική επίδραση έναντι της κυτταροτοξικότητας που προκαλείται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου, πάνω σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα της ομφάλιας φλέβας.

Οι περισσότερες από τις κουμαρίνες *Grandivittin (8)*, *Agasyllin (9)*, *Aegelinol Benzoate(10)* και *Osthole (11)* που έχουν απομονωθεί από τις ρίζες του *Ferulago campestris* (Ariaceae), εμφάνισαν οριακή κυτταροτοξική δραστηριότητα έναντι του καρκίνου του πνεύμονα.

Τέλος η *Chartreusin (15)* έχει παρουσιάσει αντικαρκινικές ιδιότητες κατά της P388 λευχαιμίας και του μελανώματος B16. Η 3'- *Demethylchartreusin (31)*, είναι ένα νέο αντιβιοτικό κατά του όγκου που παράγεται από τον *Streptomyces chartreusis* και αποτελεί δομικό ανάλογο της *chartreusis* περιέχοντας το ίδιο τμήμα αγλυκόνης αλλά διαφορετικά τμήματα σακχάρου. [18-26]

³ Η λουσιφεράση είναι ένας γενικός όρος για την κατηγορία των οξειδωτικών ενζύμων που χρησιμοποιούνται στην βιοφωταύγεια και διακρίνεται από μια φωτοπρωτεΐνη. Στην αντίδραση λουσιφεράσης, εκπέμπεται φως όταν η λουσιφεράση δράσει με το κατάλληλο σχετικό υπόστρωμα λουσιφερίνης. Η εκπομπή των φωτονίων μπορεί να ανιχνευθεί με κατάλληλες φωτοευαίσθητες συσκευές όπως ένα φωτόμετρο ή τροποποιημένα οπτικά μικροσκόπια. Αυτό επιτρέπει την παρατήρηση των βιολογικών διεργασιών.

⁴ Ζυμογραφία είναι μία ηλεκτροφορητική τεχνική για την ανίχνευση υδρολυτικών ενζύμων, με βάση το υπόστρωμα του ενζύμου.



Σχήμα 15. Χημική δομή των Fraxin (30) και 3'-Demethylchartreusin (31)

1.5.7 Κουμαρίνες με αντιυπερτασική δράση

Μια νέα κουμαρινική ένωση με το όνομα *Dihydromammea C / OB* (32) έχει ανακαλυφθεί και απομονωθεί από τους σπόρους του δέντρου της Δυτικής Αφρικής *Mammea africana* Sabine (guttiferae), ενώ η μοριακή δομή της έχει διευκρινιστεί με τη μέθοδο της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ.

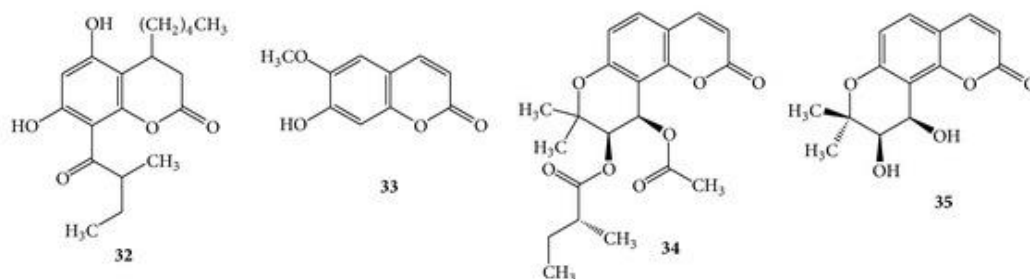
Η αντιυπερτασική δράση του εκχυλίσματος της μεθανόλης και του διχλωρομεθανίου από το φλοιό των δέντρων *Mammea africana* μελετήθηκε μέσα από πειράματα σε αλμπίνο ,τύπου Wistar, διαβητικούς αρσενικούς αρουραίους βάρους 200-250 g, ηλικίας 3 μηνών. Πέρα από την ταυτοποίηση της δραστηριότητας τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική αντιυπεργλυκαιμική δραστηριότητα και βελτιωμένες μεταβολικές αλλαγές στην επαγόμενη στρεπτοζοτοκίνη στους αρουραίους .

Η συγκεκριμένη κουμαρίνη ανέδειξε επιπλέον αγγειοδιασταλτικά αποτελέσματα σε καλλιεργημένα κύτταρα του μυοκαρδίου.

Μια άλλη κουμαρινική ένωση η *Σκοπολετίνη (Scopoletin)* (33) απομονωμένη από τους καρπούς του δέντρου *Tetrapleura tetraptera* Taub (Mimosaceae) έχει παρουσιάσει υποτασική δράση σε πειραματόζωα *in vitro* και *in vivo* μέσω της ομαλής μυοχαλαρωτικής δραστηριότητας του.

Η *Βιζναδίνη (Visnadine)* (34), ένα ενεργό συστατικό που εξάγεται από το φρούτο του *Ammi visnaga*, έχει εμφανίσει αγγειοδιασταλτική περιφερική και στεφανιαία δραστηριότητα με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της στηθάγχης. [18]

Η *Khellactone* (35) απομονωμένη από το φυτό *Phlojodicarpus sibiricus* έχει επίσης παρουσιάσει αγγειοδιασταλτική δράση.



Σχήμα 16. Κουμαρινικές δομές των *Dihydromammea C / OB* (32), *Scopoletin* (33), *Visnadine* (34), *Khellactone* (35) με αντιυπερτασική δράση.

1.5.8 Κουμαρίνες με αντιφυματική δράση

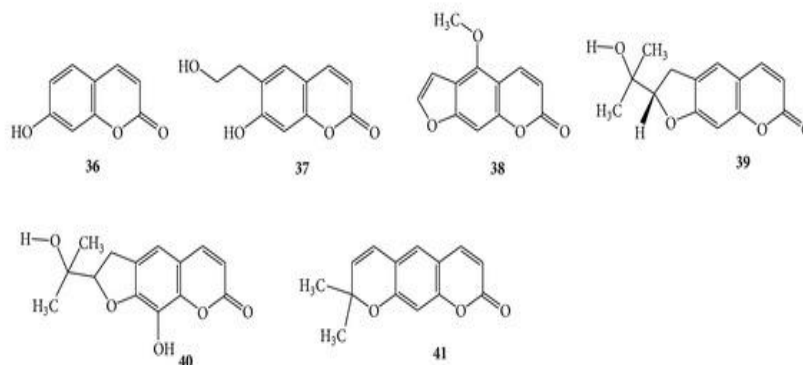
Η *Ουμπελιφερόνη* (*Umbelliferone*) (36) βρίσκεται σε πολλά φυτά και λαμβάνεται από την απόσταξη των ρητινών που ανήκουν στην φυσική τάξη των σκιαδοφόρων. Τα κουμαρινικά παράγωγα όπως φαίνονται στο [Σχήμα 17](#), *Ουμπελιφερόνη* (36), *Φελοδενόλη Α* (37), *Ψωραλένιο* (16) *Σκοπολετίνη* (33), *Μπεργκαπτένη* (38), (+) - (S) -*Μαρμεσίνη* (39), (+) - (S) -*Ρουταρετίνη* (40) και *Ξανθολετίνη* (41), έχουν απομονωθεί από το φυτό *Fatoua pilosa*.

Τα παραπάνω έχουν ταυτοποιηθεί ως προς την αντιφυματική τους δράση με τα εξής αναλυτικά αποτελέσματα:

Οι κουμαρινικές ενώσεις της *Σκοπολετίνης* και *Ουμπελιφερόνης* φέρονται να είναι ιδιαίτερα δραστικές έναντι του μυκοβακτηρίου *tuberculosis H37Rv* με τιμές MIC⁵ 42 και 58,3 μg/mL αντίστοιχα.

Οι ενώσεις *Φελοδενόλη Α*, (+) - (S) *Μαρμεσίνη* και *Ξανθολετίνη* επέδειξαν δραστηριότητα σε 60 μg / mL, ενώ οι υπόλοιπες ενώσεις εμφάνισαν δραστηριότητα σε περισσότερα από 119 μg / mL^[18]. (Σχήμα 17)

⁵ Στην μικροβιολογία, η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση αντιμικροβιακού που αναστέλλει την ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού μετά από ολονύκτια επώαση. Οι τιμές του δείκτη MIC είναι σημαντικές στα διαγνωστικά εργαστήρια για την επιβεβαίωση της αντίστασης των μικροοργανισμών σε ένα αντιμικροβιακό παράγοντα και επίσης στην παρακολούθηση της δραστηριότητας των νέων αντιμικροβιακών παραγόντων. Η MIC θεωρείται γενικά ως το πιο βασική εργαστηριακή μέτρηση της δραστηριότητας ενός αντιμικροβιακού παράγοντα έναντι ένας οργανισμού.



Σχήμα 17. Χημικές δομές κουμαρινικών αναλόγων με αντιφυματική δράση. Ουμπελιφερόνη (36), Φελοδενόλη Α (37), Ψωραλένιο (16) Σκοπολετίνη (33), Μπεργκαπτίνη (38), (+) - (S) -Μαρμεσίνη (39), (+) - (S) -Ρουταρετίνη (40) και Ξανθολετίνη (41).

1.5.9 Κουμαρίνες με αντιεπιληπτική-αντισπασμωδική δράση

Η επιληψία είναι μια σοβαρή νευρική νόσος που προσβάλλει περίπου 50 εκατομμύρια ανθρώπους σε όλο τον κόσμο. Παρά το γεγονός ότι στην πλειοψηφία τους οι ασθενείς με επιληψία και επιληπτικές κρίσεις ελέγχονται ικανοποιητικά με τα σημερινά διαθέσιμα αντιεπιληπτικά φάρμακα (ΑΕΦ), εξακολουθούν να υπάρχουν περισσότεροι από 30% των ασθενών που πάσχουν από επιληψία ανθεκτική στη φαρμακολογική θεραπεία και περίπου 30-40% του συνόλου των επιληπτικών ασθενών που πάσχουν από πολλές παρενέργειες. [27]

Ως εκ τούτου, πολλοί ερευνητές προσπαθούν να αναπτύξουν νέες προσεγγίσεις για τη θεραπεία της επιληψίας, για παράδειγμα, να ανακαλύψουν νέα αντιεπιληπτικά συστατικά από φυτικά φάρμακα. Η κουμαρινική οικογένεια φέρεται να αποτελεί ένα από τα πεδία ερευνών καθώς ήδη υπάρχουν αξιολογικά αποτελέσματα σε ότι αφορά την αντισπασμωδική δράση δυο κυρίως κουμαρινικών αναλόγων.

Πιο συγκεκριμένα η *Ιμπερατορίνη* (*Imperatorin* (2)) έδειξε αντισπασμωδική δράση σε πειραματικές μελέτες που έγιναν πάνω σε ποντίκια με την τιμή της ED50⁶ να κυμαίνεται μεταξύ 167 και 290 mg / kg και της TD50 μεταξύ 329 και 443 mg / kg.

⁶ Μία αποτελεσματική δόση (ED) στην φαρμακολογία είναι η δόση ή η ποσότητα του φαρμάκου που παράγει μια θεραπευτική ανταπόκριση ή ένα επιθυμητό αποτέλεσμα σε κάποιο κλάσμα των υποκειμένων λήψης. Η

Η Οσθόλη (*Osthole* (11)) από την άλλη έχει παρουσιάσει αντισπασμωδική δράση σε ποντίκια με την τιμή της ED50 να κυμαίνεται μεταξύ 253 και 639 mg / kg και οξείες νευροτοξικές επιδράσεις με τις τιμές TD50⁷ να κυμαίνονται μεταξύ 531 και 648 mg / kg . [18]

1.5.10 Κουμαρίνες με αντιοξειδωτική δράση

Οι ιδιαίτερα δραστικές ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται από διάφορους παράγοντες όπως είναι οι εξωγενείς χημικές ουσίες, το άγχος ή και το σύστημα τροφίμων. Κατά την οξείδωση των βιομορίων, είναι ικανές να προκαλέσουν πολλές αρρώστιες όπως είναι ο καρκίνος, η στεφανιαία νόσος και η υπέρταση.

Οι Κουμαρίνες ως φυσικά φαινολικά συστατικά που προέρχονται από φαρμακευτικά φυτά, λαχανικά και φρούτα, έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση [28] . Πιο συγκεκριμένα έχουν περιγραφεί να μειώνουν τον σχηματισμό και να ενεργοποιούν την διαδικασία της απομάκρυνσης των ROS⁸, παρουσιάζοντας έτσι προστατευτικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες κατά των βλάβη των ιστών. [31]

Ως εκ τούτου, έχουν επίσης βρεθεί να αναστέλλουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων, ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί και ως αναστολείς της λιποξυγενάσης και κυκλοοξυγενάσης στην αλληλουχία των πρωτεασών σερίνης, τυροσίνης κινάσης του αραχιδονικού οξέος. [29]

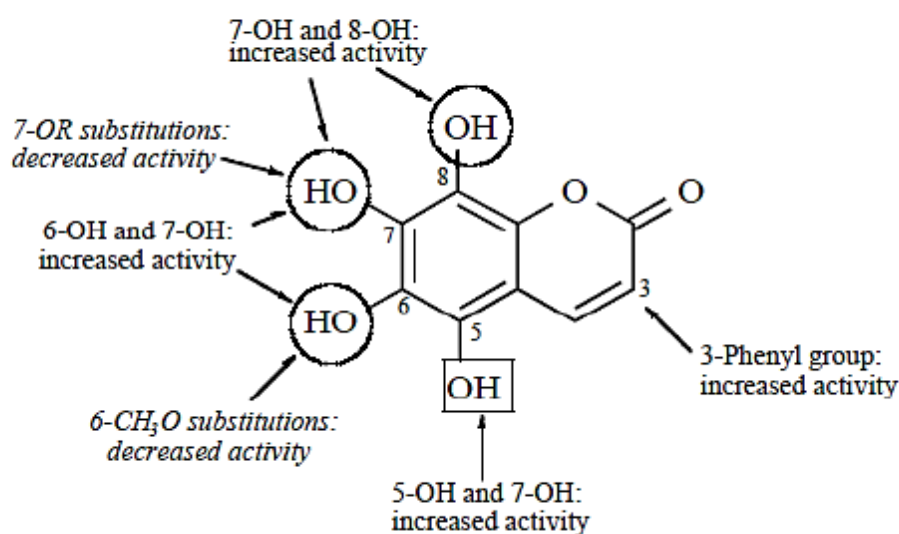
Οι κουμαρίνες έχουν επιπλέον αξιολογηθεί in vitro για την ανασταλτική τους δράση ως προς , την ελαστάση των ανθρώπινων λευκο-κυττάρων [30] , την θρομβίνη, την πλασμίνη και τον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου ιστού.

«μέση αποτελεσματική δόση" (ED50) είναι η δόση, που παράγει μια κβαντική επίδραση (όλα ή τίποτα) στο 50% του πληθυσμού που τη λαμβάνει.

⁷ Στην τοξικολογία, η διάμεση τοξική δόση (TD50) ενός φαρμάκου ή τοξίνης είναι η δόση στην οποία παρουσιάζεται τοξικότητα στο 50% των περιπτώσεων.

⁸ Τα αντιδραστικά οξυγονούχα είδη (ROS) είναι χημικά αντιδραστικά μόρια που περιέχουν οξυγόνο (υπεροξείδια, ρίζες υδροξυλίου, μονήρη οξυγόνα).

Η θέση και ο τύπος του υποκαταστάτη που συνδέεται στον αρωματικό δακτύλιο των κουμαρινικών μορίων, έχει μεγάλη επίδραση στην αντιοξειδωτική δράση αυτών των ουσιών, με τον αριθμό των ομάδων υδροξυλίου επί της δομής του κουμαρινικού δακτυλίου να συσχετίζεται με τις επιδράσεις καταστολής του ROS.



Σχήμα 18. Απεικόνιση της αντιοξειδωτικής δράσης των κουμαρινών συναρτήσει των δομικών τους χαρακτηριστικών.

Πιο συγκεκριμένα η κουμαρινική ένωση *Φραξίνη (Fraxin (30))* έχει παρουσιάσει καθαρική δράση έναντι των ελευθέρων ριζών σε υψηλή συγκέντρωση (0.5 mM) και κυτταρικό προστατευτικό αποτέλεσμα κατά του H₂O₂, διαμεσολαβητή του οξειδωτικού στρες(ROS)^[32].

Η *Εσκουλετίνη (3)* επέδειξε επίσης αντιοξειδωτικές ιδιότητες, ενώ η αντιοξειδωτική δράση των κουμαρινικών *Grandivittin (8)*, *Agasyllin (9)*, *Aegelinol Benzoate(10)* και *Osthole (11)*, εκτιμήθηκε από τις επιδράσεις τους στα ανθρώπινα λευκά αιμοσφαίρια.^{[33],[34]}

2

Κουμαρίνες και μέθοδοι σύνθεσης

Εδώ και πολλά χρόνια, η σύνθεση των κουμαρινών και των αναλόγων τους, έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών χημικών της οργανικής και της φαρμακευτικής, καθώς ένα σημαντικός αριθμός από φυσικά προϊόντα περιέχει αυτόν τον ετεροκυκλικό πυρήνα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι κουμαρίνες χρησιμοποιούνται ευρέως ως πρόσθετα στα τρόφιμα, τα αρώματα, τα καλλυντικά, τα φαρμακευτικά προϊόντα [20], τα οπτικά λευκαντικά, [35] τις φθορίζουσες χρωστικές και τα λέιζερ. [36]

Ενόψει λοιπόν της φυσικής εμφάνισης και το χρήσιμο εύρος της βιολογικής δραστηριότητας παράλληλα με τις ποικίλες φαρμακολογικές ιδιότητες των κουμαρινών, πολλές στρατηγικές έχουν αναπτυχθεί για την σύνθεση τους.

Η ιστορία της σύνθεσης της κουμαρίνης ξεκίνησε στα μέσα του δέκατου ένατου αιώνα, με την ανακάλυψη της σύνθεσης της κουμαρίνης από τον Perkin, μια αντίδραση που φέρει ακόμα και σήμερα το όνομά του. [37] Εντούτοις, εν όψει των συνεχώς αυξανόμενων εφαρμογών και χρήσεων των κουμαρινών, δόθηκε μεγάλη προσπάθεια στη σύνθεση ποικίλων υποκατεστημένων κουμαρινών και στο να εξελιχθούν νέες καθώς και τροποποιημένες μεθοδολογίες για τη σύνθεση τους.

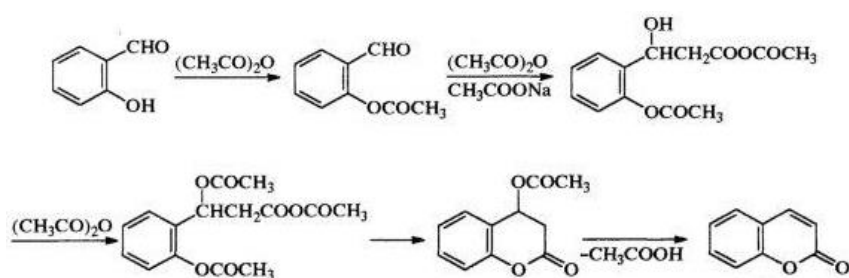
Οι κουμαρίνες μπορούν να συντεθούν κλασικά με διάφορους τρόπους, συμπεριλαμβανομένων των von Pechmann (Hans von Pechmann, Γερμανός χημικός έδρασε κατά την περίοδο 1850-1902 [40]), Perkin (Sir William Henry Perkin, Βρετανός χημικός, 1838-1907) [37], Reformatsky (Σέργιο Reformasky, Ρώσος χημικός, 1860-1934), [41] μέσω των αντιδράσεων Wittig, [42] της αναδιάταξης Claisen, [43] την κυκλική σύζευξη [44] και της μεθόδου Knoevenagel (Emil Knoevenagel, ένας Γερμανός χημικός, 1865-1921) μέσω συμπύκνωσης των ορθο-υδροξυαλδεΐδων, με το οξύ του Meldrum, το μηλεϊνικό οξύ, το μηλονικό εστέρα, ή τον κυανοξικό εστέρα. [39] Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι όλες οι μέθοδοι που αναφέρθηκαν έχουν κάποια μειονεκτήματα, δεδομένου ότι στερούνται γενικής μεθόδου και

αποδοτικότητα, καθιστώντας την ανάπτυξη νέων αξιόπιστων και υψηλής απόδοσης μεθόδων σύνθεσης των κουμαρινών ένα σημαντικό θέμα.

Πρόσφατα αρκετές βελτιωμένες συνθετικές μεθοδολογίες έχουν αναπτυχθεί, χρησιμοποιώντας μια ποικιλία από καταλύτες οξέος Lewis^[44], καταλύτες μεταφοράς φάσης^[46], ή μέσω αντιδράσεων με μικροκύματα^[47], και χρήση μοριακού ιωδίου.^[48] Η ακτινοβολία των μικροκυμάτων έχει έκτοτε αποδειχθεί να είναι εξαιρετικά χρήσιμη για την προώθηση και την απλούστευση πολλών αντιδράσεων συμπύκνωσης και μπορεί να διεξαχθεί τόσο σε διαλύτη, όσο και χωρίς αυτόν υπό συνθήκες.

2.1 Μέθοδος Perkin

Το 1868, ο Perkin ανέφερε την σύνθεση της κουμαρίνης χρησιμοποιώντας μια ορθο-υδροξυ-βενζαλδεΐδη και οξικό ανυδρίτη παρουσία οξικού νατρίου^[37]. Αυτή η αντίδραση είναι ένα παράδειγμα αλδολικής συμπύκνωσης. Ο πιθανός μηχανισμός φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. (Σχήμα 19)



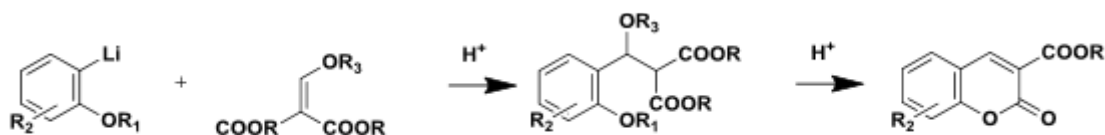
Σχήμα 19. Σύνθεση κουμαρίνης μέσω αντίδρασης Perkin

Η αντίδραση Perkin παρέχει μια χρήσιμη μέθοδο για τη σύνθεση των α, β-ακόρεστων αρωματικών οξέων και περιλαμβάνει τη συμπύκνωση ενός καρβοξυλικού ανυδρίτη με μια αρωματική αλδεΐδη παρουσία μίας ασθενούς βάσης όπως οξικό νάτριο ή κάλιο ή τριαιθυλαμίνη. Αρκετές αναφορές έχουν δημοσιευτεί σχετικά με τη σύνθεση των κουμαρινών μέσω αυτής της μεθόδου και πολλές απλές κουμαρίνες εξακολουθούν να παρασκευάζεται με αυτόν τον τρόπο.

Μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η δυσκολία παρασκευής των απαραίτητων πρώτων υλών (υποκατεστημένες ο-υδροξυβενζαλδεΐδες) και οι χαμηλές αποδόσεις που οφείλονται στο γεγονός ότι οι δραστικές συνθήκες που απαιτούνται (παρατεταμένη θέρμανση στους 150-200 °C) οδηγούν στο σχηματισμό ρητινωδών προϊόντων. [35]

2.2 Προσθήκη Michael

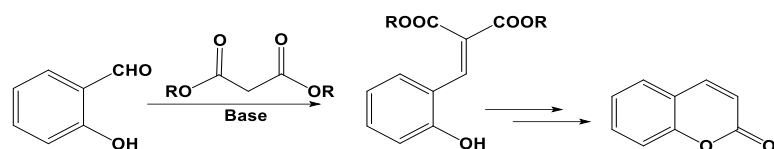
Σε αυτή την μέθοδο κατά την προσθήκη Michael πραγματοποιείται προσθήκη του ο-λιθιο-φαινολικού αιθέρα σε αλκοξυ-μεθυλενικό μηλονικό εστέρα ή αλκοξυ-μεθυλενοακετοξικό εστέρα. Η κατεργασία με οξύ προκαλεί απομάκρυνση της φαινολικής προστατευτικής ομάδας, λακτονοποίηση και απόσπαση μορίου αλκοόλης προς σχηματισμό οξυγονομένων κουμαρινών. (Σχήμα 20).



Σχήμα 20. Συμπύκνωση με προσθήκη Michael

2.3 Αντίδραση Knoevenagel

Η συμπύκνωση των αλδεϊδών με δραστικές ενώσεις μεθυλενίου και την παρουσία αμμωνίας ή αμινών, είναι μια αντίδραση γνωστή ως Knoevenagel. Στις αρχές του 1900, η αντίδραση Knoevenagel προέκυψε ως μια σημαντική συνθετική μέθοδο για τα παράγωγα κουμαρίνης με την καρβοξυλική ομάδα στην 3-θέση. [49] Συνήθως, η αντίδραση καταλύεται από ασθενείς βάσεις ή με κατάλληλους συνδυασμούς αμινών και καρβοξυλικών οξέων ή οξέων Lewis υπό ομοιογενείς συνθήκες. Επιπλέον, όταν το μηλονικό οξύ και η πυριδίνη χρησιμοποιούνται, η αντίδραση συχνά ονομάζεται μετασχηματισμός Doebner. (Σχήμα 21)

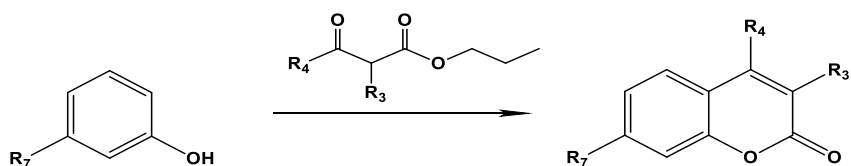


Σχήμα 21. Σύνθεση κουμαρίνης μέσω αντιδράσεως Knoevenagel

Ένας μεγάλος κατάλογος των κουμαρινών έχει συντεθεί με τη χρήση αυτής της μεθόδου, όπως για παράδειγμα, αμινο- και αλκυλαμινοκουμαρίνες, 3-ακετυλοκουμαρίνες, και νέες ετεροκυκλικές ενώσεις που συνδέονται με κουμαρίνες. [49] Η σύνθεση των κουμαρινών μέσω της Knoevenagel αντίδρασης έχει επίσης διεξαχθεί με μεθυλένια που ενεργοποιούνται από ετεροκυκλικές ενώσεις. [50] Επιπλέον τα C-γλυκοσυλ κουμαρινικά παράγωγα συντέθηκαν επίσης με ενός σταδίου αντίδραση συμπύκνωσης Knoevenagel. [50]

2.4 Αντίδραση Pechmann

Η αντίδραση Pechmann έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για την παρασκευή της κουμαρίνης και των παραγώγων της από απλά υλικά εκκίνησης. Σε γενικές γραμμές, οι κουμαρίνες ελήφθησαν μέσω της συμπύκνωση φαινολών με κετοεστέρες, παρουσία όξινων καταλυτών - όπως το μεθανοσουλφονικό οξύ ή ένα οξύ Lewis όπως $AlCl_3$ [52] (Σχήμα 22).



