



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ (Ι) ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΠΥΡΑΖΟΛΙΝΩΝ ΜΕ
ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ
ΚΑΙ ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗ ΔΡΑΣΗ**

ΚΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥ ΙΩΑΝΝΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ:

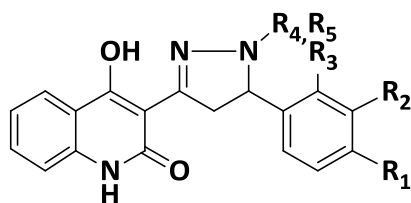
Δρ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΔΕΤΣΗ, Επίκουρος Καθηγήτρια

ΑΘΗΝΑ 2015

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία έχει ως αντικείμενο τη σύνθεση νέων βιοδραστικών υβριδικών ενώσεων κινολινονών-χαλκονών, όπως επίσης και τη χημική τροποποίηση του παραπάνω συστήματος, προς σχηματισμό ετεροκυκλικών πυραζολινικών αναλόγων. Τα νέα πυραζολινικά ανάλογα μελετώνται για πιθανή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.

Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεση των επιθυμητών ενώσεων πραγματοποιήθηκε μέσω συμπύκνωσης α,β-ακόρεστων καρβονυλικών ενώσεων (κινολινονών-χαλκονών) με 1,2-διπυρηνόφιλες ενώσεις, π.χ. παράγωγα της υδραζίνης και της υδροξυλαμίνης. Αρχικά παρασκευάστηκε η 3-ακετυλο-4-υδρόξυ-2-κινολινονη, η οποία μέσω αλδολικής συμπύκνωσης με διάφορες αρωματικές αλδεΐδες παρουσία καταλυτικής ποσότητας πιπεριδίνης οδήγησε στο σχηματισμό νέων κινολινονών-χαλκονών. Στη συνέχεια, τα νέα ετεροκυκλικά πυραζολινικά ανάλογα συντέθηκαν μέσω θέρμανσης της αντίστοιχης χαλκόνης με παράγωγα υδραζίνης σε οξικό οξύ.



R1=OH, OCH₃

R2=OCH₃

R3=CH₃

R4= phenyl

R5= 4-cyannophenyl

1(3,4-dimethylphenyl)

Τα νέα αυτά παράγωγα στη συνέχεια, ελέγχθησαν ως προς την αντιοξειδωτική δράση τους *in vitro* με βάση την ικανότητα δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH παρουσιάζοντας αξιόλογα αποτελέσματα. Ακόμη, μελετήθηκε η αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης του λινολεϊκού οξέος που επάγεται από τη ρίζα AAPH, καθώς και η αντιφλεγμονώδης δράση των μορίων.

Η ταυτοποίηση της δομής των νέων αυτών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού NMR και με Φασματοσκοπία Μάζας MS.

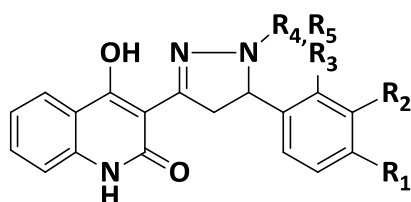
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Οργανική και φαρμακευτική χημεία.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Κινολινονο-χαλκόνες, πυραζολίνες, αντιοξειδωτική δράση, αντιφλεγμονώδης δράση.

ABSTRACT

The present work aims the synthesis of new bioactive hybrid quinoline-chalcone compounds, as well as their chemical modification to form heterocyclic pyrazolines analogues. The new pyrazolines analogues were studied for potential antioxidant and anti-inflammatory activity.

More specifically, the synthesis of the desired compounds was performed by condensing of α,β -unsaturated carbonyl compounds (quinolinone-chalcone hybrids) with derivatives of hydrazine and hydroxylamine. Initially, 3-acetyl-4-hydroxy-2-quinolinone was prepared which, by aldol condensation with various aromatic aldehydes in the presence of a catalytic amount of piperidine, resulted in the formation of new quinolinone-chalcones. Then, the new pyrazoline heterocyclic analogs were synthesized by heating the corresponding chalcone with hydrazine derivatives in acetic acid.



R1=OH, OCH₃

R2=OCH₃

R3=CH₃

R4= phenyl

R5= 4-cyannophenyl

1(3,4-dimethylphenyl)

These new derivatives were then tested for their antioxidant activity in vitro based on the stable free radical scavenging capacity DPPH, showing remarkable results. Furthermore, the molecules were tested for the inhibition of lipid peroxidation of linoleic acid induced by AAPH radical, and for their ability to inhibit soybean lipoxygenase, as an indication of their anti-inflammatory activity.

The identification of the structure of these novel compounds was performed by NMR spectroscopy.

SCIENTIFIC AREA: Organic chemistry, medicinal chemistry.

KEY WORDS: quinoline-chalcones, pyrazolines, antioxidant, anti-inflammatory effect.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2014-2015.

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

Πρώτα απ' όλα, την υπεύθυνη Επίκουρο καθηγήτρια κα Α. Δέτση για την εμπιστοσύνη της και την ουσιαστική βοήθειά της στην συγγραφή της εργασίας, τις συμβουλές και την καθοδήγησή της σε εργαστηριακό και γνωστικό επίπεδο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας, Ελένη Καβέτσου, για την συνεχή βοήθεια σε κάθε προκύπτον ζήτημα, για την λήψη και αποτίμηση των φασμάτων NMR και για την ουσιαστική συνεισφορά της στην εκτέλεση της διπλωματικής εργασίας. Η συμβολή της ήταν καθοριστική και προσοδοφόρα.

Ακόμη, την υποψήφια διδάκτορα, Ανδρομάχη Τζάνη, στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας, για την άψογη συνεργασία και την βοήθεια κατά την εκτέλεση των πειραμάτων και για την αποτίμηση των φασμάτων NMR.

Επίσης, είμαι ευγνώμων στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής της διπλωματικής εργασίας μου κ. Φώτιο Τσόπελα και κ. Εμμανουήλ Κούκιο, για την προσεκτική ανάγνωση της εργασίας μου και για τις πολύτιμες υποδείξεις τους.

Οφείλω ευχαριστίες στην Καθηγήτρια κα. Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα, στον Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, για την διεξαγωγή των *in vitro* βιοδοκιμασιών για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης των νέων παραγώγων.

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

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο : ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	12
1.1	ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ	12
1.1.1	Βιοσύνθεση φλαβονοειδών.....	13
1.1.2	Βιολογική δραστικότητα	14
1.1.2.1	Αντιοξειδωτική δράση.....	15
1.1.2.2	Αντιφλεγμονώδης δράση.....	16
1.1.2.3	Αντιμικροβιακή δράση.....	16
1.1.2.4	Αντικαρκινική δράση.....	17
1.2	ΧΑΛΚΟΝΕΣ.....	18
1.2.1	Γενικά.....	18
1.2.2	Δομή.....	18
1.2.3	Βιολογική δραστικότητα	19
1.2.4	Μέθοδοι σύνθεσης.....	21
1.3	ΠΥΡΑΖΟΛΙΝΕΣ.....	24
1.3.1	Δομή.....	24
1.3.2	Πρόελευση.....	24
1.3.3	Βιολογική δραστικότητα	26
1.3.3.1	Αντιφλεγμονώδης και αναλγητική δράση.....	27
1.3.3.2	Αντικαταθλιπτική δράση.....	27
1.3.3.3	Αντιμικροβιακή δράση	28
1.3.3.4	Αντικαρκινική δράση.....	29
1.3.3.5	Αντιοξειδωτική δράση.....	29
1.3.4	Μέθοδοι σύνθεσης.....	30
1.3.4.1	Σύνθεση πυραζολινών μέσω αντίδρασης α,β-ακόρεστων κετονών με διαζωμεθάνιο	30
1.3.4.2	Σύνθεση πυραζολινών μέσω αντιδράσεων με υδραζίνες και υδροξυλαμίνες	34
1.3.4.3	Σύνθεση 2-πυραζολινών μέσω κυκλοπροσθήκης αμινών νιτριλίου	39
1.3.4.4	Άλλες μέθοδοι σύνθεσης πυραζολινών	40
1.4	ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	41
1.4.1	Γενικά.....	41
1.4.2	Ταξινόμηση αντιοξειδωτικών	44
2	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο : ΣΧΕΔΙΑΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	46
2.1	ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ	46
2.1.1	Σύνθεση 3-υποκατεστημένων-4-υδροξυ-2-κινολινονών.....	47
2.1.1.1	Σύνθεση της 2-μεθυλο-4-Η-3,1-βενζοξαζιν-4-όνης (1)	47
2.1.1.2	Σύνθεση του N-ακετυλανθρανυλο-ακετοξικού αιθυλεστέρα (2)	47
2.1.1.3	Σύνθεση της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινονης (3).....	48
2.1.2	Σύνθεση υβριδικών μορίων κινολινών-χαλκόνων.....	48
2.1.3	Πυραζολινικά ανάλογα	50
2.2	ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΥΡΑΖΟΛΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ	52

2.2.1	Αντιφλεγμονώδης δράση	52
2.2.2	Αντιοξειδωτική δράση	54
2.2.2.1	Ικανότητα δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH	54
2.2.2.2	Αναστολή λιπιδικής υπεροξειδωσης	58
3	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	61
3.1	ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ.....	61
3.2	ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	62
3.2.1	2-μεθυλο-4H-3,1-βενζοξαζιν-4-όνη (1)	62
3.2.2	α-ακετυλο-2-(ακετυλαμινο)-β-οξο-βενζολο προπανοϊκός αιθυλεστέρας (2)	62
3.2.3	3-ακετυλο-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνη (3)	63
3.2.4	Γενική μέθοδος σύνθεσης κινολινονο-χαλκονών	63
3.2.4.1	4-υδροξυ-3-[3-(2-μεθυλοφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-2(1H)-κινολινόνη (5)	64
3.2.4.2	4-υδροξυ-3-[3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-2(1H)-κινολινόνη (6)	64
3.2.4.3	4-υδροξυ-3-[3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-2(1H)-κινολινόνη (9)	65
3.2.5	5-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)-1-φαινυλο-3-(4,5-διυδρο-1H-πυραζολ-3-υλ)-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνη (10).....	65
3.2.6	Γενική Μέθοδος σύνθεσης των πυραζολινικών αναλόγων 11-14.....	66
3.2.6.1	5-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)-1-(4-κυανοφαινυλο)-3-(4,5-διυδρο-1H-πυραζολ-3-υλ)-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνη (11)	66
3.2.6.2	5-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)-1-(3,4-διμεθυλοφαινυλο)-3-(4,5-διυδρο-1H-πυραζολ-3-υλ)-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνη (12)	67
3.2.6.3	5-(2-μεθυλοφαινυλο)-1-(4-κυανοφαινυλο)-3-(4,5-διυδρο-1H-πυραζολ-3-υλ)-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνη (13).....	68
3.2.6.4	5-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-1-(4-κυανοφαινυλο)-3-(4,5-διυδρο-1H-πυραζολ-3-υλ)-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνη (14).....	68
3.3	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΛΙΠΟΞΥΓΟΝΑΣΗΣ ΑΠΟ ΣΟΓΙΑ.....	69
3.4	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΡΙΖΑΣ DPPH..	69
3.5	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗΣ (AAPH).....	70
4	ΚΕΦΑΛΕΙΟ 4^ο : ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ, ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	71
4.1	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΝΕΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ	71
4.1.1	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).....	71
4.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ	73
4.2.1	Συζήτηση αποτελεσμάτων αντιοξειδωτικής δράσης των νέων μορίων	74
4.2.2	Συζήτηση αποτελεσμάτων αντιφλεγμονώδους δράσης των νέων μορίων.....	76
4.3	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	78
4.4	ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ	79

5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	80
6	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΜΟΡΙΩΝ.....	89

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1:	Γενική δομή φλαβονοειδών.....	12
Εικόνα 2:	Κυριότερες δομές φλαβονοειδών.....	13
Εικόνα 3:	Βιοσύνθεση φλαβονοειδών.....	14
Εικόνα 4:	Φλαβονοειδή με σημαντική αντιοξειδωτική δραστηριότητα.....	15
Εικόνα 5:	Φλαβονοειδή με σημαντική δραστηριότητα κατά του καρκίνου.....	17
Εικόνα 6 :	Δομή χαλκονών.....	18
Εικόνα 7 :	Πυραζολινικός δακτύλιος.....	24
Εικόνα 8 :	Phenazone.....	26
Εικόνα 9 :	Indoxacarb.....	26
Εικόνα 10 :	Προσφορά του ηλεκτρονίου από την αντιοξειδωτική ένωση, προς εξουδετέρωση της ελεύθερης ρίζας.....	42
Εικόνα 11 :	Τροφές πλούσιες σε αντιοξειδωτικά.....	43
Εικόνα 12 :	Αναστολείς λιποξυγονάσης.....	54
Εικόνα 13 :	Η ρίζα DPPH και η αποχρωματισμένη και ανηγμένη μορφή της, μετά τη δράση του αντιοξειδωτικού.....	56
Εικόνα 14 :	Μηχανισμός λιπιδικού υπεροξειδωσης.....	59
Εικόνα 15 :	Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) της πυραζολίνης 10 ...	72
Εικόνα 16 :	Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) της πυραζολίνης 11 ...	89
Εικόνα 17 :	Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) της πυραζολίνης 12 ...	89
Εικόνα 18 :	Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) της πυραζολίνης 13 ...	90
Εικόνα 19 :	Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) της πυραζολίνης 14 ...	90

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1 : Χαλκόνη με αντιοξειδωτική δράση	20
Σχήμα 2 : Μηχανισμός αλδολικής συμπύκνωσης Claisen – Schmidt.....	21
Σχήμα 3 : Σύνθεση χαλκονών μέσω μικροκυμάτων.....	22
Σχήμα 4 : Mukaiyama αλδολική συμπύκνωση.....	22
Σχήμα 5 : Σύνθεση χαλκονών μέσω αντίδρασης Suzuki	23
Σχήμα 6 : Σύνθεση χαλκονών με λειοτρίβηση	23
Σχήμα 7 : Τα τρία είδη πυραζολινών σε ισορροπία μεταξύ τους	25
Σχήμα 8	25
Σχήμα 9 : Πυραζολινικά ανάλογα με αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση	27
Σχήμα 10 : Σχηματισμός της 3-βενζοϋλο-4-φαινυλο-1-πυραζολίνης.....	31
Σχήμα 12 : Σχηματισμός της 4-αρυλο-3- (2-φουροϋλ) -2-πυραζολίνης.	32
Σχήμα 13 : Σχηματισμός 3-αροϋλο-4-αρυλ-2-πυραζολινών μέσω ενδιάμεσου ετεροκυκλικού δακτυλίου.	32
Σχήμα 14 : Αντιδράσεις ετεροκυκλικών αναλόγων χαλκονών που λαμβάνονται από την αντίδραση κατάλληλων κετονών και διαζωμεθανίου.	33
Σχήμα 15 : trans ισομερή σπιρο-1-πυραζολινών και σπιρο-2-πυραζολινών	33
Σχήμα 16 : cis ισομερή σπιρο-1-πυραζολινών και σπιρο-2-πυραζολινών.....	33
Σχήμα 17 : Σύνθεση πυραζολινών με συμπύκνωση που περιλαμβάνει α, β-ακόρεστα καρβονύλια και 1,2-διπυρηνόφιλες ενώσεις	34
Σχήμα 18 : Παρασκευή πυραζολινών με συμπύκνωση που περιλαμβάνει α, β- ακόρεστα καρβονύλια και 1,2-διπυρηνόφιλες ενώσεις υπό όξινες συνθήκες.	35
Σχήμα 19 : Κυκλοποίηση σε υγρή φάση ναφθυλο-υποκατεστημένων χαλκονών και υδραζινών σε περιβάλλον με μικροκύματα, προς την παρασκευή των κατάλληλων πυραζολινών	36
Σχήμα 20 : Σύνθεση πυραζολινών σε ένα στάδιο χωρίς την αρχική απομόνωση της α, β-ακόρεστης κετόνης.....	36
Σχήμα 21 : Μηχανισμός σχηματισμού πυραζολινών από α, β-ακόρεστες κετόνες και τις υδραζίνες.....	37
Σχήμα 22 : Σύνθεση 3,4-εναντιομερών ή 3,5 δισυποκατεστημένων 2-πυραζολίνες με χειρόμορφο κέντρο στη θέση 4 ή 5.....	38

Σχήμα 23 : Σύνθεση 3,4,5-τριυποκατεστημένων 2-πυραζολινών	38
Σχήμα 24: Σύνθεση εναντιομερών 3,5,5-τριυποκατεστημένων 2-πυραζολινών. ...	38
Σχήμα 25 : Σύνθεση τρικυκλικών 2-πυραζολινών μέσω ενδομοριακής 1,3-διπολικής κυκλοπροσθήκης ιμινών νιτριλίου	39
Σχήμα 26 : Σύνθεση πυραζολινών μέσω κυκλοσυμπύκνωσης με τη χρήση μικροκυμάτων.....	40
Σχήμα 27 : Σύνθεση αρυλοϋποκατεστημένων πυραζολινών	40
Σχήμα 28 : Σύνθεση 2-πυραζολινών από 2-ακυλοαζιριδίνες και Huisgen zwitterions	40
Σχήμα 29: Πυραζολινικά ανάλογα με αξιόλογη βιολογική δράση	46
Σχήμα 30 : Σύνθεση της 2-μεθυλο-4H-3,1-βενζοξαζιν-4-όνης.....	47
Σχήμα 31 : Αντίδραση C-ακυλίωσης ενώσεων ενεργού μεθυλίου	48
Σχήμα 32 : Σύνθεση της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνης.....	48
Σχήμα 33 : Σύνθεση κινολινο-χαλκονών (3)	49
Σχήμα 34 : Υβριδικά ανάλογα κινολινο-χαλκονών.....	49
Σχήμα 35 : Πυραζολινικά ανάλογα κινολινο-χαλκονών.....	50
Σχήμα 36 : Αντιδράσεις σχηματισμού πυραζολινικών παραγώγων.....	51
Σχήμα 37: Μηχανισμός σχηματισμού πυραζολίνης.	51
Σχήμα 38 : Αντιδράσεις οξειδωσης των λιποξυγενασών.....	53
Σχήμα 39 : Χημική δομή DPPH	55
Σχήμα 40: Χημική δομή NDGA	58
Σχήμα 41 : Χημική δομή AAPH.	60
Σχήμα 42 : Χημική δομή Trolox	60
Σχήμα 43: Αρίθμηση δακτυλίων της πυραζολίνης 10	72
Σχήμα 44 : Πυραζολινικό ανάλογο με την καλύτερη συνδυασμένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.	77

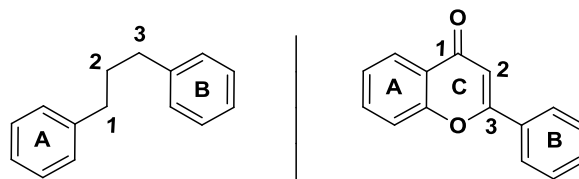
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 : Αποτελέσματα της in vitro αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης των νέων πυραζολινικών αναλόγων.....	73
---	----

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο : ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

Τα φλαβονοειδή είναι μια κατηγορία πολυφαινολικών ενώσεων δευτερογενών φυτικών μεταβολιτών η οποία αριθμεί σήμερα περισσότερες από 9000 δομές. Ο όρος "flavone" προέρχεται από τη λατινική λέξη flavus που σημαίνει κίτρινο. Ο βασικός σκελετός των φλαβονοειδών αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα σε μία διάταξη δύο αρωματικών δακτυλίων με έξι άτομα άνθρακα (δακτύλιοι A και B) που συνδέονται με μια γέφυρα 3 ατόμων άνθρακα ($C_6 - C_3 - C_6$). Η χημική δομή των φλαβονοειδών στηρίζεται στην ύπαρξη του φλαβανικού σκελετού, ο οποίος αποτελείται από τους δύο αρωματικούς δακτυλίους A και B με ένα ενδιάμεσο ετεροκυκλικό πυρανικό δακτύλιο (δακτύλιο C) [1].