Σχήμα 22. Σύνθεση κουμαρίνης μέσω αντιδράσεως Pechmann

Η αντίδραση αυτή συχνά αναφέρεται ως Pechmann-Duisberg, όταν χρησιμοποιούνται εστέρες ακετοξικού και παράγωγα. Αυτή η συνθετική οδός έχει χρησιμοποιηθεί συχνά για τη λήψη φυσικών κουμαρινών άλλα και βενζοπυρονών με βιολογικό ή βιομηχανικό ενδιαφέρον. Επιπλέον, οι φορείς φθορισμού που έχουν

ένα παράγωγο κουμαρίνης, ομοιοπολικά ακινητοποιημένο σε μία μεμβράνη ανίχνευσης, έχουν συντεθεί με αυτή τη μέθοδο. [53]

Λόγω των πρόσφατων προσπαθειών προς την κατεύθυνση της πράσινης χημείας, γίνονται προσπάθειες για την αντικατάσταση των στοιχειομετρικών κατά Bronsted και Lewis οξέων, από μη στοιχειομετρικά στερεά οξέα, όπως ο μοντμοριλλονίτης άργιλος και η κατιοντοεναλλασόμενη ρητίνη. Έχουν επιπλέον αναφερθεί εφαρμογές σε ιοντικά υγρά. [54]

Αν και αυτές οι μέθοδοι είναι κατάλληλες για ορισμένες συνθετικές εφαρμογές, πολλές από αυτές συνδέονται με ένα (ή περισσότερα) μειονεκτήματα όπως είναι τα ακριβά ή διαβρωτικά αντιδραστήρια, το μεγάλο χρονικό διάστημα της αντίδρασης, η κουραστική επεξεργασία και η χαμηλή επιλεκτικότητα. Για τους λόγους αυτούς, έχουν γίνει κάποιες προσπάθειες για την εξεύρεση εναλλακτικών, φιλικών προς το περιβάλλον, συνθετικών οδών, οι οποίες περιλαμβάνουν ακτινοβολία υπερήχων χωρίς την χρήση διαλυτών για την σύνθεση των κουμαρινών. [55, 57]

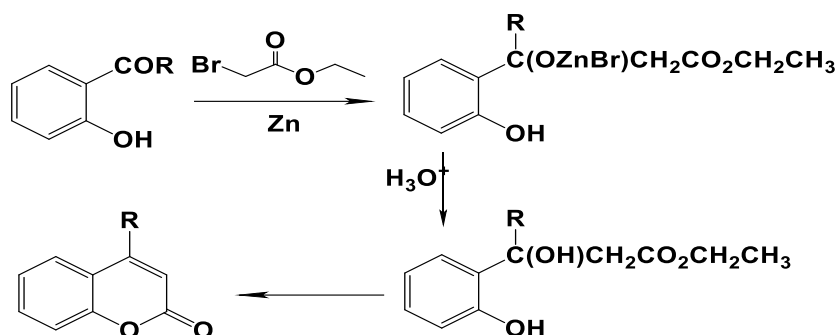
Η ακτινοβολήση με υπερήχους χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο στην οργανική σύνθεση τις τρεις τελευταίες δεκαετίες. Συγκρίνοντας με τις παραδοσιακές μεθόδους, η μέθοδος αυτή είναι πιο βολική και εύκολα ελεγχόμενη. Ένας μεγάλος αριθμός οργανικών αντιδράσεων έχουν διεξαχθεί σε υψηλότερη απόδοση, μικρότερο χρόνο αντίδρασης και σε πιο ήπια κατάσταση υπό ακτινοβολήση με υπερήχους.

Σε όλες τις αντιδράσεις πάντα χρησιμοποιούνταν οργανικοί διαλύτες. Πρόσφατα έχουν τραβήξει πολύ την προσοχή οι οργανικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στο νερό, χωρίς την χρήση επιβλαβών οργανικών διαλυτών, καθώς το νερό αποτελεί έναν φθινό, ασφαλή και φιλικό προς το περιβάλλον διαλύτη. [56]

2.5 Αντίδραση Reformatsky

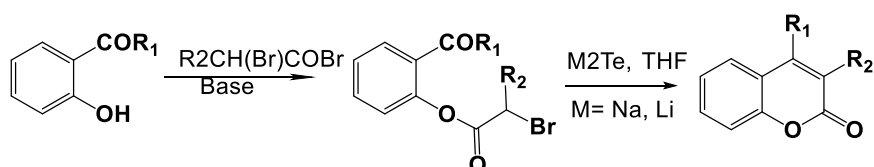
Η συμπύκνωση των αλδεϋδών ή κετονών με παράγωγα οργανοψευδαργύρου των α-αλογονο εστέρων που δίνει β-υδροξυ εστέρες, είναι γνωστή ως αντίδραση

Reformatsky (Σχήμα 23). Σε κατάλληλες συνθήκες αντίδρασης, θα μπορούσε να συμβεί και λακτονοποίηση με το σχηματισμό των κουμαρινών.



Σχήμα 23. Σύνθεση κουμαρίνης μέσω της αντίδρασης Reformatsky

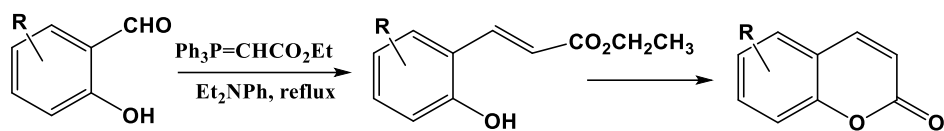
Οι Dittmer et al. [58] έχουν επιτύχει την ενεργοποίηση της κυκλοποίησης του τελλουριούχου- νατρίου του βρωμοοξικού της σαλικυλαλδεύδης σε κουμαρίνη μέσω της τροποποιημένης αντίδρασης Reformatsky. Η κυκλοποίηση εισπράττεται με σχηματισμό του φαινολικού ενολικού εστέρα, του στοιχειακού τελλούριου, και του βρωμιούχου ιόντος. Το ενολικό ανιόν είτε προσβάλλει την όρθο ομάδα καρβονυλίου οδηγώντας σε κυκλοποίηση, είτε εξαλείφει ένα φαινολικό ιόν για να δώσει ένα κετόνιο (Σχήμα 24).



Σχήμα 24. Σύνθεση κουμαρίνης μέσω της τροποποιημένης αντίδρασης Reformatsky

2.6 Αντίδραση Wittig

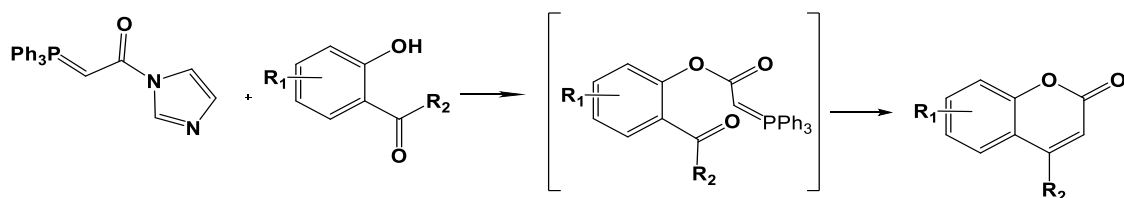
Στην αντίδραση Wittig, ο σχηματισμός του αλκενίου λαμβάνει χώρα από ενώσεις καρβονυλίου και υλίδια φωσφονίου, προχωρώντας κυρίως μέσω βεταϊνικών και/ή οξαφωσφετινικών (oxaphosphetane) ενδιάμεσων (Σχήμα 25). Όταν το υλίδιο έχει αντικατασταθεί από ένα καρβανιόν οξειδίου φωσφίνης ή με ένα καρβανιόν φωσφονικού, η αντίδραση αναφέρεται ως Horner ή Horner-Emmons-Wadsworth, αντίστοιχα.



Σχήμα 25. Σύνθεση της κουμαρίνης μέσω της αντίδρασης Wittig

Αυτό το είδος της ολεφίνωσης των ορθο-υδροξυκαρβονύλιο αρωματικών ενώσεων, που ακολουθείται από περαιτέρω λακτονοποίηση, είναι μια γνωστή μέθοδος για την παρασκευή παραγώγων κουμαρίνης [59, 60]. Πρενυλιωμένες κουμαρίνες και άλλες αλλυλοκουμαρίνες έχουν συντεθεί πολύ πιο εύκολα μέσω των αντιδράσεων Wittig [61].

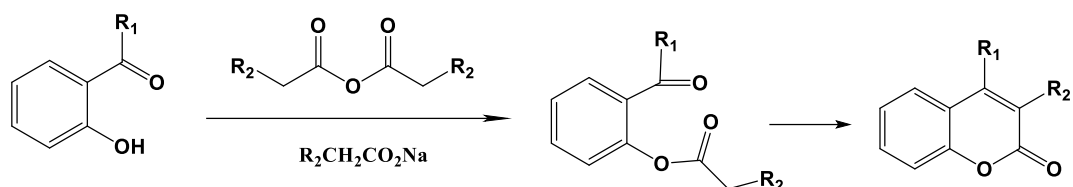
Πρόσφατα, αναφέρθηκε από τον Uradhaya και την ομάδα του μία νέα μέθοδος σύνθεση του κουμαρινών, ενός σταδίου, μέσω ενδομοριακής κυκλοποίησης Wittig από την αντίδραση των φαινολικών ενώσεων που περιέχουν ορθο-καρβονυλική ομάδα και τριφαινυλο (α-καρβοξυμεθυλενο) φωσφοράνιο ιμιδαζολιδίου (σχήμα 26).



Σχήμα 26. Σύνθεση κουμαρίνης μέσω ενδομοριακής κυκλοποίησης Wittig

2.7 Αντίδραση Kostanecki-Robinson Reaction

Στην αντίδραση αυτή ο σχηματισμός των κουμαρινών, συνήθως των 3- και 4-υποκατεστημένων, πραγματοποιείται με ακυλίωση των ορθο-υδροξυαρυλίου κετονών με ανυδρίτες αλειφατικού οξέος, ακολουθούμενος από κυκλοποίηση (Σχήμα 27).

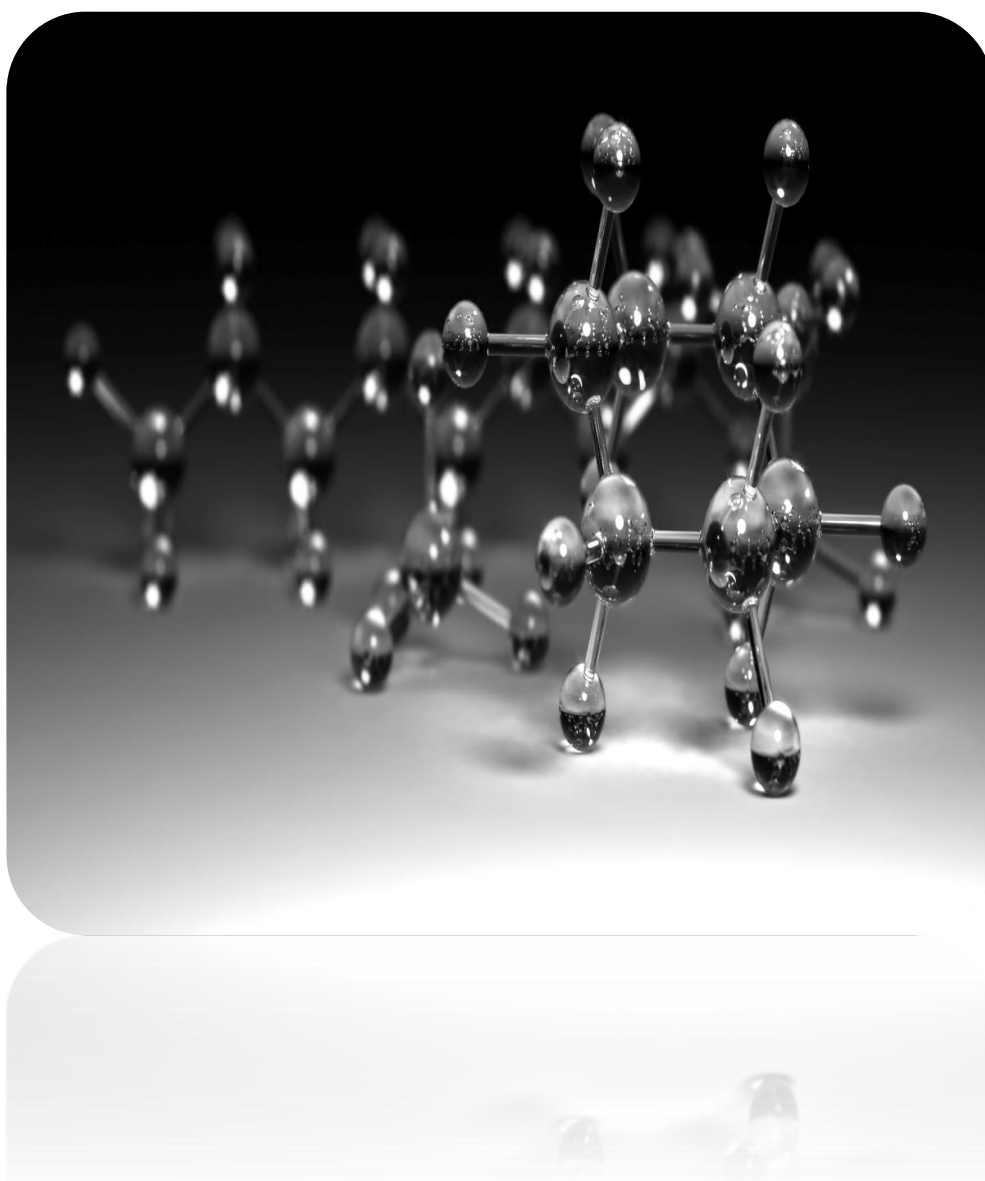


Σχήμα 27. Σύνθεση κουμαρίνης μέσω της αντιδράσεως Kostanecki – Robinson

Με τη διαδικασία αυτή, οι ορθο-υδροξυκετόνες μετατράπηκαν σε φαινυλοκουμαρίνες, 3-κυανο-4-μεθυλοκουμαρίνες και σε άλλο τύπο κουμαρινικών παραγώγων. Αυτές οι κουμαρίνες είναι κατάλληλες πρώτες ύλες για την απόκτηση ενός άλλου τύπου ενώσεων όπως τα στυριλ- και ακετυλ- παράγωγα, οι υδραζόνες, κλπ. Οι 3-καρβοξυκουμαρίνες λήφθηκαν σε εξαιρετικές αποδόσεις από τις κατάλληλες ακετοφαινόνες, χρησιμοποιώντας το οξύ του Meldrum και φυσικές αργίλους. Μια πρωτότυπη σύνθεση ενός σταδίου, των 3-χλωροκουμαρινών και στυρενίων, με καθοδική αναγωγή των εστέρων τριχλωροακετυλίου των ορθο-υδροξυκετονών και των σαλικυλαλδεΐδων σε απρωτονικά μέσα, παρουσιάζεται από τους Batanero και Barba^[62].

Μέρος Δεύτερο

Σχεδιασμός, σύνθεση και ταυτοποίηση δομής νέων
κουμαρινικών αναλόγων



3

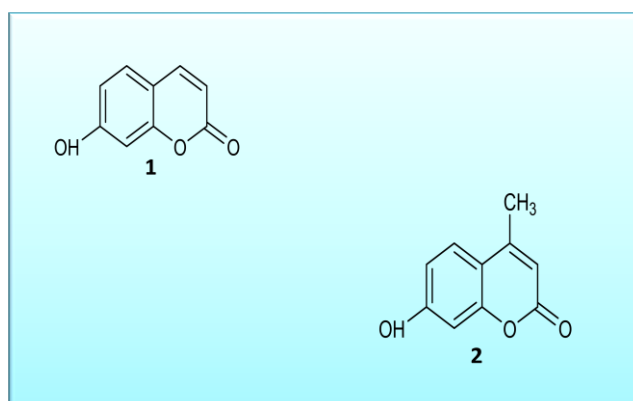
Σχεδιασμός και σύνθεση των νέων παραγώγων

Στόχος της παρούσας διπλωματικής, είναι ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη μιας συνθετικής μεθοδολογίας με σκοπό τη σύνθεση νέων υβριδικών παραγώγων κουμαρινών- φαινολικών οξέων. Παράλληλα, η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητα των νέων ενώσεων μέσω της αλληλεπίδρασής τους με την ελεύθερη ρίζα του DPPH και μέσω της δυνατότητας αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH), αλλά και η αντιφλεγμονώδης δράση τους μέσω της αναστολής της λιποξυγονάσης από σόγια.

Για τη διπλωματική αυτή εργασία, επιλέχθησαν να παρασκευαστούν νέα κουμαρινικά ανάλογα μέσω μιας σειράς αντιδράσεων με κύρια την αντίδραση εστεροποίησης των φαινολικών οξέων και των κουμαρινικών αναλόγων.

Προκειμένου να μελετηθεί η σχέση δομής-βιολογικής δράσης, παρασκευάστηκαν ανάλογα στα οποία η υδροξυ-ομάδα της κουμαρίνης βρίσκεται στη θέση 7 του λακτονικού δακτυλίου **α**) χωρίς μεθυλο υποκαταστάτες (7-υδροξυκουμαρίνη-umbelliferone(**1**)), και **β**) με έναν μεθυλο-υποκατάστατη στη θέση 4 του λακτονικού δακτυλίου (4-μεθυλο 7-υδροξυκουμαρίνη (**2**)).

Χρησιμοποιώντας τις ενώσεις αυτές (**1-2**) πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός και η σύνθεση νέων κουμαρινικών αναλόγων με υποκαταστάτες φαινολικά οξέα, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση αυτών, στις βιολογικές τους δράσεις.



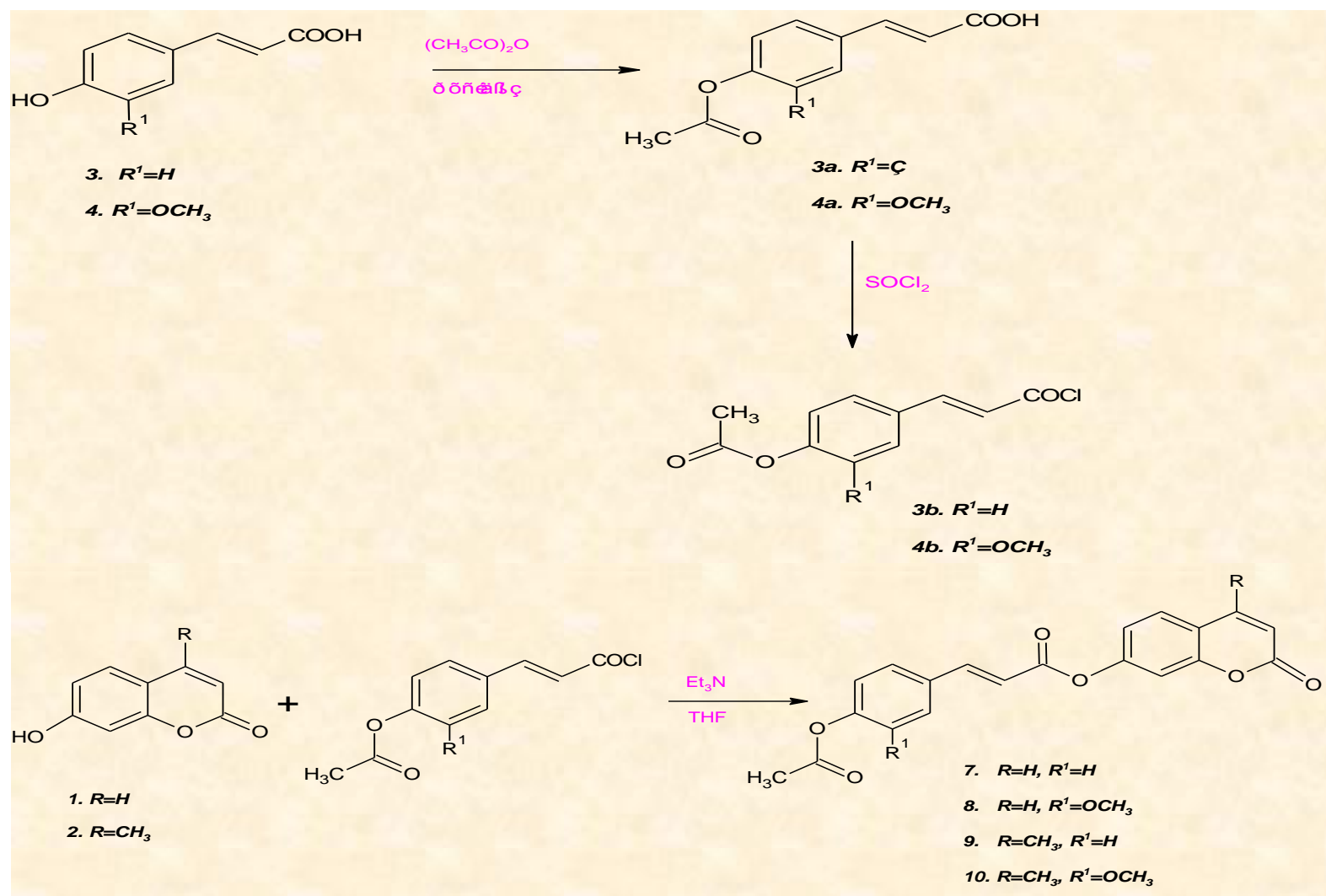
Σχήμα 28. Κουμαρινικά ανάλογα με αξιόλογη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.

7υδροξυ-κουμαρίνη-umbelliferone (**1**)/4 μεθυλο-7 υδροξυ-κουμαρίνη(**2**)

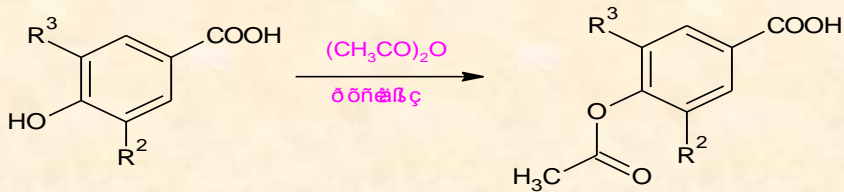
Οι ενώσεις αυτές αποτελούν μέρος της τρέχουσας ερευνητικής δραστηριότητας του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ΕΜΠ, και εμφανίζουν αξιόλογη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, όπως αυτή εκφράζεται με την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια.

Η επιλογή των συγκεκριμένων κουμαρινών, έγινε επιπλέον και βάση της βιβλιογραφικής αναφοράς που θέλει οι φυσικές κουμαρίνες (umbelliferone) που περιέχουν υδροξυλική ομάδα στη θέση 7 του αρωματικού δακτυλίου, να παρουσιάζουν ιδιαίτερα ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες και δράσεις, ενώ τα 4-μεθυλο παράγωγα τους να φέρουν κυρίως αντιοξειδωτική δράση.

Στα παρακάτω σχήματα φαίνεται αναλυτικά η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε, τόσο για τα υδροξυ-κιναμμικά όσο και για τα υδροξυβενζοϊκά φαινολικά οξέα που χρησιμοποιήθηκαν.



Πίνακας 5. Συνθετική πορεία ακετυλίωσης, χλωρίωσης και εστεροποίησης p-κουμαρικού/φερουλικού οξέος

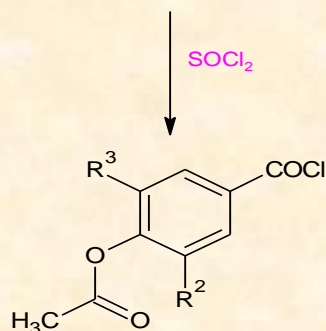


5. $R^2 = R^3 = OCH_3$

6. $R^2 = R^3 = OH$

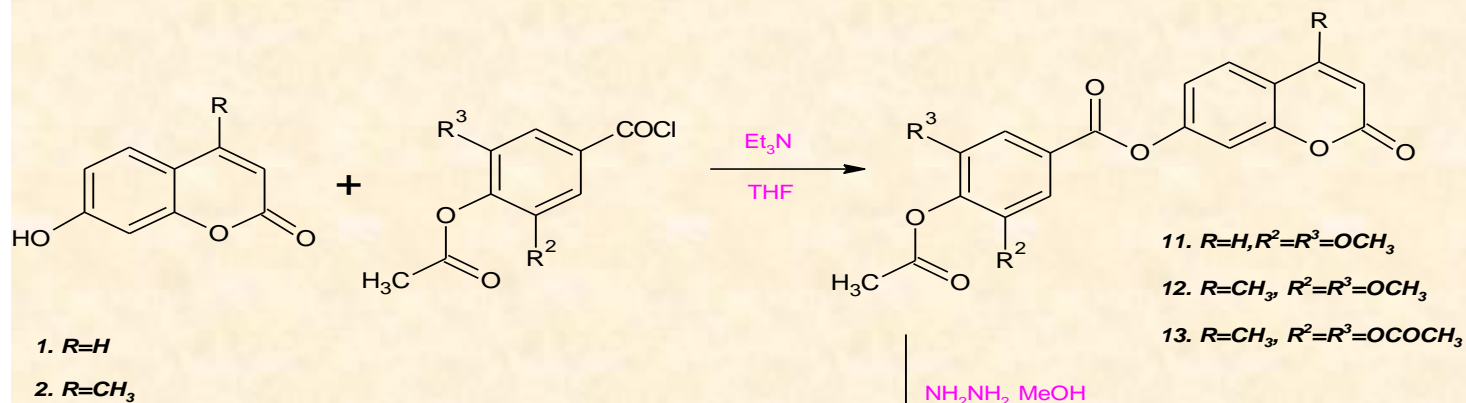
5a. $R^2 = R^3 = OCH_3$

6a. $R^2 = R^3 = OCOCH_3$



5b. $R^2 = R^3 = OCH_3$

6b. $R^2 = R^3 = OCOCH_3$



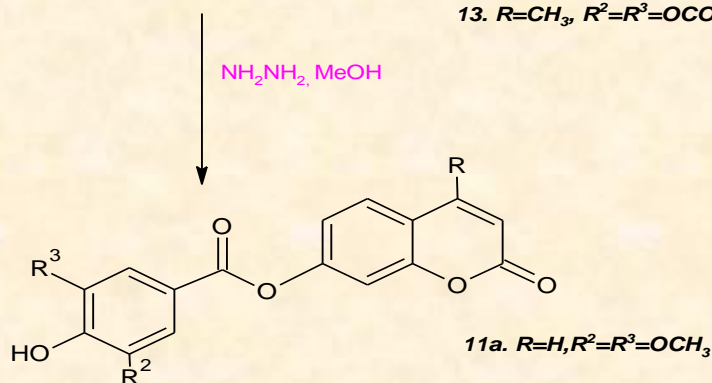
1. $R = H$

2. $R = CH_3$

11. $R = H, R^2 = R^3 = OCH_3$

12. $R = CH_3, R^2 = R^3 = OCH_3$

13. $R = CH_3, R^2 = R^3 = OCOCH_3$



11a. $R = H, R^2 = R^3 = OCH_3$

Πίνακας 6. Συνθετική πορεία ακετυλίωσης, χλωρίωσης και εστεροποίησης συριγγικού/γαλλικού οξέος, και απακετυλίωσης συριγγικού οξέος.

3.1 Σύνθεση ακετυλο-φαινολικών οξέων

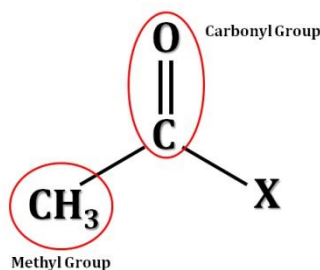
Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των ακετυλο-φαινολικών οξέων, στηρίζεται σε αντιδράσεις ακετυλίωσης με επιλογή του οξικού ανυδρίτη ως κατάλληλο ακυλιωτικό μέσο και την πυριδίνη ως βασικό καταλύτη για την σύνθεση του επιθυμητού παραγώγου καρβοξυλικού οξέος.

Ο οξικός ανυδρίτης είναι ένα αντιδραστήριο ακυλίωσης, που συχνά χρησιμοποιείται με ένα βασικό καταλύτη, όπως η πυριδίνη. Αυτός ο συνδυασμός προάγει ομαλές αντιδράσεις και έχει μεγάλη διαλυτική δύναμη. Η πυριδίνη δρα ως δέκτης για το οξύ παραπροϊόν που σχηματίζεται κατά την αντίδραση, ωστόσο υπάρχει επίσης και η περίπτωση να αντιδράσει με οξικό ανυδρίτη, σχηματίζοντας N-ακετυλ-1,2-διυδρο-2-πυριδυλοξικό οξύ.

Η χρησιμότητα αυτής της αντίδρασης έγκειται στη δυνατότητα παραγωγής σταθερών φαινολικών παραγώγων μέσω της προστασίας των ομάδων υδροξυλίου του φαινολικού δακτυλίου.

3.1.1 Ακετυλίωση μιας υδροξυλομάδας

Η ακετυλίωση είναι μια αντίδραση η οποία μειώνει τη πολικότητα των υδροξυ ομάδων. Επιπλέον βελτιώνει την σταθερότητα μιας ένωσης, προστατεύοντας τις ασταθείς ομάδες, ενώ παράλληλα αυξάνει την μεταβλητότητα. Μια ακετυλο ομάδα είναι μία ομάδα μεθυλίου συνδεδεμένη σε μία ομάδα καρβονυλίου.