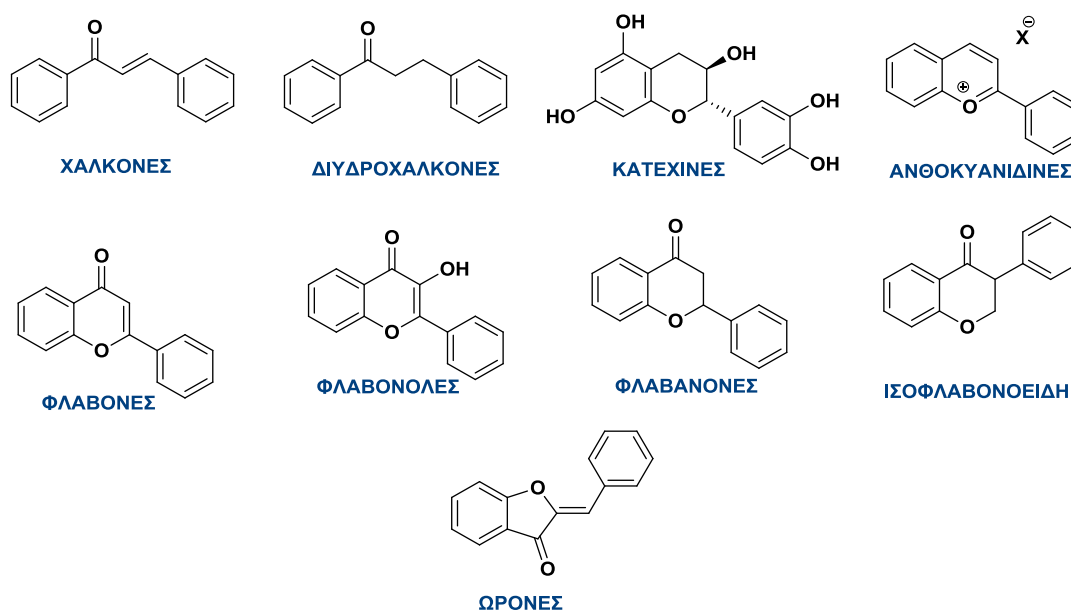
Εικόνα 1: Γενική δομή φλαβονοειδών.

Τα περισσότερα φλαβονοειδή, απαντώνται υπό μορφή γλυκοζιτών και ανήκουν στις πολυφαινόλες. Περιέχονται σε πολλά φυτικά διατροφικά μέσα, ενώ πειραματικές και επιδημιολογικές μελέτες έχουν προτείνει γι'αυτά μια ποικιλία φαρμακολογικών ιδιοτήτων προσδίδοντάς τους έτσι ένα προστατευτικό ρόλο για την ανθρώπινη υγεία.

Σημαντικές πηγές φλαβονοειδών στη διατροφή είναι το τσάι, το κόκκινο κρασί, μήλο, η ντομάτα, το κεράσι, το κρεμμύδι, το θυμάρι, ο μαϊντανός, η σόγια, καθώς και άλλα όσπρια και φρούτα. Οι φλαβονοειδείς ομάδες πολυφαινολικών ενώσεων έχουν χαμηλή τοξικότητα στα θηλαστικά και είναι ευρέως κατανεμημένες σε φυτικό βασίλειο. Έχει δειχθεί πως αναστέλλουν την ανάπτυξη διαφόρων καρκινικών

κυττάρων σε *in vitro* δοκιμές και πως μειώνουν την πιθανότητα ανάπτυξης όγκου [2].

Τα φλαβονοειδή κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το βαθμό οξείδωσης και τους υποκαταστάτες του χρωμανικού σκελετού στις ακόλουθες βασικές κατηγορίες.

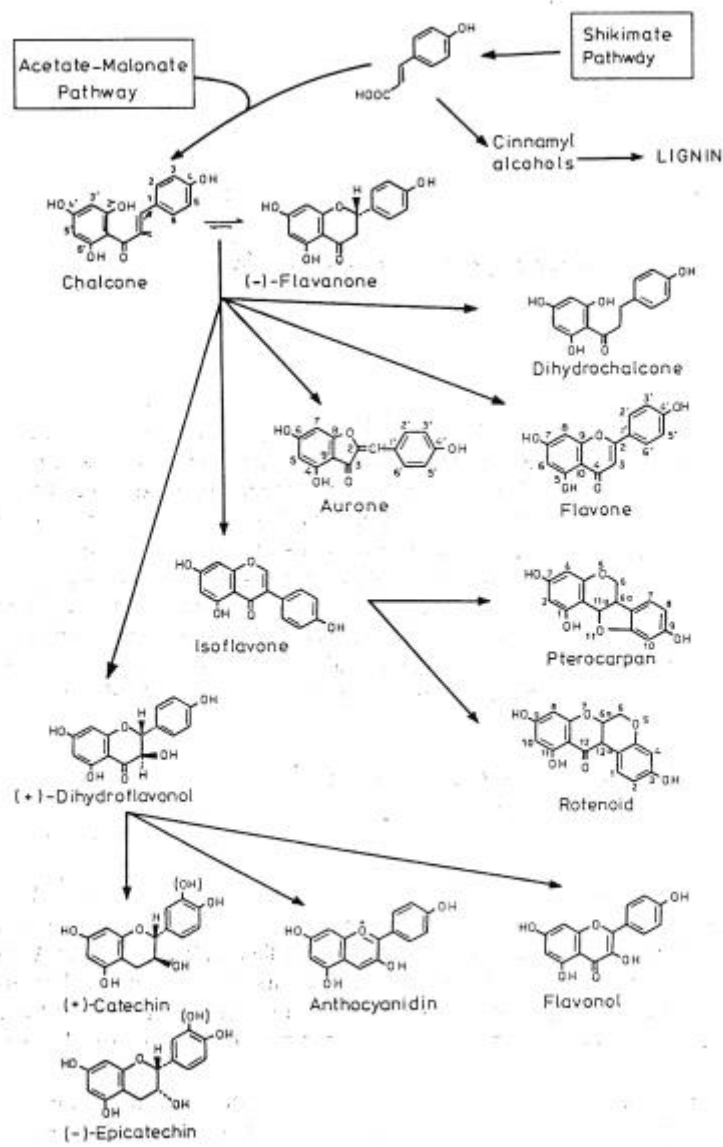


Εικόνα 2: Κυριότερες δομές φλαβονοειδών

1.1.1 Βιοσύνθεση φλαβονοειδών

Όλα τα φλαβονοειδή έχουν κοινό βιοσυνθετικό δρόμο και ως εκ τούτου έχουν τον ίδιο βασικό σκελετό. Προέρχονται από τη συσσωμάτωση δύο άλλων δρόμων, του άλατος του σικιμικού και του μαλονικού οξέος.

Το πρώτο φλαβονοειδές που προέκυψε από τη συνένωση των δύο δρόμων είναι η χαλκόνη και από αυτή με την επίδραση διαφόρων ενζυμικών συστημάτων προέκυψαν οι άλλοι τύποι των φλαβονοειδών [3].



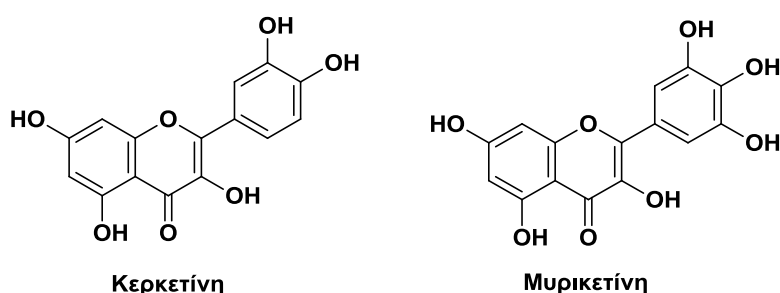
Εικόνα 3: Βιοσύνθεση φλαβονοειδών

1.1.2 Βιολογική δραστηριότητα

Διάφοροι ερευνητές μελετώντας τα φλαβονοειδή, ανακάλυψαν πως μία πολύ σημαντική ιδιότητά τους είναι η παγίδευση των ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Ακόμη, *in vitro* πειραματικά συστήματα έδειξαν ότι τα φλαβονοειδή διαθέτουν αντιφλεγμονώδη, αναλγητική, αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δράση [4].

1.1.2.1 Αντιοξειδωτική δράση

Η σημαντικότερη ιδιότητα σε κάθε ομάδα των φλαβονοειδών είναι η ικανότητά τους να δρουν ως αντιοξειδωτικά. Οι φλαβόνες και οι κατεχίνες φαίνεται να είναι τα πιο ισχυρά φλαβονοειδή για την προστασία του οργανισμού έναντι των δραστικών ριζών οξυγόνου. Λόγω του αριθμού και της θέσης των ελευθέρων υδροξυλίων, ως ισχυρότερα αντιοξειδωτικά θεωρούνται ακόμη, η κερκετίνη (quercetin), η μυρικετίνη (myricetin), η γκοσουπετίνη και η κερκεταγενίνη.



Εικόνα 4: Φλαβονοειδή με σημαντική αντιοξειδωτική δραστηριότητα.

Τα κύτταρα και οι ιστοί του σώματος απειλούνται συνεχώς από τις βλάβες που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες και οι ρίζες οξυγόνου. Οι κυτταρικές αυτές βλάβες μπορεί να προκαλέσουν μετατόπιση στο καθαρό φορτίο του κυττάρου, αλλάζοντας την οσμωτική πίεση, που οδηγεί σε οίδημα και τελικά σε κυτταρικό θάνατο.

Τα φλαβονοειδή μπορούν να αποτρέψουν τη ζημιά που προκαλείται στο κύτταρο με διάφορους τρόπους. Ένας από αυτούς είναι η άμεση δέσμευση των ελευθέρων ριζών. Πιο συγκεκριμένα, η υψηλής δραστηριότητας ομάδα υδροξυλίου των φλαβονοειδών αντιδρά με τις ελεύθερες ρίζες, καθιστώντας τις ανενεργές [5].

1.1.2.2 Αντιφλεγμονώδης δράση

Ένας μεγάλος αριθμός флаβονοειδών όπως η εσπεριδίνη, η απιγενίνη, η λουτεολίνη και η κουερσετίνη έχει αποδειχθεί πως κατέχουν σημαντική αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δραστηριότητα. Τα флаβονοειδή και ειδικώς η τυροσίνη και η σερίνη-θρεονίνη επηρεάζουν σημαντικά τη λειτουργία των ενζυμικών συστημάτων, συμμετέχοντας στον σχηματισμόν διεργασιών αντιφλεγμονώδους δράσης [6], [7].

Διαπιστώθηκε ακόμη, ότι ορισμένα флаβονοειδή, όπως η κερκετίνη και οι προκυανιδίνες, αναστέλλουν την ελεύθερη ισταμίνη, ελέγχουν τη σύνθεση των προσταγλαδινών και λευκοτριενίων και μειώνουν τη διαπερατότητα και ευθραυστότητα των τοιχωμάτων των τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων.

1.1.2.3 Αντιμικροβιακή δράση

Τα флаβονοειδή σχηματίζονται από τα φυτά για την αντιμετώπιση μικροβιακών μολύνσεων. Επομένως, ύστερα από πολλές *in vitro* δοκιμές έχει αποδειχθεί πως διαθέτουν σημαντική δράση, ενάντια σε διάφορους μικροοργανισμούς.

Πιο συγκεκριμένα, αναφέρεται πως οι κατεχίνες έχουν ερευνηθεί εκτενώς λόγω της αντιμικροβιακής τους δραστηριότητας. Αυτές οι ενώσεις αναφέρονται για την αντιβακτηριακή τους δράση έναντι των *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Shigella*, και άλλων βακτηρίων [8].

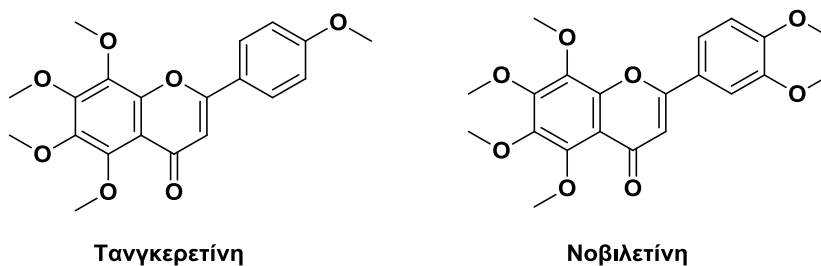
Ο Mori κ.α. πρότεινε ότι ο δακτύλιος Β των флаβονοειδών μπορεί να παρεμβάλλεται ή να σχηματίσει δεσμούς υδρογόνου με το στοίβαγμα των βάσεων νουκλεϊκών οξέων και να οδηγήσει έτσι σε αναστολή της σύνθεσης του DNA και RNA στα βακτήρια [9].

Ακόμη, οι Osawa κ.α. έχουν δείξει ότι οι 5-υδροξυφλαβανόνες και οι 5-υδροξυισοφλαβανόνες με μια, δύο, ή τρεις επιπλέον ομάδες υδροξυλίου στις θέσεις 7' , 2' και 4' του δακτυλίου αναστέλλουν την ανάπτυξη των *S. mutans* και *Streptococcus sobrinus* [10].

1.1.2.4 Αντικαρκινική δράση

Όσο αναφορά την δράση των φλαβονοειδών κατά της καρκινογένεσης έχουν διεξαχθεί διάφορες μελέτες, αποδίδοντας ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

Τα φλαβονοειδή που υπάρχουν στα εσπεριδοειδή, και ιδίως τα πολυμεθυλιωμένα όπως η τανγκερετίνη (tangeretin) που περιέχεται στη φλούδα των κίτρων και η νοβιλετίνη (nobiletin) είναι αυτά που παρουσιάζουν την πιο έντονη ανασταλτική δράση στους καρκινικούς όγκους σε σχέση με τα υδροξυλιωμένα παράγωγα [11].



Εικόνα 5: Φλαβονοειδή με σημαντική δραστικότητα κατά του καρκίνου.

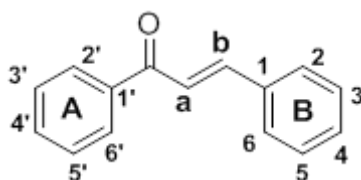
1.2 ΧΑΛΚΟΝΕΣ

1.2.1 Γενικά

Οι χαλκόνες (1,3-διαρυλο-2-προπεν-1-όνες) αποτελούν μία από τις κυριότερες κατηγορίες φυσικών προϊόντων. Είναι πρόδρομες ενώσεις των φλαβονοειδών και των ισοφλαβονοειδών και συγκαταλέγονται στους φυτοχημικούς παράγοντες. Η βιοσύνθεσή τους στα φυτά πραγματοποιείται για να τα προστατεύει από το φωτοσυνθετικό στρες, τις δραστικές μορφές οξυγόνου και τα παράσιτα [12], [13].

1.2.2 Δομή

Ο δομικός σκελετός των χαλκονών αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους (A και B) που συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός α,β-ακόρεστου καρβονυλικού συστήματος τριών ατόμων άνθρακα [14]. Το όνομα χαλκόνες δόθηκε για πρώτη φορά από τους Kostanecki και Tambor το 1899 και προέρχεται από την ελληνική λέξη «χαλκός», θέλοντας να δώσουν έμφαση στο χαρακτηριστικό χάλκινο χρώμα των ενώσεων αυτών. [15]



Εικόνα 6 : Δομή χαλκονών

Οι θέσεις στις συγκεκριμένες ενώσεις επισημαίνονται χρησιμοποιώντας ένα σύστημα αρίθμησης μοναδικό για αυτές τις ενώσεις. Οι χαλκόνες αναγνωρίζονται επειδή δομικά σχετίζονται με τις ακετοφαινόνες, των οποίων οι θέσεις των ανθράκων στους αρωματικούς δακτυλίους επισημαίνονται με τονισμένους αριθμούς. Έτσι στις χαλκόνες και τις διυδροχαλκόνες οι θέσεις των ανθράκων στον A-δακτύλιο επισημαίνονται με τονισμένους αριθμούς, ενώ στο B-δακτύλιο με

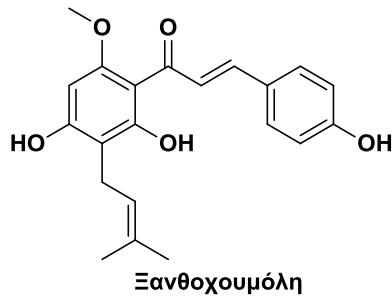
απλούς αριθμούς. Στις χαλκόνες, οι α και β θέσεις συνδέονται με διπλό δεσμό, αλλά αυτό δε συμβαίνει στις διυδροχαλκόνες. Οι φυσικές χαλκόνες περιέχουν κυρίως υδροξυ-, μεθοξυ-, πρενυλο- και μεθυλο- ομάδες ως υποκαταστάτες στους δακτυλίους A και B.

Από συνθετική άποψη, οι χαλκόνες ανήκουν στην κατηγορία των 'προνομιούχων δομών', δηλαδή ενώσεων που μπορούν να τροποποιηθούν δομικά με μεγάλη ποικιλία υποκαταστατών ούτως ώστε να διαφοροποιείται η βιολογική δράση τους και να μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για τη σχέση δομής-βιολογικής δραστηριότητας. Το πλεονέκτημα αυτό, σε συνδυασμό με τις απλές συνθετικές μεθοδολογίες που οδηγούν στη σύνθεσή τους, καθιστά τις χαλκόνες ελκυστικές ενώσεις-στόχους στην οργανική και φαρμακευτική χημεία. [16]

1.2.3 Βιολογική δραστηριότητα

Οι χαλκόνες(1,3-διαρυλ-2-προπεν-1-όνες), τόσο οι φυσικής προέλευσης, όσο και οι συνθετικές, χαρακτηρίζονται για το ιδιαίτερο βιολογικό τους ενδιαφέρον. Πρόκειται για φλαβονοειδή ανοικτής αλυσίδας που βιοσυντίθενται ευρέως σε φυτά. Είναι σημαντικές για την χρώση των λουλουδιών και, ως εκ τούτου, δρουν προσελκυστικά στους επικονιαστές. Ως φλαβονοειδή, οι χαλκόνες διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην άμυνα έναντι παθογόνων οργανισμών και εντόμων. Μια μακροχρόνια επιστημονική έρευνα έχει δείξει ότι οι χαλκόνες εμφανίζουν πολλές ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες, όπως είναι η κυτταροτοξική, η αντικαρκινική και η αντιμικροβιακή. Ακόμη, εμφανίζουν έντονη αντιισταμινική και αντι-φλεγμονώδη δραστηριότητα, ενώ δρουν και κατά του έλκους [17].

Η αντιοξειδωτική δράση των χαλκονών είναι ευρείας βιολογικής σημασίας, όπως στην περίπτωση της ξανθοχουμόλης (xanthohumol), μιας πρενυλιωμένης χαλκόνης που αποτελεί συστατικό του λυκίσκου η οποία σχετίζεται με την προστασία της καρδιάς και των αιμοφόρων αγγείων και της χαλκοναρινγκενίνης, μιας πολυυδροξυλιωμένης χαλκόνης που απομονώνεται από την τομάτα [18-20].

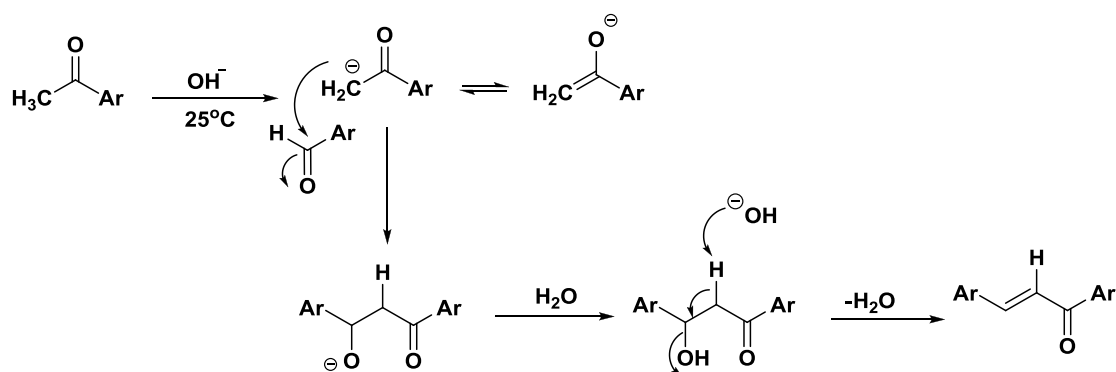


Σχήμα 1 : Χαλκόνη με αντιοξειδωτική δράση

Ορισμένες ενώσεις με ποικίλες φαρμακολογικές ιδιότητες έχουν αναπτυχθεί με βάση το σκελετό της χαλκόνης. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι αυτές οι ενώσεις έφθασαν σε λογικές συγκεντρώσεις στο πλάσμα και δεν προκάλεσαν τοξικότητα. Έτσι, οι χαλκόνες αποτέλεσαν αντικείμενο συνεχούς ενδιαφέροντος τόσο της ακαδημαϊκής κοινότητας όσο και της βιομηχανίας. Σήμερα, αρκετές χαλκόνες χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ιογενών διαταραχών, καρδιαγγειακών παθήσεων, παρασιτικών λοιμώξεων, του πόνου, της γαστρίτιδας, κατά του καρκίνου του στομάχου, καθώς και σαν πρόσθετα τροφίμων και καλλυντικών συστατικών σκευάσματος [17].