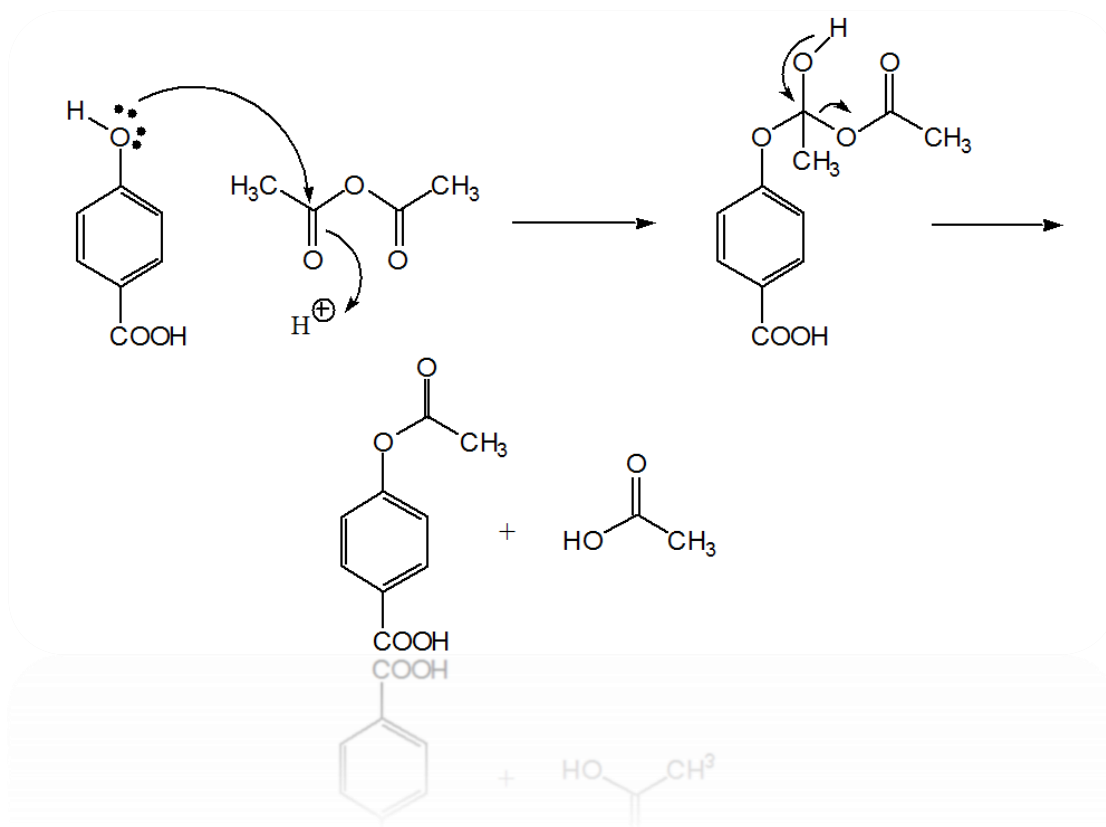
Εικόνα 3. Ακετυλομάδα

Οι ανυδρίτες αποτελούν χρήσιμα αντιδραστήρια για τη μεταφορά μιας ομάδας ακετυλίου σε ένα ετεροάτομο άλλης οργανικής ένωσης. Οι αντιδράσεις αυτές ονομάζονται **αντιδράσεις ακετυλίωσης**, και περιλαμβάνουν τη μεταφορά μιας ομάδας ακετυλίου με ένα άτομο οξυγόνου.

Όταν οι φαινόλες είναι ακετυλιωμένες, τα προϊόντα που προκύπτουν είναι εστέρες, τα οποία αποτελούν παράγωγα καρβοξυλικών οξέων. Όταν ακετυλιώνονται με οξικό ανυδρίτη, τότε ο εστέρας που προκύπτει είναι ένας εστέρας οξικού οξέος.

3.1.2 Μηχανισμός Ακετυλίωσης

Το παρακάτω σχήμα δείχνει τον μηχανισμό ακετυλίωσης του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος από τον οξικό ανυδρίτη και αποτελεί γενικό μηχανισμό ακετυλίωσης των φαινολικών οξέων.



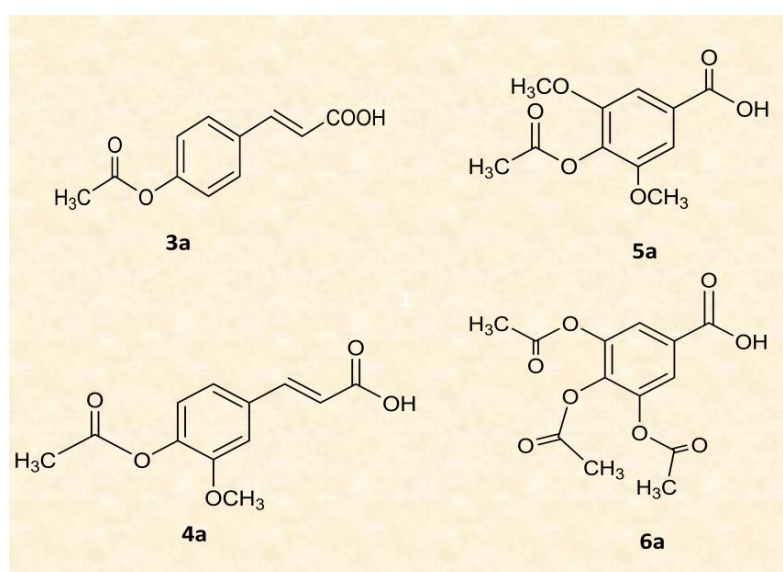
Σχήμα 29. Μηχανισμός ακετυλίωσης φαινολικού οξέος (4-υδροξυβενζοϊκού οξέος) από οξικό ανυδρίτη.

Σε πρώτο στάδιο, ένα ζεύγος από μη-συνδεδεμένα ηλεκτρόνια από το άτομο του οξυγόνου του φαινολικού οξέος , σχηματίζει δεσμό με την ομάδα καρβonyλίου του οξικού ανυδρίτη. Σε δεύτερο στάδιο, το πρωτόνιο μετακινείται από το ένα άτομο οξυγόνου στο άλλο, αλλάζοντας το δι-ιόν σε ένα μη φορτισμένο μόριο. Το προϊόν του 2^{ου} σταδίου, μια ημιακετάλη,(δηλαδή, ένα άτομο άνθρακα που συνδέεται με δύο άτομα οξυγόνου), ανασχηματίζει την ομάδα καρβonyλίου, με την απώλεια του ιόντος οξικού. Το ενδιάμεσο προϊόν που προκύπτει αποπρωτονιώνεται

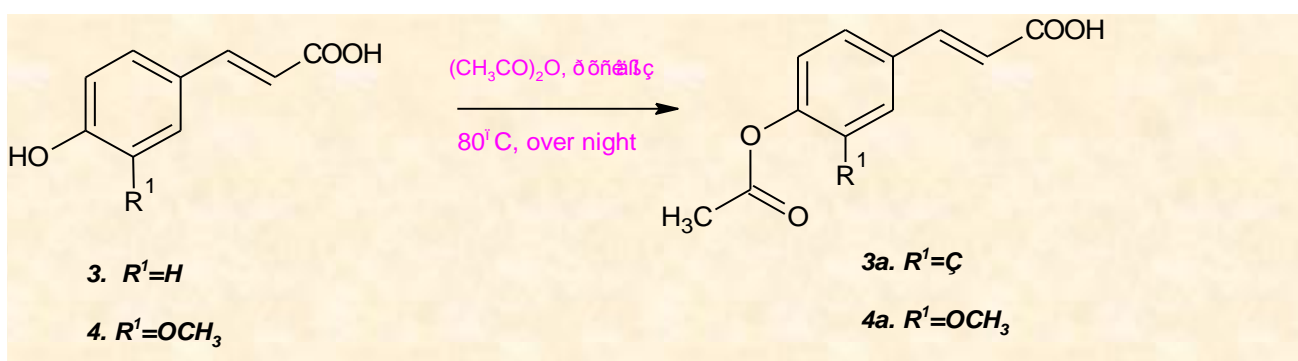
από το ιόν οξικού για την παραγωγή οξικού εστέρα και οξικού οξέος ως παραπροϊόν.

3.1.3 ΣΕΙΡΑ Α: Ακετυλο φαινολικά παράγωγα

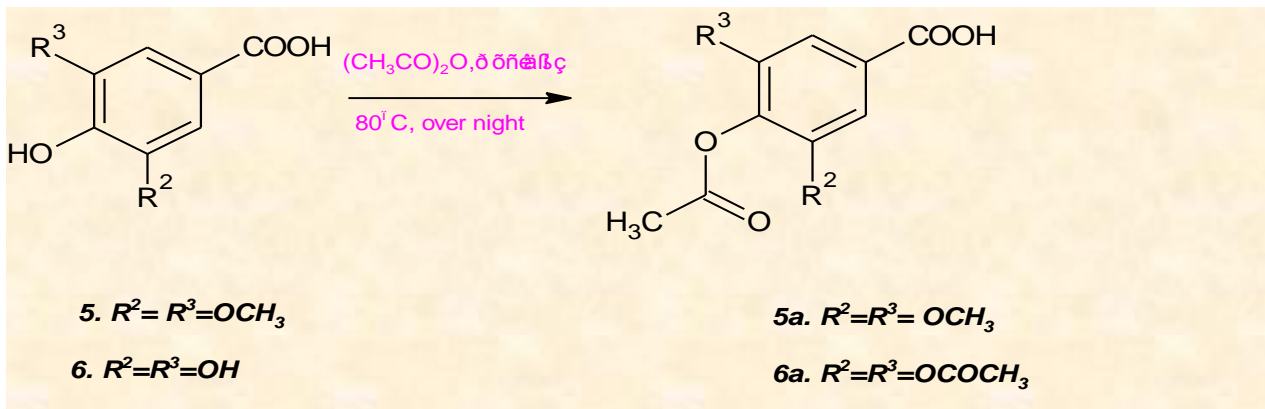
Στην παρούσα διπλωματική διεξήχθη η ακετυλίωση του p-κουμαρικού, συριγγικού, φερουλικού και γαλλικού οξέος παρουσία του οξικού ανυδρίτη (Ac_2O) και της πυριδίνης ως βασικός καταλύτης. Οι ακετυλο φαινολικές δομές (**3a-6a**) που προέκυψαν καθώς και η συνθετική πορεία παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.



Πίνακας 7. Χημικές δομές των ακετυλιωμένων φαινολικών οξέων p-κουμαρικό(**3a**), συριγγικό (**5a**), φερουλικό(**4a**),γαλλικό(**6a**).



Πίνακας 8. Συνθετική πορεία ακετυλίωσης των φαινολικών οξέων p-κουμαρικό, φερουλικό.



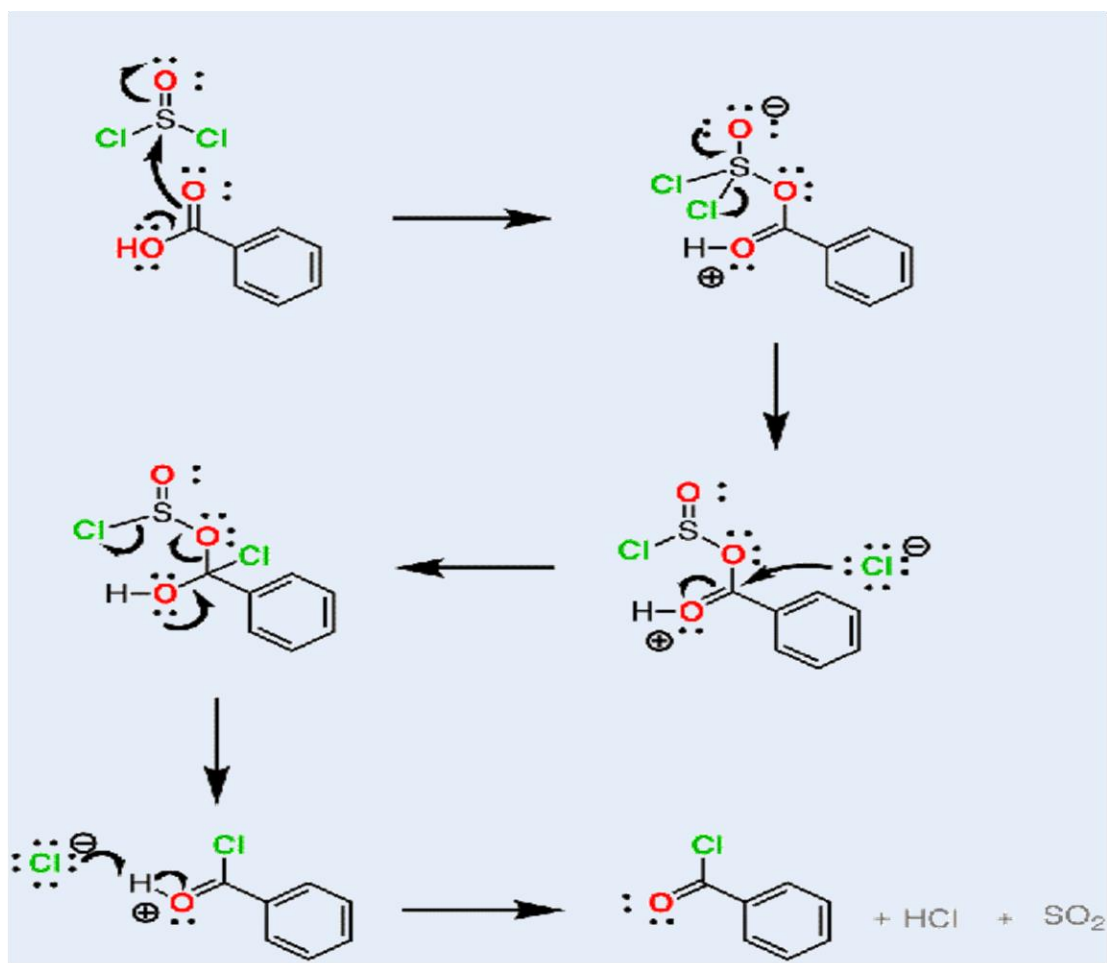
Πίνακας 9. Συνθετική πορεία ακετυλίωσης των φαινολικών οξέων συριγγικό, γαλλικό.

3.2 Σύνθεση χλωριδίων ακετυλο-φαινολικών οξέων

Τα ακετυλιωμένα φαινολοξικά οξέα ως αντιδρώντα της συνθετικής πορείας που σχεδιάστηκε, είναι σχετικά αδρανή αντιδραστήρια, καθιστώντας έτσι αναγκαία την ενεργοποίηση του εκάστοτε οξέος που χρησιμοποιήθηκε. Η συνθετική πορεία μέσω των ακυλοχλωριδίων αποτελεί την ευρέως χρησιμοποιούμενη πορεία που ακολουθείται σε αντίστοιχες περιπτώσεις.

Αυτή η μεθοδολογία στηρίχτηκε στο ότι οι καλές αποχωρούσες ομάδες είναι ασθενείς βάσεις. Επομένως το ιόν υδροξειδίου των φαινολικών οξέων, όντας δυνατή βάση, τείνει να αποτελεί δύσκολη αποχωρούσα ομάδα. Η μετατροπή της σε αυτό που ονομάζουμε good leaving group διευκολύνεται μέσω των αντιδράσεων χλωρίωσης, παρουσία, θειονυλοχλωριδίου που μετατρέπει τα καρβοξυλικά οξέα σε χλωρίδια οξέος («ακυλοχλωρίδια»). Αυτή είναι μια ιδιαίτερα χρήσιμη αντίδραση, καθώς τα προκύπτοντα ακυλοχλωρίδια αποτελούν ευέλικτες ενώσεις και μπορούν να μετατραπούν σε πολλές περαιτέρω νέες, που δεν είναι άμεσα προσβάσιμες από το ίδιο το ακετυλο φαινολικό οξύ. Η μετατροπή του OH σε Cl επιλύει αυτό το πρόβλημα, ενώ τα παραπροϊόντα αυτής της αντίδρασης είναι το υδροχλωρικό οξύ (HCl) και το διοξείδιο του θείου (SO₂).

3.2.1 Μηχανισμός σύνθεσης ακετυλοχλωριδίων

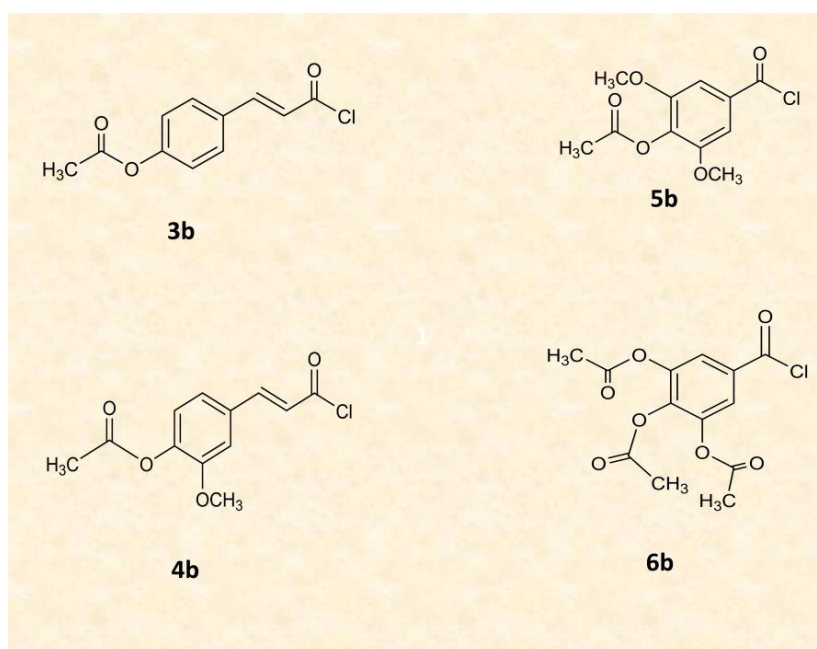


Σχήμα 30 : Γενικός μηχανισμός σύνθεσης χλωριδίων ακετυλο-φαινολικών οξέων.

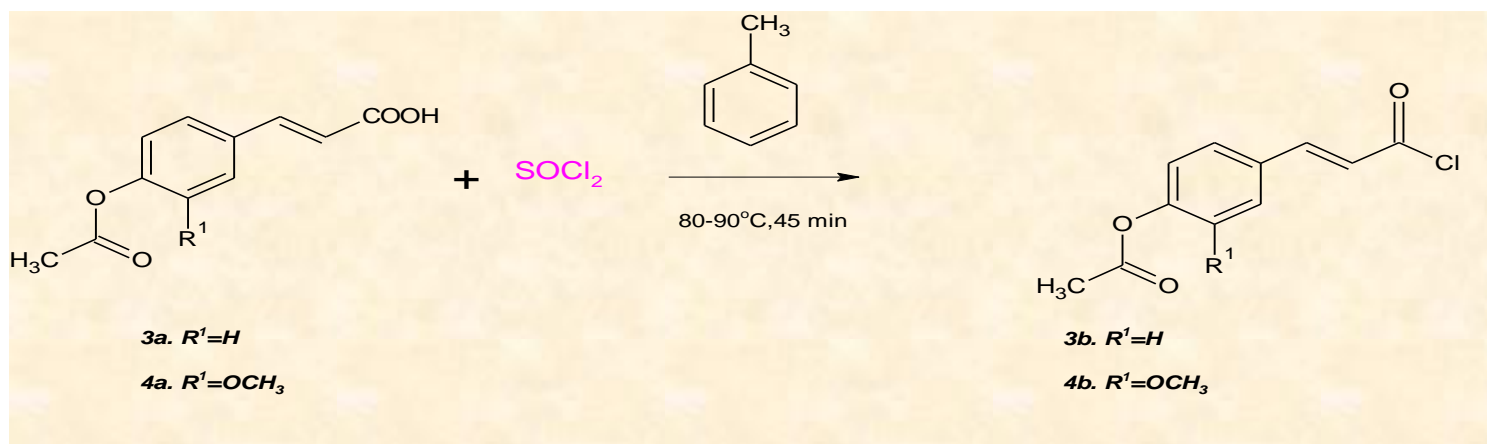
Βάση του παραπάνω μηχανισμού το πρώτο βήμα είναι η “επίθεση” του οξυγόνου επί του θείου του θειονυλοχλωριδίου (SOCl₂), η οποία οδηγεί σε εκτόπιση του ιόντος χλωρίου. Αυτό έχει το πλεονέκτημα της μετατροπής του καρβοξυλικού οξέος σε μια καλή αποχωρούσα ομάδα. Στο επόμενο στάδιο, το ιόν του χλωριδίου “επιτίθεται” στον άνθρακα του καρβονυλίου, με αποτέλεσμα τη διάσπαση του δεσμού C-O με αναστροφή της διαμόρφωσης. Στη συνέχεια το HOSCl διασπάται σε HCl και διοξείδιο του θείου, απομακρυνόμενο υπο την μορφή φυσαλίδων.

3.2.2 ΣΕΙΡΑ Β: Χλωρίδια ακετυλο φαινολικών παραγώγων

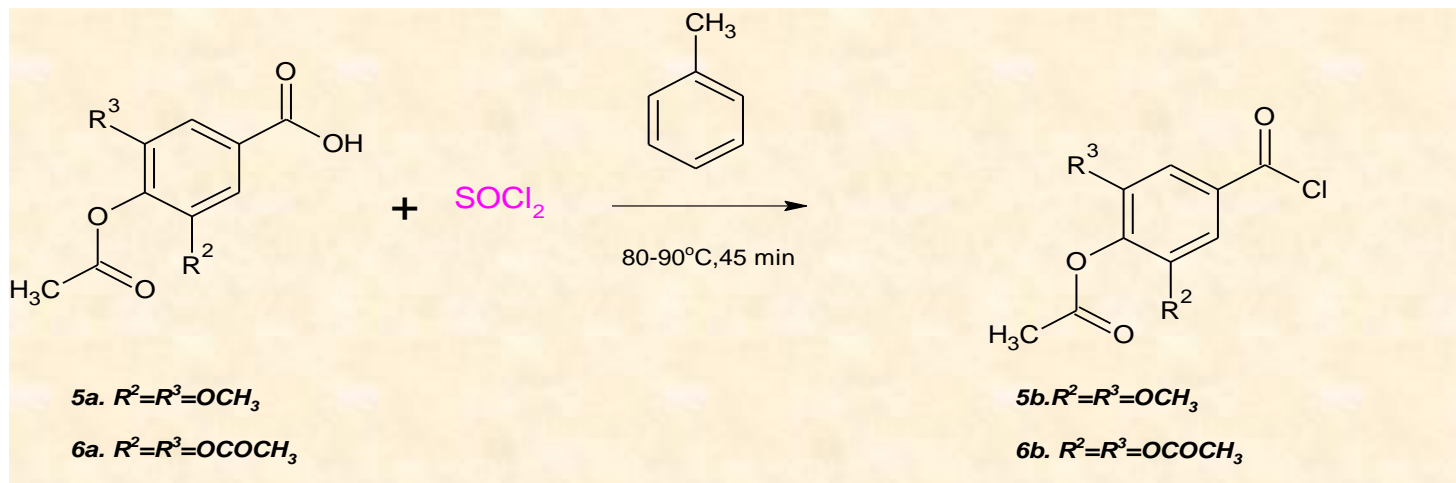
Στην παρούσα διπλωματική διεξήχθη η σύνθεση των ακετυλοχλωριδίων του p-κουμαρικού, συριγγικού, φερουλικού και γαλλικού οξέος παρουσία του θειονυλοχλωριδίου και διαλύτη τολουολίου, μέσω αντιδράσεως χλωρίωσης. Οι δομές των χλωριδίων (**3b-6b**) που προέκυψαν και η γενική μέθοδος σύνθεσης παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.



Πίνακας 10. Χημικές δομές των ακετυλοχλωριδίων p-κουμαρικό(**3b**), συριγγικό (**5b**), φερουλικό (**4b**), γαλλικό(**6b**)



Πίνακας 11. Συνθετική πορεία χλωρίωσης του p-κουμαρικού και φερουλικού οξέος.



Πίνακας 12. Συνθετική πορεία χλωρίωσης του συριγγικού και γαλλικού οξέος.

Τα παραγόμενα χλωρίδια **3b-6b**, συντέθηκαν μέσω αντίδρασης χλωρίωσης των παραπάνω οξέων **3a-6a** με περίσσεια θειονυλοχλωριδίου $SOCl_2$ και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς καθαρισμό ή κάποια άλλη επεξεργασία στα περαιτέρω στάδια, καθώς λόγω της αυξημένης τους αστάθειας ενδέχεται να δώσουν προϊόντα υδρόλυσης είτε σε βασικές είτε σε όξινες συνθήκες.

3.3 Σύνθεση εστέρων των φαινολικών οξέων με την 7-υδροξυ και την 4-μεθυλο-7-υδροξυ κουμαρίνη

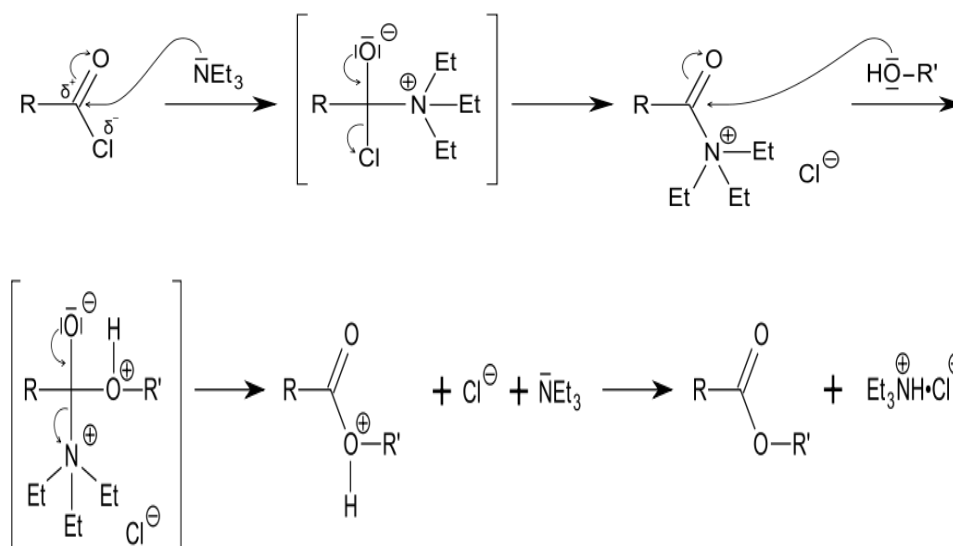
Πληθώρα ερευνητικών ομάδων έχουν ασχοληθεί προς την κατεύθυνση της σύνθεσης αναλόγων υδροξυ κουμαρινών με το υδροξύλιο να βρίσκεται σε διάφορες θέσεις του αρωματικού δακτυλίου της κουμαρίνης. Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν ανάλογα της 7-υδροξυ-κουμαρίνης(**1**), η οποία είναι γνωστό ότι εμφανίζει πληθώρα βιολογικών ιδιοτήτων.

Η βελτιστοποίηση της βιοδραστικότητας των ενώσεων, συνεπάγεται συχνά την τροποποίηση, την αφαίρεση ή την εισαγωγή λειτουργικών ομάδων ακόμη και την αναδιαμόρφωση του δομικού σκελετού με σκοπό την βελτίωση των φυσικοχημικών και των φαρμακευτικών ιδιοτήτων της ένωσης.

Προκειμένου λοιπόν να μελετηθεί η σχέση δομής-βιολογικής δράσης, παρασκευάστηκαν ανάλογα στα οποία η υδροξυ-ομάδα της κουμαρίνης βρίσκεται στη θέση 7 του λακτονικού δακτυλίου **α**) χωρίς μεθυλο υποκαταστάτες (7-υδροξυκουμαρίνη(**1**)), και **β**) με έναν μεθυλο-υποκατάστατη στη θέση 4 του λακτονικού δακτυλίου (4-μεθυλο 7-υδροξυκουμαρίνη(**2**)).

Και στις δυο περιπτώσεις (α,β) ο μηχανισμός της αντίδρασης ακολουθεί την παρακάτω πορεία:

3.3.1 Μηχανισμός αντίδρασης



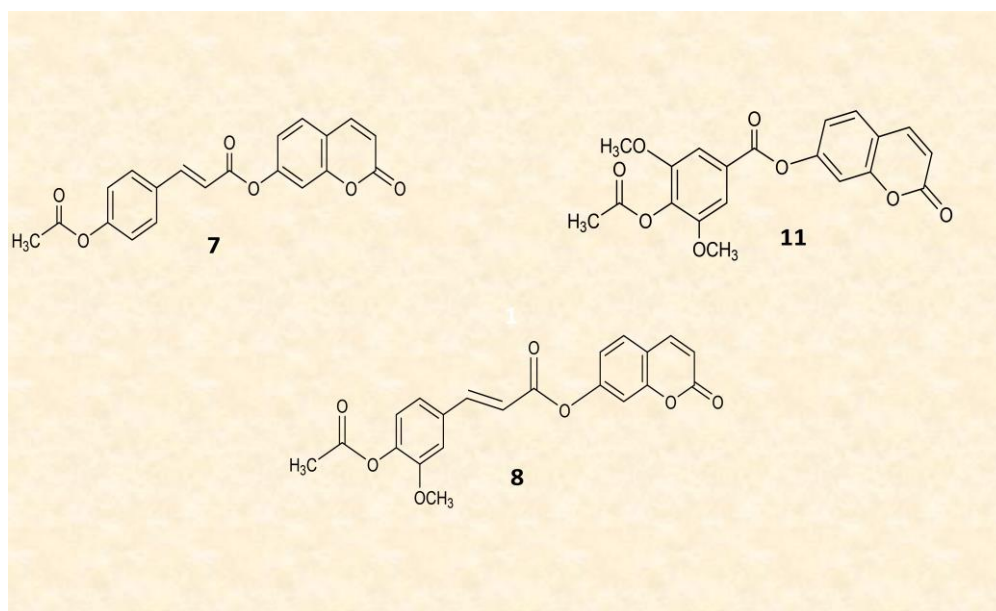
Σχήμα 31. Μηχανισμός αντίδρασης προς τον σχηματισμό των εστέρων των φαινολικών οξέων.

Το ακυλοχλωρίδιο αντιδρά με αλκοόλες και αμίδια προ σχηματισμό εστέρων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί το ακυλοχλωρίδιο αποτελεί μία οργανική ένωση με την λειτουργική ομάδα $-COCl$. Χωρίς να έχει τη δυνατότητα να δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου, έχει μικρότερα σημεία βρασμού και τήξεως από τα παρόμοια καρβοξυλικά οξέα. Είναι ένα ιδιαίτερα δραστικό αντιδραστήριο καθώς αν συγκριθεί με το ανάλογο του $RCOOH$ οξύ: το ιόν χλωριδίου είναι μια εξαιρετική αποχωρούσα ομάδα, ενώ το υδροξύλιο όχι υπό κανονικές συνθήκες. Ακόμα και τα αδύναμα πυρηνόφιλα επιτίθενται στο καρβονύλιο. Στον μηχανισμό αυτόν, η χρήση μιας βάσης είναι επιθυμητή προς απομάκρυνση του παραπροϊόντος του υδροχλωρίου, αλλά και για την κατάλυση της αντίδρασης. Ενώ είναι συχνά δυνατό να ληφθούν εστέρες ή αμίδια του καρβοξυλικού οξέος με αλκοόλες ή αμίνες, οι αντιδράσεις αυτές είναι αναστρέψιμες, και συχνά οδηγούν σε χαμηλές αποδόσεις. Η τριεθυλαμίνη είναι μια συχνά χρησιμοποιούμενη βάση στην οργανική σύνθεση,

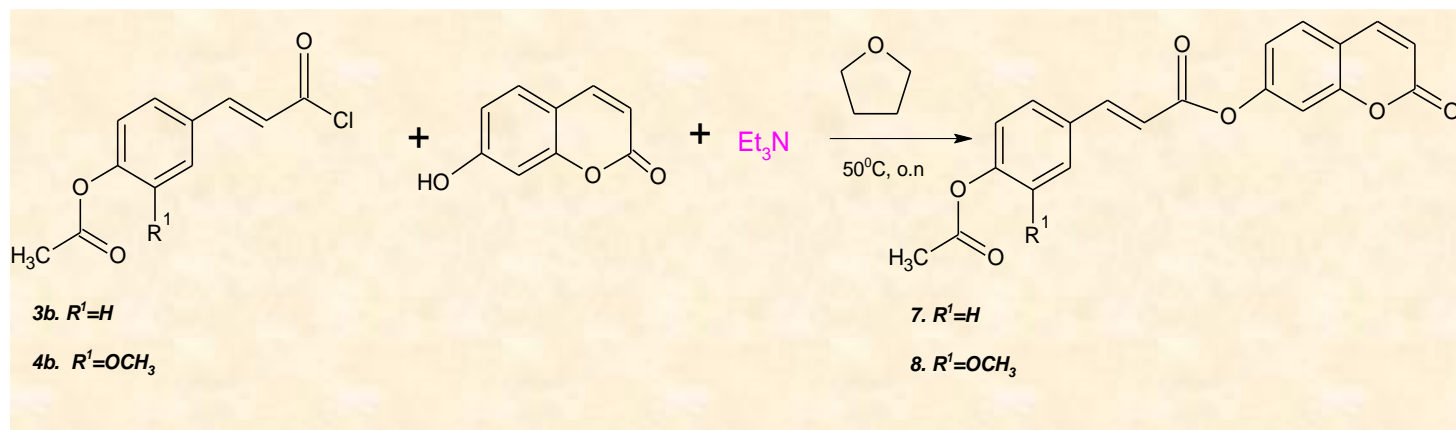
κατά κύριο λόγο στη προετοιμασία των εστέρων και των αμινών από ακυλοχλωρίδια. Τέτοιες αντιδράσεις οδηγούν στη δημιουργία υδροχλωρίου, το οποίο συνδυάζεται με την τριεθυλαμίνη σχηματίζοντας άλας τριμεθυλοχλωριδίου, το οποίο συχνά καλείται χλωριούχο τριαιθυλαμμώνιο. Κατά αυτόν τον τρόπο δεσμεύεται το υδροχλώριο από το μίγμα που αντιδρά, το οποίο απαιτείται για την ολοκλήρωση αυτών των αντιδράσεων.

3.3.2 ΣΕΙΡΑ Γ: Εστέρες των φαινολικών οξέων με την 7-υδροξυ-κουμαρίνη

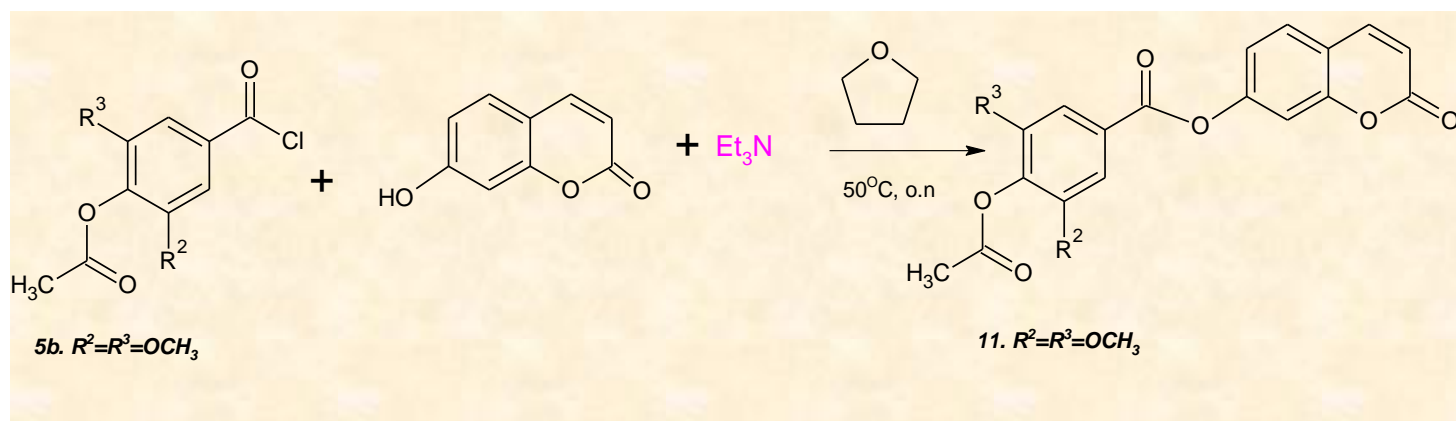
Οι εστέρες των φαινολικών οξέων με την 7-υδροξυ κουμαρίνη (**7,8,11**) παρασκευάστηκαν μέσω αντιδράσεως εστεροποίησης, μεταξύ των χλωριδίων των ακετυλιωμένων, συριγγικού, p-κουμαρικού και φερουλικού, οξέων της **σειράς Β** με την 7-υδροξυκουμαρίνη (**1**), παρουσία τριαιθυλαμίνης (Et_3N) και τετραϋδροφουρανίου (THF). Οι χημικές δομές (**7,8,11**) που προέκυψαν καθώς και η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε, παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.



Πίνακας 13. Χημικές δομές των εστέρες των φαινολικών οξέων με την 7-υδροξυ κουμαρίνη



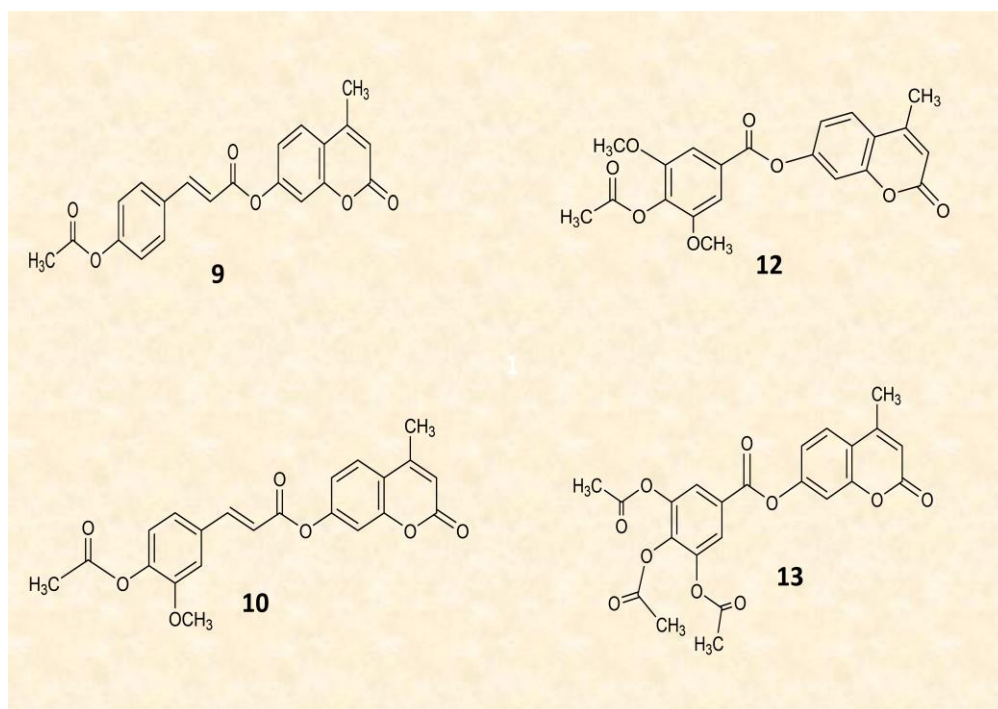
Πίνακας 14. Συνθετική πορεία εστεροποίησης του χλωριδίου του ακετυλο *p*-κουμαρικού και φερουλικού οξέος.



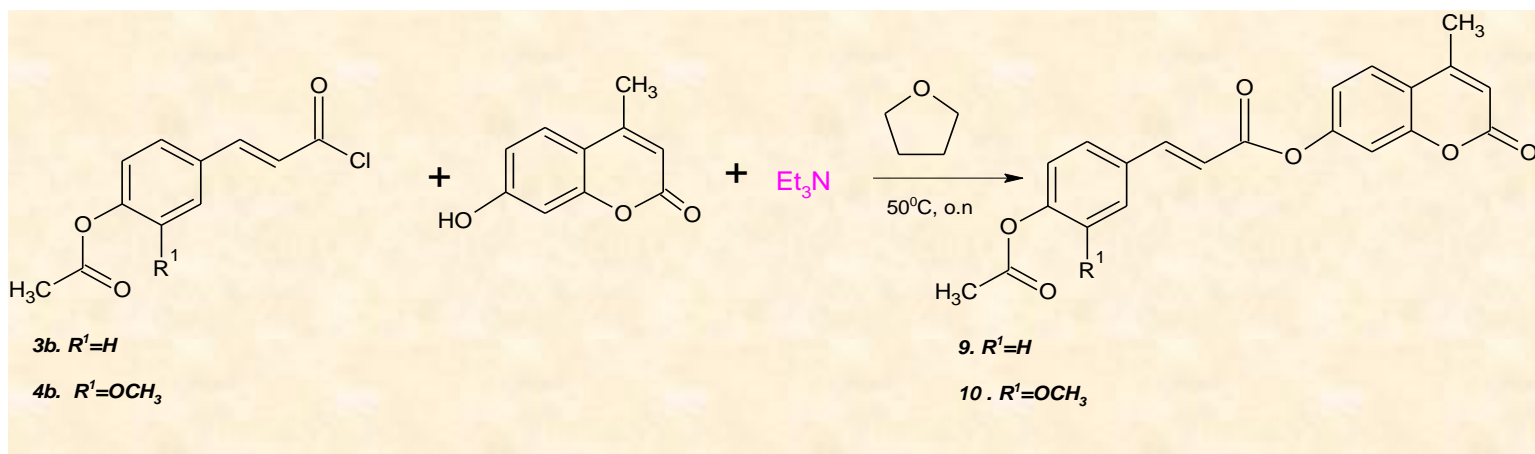
Πίνακας 15. Συνθετική πορεία εστεροποίησης του χλωριδίου του ακετυλο συριγγικού οξέος.

3.3.3 ΣΕΙΡΑ Δ: Εστέρες των φαινολικών οξέων με την 4-μεθυλο-7-υδροξυ κουμαρίνη

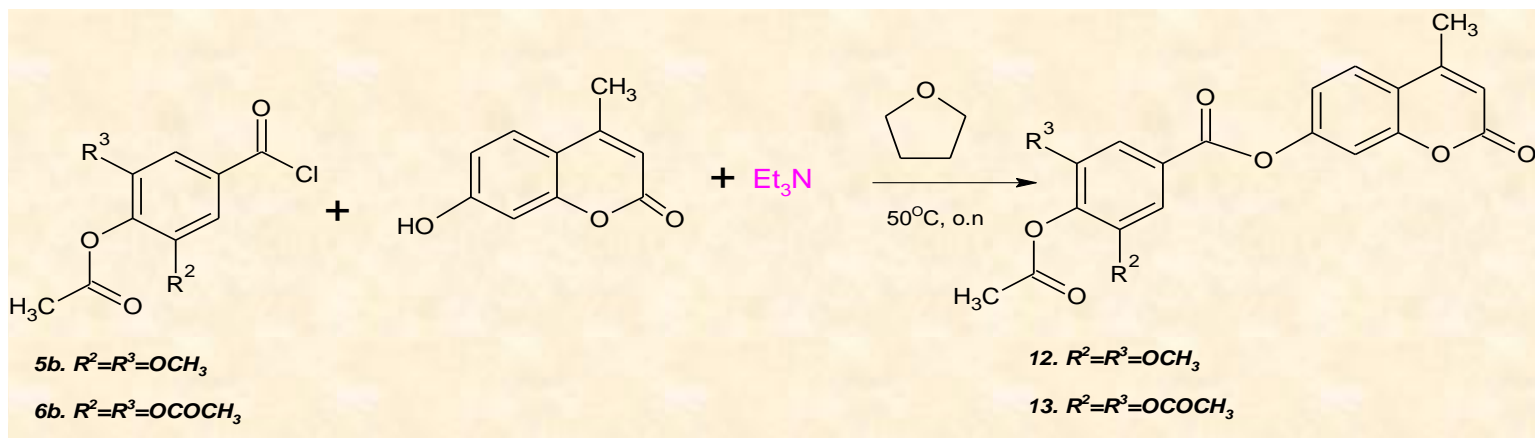
Η σειρά Δ των κουμαρινικών αναλόγων αφορά στη σύνθεση εστέρων των φαινολικών οξέων με την 4-μεθυλο 7-υδροξυ κουμαρίνη (**9,10,12,13**), μέσω αντιδράσεως εστεροποίησης του εκάστοτε ακετυλοχλωριδίου (συριγγικού, *p*-κουμαρικού, φερουλικού, γαλλικού) της **σειράς Β**, με την 4-μεθυλο 7-υδροξυκουμαρίνη (**2**). Τα μόρια που προέκυψαν και η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.



Πίνακας 16. Χημικές δομές των εστέρων των φαινολικών οξέων με την 4-μεθυλο-7-υδροξυ κουμαρίνη.



Πίνακας 17. Συνθετική πορεία εστεροποίησης του χλωριδίου του ακετυλο-συριγγικού και γαλλικού οξέος.



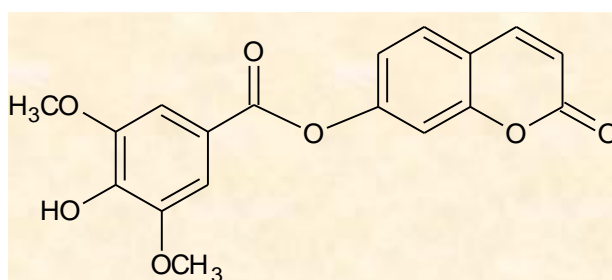
Πίνακας 18. Συνθετική πορεία εστεροποίησης του χλωριδίου του ακετυλο-συριγγικού και γαλλικού οξέος.

3.4 Απομάκρυνση της ακετυλο-προστατευτικής ομάδας

Για την περαιτέρω διερεύνηση του τρόπου που επηρεάζει η δομή την βιολογική δράση, πραγματοποιήθηκε τροποποίηση του κουμαρινικού παραγώγου **11**, μέσο αντιδράσεως αποπροστασίας, με αποτέλεσμα το νέο παράγωγο **11a**.

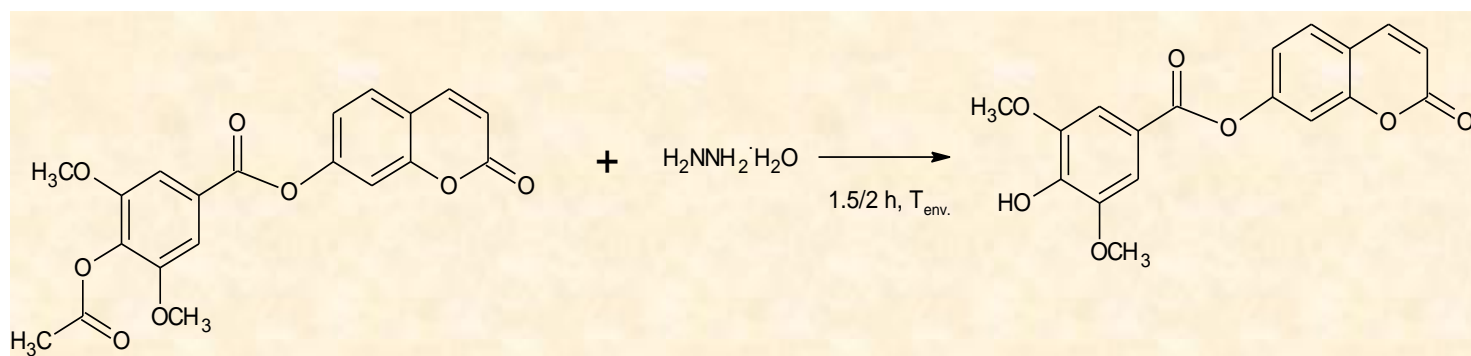
Συγκεκριμένα, για την αποπροστασία της ακετυλο-ομάδας, το παράγωγο **11**, κατεργάστηκε με άνυδρη υδραζίνη και διαλύτη μεθανόλης, σχηματίζοντας το νέο μόριο.

Η αποπροστασία της ακετυλο-ομάδας του φαινολικού δακτυλίου της θέσης 5 του κουμαρινικού αναλόγου **11**, οδήγησε στο παρακάτω προϊόν.



Πίνακας 19. Χημική δομή του συριγγικού 2-οξο-2H-χρωμεν-7-υλ εστέρα

Η συνθετική πορεία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα:



Πίνακας 20. Συνθετική πορεία απομάκρυνσης της ακετυλο-προστατευτικής ομάδας του συριγγικού 2-οξο-2H-χρωμεν-7-υλ εστέρα.

ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ

Πειραματικό



4

Γενικό Πειραματικό - Οργανολογία

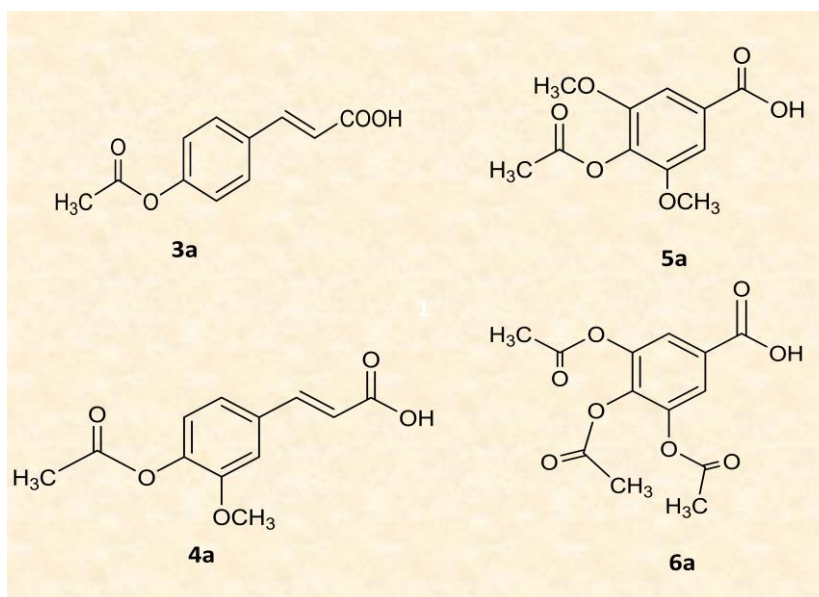
Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (^1H NMR) έχουν καταγραφεί με το όργανο Varian 300MHz και ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (d_6 -DMSO). Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων, δίνονται σε ppm. Η πολλαπλότητα των σημάτων στα φάσματα ^1H NMR αναφέρονται ως : s (singlet, απλό), d (doublet, διπλό), t (triplet, τριπλό), q (quartet, τετραπλό), m (multiplet, πολλαπλό), br (broad, ευρύ). Οι σταθερές συζεύξεως J δίνονται σε Hz.

Ο προσδιορισμός των σημείων τήξης (Σ.Τ.) έγινε σε ανοικτούς τριχοδιαμετρικούς σωλήνες σε μια συσκευή Gallenkamp και οι τιμές τους δεν έχουν διορθωθεί.

Ο έλεγχος της καθαρότητας των ενώσεων και η παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων έγινε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε πλάκες αλουμινίου, επιστρωμένες με Silica gel F254 της εταιρίας Merck. Οι κηλίδες των χρωματογραφημάτων TLC εμφανίστηκαν με λάμπα υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας στα 254 nm και με εμποτισμό σε διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος (PMA) σε αναλογία (αιθανολικό διάλυμα PMA 7% /EtOH 1:2).

4.1 Συνθετική πορεία ακετυλο-φαινολικών οξέων

Τα φαινολικά οξέα,(p-κουμαρικό, συριγγικό ,φερουλικό και γαλλικό), ο οξικός ανυδρίτης (Ac₂O) και ο βασικός καταλύτης ,που χρησιμοποιήθηκαν είναι χημικώς καθαρά εμπορικά προϊόντα. Οι ακετυλο φαινολικές δομές **3a-6a** που αποτελούν εστέρες οξικού οξέος παρασκευάστηκαν μέσω αντίδρασης ακετυλίωσης παρουσία οξικού ανυδρίτη και ενός βασικού καταλύτη.

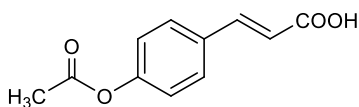


Πίνακας 21 . Χημικές δομές των ακετυλιωμένων φαινολικών οξέων p-κουμαρικό(**3a**), συριγγικό (**5a**), φερουλικό(**4a**),γαλλικό(**6a**).

4.1.1 Γενική μέθοδος σύνθεσης ακετυλο-φαινολικών οξέων (**3a-6a**)

Σε σφαιρική φιάλη διαλύονται 1eq φαινολικού οξέος σε 2eq οξικού ανυδρίτη και εν συνεχεία προστίθεται κατάλληλη ποσότητα πυριδίνης. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 24 ώρες στους 80°C υπό αδρανείς συνθήκες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών διχλωρομεθανίου: μεθανόλης – 9:1. Μετά το τέλος της αντίδρασης ο διαλύτης του μίγματος (πυριδίνη) εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση στους 70-80°C, οπότε προκύπτει στερεό υπόλειμμα. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται κατόπιν εκπλύσεων με διαλύτη διαιθυλαιθέρα και διήθησης υπο κενό του σχηματιζόμενου στερεού. Το προϊόν χρησιμοποιείται για τις αντιδράσεις χλωρίωσης χωρίς περαιτέρω διεργασίες καθαρισμού.

ΑΚΕΤΥΛΟ P- ΚΟΥΜΑΡΙΚΟ ΟΞΥ (3a)



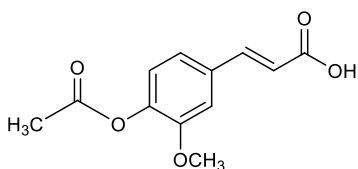
Σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο, χρησιμοποιήθηκαν 4,26 mmol (0,7 gr) p-κουμαρικού οξέος σε 0,8 ml οξικού ανυδρίτη και 8,53 ml πυριδίνης.

Απόδοση : 83,25%

Σ.Τ. : 185-188 °C, σ.τ. βιβλιογραφίας: 205-211 °C^[67].

Χρώμα : υπόλευκο

ΑΚΕΤΥΛΟ ΦΕΡΟΥΛΙΚΟ ΟΞΥ (4a)



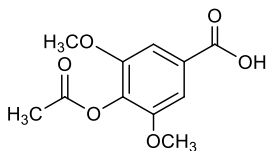
Σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο, χρησιμοποιήθηκαν 2,57 mmol (0,5 gr) φερουλικού οξέος σε 1,08 ml οξικού ανυδρίτη και 5,15 ml πυριδίνης.

Απόδοση : 95,11%

Σ.Τ. : 191 - 194°C ,σ.τ. βιβλιογραφίας: 201-203 °C.^[68]

Χρώμα : λευκό

ΑΚΕΤΥΛΟ ΣΥΡΙΓΓΙΚΟ ΟΞΥ (5a)



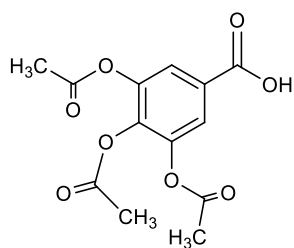
Σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο, χρησιμοποιήθηκαν 3,53 mmol (0,7 gr) συριγγικού οξέος σε 0,4 ml οξικού ανυδρίτη και 7,06 ml πυριδίνης.

Απόδοση : 81,91%

Σ.Τ. : 177-180°C ,σ.τ. βιβλιογραφίας: 190-191°C.^[69]

Χρώμα : υπόλευκο

ΤΡΙ-ΑΚΕΤΥΛΟ ΓΑΛΛΙΚΟ ΟΞΥ (6a)



Σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο, χρησιμοποιήθηκαν 3,72 mmol (0,7 gr) γαλλικού οξέος σε 2,11 ml οξικού ανυδρίτη και 7,44 ml πυριδίνης.

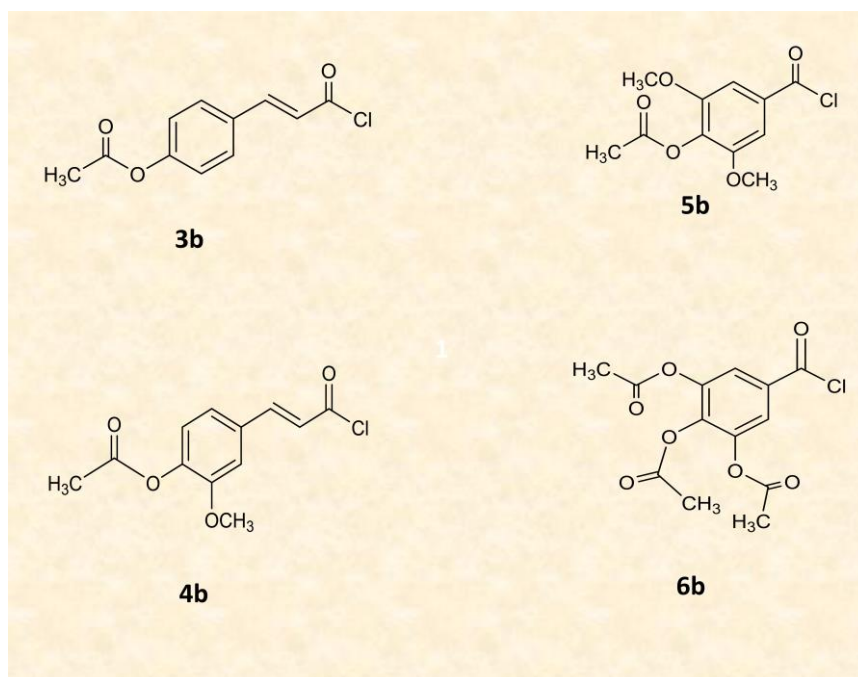
Απόδοση : 100%

Σ.Τ. : 157-160°C, σ.τ. βιβλιογραφίας: 168-171 °C^[70]

Χρώμα : λευκό

4.2 Συνθετική πορεία χλωριδίων ακετυλο- φαινολικών οξέων (3b-6b)

Το θειονυλοχλωρίδιο (SOCl₂) και το τολουόλιο που χρησιμοποιήθηκαν είναι χημικώς καθαρά εμπορικά προϊόντα. Τα χλωρίδια **3b-6b** των ακετυλιωμένων οξέων συριγγικού, ρ-κουμαρικού, φερουλικού και γαλλικού παρασκευάστηκαν μέσω αντίδρασης με θειονυλοχλωρίδιο σε διαλύτη τολουολίου.