1.2.4 Μέθοδοι σύνθεσης

Η κυριότερη μέθοδος σύνθεσης των χαλκονών γίνεται μέσω αντίδρασης μικτής αλδολικής συμπύκνωσης (Claisen – Schmidt condensation) ανάμεσα σε καρβονυλικές ενώσεις η οποία αναπτύχθηκε το 1881 [21]. Η αντίδραση αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική στην οργανική σύνθεση, καθώς παρέχει έναν αποδοτικό τρόπο σχηματισμού δεσμών άνθρακα-άνθρακα.



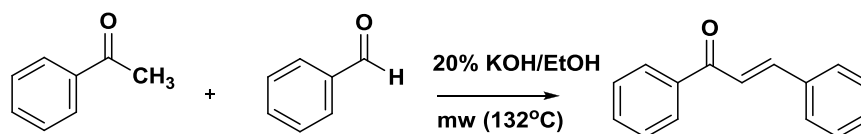
Σχήμα 2 : Μηχανισμός αλδολικής συμπύκνωσης Claisen – Schmidt

Η αλδολική συμπύκνωση πρόκειται για μια οργανική αντίδραση στην οποία μία ενόλη ή ένα ενολικό ιόν αντιδρά με μία καρβονυλική ένωση για να σχηματιστεί μια β-υδροξυαλδεΐδη ή β-υδροξυκετόνη. Ακολουθεί μία αντίδραση αφυδάτωσης προς σχηματισμό μιας συζευγμένης ενόνης.

Πιο συγκεκριμένα, κατά το πρώτο στάδιο της αντίδρασης, ένα α-υδρογόνο από ένα μόριο αλδεΐδης ή κετόνης αποσπάται από ισχυρή βάση, σχηματίζοντας ένα σταθεροποιημένο λόγω συντονισμού ενολικό ιόν. Στη συνέχεια, το ενολικό ιόν προσβάλλει ένα δεύτερο καρβονυλικό μόριο, σε μια αντίδραση πυρηνόφιλης προσθήκης, για να σχηματιστεί ένα τριεδρικό ιόν αλκοξειδίου ως ενδιάμεσο. Τέλος, με πρωτονίωση του ενδιάμεσου ιόντος αλκοξειδίου, σχηματίζονται οι α,β-ακόρεστες χαλκόνες και αποσπάται ένα μόριο νερού.

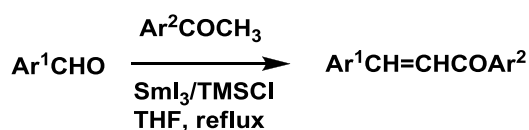
Η αλδολική συμπύκνωση, θεωρείται η πιο διαδεδομένη, κοινή μέθοδος για την σύνθεση χαλκονών σε ομογενή φάση, με συμβατική συνθετική πορεία. Απαιτεί ήπιες συνθήκες, χωρίς σχηματισμό παραπροϊόντων, ενώ η απομόνωση των τελικών προϊόντων πραγματοποιείται χωρίς επίπονους τρόπους καθαρισμού και σε υψηλές συνήθως αποδόσεις.

Παράλληλα, τα τελευταία χρόνια, νέες μη συμβατικές μέθοδοι σύνθεσης χαλκονών έχουν αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας ακτινοβολία μικροκυμάτων (microwave irradiation) με εξίσου ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η χρήση των μικροκυμάτων εφαρμόζεται πλέον ευρέως στην οργανική σύνθεση και στη διαδικασία σχεδιασμού νέων φαρμάκων ως εναλλακτική λύση στις παραδοσιακές τεχνικές θέρμανσης. Η διαδικασία οδηγεί συχνά σε υψηλότερες αποδόσεις και καθαρότερα προϊόντα με σημαντικά πιο σύντομους χρόνους αντίδρασης, καθώς είναι περισσότερο αποδοτική ενεργειακά από τη συμβατική θέρμανση. [22]



Σχήμα 3 : Σύνθεση χαλκονών μέσω μικροκυμάτων

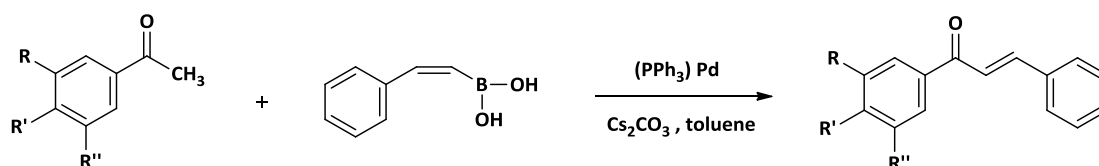
Η αλδολική συμπύκνωση τύπου Mukaiyama μεταξύ μη κυκλικών κετονών και βενζαλδεΐδων, παρουσία ιωδιούχου σαμαρίου και τριμεθυλοσιλυλοχλωριδίου, είναι μία ακόμη μέθοδος σύνθεσης χαλκονών. [23]



Σχήμα 4 : Mukaiyama αλδολική συμπύκνωση

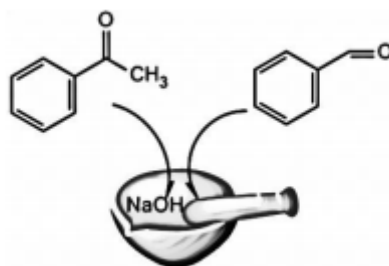
Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται κυρίως για τη σύνθεση προϊόντων μικτής αλδολικής συμπύκνωσης, οδηγώντας στην απομόνωση μόνο των *trans* ισομερών. Οι αποδόσεις των παραγόμενων ενώσεων είναι ικανοποιητικές και κυμαίνονται σε ποσοστά 75-82%, σύμφωνα με τους Fan και Zhang [23]. Τα προϊόντα με τις μεγαλύτερες αποδόσεις λαμβάνονται στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται ως υποκαταστάτες ομάδες-δέκτες ηλεκτρονίων, ενώ οι μικρότερες αποδόσεις λαμβάνονται από ομάδες-δότες ηλεκτρονίων. Επιπλέον, στην ίδια έρευνα προέκυψε ότι η απουσία του SmI3 ή του TMSCl αναστέλλει την αντίδραση.

Επιπρόσθετα, η αντίδραση Suzuki μεταξύ του βενζοϋλοχλωριδίου και φαινυλοβινυλοβορονικού οξέος παρουσία παλλαδίου, αποτελεί μια ακόμη μέθοδο για τη σύνθεση των χαλκονών. [24]



Σχήμα 5 : Σύνθεση χαλκονών μέσω αντίδρασης Suzuki

Τέλος, στα πλαίσια εφαρμογής των αρχών της πράσινης χημείας, έχει αναφερθεί η σύνθεση μιας σειράς χαλκονών με NaOH, με λειοτρίβηση των πρώτων υλών σε ιγδίο, απουσία διαλύτη [25].

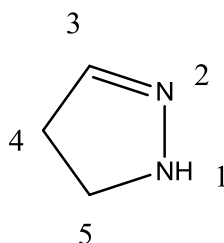


Σχήμα 6 : Σύνθεση χαλκονών με λειοτρίβηση

1.3 ΠΥΡΑΖΟΛΙΝΕΣ

1.3.1 Δομή

Η πυραζολίνη είναι μια πενταμελής ετεροκυκλική ένωση που έχει δύο παρακείμενα άτομα αζώτου μέσα στο δακτύλιο. Έχει μόνο ένα ενδοκυκλικό διπλό δεσμό και η δομή της είναι βασική στη φύση. Ανάμεσα στην πληθώρα παραγώγων της, μεγαλύτερη προσοχή έχει δοθεί στις 2-πυραζολίνες. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να θεωρηθούν κυκλικά ανάλογα υδραζίνης.

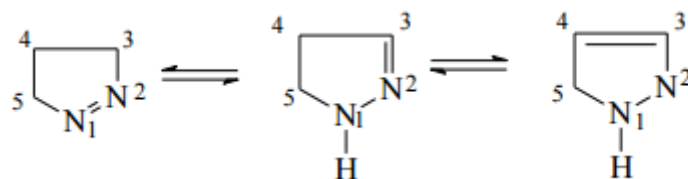


Εικόνα 7 : Πυραζολινικός δακτύλιος

Το άτομο του άνθρακα 5 παρεκκλίνει από το επίπεδο του σχεδόν επιπέδου συστήματος των υπόλοιπων τεσσάρων ατόμων του ετεροκυκλικού δακτυλίου και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της θεωρίας της ετεροκυκλικής χημείας.

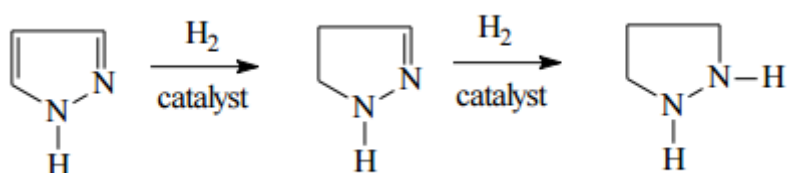
1.3.2 Προέλευση

Οι πυραζόλες εκδηλώνουν αρωματικό χαρακτήρα, με τις ιδιότητές τους να μοιάζουν τόσο στις πυρρόλες, όσο και στις πιριδίνες. Οι τρεις μερικώς μειωμένες μορφές στη δομή της πυραζόλης είναι η 1-πυραζολίνη, η 2-πυραζολίνη και η 3-πυραζολίνη. Τα τρία αυτά μόρια διαθέτουν τους διπλούς δεσμούς σε διαφορετικές θέσεις του δακτυλίου τους, ενώ βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ τους. Παρόλο που και τα τρία αυτά είδη έχουν συντεθεί, η 2-πυραζολίνη εμφανίζεται να έχει τον πιο σταθερό χαρακτήρα. [26]



Σχήμα 7 : Τα τρία είδη πυραζολινών σε ισορροπία μεταξύ τους

Οι πυραζόλες είναι ασθενείς βάσεις και σχηματίζουν άλατα με ανόργανα οξέα. Ακόμη, είναι πολύ ανθεκτικές στην οξείδωση και την αναγωγή, μπορούν όμως να υδρογονωθούν καταλυτικά, πρώτα σε πυραζολίνες και ύστερα σε πυραζολιδίνες. Και οι δύο αυτές ουσίες είναι πολύ πιο ισχυρές βάσεις από τις πυραζόλες.