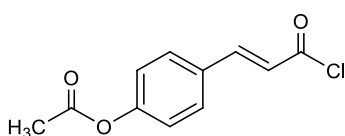


Πίνακας 22. Χημικές δομές των ακυλοχλωριδίων ρ-κουμαρικό(**3b**), συριγγικό (**5b**), φερουλικό (**4b**), γαλλικό(**6b**)

4.2.1 Γενική μέθοδος παρασκευής χλωριδίων φαινολικών οξέων (3b-6b)

Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 1eq του κατάλληλου ακετυλο φαινολικού οξέος με ορισμένη ποσότητα τολουολίου και 4eq θειονυλοχλωριδίου. Η αντίδραση αναδεύεται στους 80-90°C, για 45min, και με το πέρας της αντίδρασης πραγματοποιείται συμπύκνωση της περίσσειας του θειονυλοχλωριδίου υπο ελαττωμένη πίεση. Τα παραγόμενα χλωρίδια χρησιμοποιούνται χωρίς καθαρισμό, άμεσα στα περαιτέρω στάδια.

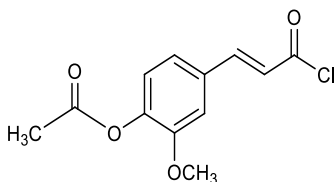
ΧΛΩΡΙΔΙΟ ΑΚΕΤΥΛΟ Ρ- ΚΟΥΜΑΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (3b)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής χλωριδίων φαινολικού οξέος, σε 3.39 mmol (700mg) του ακετυλο p-κουμαρικού οξέος προστίθενται 7,57ml τολουολίου και 13.57 mmol (0.98ml) θειονυλοχλωριδίου.

Απόδοση : 100%

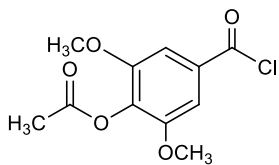
ΧΛΩΡΙΔΙΟ ΑΚΕΤΥΛΟ ΦΕΡΟΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (4b)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής χλωριδίων φαινολικού οξέος, σε 2,44 mmol (577,4 mg) του ακετυλο φερουλικού οξέος προστίθενται 5,45ml τολουολίου και 9,77 mmol (0.71ml) θειονυλοχλωριδίου.

Απόδοση : 100%

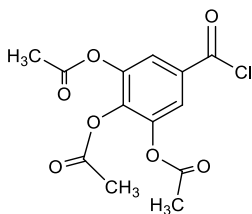
ΧΛΩΡΙΔΙΟ ΑΚΕΤΥΛΟ ΣΥΡΙΓΓΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (5b)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής χλωριδίων φαινολικού οξέος, σε 1.35 mmol (350mg) ακετυλο-συριγγικού οξέος προστίθενται 3,02 ml τολουολίου και 1,64 mmol (0,39ml) θειονυλοχλωριδίου.

Απόδοση : 100%

ΧΛΩΡΙΔΙΟ ΑΚΕΤΥΛΟ ΓΑΛΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (6b)

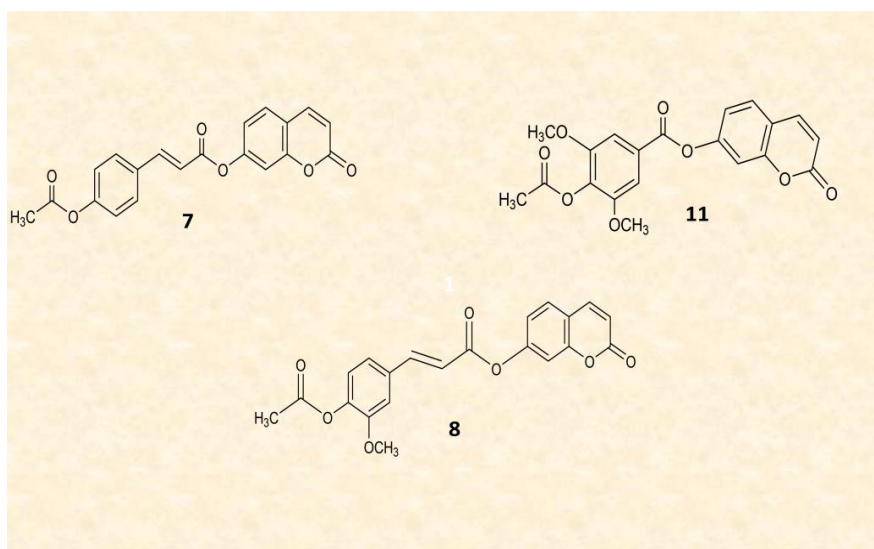


Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο παρασκευής χλωριδίων φαινολικού οξέος, σε 4,50 mmol (1333,5 mg) του ακετυλο γαλλικού οξέος προστίθενται 10,04ml τολουολίου και 18 mmol (1,3ml) θειονυλοχλωριδίου.

Απόδοση : 97.7%

4.3 Συνθετική πορεία εστέρων των φαινολικών οξέων με την 7-υδροξυ-κουμαρίνη (7,8,11)

Οι εστέρες των φαινολικών οξέων με την 7-υδροξυ κουμαρίνη (7,8,11) παρασκευάστηκαν μέσω αντιδράσεως εστεροποίησης, μεταξύ κατάλληλων χλωριδίων των ακετυλιωμένων φαινολικών οξέων (3b-6b) και της 7-υδροξυκουμαρίνης, παρουσία τριαιθυλαμίνης (Et₃N) και διαλύτη τετραϋδροφουρανίου (THF).

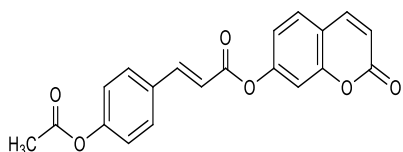


Πίνακας 23. Χημικές δομές των εστέρων των φαινολικών οξέων με την 7-υδροξυ κουμαρίνη.

4.3.1 Γενική μέθοδος παρασκευής των εστέρων των φαινολικών οξέων με την 7-υδροξυ-κουμαρίνη (7,8,11)

Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 1,5eq του κατάλληλου χλωριδίου του ακετυλο φαινολικού οξέος και 1eq της 7-υδροξυ-κουμαρίνης(**1**), διαλυόμενα σε κατάλληλη ποσότητα τετραϋδροφουρανίου (THF). Εν συνεχεία στο μίγμα προστίθεται η τριαιθυλαμίνη (Et_3N). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπο ανάδευση στους 50°C , για 24 ώρες υπό αδρανείς συνθήκες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών πετραλαϊκού αιθέρα: οξικού αιθυλεστέρα - 6:4. Μετά το πέρας της αντίδρασης γίνεται προσθήκη κατάλληλης ποσότητας νερού και ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc). Ακολουθεί ξήρανση της οργανικής φάσης που προκύπτει από την εκχύλιση με ξηραντικό μέσο το θειικό νάτριο (Na_2SO_4) και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση, οπότε προκύπτει στερεό υπόλειμμα. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται κατόπιν ανακρυστάλλωσης.

P-ΑΚΕΤΥΛΟΕΥ ΚΟΥΜΑΡΙΚΟΣ 2-ΟΞΟ-2Η-ΧΡΩΜΕΝ-7-ΥΛ ΕΣΤΕΡΑΣ (7)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης των εστέρων των φαινολικών οξέων με την 7-υδροξυ κουμαρίνη, προστίθενται 3.44 mmol (766mg) του χλωριδίου του p-κουμαρικού οξέος και 2.29mmol (372.1mg) της 7-υδροξυ-κουμαρίνης, διαλυόμενα σε 11.47 ml THF. Εν συνεχεία στο μίγμα προστίθενται 1.04ml τριεθυλαμίνης. Το τελικό καθαρό προϊόν παραλαμβάνεται κατόπιν ανακρυστάλλωσης σε σύστημα μεθανόλης (MeOH) διχλωρομεθανίου (DCM).

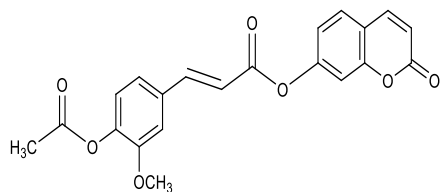
Απόδοση : 97.46 %

Σ.Τ. : 197-200°C

Χρώμα : λευκό

¹H NMR: (300 MHz, DMSO) δ(ppm) 8.06(d,J=9.6Hz, 1H, C4),7.89(d,J=15.6Hz,1H, Cβ), 7.86(d, J=8.7Hz, 2H, C6',C2'), 7.77(d, J=8.4Hz,1H,C5), 7.36 (d,J=2.1Hz, 1H, C8),7.21(d,J=8.7Hz,2H,C5',C3'),7.23(dd, J=8.7Hz, 2.1Hz, 1H, C6),6.87 (d,J=16.2Hz,1H,Cα), 6.47(d,J=9.6Hz ,1H, C3),2.29(s, 3H, CH₃)

ΑΚΕΤΥΛΟΕΥ ΦΕΡΟΥΛΙΚΟΣ 2-ΟΞΟ-2Η-ΧΡΩΜΕΝ-7-ΥΛ3 ΕΣΤΕΡΑΣ (8)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης των εστέρων των φαινολικών οξέων με την 7-υδροξυ κουμαρίνη ,προστίθενται 2.45 mmol (623,9mg) του χλωριδίου του φερουλικού οξέος και 1.63mmol (264.811 mg) της 7-υδροξυ-κουμαρίνης, διαλυόμενα σε 8.16 ml THF. Εν συνεχεία στο μίγμα προστίθενται 0.74 ml τριεθυλαμίνης. Το τελικό καθαρό προϊόν παραλαμβάνεται κατόπιν ανακρυστάλλωσης σε σύστημα μεθανόλης (MeOH)- διχλωρομεθανίου (DCM).

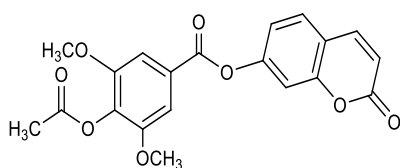
Απόδοση : 100%

Σ.Τ. : 166-169 °C

Χρώμα : λευκό

¹H NMR: (300 MHz, DMSO) δ(ppm) 8.08(d,J=9.6Hz, 1H, C5'),7.88(d,J=15.9Hz,1H, Cβ), 7.79(d, J=8.4Hz, 1H, C4), 7.62(d, J=1.8Hz, 1H,C8), 7.4(m,2H,C6',C2'), 7.25(dd,J=8.4,8.4Hz,1H,C6),7.17 (d,J=8.1Hz,1H,C5),6.98(d, J=15.9, 1H, Cα),6.34 (d,J=9.6Hz,1H,C3), 3.86(s,3H, OCH₃),2.29(s, 3H, CH₃COO)

ΑΚΕΤΥΛΟΕΥ ΣΥΡΙΓΓΙΚΟΣ 2-ΟΞΟ-2Η-ΧΡΩΜΕΝ-7-ΥΛ ΕΣΤΕΡΑΣ (11)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης των εστέρων των φαινολικών οξέων με την 7-υδροξυ κουμαρίνη ,προστίθενται 1.35 mmol (350mg) του χλωριδίου του συριγγικού οξέος και 0.90mmol (146.25 mg) της 7-υδροξυ-κουμαρίνης, διαλυόμενα σε 4.51 ml THF .Εν συνεχεία στο μίγμα προστίθενται 0.41ml τριεθυλαμίνης. Το τελικό καθαρό προϊόν παραλαμβάνεται κατόπιν ανακρυστάλλωσης σε σύστημα μεθανόλης (MeOH) - διχλωρομεθανίου (DCM).

Απόδοση : 87.66 %

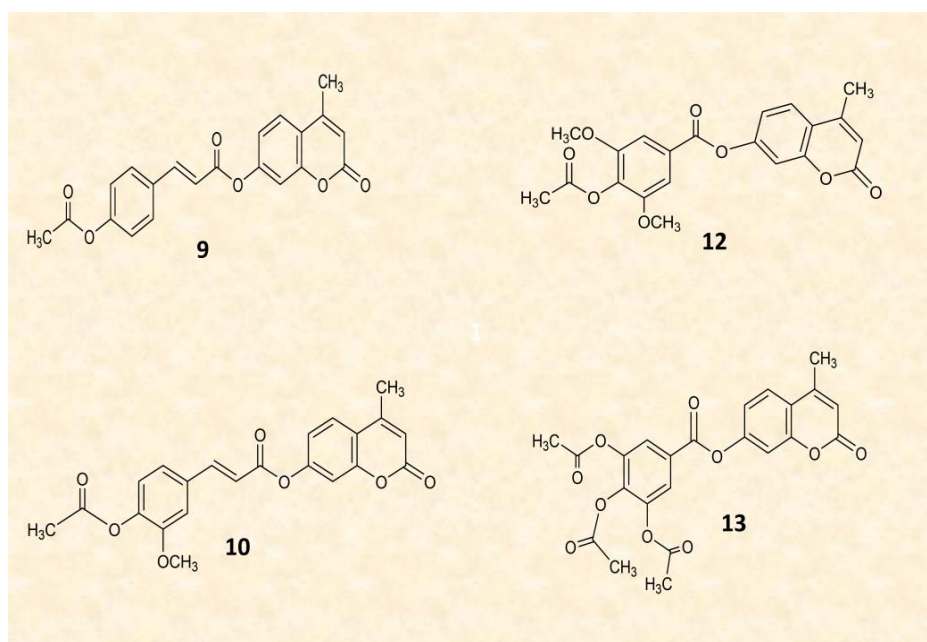
Σ.Τ. : 176-179°C

Χρώμα : λευκό

¹H NMR: (300 MHz, DMSO) δ(ppm) 8.09(d,J=9Hz, 1H, C4),7.82(d,J=9Hz,1H, C5), 7.47(s, 3H, C6',C2',C8), 7.33(dd, J=9, 9 Hz,1H, C6), 6.5(d,J=9Hz,1H,C3),3.88(s,6H, OCH₃),2.32 (s,3H,CH₃COO)

4.4 Συνθετική πορεία των εστέρων των φαινολικών οξέων με την 4-μεθυλο-7-υδροξυ κουμαρίνη (9,10,12,13)

Οι εστέρες των φαινολικών οξέων με την 4-μέθυλο-7-υδροξυ κουμαρίνη (9,10,12,13), παρασκευάστηκαν μέσω αντιδράσεως εστεροποίησης, μεταξύ κατάλληλων χλωριδίων ακετυλιωμένων φαινολικών οξέων και της 4-μέθυλο-7-υδροξυ κουμαρίνης(2), παρουσία τριαιθυλαμίνης (Et_3N) και τετραϋδροφουρανίου (THF).

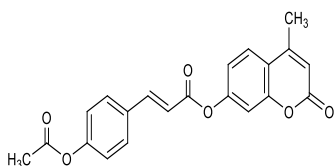


Πίνακας 24. Χημικές δομές των εστέρων των φαινολικών οξέων με την 4-μεθυλο-7-υδροξυ κουμαρίνη

4.4.1 Γενική μέθοδος παρασκευής εστέρων των φαινολικών οξέων με την 4-μεθυλο-7-υδροξυ κουμαρίνη (9,10,12,13)

Σε σφαιρική φιάλη διαλύονται 1,5eq του κατάλληλου χλωριδίου του ακετυλο φαινολικού οξέος και 1eq της 4-μεθυλο 7-υδροξυ-κουμαρίνης σε κατάλληλη ποσότητα τετραϋδροφουρανίου (THF) και εν συνεχεία προστίθεται κατάλληλη ποσότητα τριαιθυλαμίνης (Et₃N). Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται προς ανάδευση στους 50°C, για 24 ώρες , σε αδρανείς συνθήκες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών πετραλαϊκού αιθέρα: οξικού αιθυλεστέρα - 6:4. Μετά το πέρας της αντίδρασης γίνεται προσθήκη κατάλληλης ποσότητας νερού και ακολουθεί εκχύλιση του μίγματος με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc). Ακολουθεί ξήρανση της οργανικής φάσης που προκύπτει από την εκχύλιση με ξηραντικό μέσο το θειικό νάτριο (Na₂SO₄) και ο διαλύτης εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση, οπότε προκύπτει στερεό υπόλειμμα. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται κατόπιν ανακρυστάλλωσης.

P-ΑΚΕΤΥΛΟΞΥ ΚΟΥΜΑΡΙΚΟΣ 4 ΜΕΘΥΛΟ 2-ΟΞΟ-2Η-ΧΡΩΜΕΝ-7-ΥΛ ΕΣΤΕΡΑΣ (9)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης των εστέρων των φαινολικών οξέων με την 4-μέθυλο-7-υδροξυ κουμαρίνη, προστίθενται ,4 mmol (757.4mg) του χλωριδίου του p-κουμαρικού οξέος και 2.26mmol (399.48mg) της 4-μεθυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης, διαλυόμενα σε 11.34ml THF . Εν συνεχεία στο μίγμα προστίθενται 1.03ml τριαεθυλαμίνης. Το τελικό καθαρό προϊόν παραλαμβάνεται κατόπιν ανακρυστάλλωσης σε σύστημα μεθανόλης (MeOH) διχλωρο-μεθανίου (DCM).

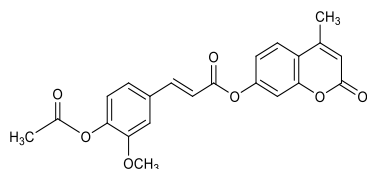
Απόδοση : 88.24%

Σ.Τ. : 177-181°C

Χρώμα : λευκό

¹H NMR: (300 MHz, DMSO) δ(ppm) 7.86(m,4H,Cβ,C5',C6',C2'), 7.36(S,1H, C8), 7.24(m, 3H, C6,C5), 6.88(d, J=16.2Hz,1H,Cα), 6.39 (S, 1H, C3), 2.46(S,3H, CH₃COO),2.20(S, 3H, CH₃)

ΑΚΕΤΥΛΟΞΥ ΦΕΡΟΥΛΙΚΟΣ 4 ΜΕΘΥΛΟ 2-ΟΞΟ-2Η-ΧΡΩΜΕΝ-7-ΥΛ3 ΕΣΤΕΡΑΣ (10)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης των εστέρων των φαινολικών οξέων με την 4-μέθυλο-7-υδροξυ κουμαρίνη προστίθενται , 2.51 mmol (641,1mg) του χλωριδίου του φερουλικού οξέος και 1.67mmol (295.65 mg) της 4 –μέθυλο-7-υδρόξυ-κουμαρίνης, διαλυόμενα , σε 8.39 ml THF . Εν συνεχεία στο μίγμα προστίθενται 0.76 ml τριεθυλαμίνης. Το τελικό καθαρό προϊόν παραλαμβάνεται κατόπιν ανακρυστάλλωσης σε σύστημα.

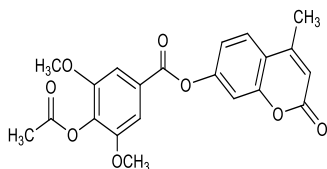
Απόδοση : 45.42%

Σ.Τ. : 190-194 °C

Χρώμα : λευκό

¹H NMR: (300 MHz, DMSO) δ(ppm) 7.87(m,2H,Cβ,C5'), 7.63(S,1H,C8), 7.4(m, 2H, C6',C2'), 7.28(dd, J=8.7,8.7Hz,1H,C6), 7.17(d,J=7.8Hz,1H,C5), 6.98 (d,J=15.9 Hz, 1H, Cα), 6.41(S,1H,C3), 3.86(S,3H,OCH₃), 2.47(S,3H, CH₃),2.29(S, 3H, CH₃ COO)

ΣΥΡΙΓΓΙΚΟΣ-ΑΚΕΤΥΛΟΞΥ 4 ΜΕΘΥΛΟ 2-ΟΞΟ-2Η-ΧΡΩΜΕΝ-7-ΥΛ ΕΣΤΕΡΑΣ (12)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης των εστέρων των φαινολικών οξέων με την 4-μέθυλο-7-υδροξυ κουμαρίνη, σε 4.6 ml THF και 0.42 ml τριεθυλαμίνης, προστίθενται 1.39 mmol (359.6mg) του χλωριδίου του συριγγικού οξέος και 0.92mmol (162.07 mg) της 7-υδροξυ-κουμαρίνης. Το τελικό καθαρό προϊόν παραλαμβάνεται κατόπιν ανακρυστάλλωσης σε σύστημα μεθανόλης (MeOH) - διχλωρομεθανίου (DCM).

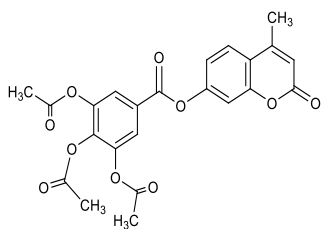
Απόδοση : 85.62%

Σ.Τ. : 184-187°C

Χρώμα : λευκό

¹H NMR: (300 MHz, DMSO) δ(ppm) 7.87(d, J=9Hz, 1H, C5), 7.47(s, 3H, C6', C2', C8), 7.35(dd, J=9Hz, 6Hz, 1H, C6), 6.41(s, 1H, C3), 3.88(s, 6H, CH₃O), 2.48(s, 3H, CH₃COO), 2.319 (s, 3H, CH₃)

ΑΚΕΤΥΛΟΞΥ ΓΑΛΛΙΚΟΣ 4 ΜΕΘΥΛΟ 5 - (2-ΟΞΟ-2Η-ΧΡΩΜΕΝ-7-ΥΛΟΞΥ) ΕΣΤΕΡΑΣ (13)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης των εστέρων των φαινολικών οξέων με την 4-μέθυλο-7-υδροξυ κουμαρίνη, προστίθενται 4.39 mmol (314.67mg) του χλωριδίου του γαλλικού οξέος και 2.93mmol (516.477mg) της 4-μεθυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης, διαλυόμενα, σε 14.65 ml THF. Εν συνεχεία στο μίγμα προστίθενται 1.46 ml τριεθυλαμίνης. Το τελικό καθαρό προϊόν παραλαμβάνεται κατόπιν ανακρυστάλλωσης σε σύστημα μεθανόλης (MeOH)- διχλωρομεθανίου (DCM).

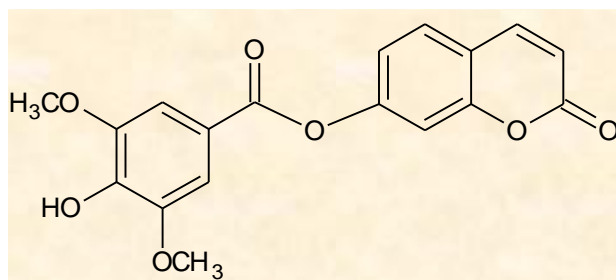
Απόδοση : 84.44%

Σ.Τ. : 123-126 °C

Χρώμα : καφέ ανοιχτό

4.5 Συνθετική πορεία του συριγγικού 2-οξο-2Η-χρωμεν-7-υλ-εστέρα (11α)

Η σύνθεση του υδροξυλιωμένου κουμαρινικού αναλόγου **11α** πραγματοποιήθηκε μέσω αντίδρασης αποπροστασίας της ακετυλο-ομάδας.



Πίνακας 25. Χημική δομή του συριγγικού 2-οξο-2Η-χρωμεν-7-υλ εστέρα.

0.117mmol (45 mg) του ακετυλοξυ συριγγικού 2-οξο-2H- χρωμεν-7-υλ-εστέρα (**11**) αντιδρά με 0.03ml (29.31mg) μονοένυδρης υδραζίνης $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ παρουσία 1.8 ml διαλύτη μεθανόλης. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα για 1,5 με 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Μετά το πέρας της αντίδρασης στο διάλυμα προστίθεται νερό και εν συνεχεία πραγματοποιείται εκχύλιση με διαλύτη οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc). Το διάλυμα συμπυκνώνεται και λαμβάνεται το τελικό ξηρό στερεό. Το τελικό καθαρό προϊόν παραλαμβάνεται κατόπιν ανακρυστάλλωσης σε κατάλληλο σύστημα διαλυτών.

Απόδοση : 52,18%

Σ.Τ. : 172-175°C

Χρώμα : λευκό

$^1\text{H NMR}$: (300 MHz, MeOH) δ (ppm) 7.83(d, J=9.6Hz, 2H, C4), 7.44(d, J=8.4Hz, 1H, C5), 7.14(s, 2H, C2', C6'), 6.79(dd, J=8.4Hz, 8.4 Hz, 1H, C6), 6.70(d, J=2.4Hz, 1H, C8), 6.18(d, J=9.6Hz, 1H, C3), 3.39 (s, 6H, CH_3O)

4.6 Χαρακτηρισμός δομής νέων κουμαρινικών αναλόγων

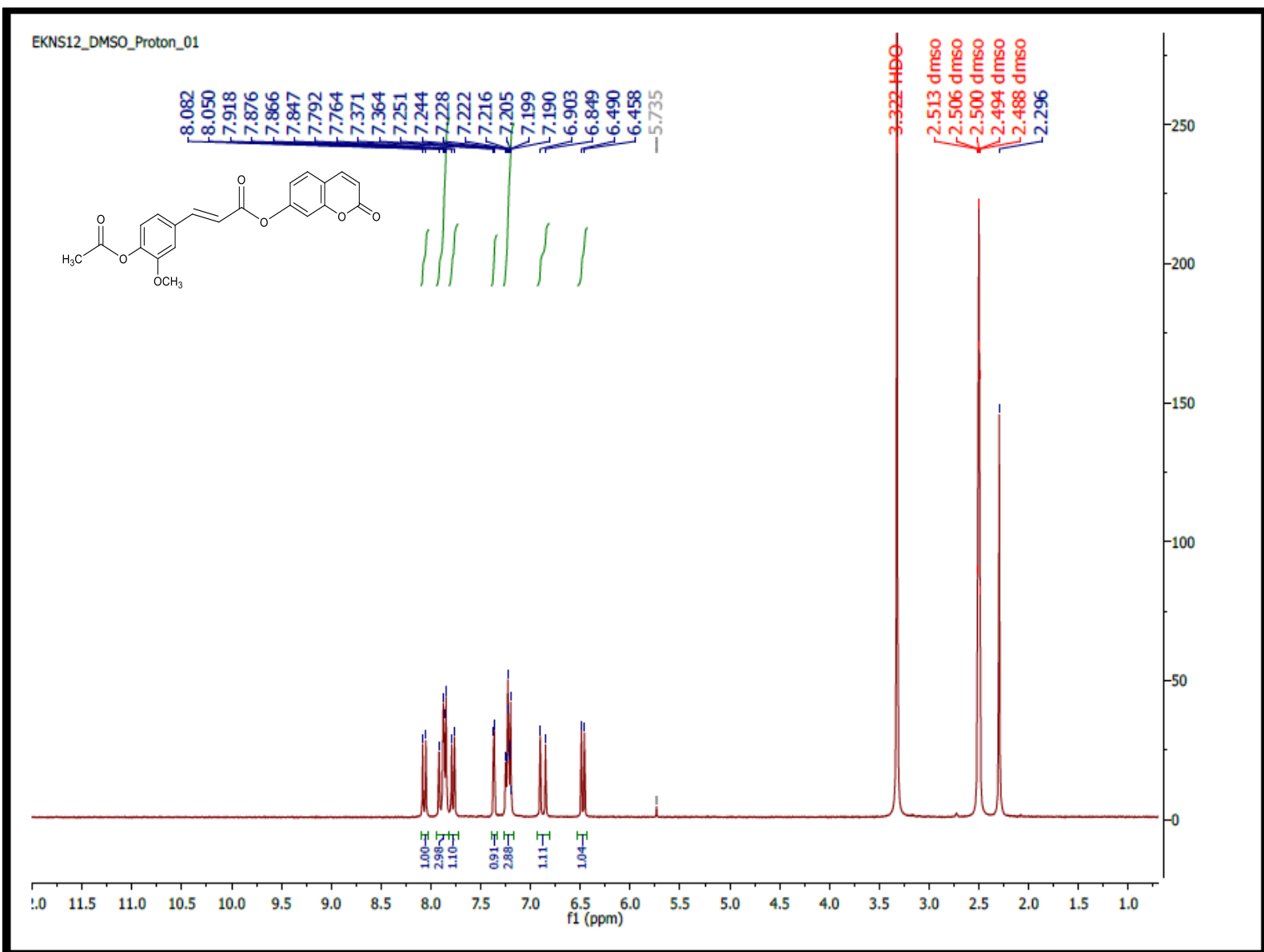
Η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός της δομής όλων των νέων παραγώγων που συντέθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής, πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου NMR ($^1\text{H NMR}$), τα οποία λήφθηκαν στο Φασματογράφο NMR *Varian Gemini 300* του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων αποδίδονται σε ppm ως προς το εσωτερικό πρότυπο TMS και οι σταθερές συζεύξεως δίνονται σε Hz.

Η φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού, κοινώς ως NMR, χαρακτηρίζεται ως η πιο διακεκριμένη τεχνική για την αναγνώριση και ταυτοποίηση οργανικών ενώσεων. Το φαινόμενο NMR βασίζεται στο γεγονός ότι οι πυρήνες των ατόμων έχουν μαγνητικές ιδιότητες, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να εξαχθούν χημικές πληροφορίες από το 'χάρτη' του ανθρακικού σκελετού που εξάγεται.

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται ο τρόπος ταυτοποίησης των νέων κουμαρινικών παραγώγων από τα προκύπτοντα φάσματα NMR για κάποια αντιπροσωπευτικά μόρια από κάθε κατηγορία.

4.6.1 ΣΕΙΡΑ Γ: *P*-ΑΚΕΤΥΛΟΞΥ ΚΟΥΜΑΡΙΚΟΣ 2-ΟΞΟ-2Η-ΧΡΩΜΕΝ-7-ΥΛ ΕΣΤΕΡΑΣ (7)



Εικόνα 4. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης 7 (DMCO, 300MHz)

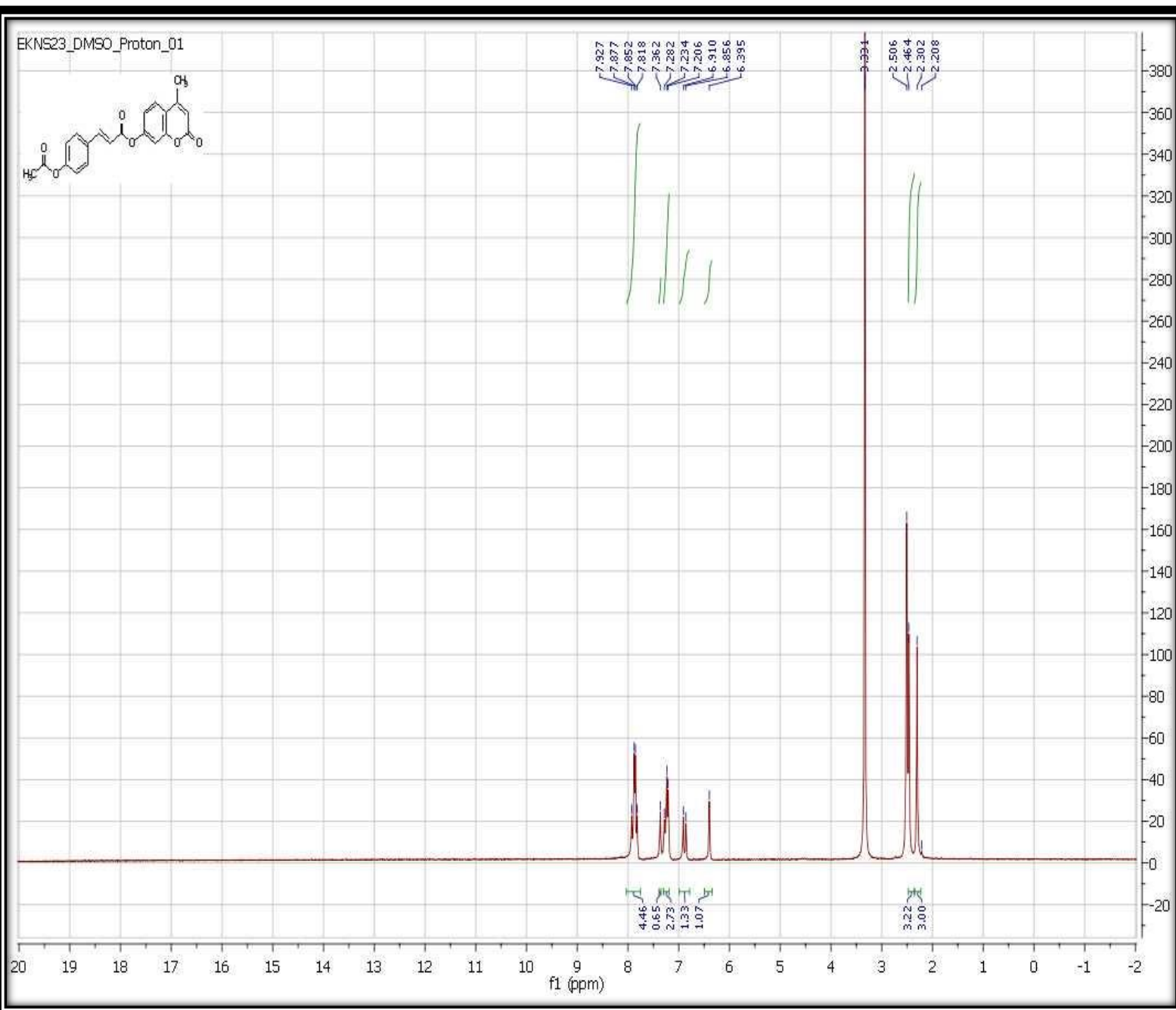
Στην Εικόνα 4 παρουσιάζεται το φάσμα ^1H NMR του κουμαρινικού παραγώγου 7 σε διαλύτη δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο ($\text{DMSO} - d_6$) και παρατηρούνται τα εξής:

Στα 8.06ppm εμφανίζεται μία διπλή κορυφή για ένα πρωτόνιο της θέσης 4 ($J=9.6\text{Hz}$). Το πρωτόνιο της θέσης β δίνει διπλή κορυφή στα 7.89ppm ($J=15.6\text{Hz}$) και ολοκληρώνεται και αυτό για ένα πρωτόνιο. Στα 7.86ppm, εμφανίζετε ξανά διπλή κορυφή – με ολοκλήρωση για δύο πρωτόνια -, στις θέσεις 6' και 2' ($J=8.7\text{Hz}$). Στη θέση 5 ($J=8.4\text{Hz}$) προκύπτει διπλή

κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο στα 7.77ppm ενώ για τις θέσεις 8 ($J=2.1\text{Hz}$) και 5',3' (8.7 Hz) εμφανίζονται διπλές κορυφές με ολοκλήρωση για ένα πρωτόνιο στα 7.36 ppm και δύο πρωτόνια στα 7.21ppm αντίστοιχα. Στα 7.23ppm η ανάλυση του φάσματος δίνει μία διπλή διπλών κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο, της θέσης 6 ($J=8.7\text{Hz}$, 2.1Hz), στα 6.87 ppm μια διπλή κορυφή που ολοκληρώνετε για ένα πρωτόνιο, της θέσης α ($J=16.2\text{Hz}$) και στα 6.47ppm διπλή κορυφή που ολοκληρώνετε για ένα πρωτόνιο στη θέση 3($J=9.6\text{Hz}$).

Τέλος τα πρωτόνια της ομάδας CH_3 δίνουν μια απλή κορυφή στα 2.29 ppm και οφείλονται στα ισοδύναμα πρωτόνια της ακετυλο ομάδας της θέσης 4' του αναλόγου.

4.6.2 ΣΕΙΡΑ Δ: Ρ-ΑΚΕΤΥΛΟΕΥ ΚΟΥΜΑΡΙΚΟΣ 4 ΜΕΘΥΛΟ 2-ΟΞΟ-2Η-ΧΡΩΜΕΝ-7-ΥΛ ΕΣΤΕΡΑΣ (9)



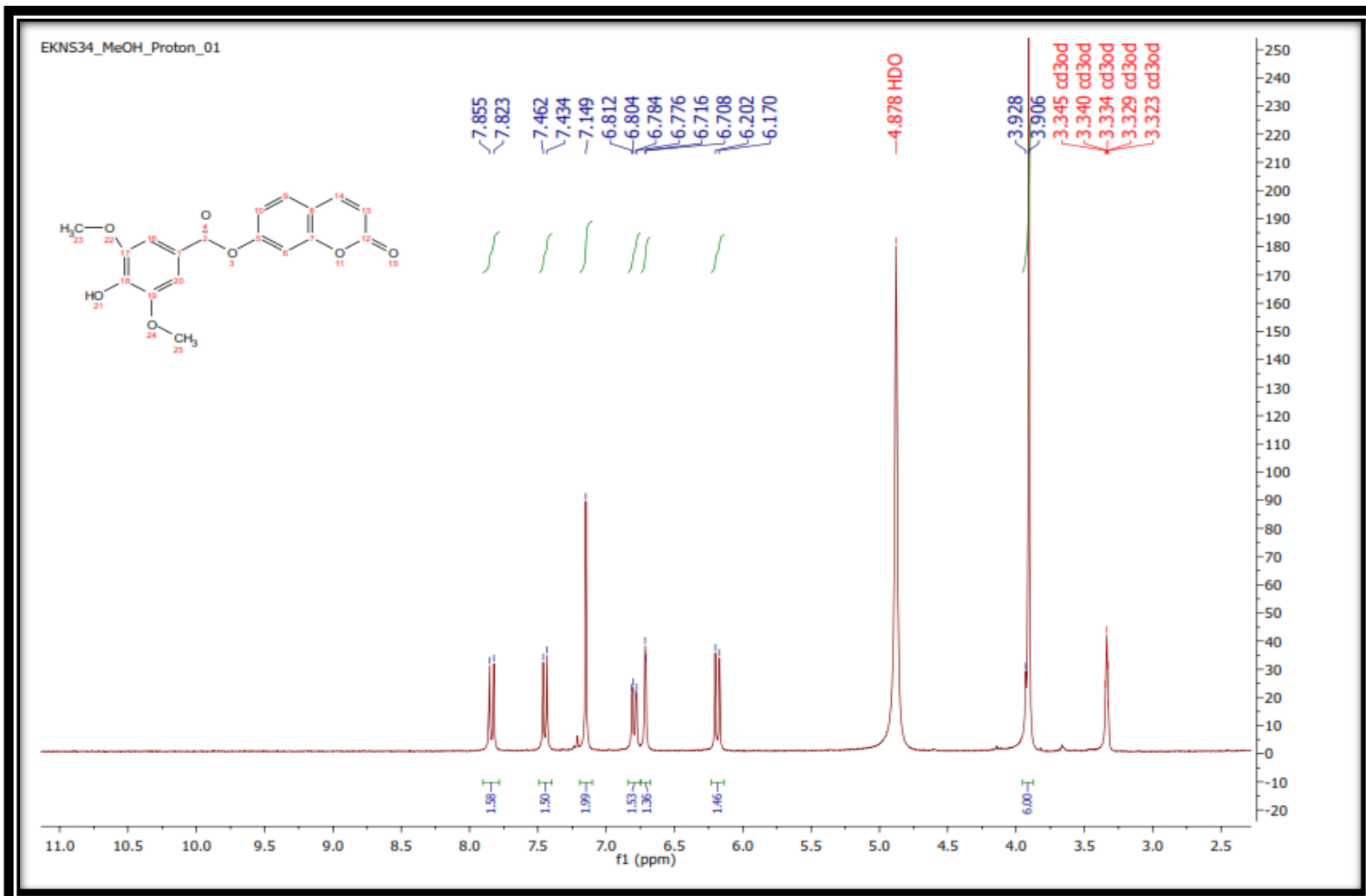
Εικόνα 5. Φάσμα ¹H NMR της ένωσης 9(DMSO, 300MHz)

Στην Εικόνα 5 παρουσιάζεται το φάσμα ¹H NMR του κουμαρινικού παραγώγου 9 σε διαλύτη δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO – d₆) και παρατηρούνται τα εξής:

Στις θέσεις β,5',6',3' και 2' εμφανίζεται πολλαπλή κορυφή εύρους 7.81-7.92ppm. Στα 7.36ppm εμφανίζεται μία απλή κορυφή για ένα πρωτόνιο της θέσης 8. Στις θέσεις 6 και 5 προκύπτει ξανά πολλαπλή κορυφή εύρους 7.206-7.282 ppm. Το πρωτόνιο της θέσης α δίνει διπλή κορυφή στα 6.88ppm ($J=16.2\text{Hz}$) και ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο. Στα 6.39ppm, εμφανίζετε απλή κορυφή– με ολοκλήρωση για ένα πρωτόνιο -, στη θέση 3.

Τέλος τα πρωτόνια της ομάδας-OCH₃ δίνουν μια απλή κορυφή στα 2.46 ppm που ολοκληρώνεται για τρία πρωτόνια, ενώ τα πρωτόνια της ομάδας -CH₃ δίνουν μια χαρακτηριστική απλή κορυφή, στα 2.20ppm που οφείλετε στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της μεθυλο ομάδας της θέσης 4 του βενζοπυρανικού δακτυλίου, ενδεικτική του σχηματισμού του τελικού προϊόντος.

4.6.3 : ΦΑΙΝΥΛΟΕΥ ΣΥΡΙΓΓΙΚΟΣ 2-ΟΞΟ-2Η-ΧΡΩΜΕΝ-7-ΥΛ ΕΣΤΕΡΑΣ (11a)



Εικόνα 6. Φάσμα ^1H NMR της ένωσης **11a**(DMCO, 300MHz)

Στην **Εικόνα 6** παρουσιάζεται το φάσμα ^1H NMR του κουμαρινικού παραγώγου **11a** σε διαλύτη δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο ($\text{DMSO} - d_6$) και παρατηρούνται τα εξής:

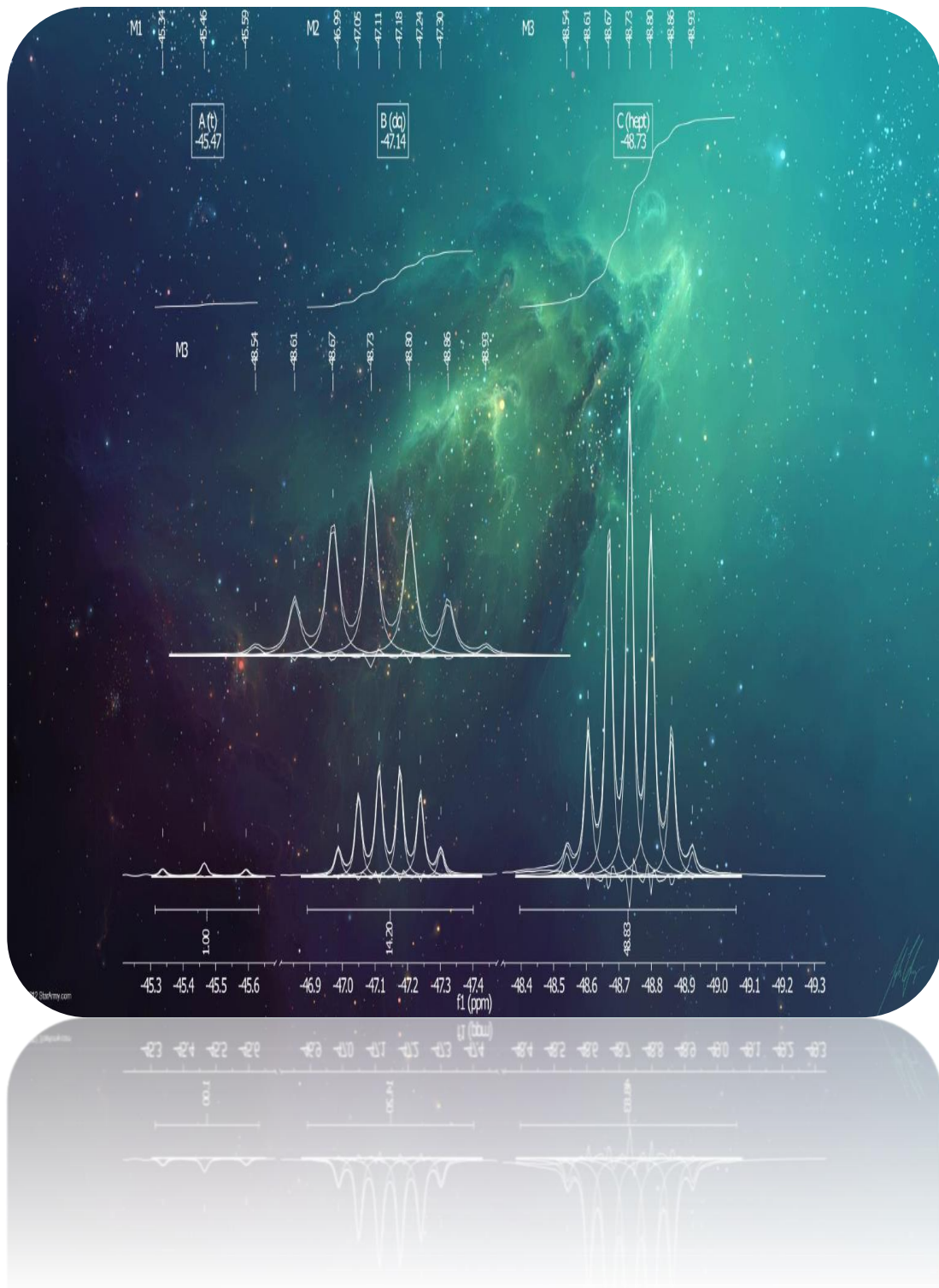
Στα χαμηλά πεδία, 7.83 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνεται για δυο πρωτόνια της θέσης 4 ($J= 9.6\text{Hz}$). Στα 7.44 ppm εμφανίζεται μία διπλή κορυφή για ένα πρωτόνιο της θέσης 5 ($J= 8.4\text{Hz}$). Τα πρωτόνια των θέσεων 6' και 2' δίνουν μια απλή κορυφή στα 7.14ppm και ολοκληρώνονται για δύο πρωτόνια. Στα 6.79 ppm η ανάλυση του φάσματος δίνει μία διπλή διπλών κορυφή που ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο, της θέσης

6 ($J=8.4\text{Hz}$, 8.4Hz) ,ενώ στα 6.70 ppm η ανάλυση δίνει μια διπλή κορυφή που ολοκληρώνετε για ένα πρωτόνιο, της θέσης 8 ($J=2.4\text{Hz}$).

Τέλος χαρακτηριστική επίσης είναι η απλή κορυφή στα 3.39 ppm, που οφείλεται στα πρωτόνια των δύο μεθοξυ ομάδων στην *παρα* και *μετα* θέση του δακτυλίου της θέσης 5' και 3', που ολοκληρώνετε για 6 πρωτόνια.

Μέρος Τέταρτο

Αποτελέσματα- Συζήτηση



5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

5.1 Βιολογικές-Φαρμακοχημικές μελέτες *in vitro*

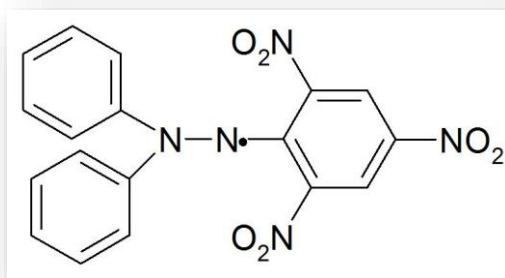
Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής, τα νέα κουμαρινικά παράγωγα που συντέθηκαν, μελετήθηκαν για την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση τους με τη βοήθεια των παρακάτω *in vitro* μεθόδων:

- Αλληλεπίδραση των ενώσεων με την ελεύθερη σταθερή ρίζα του 1,1-διφαινυλοπικρυλυδραζυλίου (DPPH)
- Αναστολή της υπεροξειδωσης του λινελαϊκού οξέος που επάγεται από την ρίζα του AAPH
- Αναστολή του ενζύμου λιποξυγονάση φυτικής προέλευση (από σόγια)

Το σύνολο των βιοδοκιμασιών για την αξιολόγηση της πιθανής φαρμακευτικής δράσης των νέων υβριδικών παραγώγων, πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής, του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, από την Καθηγήτρια Δήμητρα Χατζηπαύλου – Λίτινα.

5.1.1 Προσδιορισμός της αναγωγής της σταθερής ρίζας DPPH

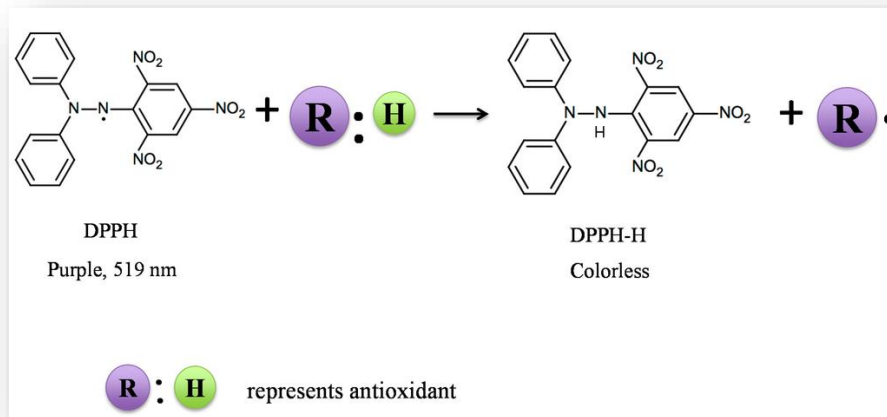
Υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον σε ότι αφορά τα αντιοξειδωτικά, και ιδιαίτερα σε εκείνα που προορίζονται για την πρόληψη των επιβλαβών επιδράσεων των ελεύθερων ριζών στο ανθρώπινο σώμα. Το γεγονός αυτό, έχει οδηγήσει σε μια παράλληλη αύξηση της χρήσης των μεθόδων για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας τέτοιων ουσιών, όπως τα αντιοξειδωτικά. Μία τέτοια μέθοδος που χρησιμοποιείται εκτενώς σήμερα, βασίζεται στη χρήση της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl).



Σχήμα 32. Η δομή του DPPH

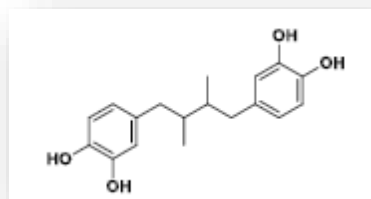
Το μόριο του 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl DPPH, είναι από τις λίγες σταθερές και εμπορικά διαθέσιμες οργανικές ρίζες αζώτου. Ειδικότερα, μπορεί να δεχθεί ένα ηλεκτρόνιο ή μια ρίζα υδρογόνου και να μετατραπεί έτσι σε ένα σταθερό, διαμαγνητικό μόριο. Η ρίζα DPPH δεν αποσυντίθεται και δεν διμερίζεται, δεν αντιδρά με οξυγόνο ενώ είναι ιδιαίτερη χρήσιμη σε περιπτώσεις όπως στην αναστολή αντιδράσεων πολυμερισμού και στον προσδιορισμό αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων αμινών, φαινολών ή άλλων φυσικών ενώσεων (βιταμινών, εκχυλίσματα φυτών, ιατρικών φαρμάκων). Το βαθύ βιολετί χρώμα που παρατηρείται λόγω του μονήρους ηλεκτρονίου που διαθέτει, προκύπτει από την ισχυρή απορρόφηση, σε διάλυμα αιθανόλης, στα 519nm. Όταν το ηλεκτρόνιο συζευχθεί, η απορρόφηση ελαττώνεται στοιχειομετρικά σε σχέση με τον αριθμό των ηλεκτρονίων που προσλαμβάνονται, με αποτέλεσμα την εξασθένηση του πορφυρού χρώματος του διαλύματός του σε ένα ωχροκίτρινο χρώμα. Η μεταβολή αυτή της έντασης απορρόφησης, χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ικανότητας των μορίων να δρουν ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών σε συστήματα που δεν περιέχουν σίδηρο. Σε άλλες περιπτώσεις, η προσθήκη του DPPH μπορεί να δώσει R-DPPH-H-υποκατεστημένα παράγωγα. Κάθε ουσία (αντιοξειδωτικό) που μπορεί να δώσει ένα άτομο υδρογόνου στο διάλυμα του DPPH μπορεί να υποβιβάσει τη σταθερή ελεύθερη ρίζα σε DPPH-H και να αλλάξει το χρώμα του διαλύματος από ιώδες σε υποκίτρινο.^[63,64]

Στο παρακάτω σχήμα φαίνετε ο τρόπος που αντιδρά η ρίζα DPPH με μια αντιοξειδωτική ένωση (RH):



Σχήμα 33. Μηχανισμός αντίδρασης της 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) με αντιοξειδωτική ουσία.

R: H = αντιοξειδωτικό δέσμευσης ριζών, R = αντιοξειδωτική ρίζα.

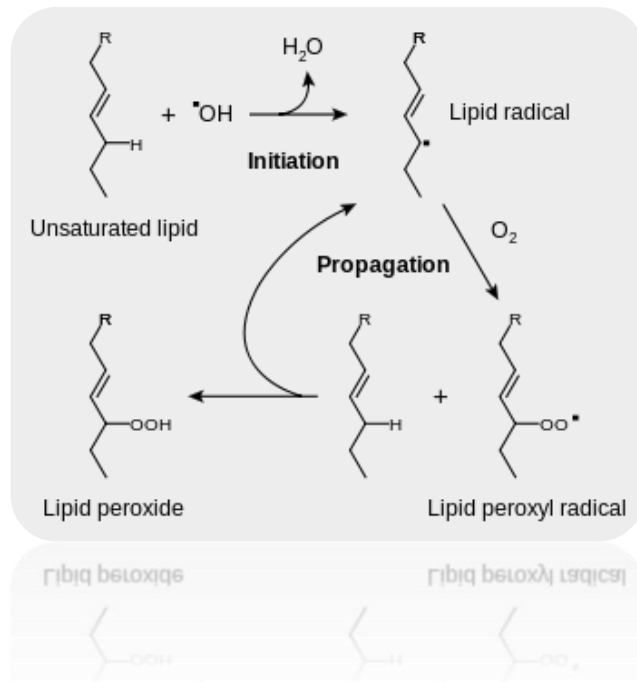


Σχήμα 34. Η χημική δομή του NDGA

5.1.2 Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης

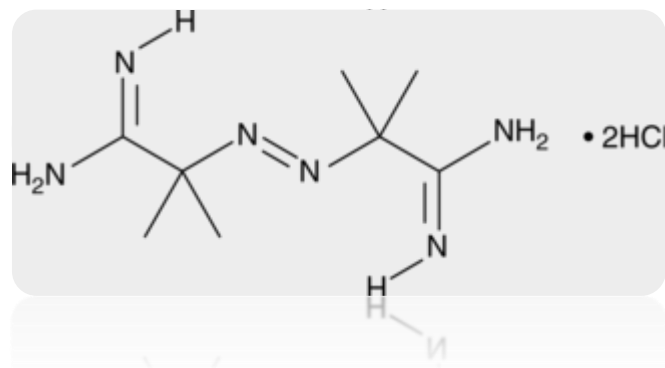
Τα υδροϋπεροξείδια των λιπιδίων θεωρούνται ενδιάμεσα προϊόντα που δεν έχουν τη μορφή ριζών και προκύπτουν κυρίως από τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, τα φωσφολιπίδια, τα γλυκολιπίδια και από την ίδια τη χοληστερόλη.

Ο σχηματισμός τους πραγματοποιείται σε ενζυματικές ή μη αντιδράσεις, που περιλαμβάνουν τις ελεύθερες ρίζες, οι οποίες ευθύνονται σε μεγάλο ποσοστό για τις διάφορες βλάβες των ιστών. Ειδικότερα, η επίδραση των ελεύθερων ριζών επί των λιπιδίων που υπάρχουν στις μεμβράνες των κυττάρων έχει ως συνέπεια τον σχηματισμό υπεροξειδίων.



Σχήμα 35. Μηχανισμός λιπιδικής υπεροξειδωσης

Η ένωση αναφοράς για τη μελέτη της αναστολής της Λιπιδικής Υπεροξειδωσης είναι το διϋδροχλωρικό άλας του 2,2'-διαζω-2-αμιδινοπροπανίου (AAPH).



Σχήμα 36. Εκκινητής ελευθέρων ριζών, 2,2'-διαζω-2-αμιδινοπροπανίου (AAPH).

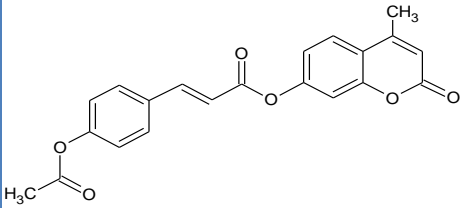
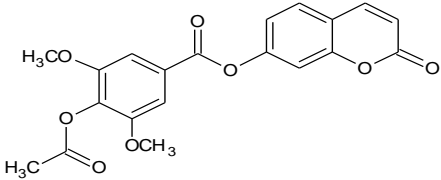
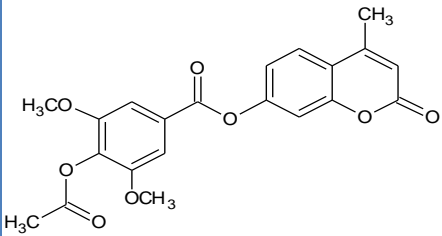
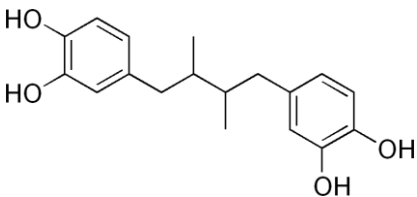
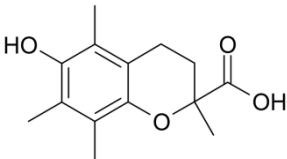
Το 2,2 αζοδισ-(2-αμιδινοπροπανο)υδροχλωρίδιο (AAPH) είναι ένας 'εκκινητής ελευθέρων ριζών' (Σχήμα 36) που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες στο διάλυμα οι οποίες προκαλούν την οξείδωση του λινελαϊκού οξέος. Η μέθοδος μέτρησης της αντιοξειδωτικής

δράσης με AAPH είναι μία γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος που χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης πρώτων υλών βοτάνων και μύρας.