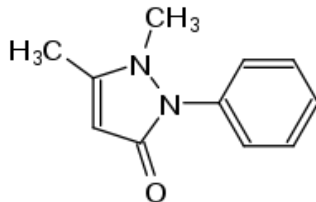
Σχήμα 8

Τα παράγωγα των πυραζολινών διαφέρουν σημαντικά στις ιδιότητές από αυτά των πυραζολών, γεγονός που οφείλεται στην πολύ χαμηλότερη σταθερότητά τους. Οι πυραζολίνες πραγματοποιούν τις αντιδράσεις αλειφατικών παραγώγων, μοιάζοντας στην συμπεριφορά τους με ακόρεστες ενώσεις. Ακόμη, παρουσιάζουν ομοιότητες με τις υδραζόνες στον τρόπο με τον οποίο υδρολύονται από ανόργανα οξέα, και με τις αλδαζίνες στην αποσύνθεσή του σε αέριο άζωτο και σε ουσίες απουσία αζώτου. Οι πυραζολίνες και τα ομολογά τους είναι ασθενείς βάσεις. Σε γενικές γραμμές διαλύονται μόνο σε συμπυκνωμένα οξέα, σχηματίζοντας ασταθή άλατα τα οποία διασπώνται με την προσθήκη νερού. Η μητρική ουσία, ένα έλαιο με σημείο ζέσεως 114 °C, είναι η πιο σταθερή από όλες αυτές τις ενώσεις. Οι πυραζολιδίνες διαθέτουν ισχυρές αναγωγικές ιδιότητες και εύκολα απελευθερώνουν υδρογόνο προς σχηματισμό πυραζολινών.

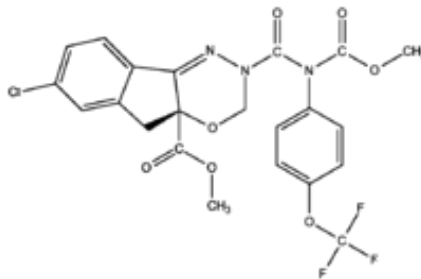
1.3.3 Βιολογική δραστηριότητα

Οι πυραζολίνες είναι μια σημαντική κατηγορία φαρμακοφόρων ενώσεων. Οι ετεροκυκλικές ενώσεις που φέρουν αυτά τα δομικά χαρακτηριστικά έχουν μεγάλη σημασία στη συνθετική και ιατρική χημεία λόγω του γεγονότος ότι έχουν ηρεμιστική, μυοχαλαρωτική, και αντικαταθλιπτική δράση.

Οι 2-πυραζολίνες χαρακτηρίζονται από ένα ευρύ φάσμα ισχυρών φαρμακολογικών δραστηριοτήτων και είναι παρούσες σε φαρμακευτικά μόρια όπως τα αναλγητικά/αντιπυρετικά phenazone, amidopyrene και methampyrone, τα ανιφλεγμονώδη phenylbutazone και oxyphenbutazone, το εντομοκτόνο indoxacarb κ.α [27].



Εικόνα 8 : Phenazone



Εικόνα 9 : Indoxacarb

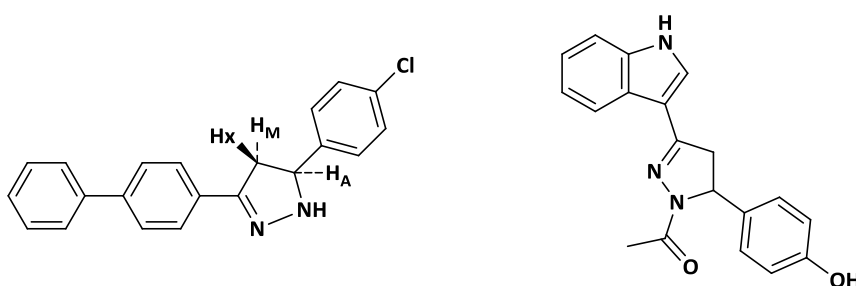
Ορισμένες 2-πυραζολίνες που παρασκευάστηκαν πρόσφατα βρέθηκε ότι εμποδίζουν τη δράση των κυκλοοξυγενασών. Οι κυκλοοξυγενάσες (COXs) είναι σημαντικά ένζυμα για τη σύνθεση της προσταγλανδίνης H₂ η οποία είναι πρόδρομος για τη βιοσύνθεση των προσταγλαδινών, θρομβοξανών και

προστακυκλινών. Η παρεμπόδιση της δράσης των συγκεκριμένων ενζύμων αποτρέπει την εμφάνιση διαταραχών όπως συσώρευση αιμοπεταλίων, πόνο, ερεθισμό και ογκογενέσεις. Πολλά μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) αλληλεπιδρούν με αυτά τα ένζυμα και εμποδίζουν τη δράση τους [28].

1.3.3.1 Αντιφλεγμονώδης και αναλγητική δράση

Προκειμένου να αποδειχθεί η σημαντική δραστηριότητα των πυραζολινών ως αντιφλεγμονώδη και αναλγητικά αντιοξειδωτικά, έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες με υποσχόμενα αποτελέσματα. Μέσα από πολλές έρευνες έχει παρατηρηθεί πως η αύξηση της αναλγητικής και αντιφλεγμονώδους δράσης των πυραζολινών οφείλεται στην παρουσία των 4-NO₂, 2-OH και 4-Cl υποκαταστατών στο φαινυλικό δακτύλιο, στη 5-θέση του δακτυλίου της πυραζολίνης [29].

Για παράδειγμα, οι Amir [30] και Rani [31] παρασκεύασαν πυραζολινικά ανάλογα και πραγματοποίησαν μια σειρά από πειράματα προκειμένου να αξιολογήσουν την δράση τους κατά του πόνου και της φλεγμονής. Οι ενώσεις που παρουσίασαν αξιοσημείωτη δραστηριότητα φαίνονται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 9 : Πυραζολινικά ανάλογα με αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση

1.3.3.2 Αντικαταθλιπτική δράση

Όσο αναφορά την αντικαταθλιπτική δράση των πυραζολινών έχουν διεξαχθεί διάφορες έρευνες, αποδίδοντας ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

Για παράδειγμα, οι Palaska κ.α., απέδειξαν πως οι 4-μεθοξυ και 4-χλωρο υποκαταστάτες στον φαινυλικό δακτύλιο στη θέση 3 του δακτυλίου της πυραζολίνης αυξάνουν την αντικαταθλιπτική δράση των ενώσεων. Ενώ, η αντικατάσταση των ομάδων αυτών με υποκαταστάτες βρωμίου και μεθυλίου αποφέρει μειωμένη δραστικότητα [32].

Ακόμη, οι Prasad κ.α., συμπέραναν πως οι ενώσεις που διαθέτουν σαν ομάδες απελευθέρωσης ηλεκτρονίων, μεθοξυ και υδροξυ υποκαταστάτες και στους δύο αρωματικούς δακτυλίους στις θέσεις 3 και 5 του δακτυλίου των πυραζολινών, παρουσιάζουν σημαντικά ενισχυμένη την αντικαταθλιπτική δράση, σε σύγκριση με τις πυραζολίνες που δεν διαθέτουν υποκαταστάτες επί του φαινυλικού δακτυλίου [33].

1.3.3.3 Αντιμικροβιακή δράση

Η αντιμικροβιακή δράση των πυραζολινών καλύπτει ένα μεγάλο εύρος βιβλιογραφικών αναφορών [34-37].

Πιο συγκεκριμένα, οι Osdemir κ.α., παρασκεύασαν διάφορες 2-πυραζολίνες και έλεγξαν την δραστικότητά τους έναντι των μικροβίων *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus faecalis*, *Aeromonas hydrophila*, *Candida albicans* και *Candida glabrata*. Τα αποτελέσματά τους απέδειξαν ένα εξαιρετικό επίπεδο αντιμικροβιακής δράσης των ενώσεων. [38]

Ακόμη, οι Abunada κ.α. παρατήρησαν στην μελέτη τους την αυξημένη αντιμικροβιακή δράση κατάλληλων 2-πυραζολινών έναντι των *E. coli*, *S. aureus*, *Aspergillus flavus* και *C. Albicans*. [39]

Οι Bhatt κ.α. συνέθεσαν διάφορους τύπους πυραζολινών και βρήκαν αξιοσημείωτη δραστικότητα έναντι των *B. mega*, *B. subtilis*, *E. coli* και *M. tuberculosis H37 Rv*. [40]

1.3.3.4 Αντικαρκινική δράση

Για την αντικαρκινική δραστηριότητα των πυραζολινών έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες και τα αποτελέσματα αποδεικνύουν πως οι ενώσεις αυτές αποτελούν ισχυρό παράγοντα κατά του όγκου, τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* δοκιμές.

Οι Bhat κ.α. παρασκεύασαν μια σειρά από κατάλληλα υποκατεστημένες πυραζόλες και τις αξιολόγησαν για *in vitro* κυτταροτοξική δραστηριότητα ενάντια ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών. Από τις 93 ενώσεις που εξετάστηκαν, 8 ενώσεις έδειξαν αξιοσημείωτη δραστηριότητα [41].

Οι Manna κ.α. συνέθεσαν μια σειρά πυραζολινών που αξιολογήθηκαν για την αντικαρκινική τους δραστηριότητα και την ικανότητά τους να αναστέλλουν την αντοχή της πολυφαρμακευτικής Ρ-γλυκοπρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά για τις περισσότερες ενώσεις [42].

Σε γενικό πλαίσιο, αποδεικνύεται πως οι αζωτούχες 1,2-πυραζολίνες με μία ομάδα φαινυλίου και υδροξυφαινυλίου στη δεύτερη και πέμπτη θέση του δακτυλίου, παρουσιάζουν αποτελεσματική αναστολή της ανάπτυξης του καρκίνου [43].

1.3.3.5 Αντιοξειδωτική δράση

Η αντιοξειδωτική δράση των πυραζολινών έχει απασχολήσει ιδιαίτερα τους μελετητές. Η ομάδα των Prasad R.Y. et.al ασχολήθηκε με τη σύνθεση 1,3,5-τριφαινυλο-2-πυραζολινών και μελέτησε την αντιοξειδωτική τους δράση κάνοντας δοκιμές με διάφορες δραστικές μορφές οξυγόνου. Οι παρασκευασθείσες ενώσεις επέδειξαν εμφανέστερη αντιοξειδωτική δράση στη δέσμευση ελευθέρων ριζών και επίσης παρεμπόδισαν την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Αποδείχθηκε ότι η παρουσία μιας ομάδας-δότη ηλεκτρονίων στην 4 θέση του φαινυλοδακτυλίου είναι απαραίτητη για αυτές τις 2-πυραζολίνες προκειμένου να έχουν αξιολογηθεί αντιοξειδωτική δράση [44].