Βασίζεται στην αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης του λινελαϊκού οξέος, και είναι ένα μέτρο του πόσο αποδοτικά τα αντιοξειδωτικά προστατεύουν ενάντια στην λιπιδική υπεροξειδωση *in vitro*. Η οξείδωση του εξωγενούς λινελαϊκού οξέος από ένα θερμικό παραγωγό ελευθέρων ριζών (AAPH) ακολουθείται από φασματοσκοπία UV σε πολύ διαλυτοποιημένο δείγμα. [\[65,66\]](#)

Αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης των κουμαρινικών αναλόγων 9, 11, 12.

Πίνακας 26. Αντιοξειδωτική δράση των νέων κουμαρινικών παραγώγων 9-11-12

Παράγωγο-Δομή	% αλληλεπίδραση με την ελεύθερη ρίζα DPPH (0.1mM)		% αναστολή της υπεροξειδωσης του λιπελαϊκού οξέος (AAPH) (0.1mM)
	20 min	60 min	
<p>9</p> 	3.5	26.4	72.0
<p>11</p> 	52.5	16.7	88.9
<p>12</p> 	39.9	16.3	96.4
<p>NDGA</p> 	83	97	-
<p>Trolox</p> 	-	-	76

Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των εξεταζόμενων ενώσεων, μετά από την αλληλεπίδραση τους με την ελεύθερη σταθερή ρίζα (DPPH)

Οι παραπάνω νέες ενώσεις μελετήθηκαν ως προς τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης με την ελεύθερη ρίζα του DPPH σε συγκέντρωση 0.1 mM σε δύο διαφορετικούς χρόνους (20 min και 60 min), ενώ η αξιολόγηση των υπόλοιπων ενώσεων βρίσκεται υπο εξέλιξη.

Παρατηρούμε ότι και τα τρία παράγωγα παρουσιάζουν μέτρια αλληλεπίδραση με την ελεύθερη σταθερή ρίζα DPPH. Ως ένα βαθμό αυτό είναι αναμενόμενο, δεδομένου ότι η συγκεκριμένη δοκιμασία απαιτεί την παρουσία φαινολικών υδροξυλίων, τα υδρογόνα των οποίων είναι ευκίνητα και μπορούν να αντιδράσουν με την ελεύθερη ρίζα DPPH, σύμφωνα με την αντίδραση:



Για τον λόγο αυτό περιμένουμε τα αντίστοιχα απακετυλιωμένα κουμαρινικά παράγωγα να παρουσιάσουν πολύ πιο αξιόλογα αποτελέσματα σε ότι αφορά την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω της αλληλεπίδρασης τους με την ελεύθερη ρίζα DPPH.

Την καλύτερη ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH μεταξύ των μορίων που ελέγχθηκαν παρουσιάζει ο εστέρας του ακετυλο-συριγγικού οξέος **11** (52.5%) ενώ το ανάλογο **12** που περιέχει μεθύλιο στη θέση 4 του κουμαρινικού δακτυλίου εμφανίζει μειωμένη δράση (39.9%). Ο εστέρας του ακετυλοξυ-κινναμικού οξέος **9** δεν εμφανίζει δράση σε αυτή τη δοκιμασία.

Εκτίμηση της ικανότητας των ενώσεων να αναστέλλουν την υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος. Μέθοδος AAPH

Τα νέα παράγωγα αξιολογήθηκαν επίσης για την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση, την οξειδωτική δηλαδή δράση των ελευθέρων ριζών στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που αποτελούν τα βασικά δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών.

Τα συνθετικά κουμαρινικά ανάλογα **11** και **12** παρουσίασαν αξιόλογα ποσοστά

αναστολής (88.9 και 96.4% αντίστοιχα), σε συγκέντρωση 0.1mM, σαφώς ικανοποιητικότερα από την ένωση αναφοράς trolox (76% σε συγκέντρωση 0.1mM). Το κουμαρινικό ανάλογο **9** παρουσιάζει επίσης καλό ποσοστό αναστολής της τάξεως του 72.0%, συγκρίσιμο με το 76% της ένωσης αναφοράς.

Μεταξύ των κουμαρινικών αναλόγων, η βέλτιστη δράση παρατηρήθηκε από την ένωση **12** (96.4 % αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης). Δομικό χαρακτηριστικό της ένωσης αυτής είναι η παρουσία μεθυλο-ομάδας στη θέση 4- , η οποία φαίνεται να ενισχύει για τη δράση του παραγώγου έναντι της λιπιδικής υπεροξειδωσης.

5.1.3 Αντιφλεγμονώδης Δράση των ενώσεων - Προσδιορισμός της ικανότητας αναστολής της δράσης του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια

Οι λιποξυγονάσες (LOX) είναι ένζυμα που περιέχουν σίδηρο και διανέμονται ευρέως στα φυτά και τα ζώα. Καταλύουν την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων όπως το λινελαϊκό οξύ (στα φυτά) και το αραχιδονικό οξύ (στα θηλαστικά) σε συγκεκριμένες θέσεις για τα υδροϋπεροξείδια. Οι λιποξυγονάσες παρουσιάζουν ενδιαφέρον λόγω της επίπτωσης του ενζύμου σε διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις.

Στους ανθρώπους η λιποξυγονάση παίζει ένα ρόλο κλειδί στη βιοσύνθεση των λευκοτριενίων, των προφλεγμονωδών μεσολαβητών που απελευθερώνονται κυρίως από τα μυελοειδή κύτταρα. Έτσι οι αναστολείς της λιποξυγονάσης έχουν προσελκύσει τη προσοχή, αρχικά ως παράγοντες για την θεραπεία των φλεγμονών και των αλλεργικών ασθενειών. Πλέον όμως το θεραπευτικό δυναμικό τους έχει επεκταθεί και σε ορισμένους τύπους καρκίνου, αλλά και σε διάφορες καρδιαγγειακές παθήσεις.^[65]

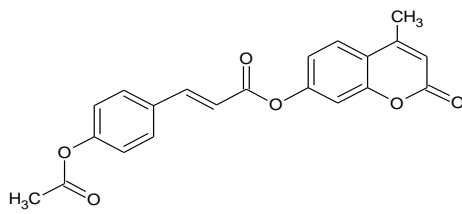
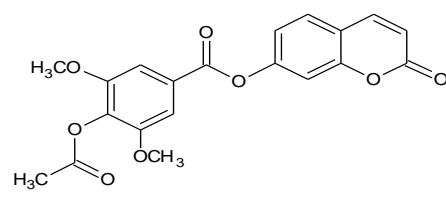
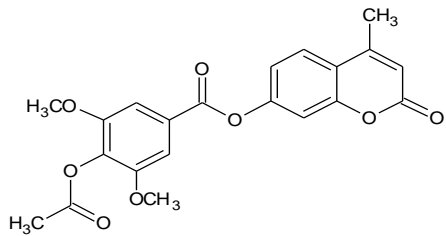
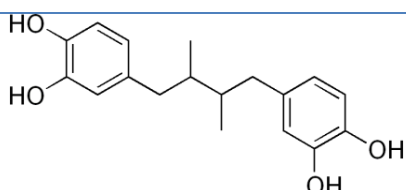
Η πλειοψηφία των αναστολέων LOX είναι αντιοξειδωτικά ή καθαριστές ελεύθερων ριζών, με τις ενώσεις αυτές να μπορούν να αναστείλουν το σχηματισμό της ελεύθερης ρίζας ή να την παγιδεύσουν άμεσα κατά το σχηματισμό της.

Ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας της λιποξυγονάσης NDGA (Nordihydroguaiaretic acid).

Αξιολόγηση της ικανότητας αναστολής της δράσης του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια

Πίνακας 27 . Ικανότητα νέων μορίων να αναστέλλουν τη φυτική λιποξυγονάση (soybean LOX) 11-9-

12

Παράγωγο	Δομή	Ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης από σόγια IC50 μM
9		100
11		87.5
12		70
NDGA		0.55

Εκτίμηση της ικανότητας των ενώσεων να αναστέλλουν το ένζυμο λιποξυγονάση από σόγια

Μελετήθηκε η αναστολή της λιποξυγονάσης φυτικής προέλευσης και προσδιορίστηκαν οι τιμές IC₅₀ και των τριών ενώσεων.

Τα μόρια στο σύνολο τους παρουσιάζουν αξιόλογη αντιφλεγμονώδη δράση. Όπως παρατηρείται τη μεγαλύτερη παρεμποδιστική ικανότητα, παρουσιάζει το κουμαρινικό ανάλογο **12**.

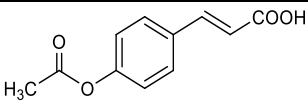
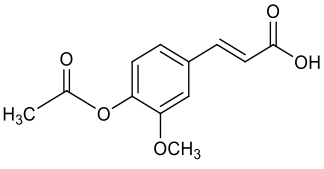
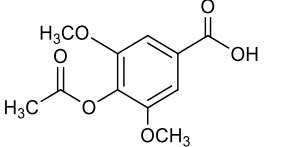
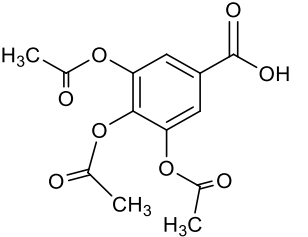
5.2 Συμπεράσματα – Συζήτηση

Στις προηγούμενες παραγράφους παρουσιάστηκε αναλυτικά η σχεδιαστική πορεία που ακολουθήθηκε για την σύνθεση και των χαρακτηρισμό οκτώ υβριδικών μορίων, με τον συνδιασμένο δομικό σκελετό των κουμαρινικών ενώσεων 7-υδροξυκουμαρίνη(**1**)/4-μεθυλο 7-υδροξυκουμαρίνη(**2**) και μιας σειράς από τα πιο διαδεδομένα φυσικά φαινολικά οξέα, του p-κουμαρικού, φερουλικού, συριγγικού και γαλλικού οξέος, ενώ στη συνέχεια, μελετήθηκε η πιθανή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράση τριών εκ των κουμαρινικών παραγώγων, με τη μελέτη των υπολοίπων να βρίσκετε ακόμα υπο εξέλιξη.

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την παρούσα εργασία.

1. Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε η **ακετυλίωση** των φαινολικών οξέων που επιλέχθησαν, μέσω **αντιδράσεως ακετυλίωσης**, με επιλογή του οξικού ανυδρίτη ως κατάλληλου ακυλιωτικού μέσου και την πυριδίνη ως βασικό καταλύτη για την σύνθεση του επιθυμητού παραγώγου καρβοξυλικού οξέος. Κατά αυτόν τον τρόπο βελτιώσαμε την σταθερότητα των φαινολικών οξέων, προστατεύοντας τις ασταθείς ομάδες υδροξυλίου, ενώ παράλληλα αυξήσαμε την μεταβλητότητα τους μειώνοντας την πολικότητα των υδροξυ ομάδων. Οι αποδόσεις που εκτιμήθηκαν για την συγκεκριμένη συνθετική πορεία ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητικές με ένα εύρος απόδοσης 81.91% έως και 100%. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 28. Παρουσίαση των ακετυλο φαινολικών οξέων που παρήχθησαν.

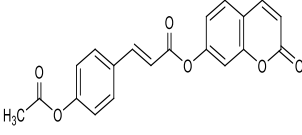
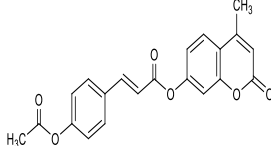
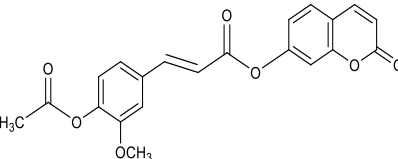
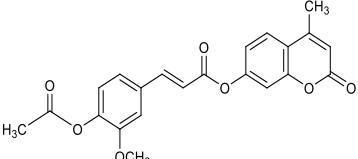
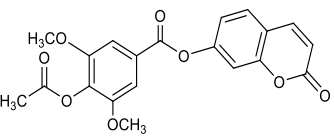
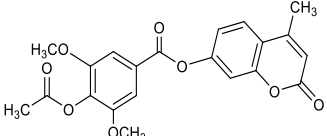
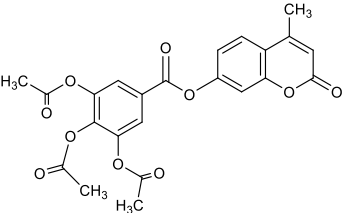
Δομή	Προϊόν	Απόδοση
	3a	83%
	4a	95%
	5a	82%
	6a	100%

Στη συνέχεια επιλέχθηκε η συνθετική πορεία **χλωρίωσης** των ακετυλιωμένων φαινολοξικών οξέων **3a-6a**. Τα ακετυλιωμένα φαινολικά οξέα είναι σχετικά αδρανή αντιδραστήρια, καθιστώντας έτσι αναγκαία την ενεργοποίηση του εκάστοτε οξέος που χρησιμοποιήθηκε. Η συνθετική αυτή πορεία μέσω των ακυλοχλωριδίων αποτελεί την ευρέως χρησιμοποιούμενη πορεία που ακολουθείται σε αντίστοιχες περιπτώσεις. Αυτή η μεθοδολογία στηρίζεται στο ότι οι καλές αποχωρούσες ομάδες είναι ασθενείς βάσεις. Επομένως το ιόν υδροξειδίου των φαινολικών οξέων, όντας δυνατή βάση, τείνει να αποτελεί δύσκολη αποχωρούσα ομάδα. Η μετατροπή της σε αυτό που ονομάζουμε good leaving group διευκολύνεται μέσω των αντιδράσεων χλωρίωσης, παρουσία, θειονυλοχλωριδίου που μετατρέπει τα καρβοξυλικά οξέα σε χλωρίδια οξέος («ακυλοχλωρίδια»). Αυτή είναι μια ιδιαίτερα χρήσιμη αντίδραση, καθώς τα προκύπτοντα ακυλοχλωρίδια αποτελούν ευέλικτες ενώσεις και μπορούν να μετατραπούν σε πολλές περαιτέρω νέες, που δεν είναι άμεσα προσβάσιμες από το ίδιο το ακετυλο φαινολικό οξύ. Η μετατροπή του OH σε Cl επιλύει αυτό το πρόβλημα. Οι αποδόσεις που εκτιμήθηκαν για την συγκεκριμένη συνθετική πορεία αγγίζουν όλες το 100%, με μεγαλύτερο προβλημα να αποτελεί μόνον η μετέπειτα διαχείριση των προϊόντων χλωρίωσης, καθότι αποτελούν

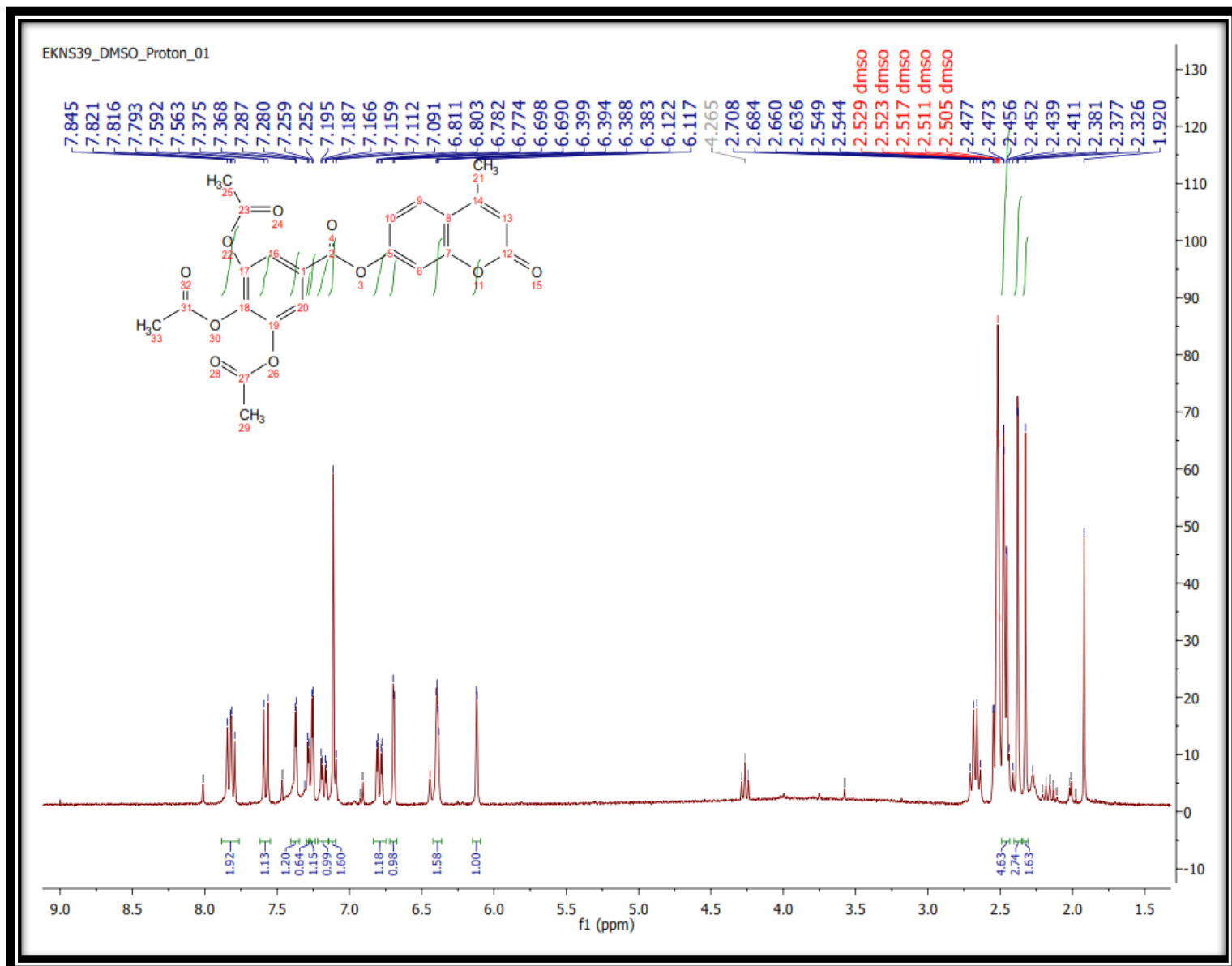
ιδιαίτερα ασταθείς ενώσεις που μπορούν εύκολα να υδρολυθούν είτε σε βασικές είτε σε όξινες συνθήκες. Για το λόγω αυτό χρησιμοποιήθηκαν άμεσα χωρίς καθαρισμό ή κάποια άλλη επεξεργασία στα περαιτέρω στάδια σύνθεσης.

2. Η βελτιστοποίηση της βιοδραστικότητας των ενώσεων, συνεπάγεται συχνά την τροποποίηση, την αφαίρεση ή την εισαγωγή λειτουργικών ομάδων ακόμη και την αναδιαμόρφωση του δομικού σκελετού με σκοπό την βελτίωση των φυσικοχημικών και των φαρμακευτικών ιδιοτήτων της ένωσης. Προκειμένου λοιπόν να μελετηθεί η σχέση δομής-βιολογικής δράσης, παρασκευάστηκαν υβριδικά μόρια συνδυάζοντας το δομικό σκελετό των κουμαρινικών ενώσεων 7-υδροξικουμαρίνη(**1**)/4-μεθυλο 7-υδροξικουμαρίνη(**2**) και των χλωριωμένων ακετυλο φαινολικών οξέων **3b-6b**, παρουσία τριεθυλαμίνης και τετραϋδροφουρανίου. Όπως έχει ήδη αναφερθεί το ακυλοχλωρίδιο είναι ένα ιδιαίτερα δραστικό αντιδραστήριο. Στον μηχανισμό αυτόν, επομένως, η χρήση μιας βάσης και συγκεκριμένα της τριεθυλαμίνης, είναι επιθυμητή για την απομάκρυνση του παραπροϊόντος του υδροχλωρίου, κατά την κατάλυση της αντίδρασης προς την παραγωγή των εστερικών προϊόντων **7,8,11** και **9,10,12,13**. Τέτοιες αντιδράσεις οδηγούν στη δημιουργία υδροχλωρίου, το οποίο συνδυαζόμενο με την τριεθυλαμίνη σχηματίζει άλας τριμεθυλοχλωριδίου, γνωστό ως χλωριούχο τριαεθυλαμμώνιο. Κατά αυτόν τον τρόπο δεσμεύεται το υδροχλωρίδιο από το μίγμα που αντιδρά, το οποίο απαιτείται για την ολοκλήρωση αυτών των αντιδράσεων. Και οι δύο σειρές των προϊόντων που παρήχθησαν, έδωσαν πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα αποδόσεων, οστόσο συγκριτικά, τις καλύτερες αποδόσεις παρουσίασαν τα υβριδικά μόρια με τον συνδιασμένο δομικό σκελετό, 7-υδροξικουμαρίνης-φαινολικών οξέων, από ότι η σειρά της 4 μεθυλο- 7-υδροξικουμαρίνης συνδιασμένη με την ίδια αντιστοιχία των φαινολικών οξέων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 29. Παρουσίαση των εστέρων των φαινολικών οξέων με την 7-υδροξυ κουμαρίνη και την 4-μεθυλο 7-υδροξυ κουμαρίνη, που παρήχθησαν.

Δομή		Προϊόν		Απόδοση	
		7	9	98%	88%
		8	10	100%	46%
		11	12	88%	86%
		13		85%	

Η ταυτοποίηση των νέων προϊόντων που συντέθηκαν εξετάστηκαν με την μέθοδο της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), δίνοντας ικανοποιητικά φάσματα ως προς την καθαρότητα των προϊόντων. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί το κουμαρινικό παράγωγο **13**, η εικόνα φάσματος του οποίου δείχνει μίγμα προϊόντων και επομένως αναμένετε να υποστεί περαιτέρω επεξεργασία καθαρισμού. Πιο συγκεκριμένα παρατηρούμε ότι στην περιοχή των αρωματικών πρωτονίων, εκτός από τα πρωτόνια της ένωσης υπάρχουν πρωτόνια τα οποία αποδίδονται σε αντιδρων που δεν αντέδρασε πλήρως. Παρακάτω παρατίθενται το προκείμενο χαρακτηριστικό φάσμα:



Εικόνα 7 : Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (DMSO, 300MHz) της κουμαρίνης 13

3. Για την περαιτέρω διερεύνηση του τρόπου που επηρεάζει η δομή την βιολογική δράση, πραγματοποιήθηκε τροποποίηση του κουμαρινικού παραγώγου **11**, κατόπιν αντιδράσεως αποπροστασίας, παρουσία άνυδρης υδραζίνης και διαλύτη μεθανόλης, με αποτέλεσμα ένα νέο παράγωγο (**11a**). Η αντίδραση αποπροστασίας επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί με σκοπό να διερευνηθεί η επίδραση του υδροξυλικού συστήματος, στην αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση των μορίων έναντι των αρχικών ακετυλιωμένων παραγώγων. Παρόλο που η απόδοση

της αντίδρασης δεν ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητική (52%), αναμένονται ελπιδοφόρα αποτελέσματα στις *in vitro* βιοδοκιμασίες για την αξιολόγηση της πιθανής φαρμακευτικής δράσης του νέου υβριδικού παραγώγου.

4. Σε ότι αφορά τις *in vitro* βιοδοκιμασίες για την αξιολόγηση της πιθανής φαρμακευτικής δράσης των νέων υβριδικών παραγώγων, τα μέχρι τώρα αποτελέσματα είναι πολύ ικανοποιητικά με το παράγωγο 11 να αποτελεί την πιο ελπιδοφόρο ένωση, συνδιάζοντας πολύ καλά αποτελέσματα και στις τρεις *in vitro* δοκιμασίες, όπως αυτές αναφέρονται αναλυτικά στο παραπάνω κεφάλαιο.

5.3 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν μέσω αυτής της ερευνητικής εργασίας ανοίγονται ορίζοντες για την έρευνα στο κομμάτι της σύνθεσης ανάλογων κουμαρινικών παραγώγων και επιπλέον δομικών τροποποιήσεων των νέων ενώσεων. Τα αποτελέσματα των βιολογικών βιοδοκιμασιών των νέων ενώσεων είναι ενθαρρυντικά και μας οδηγούν στην περαιτέρω μελλοντική μελέτη της σχέσης δομής-δράσης των μορίων.

Μία πρώτη προσέγγιση για μελλοντική σύνθεση νέων αντίστοιχων κουμαρινικών αναλόγων, αφορά στη σύνθεση υβριδικών μορίων με χρήση διαφορετικών φαινολικών οξέων, με αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση.

Η σύνθεση υβριδικών μορίων που συνδυάζουν σε ένα μόριο, δύο ή περισσότερες φαρμακοφόρες δομικές μονάδες αποτελεί μια κοινώς αποδεκτή προσέγγιση στη φαρμακευτική χημεία. Ως εκ τούτου, θα μπορούσε να διερευνηθεί περαιτέρω η δυνατότητα σύνθεσης κουμαρινικών αναλόγων με διαφορετικούς υποκαταστάτες προς τον σχηματισμό μίας υβριδικής σκελετικής διάταξης νέων κουμαρινο-φαινολικών οξέων, που θα μπορούσαν να μας οδηγήσουν σε χρήσιμα συμπεράσματα ως προς την πιθανή δραστηριότητα των νέων ενώσεων.

Μια συνήθης προσέγγιση για τη διαφοροποίηση της φυσικοχημικής συμπεριφοράς φαρμακευτικών μορίων *in vivo*, αποτελεί ο εγκλεισμός των ενώσεων σε μόρια μεγάλου μοριακού βάρους. Οι τεχνικές νανοεγκλεισμού βιοδραστικών μορίων έχουν ευρύ φάσμα δυνατοτήτων, καθώς βοηθούν στη στοχευμένη και ελεγχόμενη χορήγηση φαρμάκων, καθώς και στην προστασία ασταθών ενώσεων. Μελλοντικά, θα μπορούσε να μελετηθεί η

δυνατότητα εγκλεισμού των κουμαρινικών μορίων σε νανοσωματίδια βιοδιασπώμενων πολυμερών (PLA,PLGA), με σκοπό την αύξηση της διαλυτότητας των ενώσεων *in vivo* και τη μείωση της κυτταροτοξικότητάς τους, χωρίς βέβαια την παράλληλη μείωση της δραστικότητάς τους.

Τέλος, ο έλεγχος της κυτταροτοξικότητας των κουμαρινικών παραγώγων που συντέθηκαν, θα συμβάλλει στην ολοκλήρωση του φαρμακολογικού προφίλ των νέων ενώσεων.

Μέρος Πέμπτο -Βιβλιογραφία

1. Constantine D. Stalikas, "Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids", *J. Sep. Sci.* **2007**, 30, 3268 – 3295
2. Claudine Manach, Augustine Scalber, Christine Morand, Christian Remesy and Liliana Jimenez, "Polyphenols: food sources and bioavailability", *American Journal of Clinical Nutrition*, **2004**
3. Keating GJ, Kennedy R. In "the chemistry and occurrence of coumarins", England, **1997**, 23-64
4. Dziedzic, S.Z., Hudson, B.J.F, "Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils", *Food Chem.*, **1984**, 14, 45-51
5. Cuvelier, M.E Richard, H. Berset C, "Comparison of the activity of some acid phenols, Structure-activity relationship", *Biosci. Biotech. Biochem*, **1992**, 56, 324-325
6. Marinova, E.M., Yanishlieva, N.V., "Inhibited oxidation of lipids II. Comparison of the antioxidative properties of some hydroxy derivatives of benzoic and cinnamic acids.", *Fat. Sci. Technol*, **1992**, 94, 428-432
7. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga G, "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoid and phenolic acids", *Free Rad. Biol. Med*, **1996**, 20, 933-956
8. Natella, F, Nardini, M, De Felice, M. Scaccini C, "Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants, Structure-activity relation.", *J. Agric Food Chem.*, **1999**, 47, 1453-1459.
9. Gomes, C. A., Girao de Cruz, T., Andrade, J.L., Milhazes, N., Borges F., Marques, M. P.M. "Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin, a structure-activity study", *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 5395-5401
10. Fiuza, S. M., Gomes, C. Teixeira, L. J., Girao da Cruz, M. T., Cordeiro, M. N. D. S., Milhazes, N., Borges, F., Marques, M. P. M., "Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties- a structure-activity relationship study. Part 1, Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids.", *Bioorg. Med. Chem*, **2004**, 12, 3581-3589.
11. Etzenhouser, B., Hansch, C., Kapur, S., Selassie, C.D. "Mechanism of toxicity of esters of caffeic and dihydrocaffeic acids." *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 199-209
12. Harborne, J.B. "Plant phenolics. In Methods in plant biochemistry.", Dey, P.M., Harborne, J.B., (Eds), Academic Press, London, **1989**, 1, 127
13. Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. "Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits *Food Chem.* **1999**, 66, 401-436
14. Manach, C., Scalbert, A., Morand, A., Rémésy, A., Jimenez, L. "Polyphenols, food sources and bioavailability.", *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, 79, 727- 747.
15. Tomas-Barberan, F.A., Clifford, M.N., "Dietary hydroxybenzoic acid derivatives-nature, occurrence and dietary burden", *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 1024-1032
16. Fernanda Borges, Fernanda M F Roleira, Luana Santana, Eugenio Uriarte, "Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry : Occurrence, Synthesis and Biological Activity", Article in current medicinal chemistry, February, **2005**
17. Aoife Lacy, Richard O' Kennedy, "Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to

Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer”, *Current Pharmaceutical Design*, **2004**

18. K. N. Venugopala, V. Rashmi, B. Odhav, “Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity”, *Biomed Res Int*, Published online **2013** Mar 24
19. J. R. S Hoult and Miguel Payat, “Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential”, *Gen. Pharmac.*, **1996**, 27, 713-722
20. R. O’ Kennedy, R. Douglas Thornes, “Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action”, John Wiley and Sons, **1997**, ISBN 0-471-96997-4
21. Ivanova Ivelina, “Studies on the synthesis of biologically active coumarin oximes and derivatives”, Master thesis, June **2015**
22. Hirsh, J. And Weitz, J. I., *Lancet.*,(1999) 353, 1431.
23. Ten Berg, J. M., Kedler, J. C., Plokker, T. H., Van Hout, B. A., “*Pharmacoeconomics*”,(2002)20(12), 847.
24. Ridker, P. M., Goldhaber, S. Z. et. al., *N. Engl. J. Med.*, (2003) 348(15), 1425.
25. Gebauer, M., “Synthesis and structure-activity relationships of novel warfarin derivatives”, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 2414-2420
26. Byron E. Leach, Kenneth M. Calhoun, LeRoy E. Johnson, Charlotte M. Teeters, William G. Jackson, “Chartreusin, a New Antibiotic Produced by *Streptomyces chartreusis*, a New Species”, August **1953**
27. Zhu HL, Wan JB, Wang YT, Li BC, Xiang C, He J, Li P, “Medicinal compounds with antiepileptic/anticonvulsant activities”, **2014** Jan;55(1):3-16
28. a) Bajerovala, P., Adam, M., Bajer, T., and Ventura, K. “Comparison of various techniques for the extraction and determination of antioxidants in plants”. *J. Sep. Sci.*,(2014) ,37, 835-844. b) Hamdi, N. Fischmeister, C. Puerta, M.C. Valerga, P. “A rapid access to new coumarinyl chalcone and substituted chromen [4,3-c] pyrazol-4(1H)-ones and their antibacterial and DPPH radical scavenging activities”, *Med. Chem. Res.* ,**2011**, 20, 522–530
29. a) Hoult, J. R. S. Paya, M. *Gen. Pharmac.* **1996**, 27, 713. b) Craven, P. A.; Pfanstiel, J.; De Rubertis, F. R. *J. Clin. Invest.* **1986**, 77, 850. c) Mor, A. Maillard, J.Favreau, C. Reboud-Ravaux, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1038, 119.
30. a) Doucet, C. Pochet, L. Thierry, N. Pirotte, B. Delarge, J.Reboud-Ravaux, M. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 4161. b) Nicolaides, D. N. Fylaktakidou, K. C. Litinas, K. E. Hadjipavlou-Litina, D. *J. Heterocycl. Chem.* **1996**, 33, 967.
31. Pittella, F. Dutra, R. C Junior, D. Lopes, M. T. P. Barbosa, N. A. , “Antioxidant and Cytotoxic Activities of *Centella asiatica*”, *Urb. Int. J. Mol. Sci.* **2009**, 10, 3713- 3721.
32. J. A. Joule, G. F. Smith “*Heterocyclic Chemistry*”, 2nd edition (**1978**)
33. R. C. Shriner, A. G. Sharp *J, Org, Chem.*, 4, 575 (**1939**).
34. a) Upadhyay, K. Bavishi, A. Thakrar, S. Radadiya, A. Vala, H. Parekh, S. Bhavsar, D. Savant, M. Parmar, M. Adlakha, P., “Synthesis and biological evaluation of 4-styrylcoumarin derivatives as inhibitors of TNF- α and IL-6 with anti-tubercular activity”. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21,

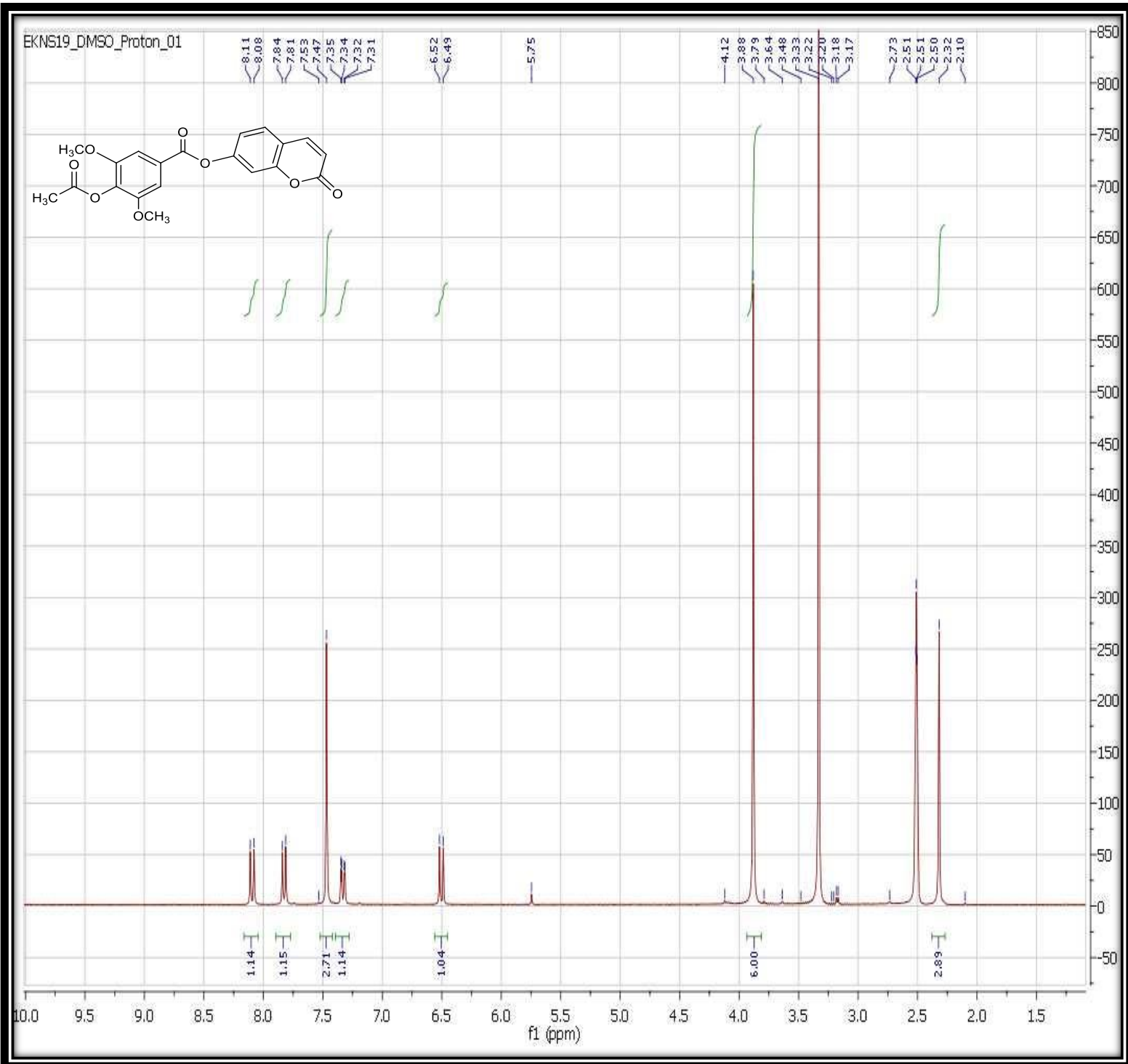
- 2547–2549. b) C. C. Chiang, M. J. Cheng, C. F. Peng, H. Y. Huang, and I. S. Chen, "A novel dimeric coumarin analog and antimycobacterial constituents from *Fatoua pilosa*," *Chemistry and Biodiversity*, **2010**, vol. 7, no. 7, pp. 1728–1736
35. Zabradnic M., "The production and application of fluorescent brightening agents", John Wiley and Sons, New York, **1992**
 36. M.C Laufer, H. Hausmann and W.F. Holderich, "Synthesis of 7-hydroxycoumarins by Pechmann reaction using Nafion resin/silica nanocomposites as catalysts", *Journal of catalysis*, **2003**, 218, 315-320
 37. W. H. Perkin, "On the Formation of Coumarin and Cinnamic Acid and of Other Analogous Acids from Aromatic Aldehydes", *J. Chem. Soc.*, **1877**, 31, 388-427.
 38. Majumder PL and Suman M , "Further Evidence for the Mechanism of Formation of Coumarin by Perkin Reaction from salicylaldehyde. *J. Chem. Soc.*, (**2007**), 21: 181.
 39. a) Jones, G. *The Knoevenagel Condensation Reaction in Organic Reactions*; John Wiley: New York, NY, USA, **1967**; Volume 15, pp. 204–599. b) Shanmuganathan, S.; Greiner, L.; María, P. D. *Tetrahedron Lett.* 2010, 51 6670. c) Valizadeh, H.; Gholipour, H. *Synth. Commun.*2010, 40(1), 1477. d) Adib, M.; Sheikhi, E.; Kavooosi, A.; Bijanzadeh, H. R. *Tetrahedron* **2010**, 66, 9263.
 40. Pechmann, H.; Duisberg, C. Novel synthesis of coumarins. *Chem. Ber.* **1884**, 17, 929-936.
 41. Shriner, R.L. Reformatsky Reaction. In *Organic Reactions*; John Wiley & Sons: New York, NY, USA, **1942**; Volume 1, pp. 1–37.
 42. Yavari, I.; Hekmat-Shoar, R.; Zonousi, A., "A new and efficient route to 4 carboxymethylcoumarins mediated by vinyltriphenylphosphonium salt. *Tetrahedron*", *Lett.* **1998**, 39, 2391–2392.
 43. S. R. Ghantwal, S. D. Samant, *Ind. J. chem.* **1999**, 38(B): 1242-1247.
 44. Wu, B.; Hua, R. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51 (49), 6433.
 45. a) Amoozadeh, A.; Ahmadzadeh, M.; Kolvari, E. , "Easy access to coumarin derivatives using alumina sulfuric acid as an efficient and reusable catalyst under solvent-free conditions", *J. Chem.* **2013**. b) Sangshettia, J.N.; Nagnnath, D.; Kokarea, B.; Shinde, D.B., "Water mediated efficient one-pot synthesis of bis-(4-hydroxycoumarin) methanes.", *Green Chem. Lett. Rev.* **2009**, 2, 233–235.
 46. a) Karimi-Jaberi, Z.; Nazarifar, M.R.; Pooladian, B., "Tris(hydrogensulfato) boron as a solid heterogeneous catalyst for the rapid synthesis of α,α' -benzylidene bis (4-hydroxycoumarin) derivatives". *Chin. Chem. Lett.* **2012**, 23, 781–784. b) Mehrabi, H.; Abusaidi, H , "Synthesis of biscoumarin and 3,4-dihydropyrano[c] chromene derivatives catalysed by sodium dodecyl sulfate (SDS) in neat water". *J. Iran. Chem. Soc.* **2010**, 7, 890–894.
 47. Cravotto, G.; Nano, G.M.; Palmisano, G.; Tagliapietra, S. "The reactivity of 4-hydroxycoumarin under heterogeneous high-intensity sonochemical conditions. *Synthesis* ", **2003**, 8, 1286–1291.
 48. Bansal, K.M.; Mothsra, P.; Saxen, S.; Somvanshi, R.K.; Dey, S.; Singh, T.P. "Molecular iodine: A versatile catalyst for the synthesis of bis(4-hydroxycoumarin) methanes in water". *J. Mol. Catal.*

- A: Chem. **2007**, 268, 76–81.
49. a) Mohareb, R.M.; El-Omran, F.A.; Ho, J.Z. *Heteroatom Chem.*, 2001, 12, 168. b) Zakehi, A.; Ito, S.; Suga, H.; Yasuraoka, K. *Heterocycles*, **2001**, 54, 185. c) Madhavan, G.R.; Balraju, V.; Mallesham, B.; Chakrabarti, R.; Lohray, V.B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 2547.
 50. Khilya, O.V.; Frasinuk, M.S.; Turov, A.V.; Khilya, V.P. *Chem.*, "Heterocyclic Compounds", **2001**, 37, 1029.
 51. Saha, N.N.; Desai, V.N.; Dhavale, D.D. *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 1715.
 52. a) Smitha, G.; Reddy, C. S. *Synth. Commun.* **2004**, 34, 3997. b) Jie, W.; Tianning, D.; Wei, S.; Yizhe, L. *Synth. Commun.* **2006**, 39(20), 2949.
 53. Jiao, C.-X.; Niu, C.-G.; Chen, L.-X.; Shen, G.-L.; Yu, R.-Q. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2003**, 376, 392.
 54. a) Li, T. S.; Zhang, Z. H.; Yang, F.; Fu, C. G. *J. Chem. Res. Synop.* **1998**, 38. b) John, E. V. O.; Israelstam, S. S. *J. Org. Chem.* 1961, 26, 240. c) Amit, K. C.; Bhushan, K. M. *Synlett* **2002**, 152.
 55. Maheswara, M.; Siddaiah, V.; Damu, G.L.V.; Rao, Y.K.; Rao, C.V. *J. Mol. Cat. A: Chem.* **2006**, 255 (1-2), 49.
 56. Jian-long Du, Li-Jun Li and Da-Hai Zhang, *E-Journal of Chemistry*, **2006**,3,10,1-4.
 57. S. Sudha, K. Venkatachalam, S. Vishnu Priya, *IJPS*, **2008**,155-158.
 58. Dittmer, D. C.; Li, Q.; Avilov, D. V. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 4682.
 59. Nicolaidis, D.N.; Fylaktakidou, K.C.; Bezergiannidou- Balouktsi, C.; Litinas, K.E. *J. Heterocyclic Chem.*, **1994**, 31, 173.
 60. Takeuchi, Y.; Ueda, N.; Uesugi, K.; Abe, H.; Nishioka, H.; Harayama, T. *Heterocycles*, 2003, 59, 217.
 61. Mali, R.S.; Massey, A.P. *Indian J. Chem.*, **1995**, 34B, 686.
 62. Dolly; Batanero, B.; Barba, F. *Tetrahedron*, **2003**, 59, 9161.
 63. M. S. Blois, 'Antioxidant determinations by the use of a stable free radical', *Nature*, **1958**, 181, 1199-1200
 64. Philip Molyneux, 'The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity', *Songklanakar J. Sci. Technol.*, **2004**, 26(2) : 211-219
 65. Anastasia Detsi, Maya Majdalani, Christos A. Kontogiorgis, Dimitra Hadjipavlou-Litina, Panagiotis Kefalas, 'Natural and synthetic 20-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity', *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 8073-8085
 66. Τσιμογιάννης Δ., 'Αντιοξειδωτική δράση φλαβονοειδών ενώσεων και εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών: αναγωγή ελευθέρων ριζών και προστασία φυτικών ελαίων', Διδακτορική Διατριβή, ΕΜΠ, **2008**
 67. Ronald D. Hatfield, Richard F. Helm, and John Ralph, 'Synthesis of Methyl 5-O-tram-Feruloyl-α-L-arabinofuranoside and Its Use as a Substrate to Assess Feruloyl Esterase Activity', USDA-Agricultural Research Service, U.S. Dairy Forage Research Center, and the *Department of

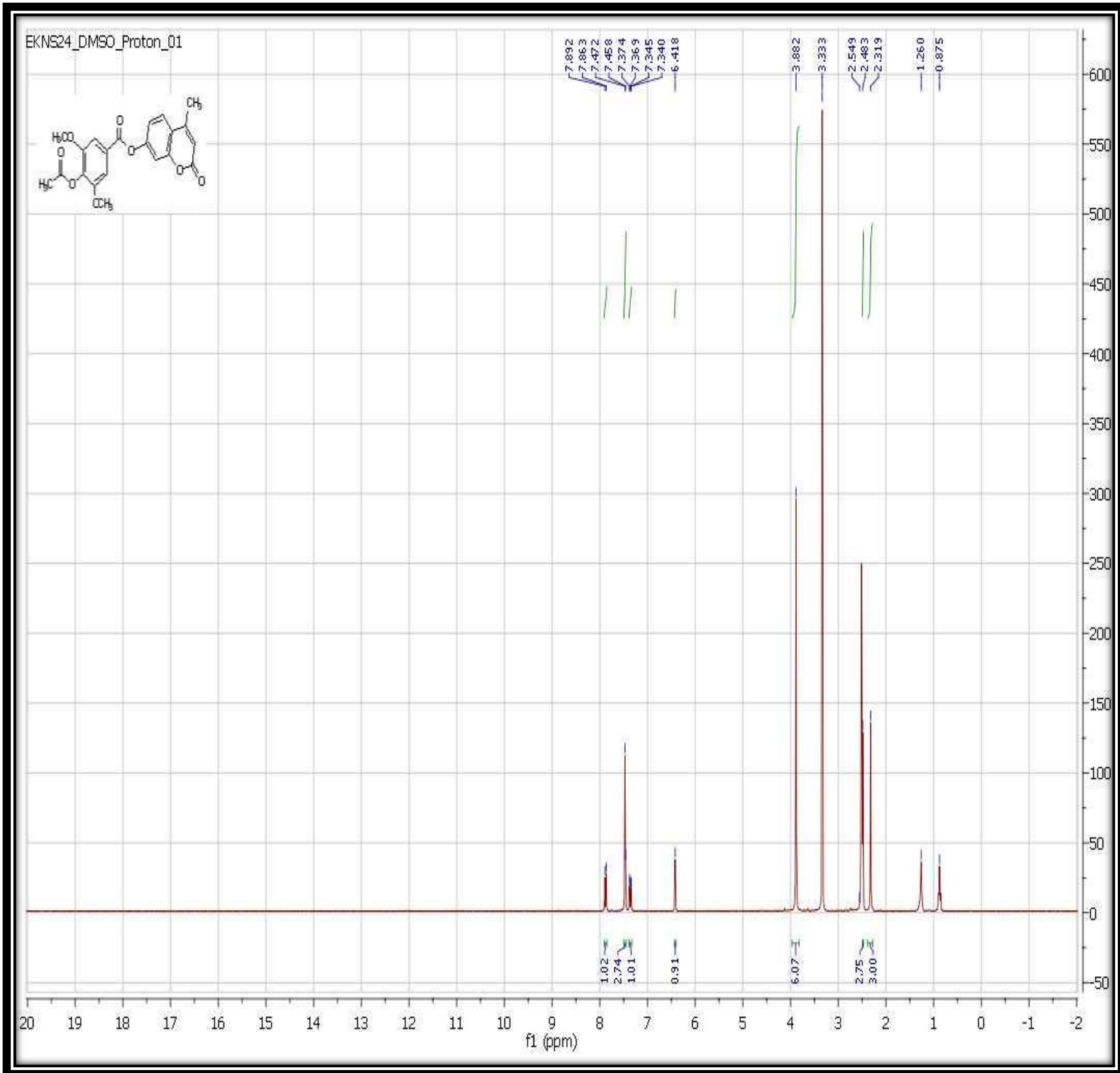
Agronomy and Department of Forestry, University of Wisconsin, 1925 Linden Drive West, Madison, Wisconsin 53706, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, **1991**,25-33, 194

68. Richard F. Helm , John Ralph , and Ronald D. Hatfield , 'Synthesis of feruloylated and p-coumaroylated methyl glycosides', Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, *Carbohydrate Research*, **1992** ,183-194, 229
69. <http://www.bramhascientific.com/6318-20-3/Acetyl-syringic-acid.html>
70. Dawid Lewandowski, Piotr Ruszkowski, Anita Pinska, Gregorz Schroeder, and Joanna Kurczewska, 'SBA-15 Mesoporous Silica Modified with Gallic Acid and Evaluation of Its Cytotoxic Activity', *Journal List Plos one*, Published online **2015** Jul 7

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ

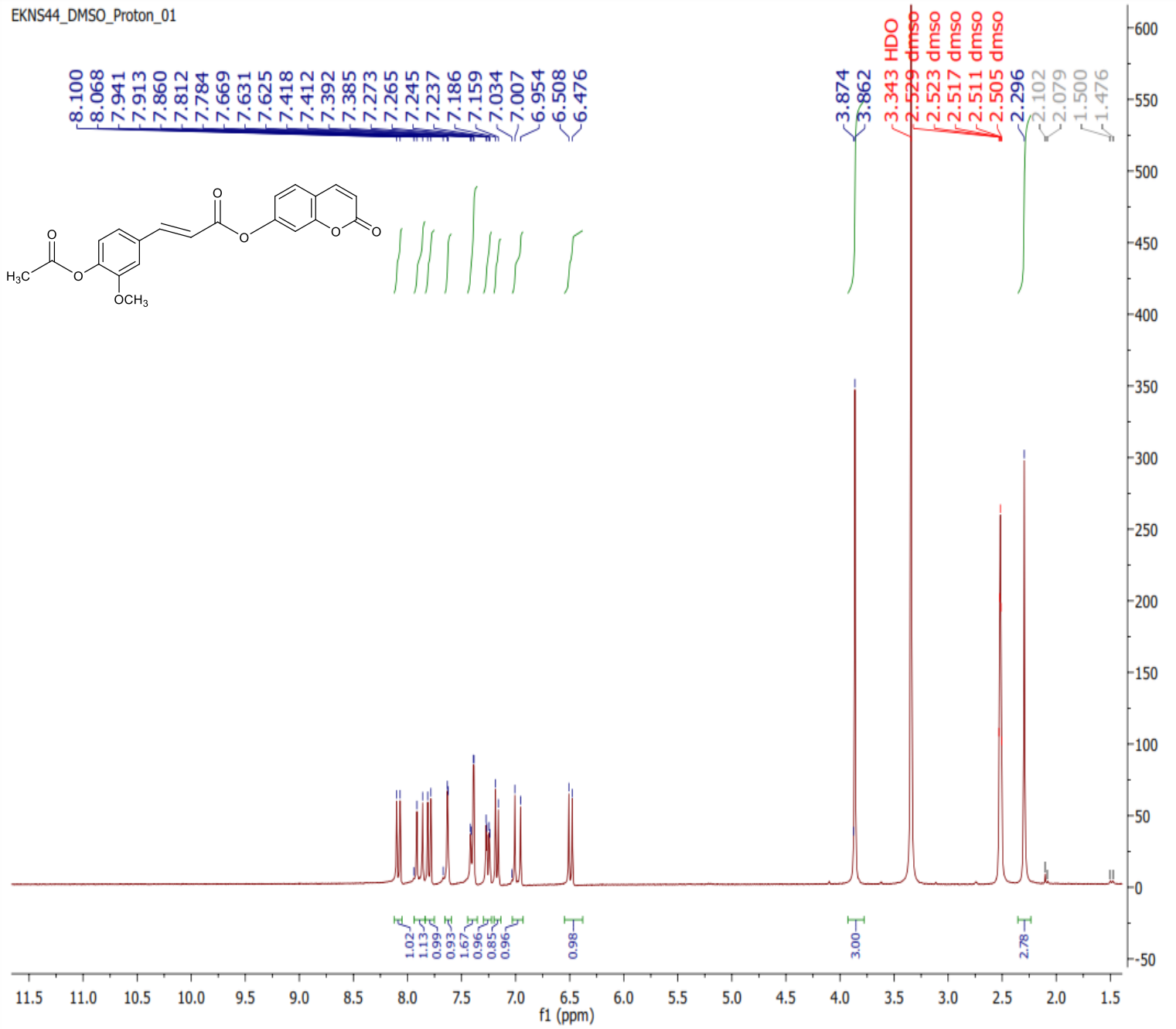


Εικόνα 8: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (DMSO, 300MHz) της κουμαρίνης 11

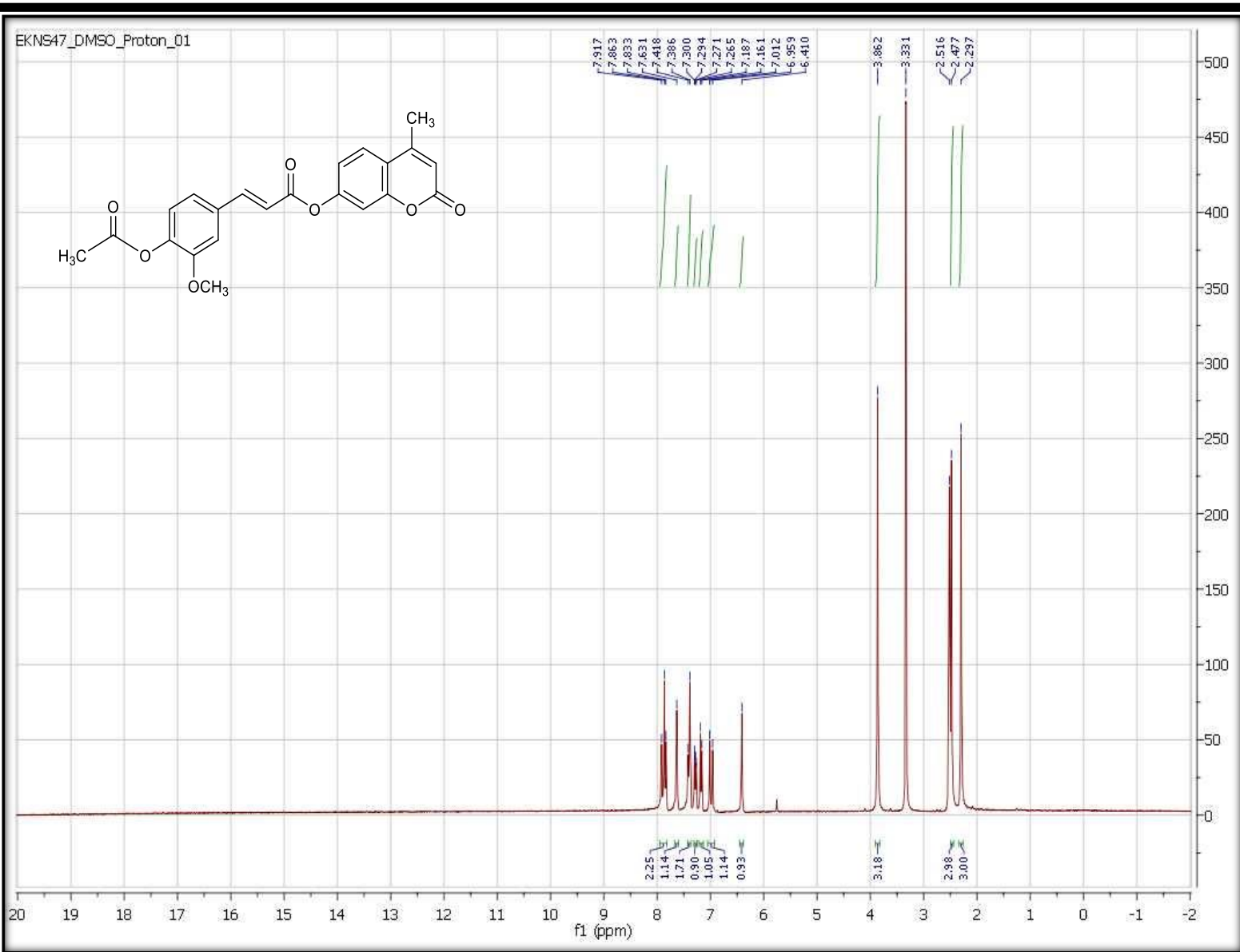


Εικόνα 9: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (DMSO, 300MHz) της κουμαρίνης 12

EKNS44_DMSO_Proton_01



Εικόνα 10: Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (DMSO, 300MHz) της κουμαρίνης 8



Εικόνα 11: Φάσμα πρωτονίου ¹H NMR (DMSO, 300MHz) της κουμαρίνης 10