Επιπλέον, έγιναν έρευνες για τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες ορισμένων παραγώγων γαλλουόλο-2-πυραζολινών, ενώ εξετάστηκε ακόμη η ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Η πλειονότητα των ενώσεων που εξετάστηκαν

έδειξαν ότι έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση έναντι της DPPH ρίζας ,όπως επίσης ότι είναι ισχυροί παρεμποδιστές του σχηματισμού μονοξειδίου του αζώτου [45].

1.3.4 Μέθοδοι σύνθεσης

Πριν περίπου 100 χρόνια, οι Fischer και Knovenagel περιέγραψαν τη σύνθεση μιας πυραζολίνης, μέσω αντίδρασης της φαινυλιδραζίνης με την ακρολεΐνη [46]. Η αναφορά αυτή αποτελεί και το πρώτο παράδειγμα σχηματισμού πυραζολίνης μέσω αντίδρασης μιας α,β -ακόρεστης καρβονυλικής ένωσης με παράγωγο υδραζίνης. Ο σχηματισμός της 1-φαινυλο-2-πυραζολίνης με τον τρόπο αυτό επιβεβαιώθηκε από τον Auwers κ.α [47], [48]. Ακολουθώντας αυτές τις πρωτοποριακές έρευνες, η αντίδραση α,β -ενονών με υδραζίνες κατέστησε δυνατή την προετοιμασία αμέτρωτων πυραζολινών.

Ακόμη ένα ορόσημο για τον σχηματισμό πυραζολινών αποτέλεσε η ανακάλυψη της αντίδρασης διαζωαλκανίων με α,β -ακόρεστα καρβοξυλικά οξέα και α,β -ενόες, στις αρχές του εικοστού αιώνα. Ειδικά το διαζωμεθάνιο, ως πηγή αζώτου, έκανε δυνατή την παρασκευή πολυάριθμων 1-πυραζολινών, οι οποίες θα μπορούσαν ύστερα να μετατραπούν στα αντίστοιχά τους ισομερή ή κυκλοπροπάνια 2-πυραζολινών για απονίτρωση. [49-53]

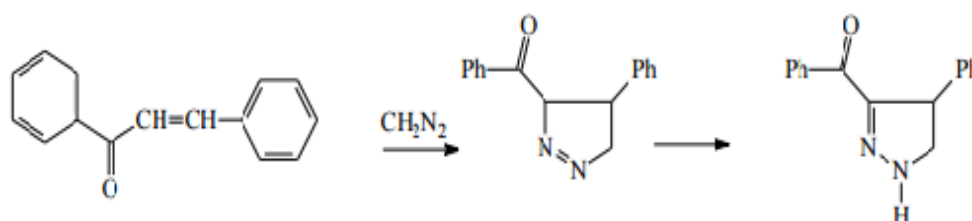
1.3.4.1 Σύνθεση πυραζολινών μέσω αντίδρασης α,β -ακόρεστων κετονών με διαζωμεθάνιο

Παρά το ότι πολλά διαζωαλκάνια είναι διαθέσιμα για την παρασκευή των πυραζολινών λόγω της υψηλής τους δραστηριότητας, αυτό που κυρίως χρησιμοποιείται είναι το διαζωμεθάνιο. Το διαζωμεθάνιο παρασκεύασε για πρώτη φορά το 1894 ο Rechmann, μέσω αντίδρασης του N-νιτροσουρεθανίου με υδροξείδιο του καλίου [54]. Το διαζωμεθάνιο, ύστερα από αντίδραση με φουμαρικό διμεθύλιο, έδωσε μια ένωση πυραζολινικού τύπου. Το πρωτογενές προϊόν αυτής της κυκλοπροσθήκης, αποδείχθηκε πως είναι μια 1-πυραζολίνη, η οποία στη συνέχεια ισομερίζεται αυθόρμητα, μέσω μετατόπισης 1,3-H, σε 2-πυραζολίνη που αποτελεί ένα θερμοδυναμικά πιο σταθερό ισομερές. [55]

Σχετικά με τη σύνθεση των πυραζολινών μέσω διαζωαλκανίων, έχουν αναφερθεί διάφορες ανωμαλίες. Η πιο συχνή από αυτές είναι ο σχηματισμός μιας πυραζόλης, ως αποτέλεσμα είτε μιας αντίδρασης απόσπασης είτε οξείδωσης της αρχικώς σχηματιζόμενης πυραζολίνης, από την κυκλοπροσθήκη της ακόρεστης ένωσης και του διαζωαλκανίου [56-58].

Η πρώτη παρασκευή μιας πυραζολίνης από αντίδραση μιας α,β-ακόρεστης κετόνης με ένα διαζωαλκάνιο δημοσιεύτηκε από τον Azzarello το 1906 [59]. Παρατηρήθηκε ο σχηματισμός της 3-ακετυλο-4-φαινυλο-2-πυραζολίνης ύστερα από αντίδραση της βενζοκετόνης με διαζωμεθάνιο σε άνυδρο αιθέρα. Η αντίδραση αυτή επαναλήφθηκε αργότερα από τους Smith και Howard [60], και από τους Raju και Rao [61], οι οποίοι επιβεβαίωσαν τον ισχυρισμό του Azzarello. [55]

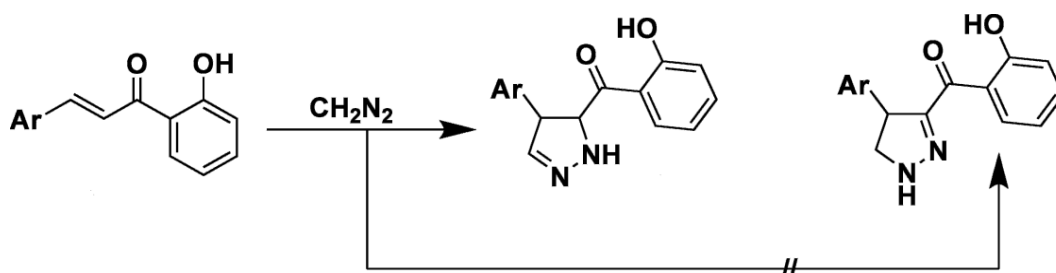
Το 1937 πραγματοποιήθηκαν κάποια παρόμοια πειράματα από τους Smith και Rings, οι οποίοι παρασκεύασαν την 3-βενζοϋλο-4-φαινυλο-1-πυραζολίνη, που στη συνέχεια ισομερίστηκε, υπό ήπια θέρμανση, σε 3-βενζοϋλο-4-φαινυλο-2-πυραζολίνη. (Σχήμα 10) [62]



Σχήμα 10: Σχηματισμός της 3-βενζοϋλο-4-φαινυλο-1-πυραζολίνης.

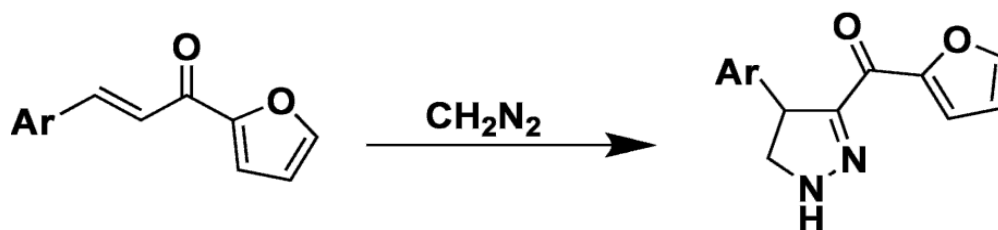
Τα επόμενα χρόνια συνέχισαν να πραγματοποιούνται αντιδράσεις διαζωμεθανίου με διάφορες α,β-ακόρεστες κετόνες. Πιο συγκεκριμένα, οι Mustafa και Freifel απέδειξαν πως η κατεργασία κατάλληλων χαλκονών με αιθερικό διαζωμεθάνιο υπό κανονικές συνθήκες επιδρά στο διπλό δεσμό της κετόνης, σχηματίζοντας τις αντίστοιχες πυραζολίνες. Εναλλακτικές κατευθύνσεις που να οδηγούν σε ετεροκυκλικούς δακτυλίους, καθώς και στη μεθυλίωση της υδροξυλομάδας δεν

παρατηρήθηκαν (Σχήμα 11) [63]. Έρευνες με παρόμοια αποτελέσματα πραγματοποιήθηκαν και από διάφορους άλλους μελετητές [64].



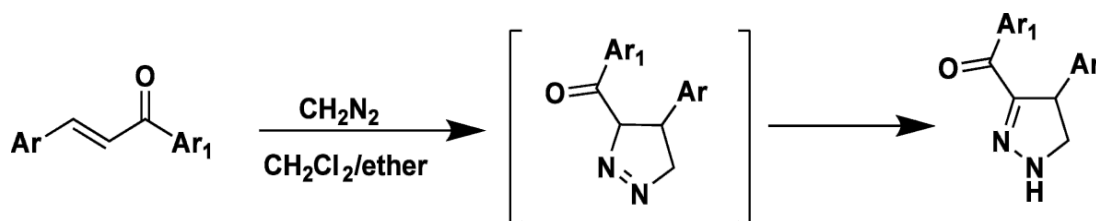
Σχήμα 11: Σχηματισμός πυραζολινών από αιθερικό διαζωμεθάνιο.

Από την άλλη πλευρά, ο Aleksandrova και διάφοροι άλλοι ανέφεραν τον σχηματισμό της 4-αρυλο-3-(2-φουροϋλ)-2-πυραζολίνης, όταν φουρυλικά ανάλογα κατάλληλης χαλκόνης αντιδρούν με διαζωμεθάνιο. (Σχήμα 12) [65]



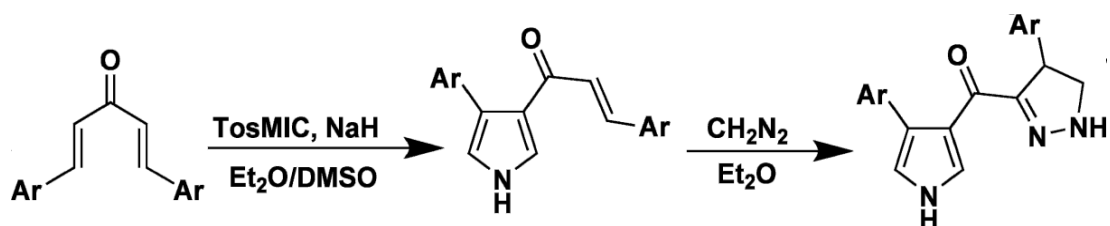
Σχήμα 12: Σχηματισμός της 4-αρυλο-3-(2-φουροϋλ)-2-πυραζολίνης.

Αργότερα, δημιουργήθηκε η ανάγκη για πιο λεπτομερείς έρευνες για τις αντιδράσεις μεταξύ των α , β -ακόρεστων κετονών και διαζωμεθανίου και για τα προϊόντα τους. Έτσι, αποδείχθηκε πως η κυκλοπροσθήκη κατάλληλων χαλκόνων και διαζωμεθανίου είναι μια τοποεκλεκτική διαδικασία που παρέχει 3-αροϋλο-4-αρυλ-2-πυραζολίνες, πιθανότατα μέσω ενός ενδιάμεσου ετεροκυκλικού δακτυλίου (Σχήμα 13) [66].



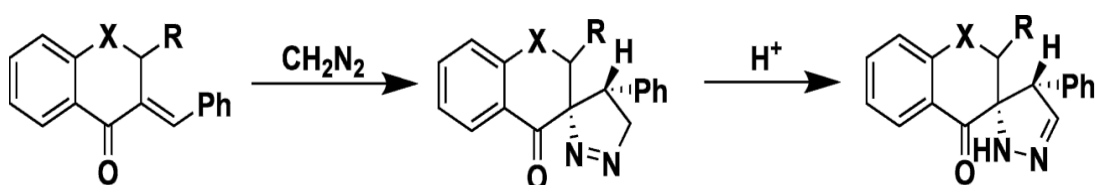
Σχήμα 13: Σχηματισμός 3-αροϋλο-4-αρυλ-2-πυραζολινών μέσω ενδιάμεσου ετεροκυκλικού δακτυλίου.

Ο Radmanathi και άλλοι μελέτησαν τις αντιδράσεις των ετεροκυκλικών αναλόγων χαλκωνών που λαμβάνονται από την αντίδραση κατάλληλων κετονών και διαζωμεθανίου (Σχήμα 14). Αποδείχθηκε πως η κατεργασία αυτή δίνει ένα στερεό το οποίο ταυτοποιήθηκε ως (40-αρυλο-40,50-διωδρο-10Η-πυραζολ-30-υλο) - (4-αρυλ-1 Η-πυρρολ-3-υλο) μεθανόνη [67].

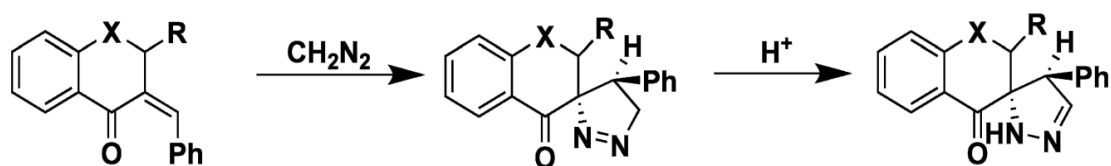


Σχήμα 14: Αντιδράσεις ετεροκυκλικών αναλόγων χαλκωνών που λαμβάνονται από την αντίδραση κατάλληλων κετονών και διαζωμεθανίου.

Αντιδράσεις διαζωαλκανίων με εξωκυκλικά ακόρεστες κετόνες οδηγούν στο σχηματισμό σπιρο-πυραζολινών. Ανάλογα με τη διαμόρφωση της αρχικής κυκλικής α,β-ακόρεστης κετόνης, οι αντιδράσεις αποδίδουν είτε trans ισομερή είτε τις cis μορφές τους.



Σχήμα 15 : trans ισομερή σπιρο-1-πυραζολινών και σπιρο-2-πυραζολινών

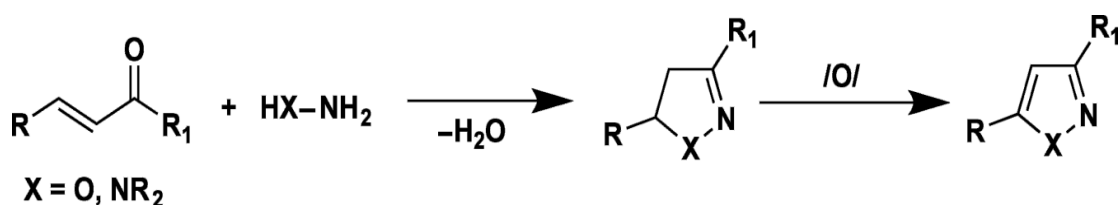


Σχήμα 16 : cis ισομερή σπιρο-1-πυραζολινών και σπιρο-2-πυραζολινών

Οι σπιρο-1-πυραζολίνες αποτελούν πολύ σταθερά ετεροκυκλικά ανάλογα. Η ισομερίωσή τους σε σπιρο-2-πυραζολίνες μπορεί να διεξαχθεί υπό όξινες συνθήκες σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες, στην περίπτωση των *cis* ισομερών, και για περισσότερο από 1 μήνα στην περίπτωση του *trans* ισομερών. [68], [69], [70]

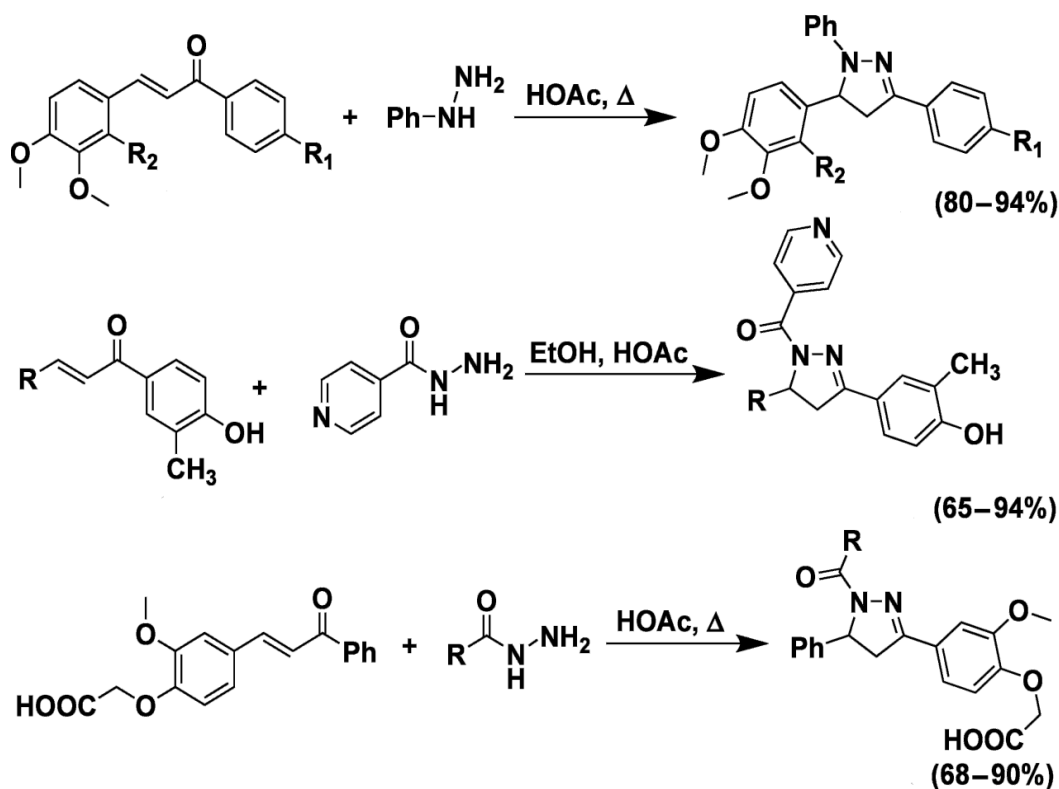
1.3.4.2 Σύνθεση πυραζολινών μέσω αντιδράσεων με υδραζίνες και υδροξυλαμίνες

Η πιο γνωστή και εύχρηστη μέθοδος σύνθεσης πενταμελών ετεροκυκλικών ενώσεων που φέρουν άζωτο είναι η συμπύκνωση που περιλαμβάνει α, β-ακόρεστα καρβονύλια και 1,2-διπυρηνόφιλες ενώσεις, π.χ. παράγωγα της υδραζίνης και της υδροξυλαμίνης [71], [72].



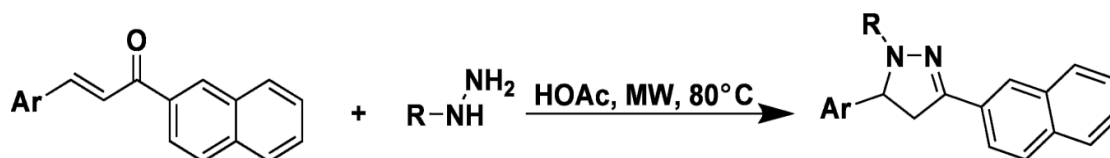
Σχήμα 17 : Σύνθεση πυραζολινών με συμπύκνωση που περιλαμβάνει α, β-ακόρεστα καρβονύλια και 1,2-διπυρηνόφιλες ενώσεις

Αυτές οι αντιδράσεις διεξάγονται αποτελεσματικότερα κάτω από όξινες συνθήκες - με την παρουσία μεταλλικών ή οργανικών οξέων - ή χωρίς κατάλυση. Για παράδειγμα οι Palaska [73] και Fathi [74] ανέφεραν τη σύνθεση πυραζολινών σε υψηλές αποδόσεις με την αντίδραση ακόρεστων κετονών και τη φαινυλδραζίνη σε παγόμορφο οξικό οξύ. Παρόλα αυτά, οι Ν'-νικοτινοϋλ-υποκατεστημένες πυραζολίνες παραλαμβάνονται από την αντίδραση κατάλληλων χαλκονών και ισονικοτινυλο-υδραζίνης σε αιθανόλη με καταλυτικές ποσότητες οξικού οξέος [75]. Οι αντιδράσεις με μια άλλη υδραζίνη που οδηγεί στο σχηματισμό των πυραζολινών, διεξάγονται επίσης σε οξικό οξύ [76].



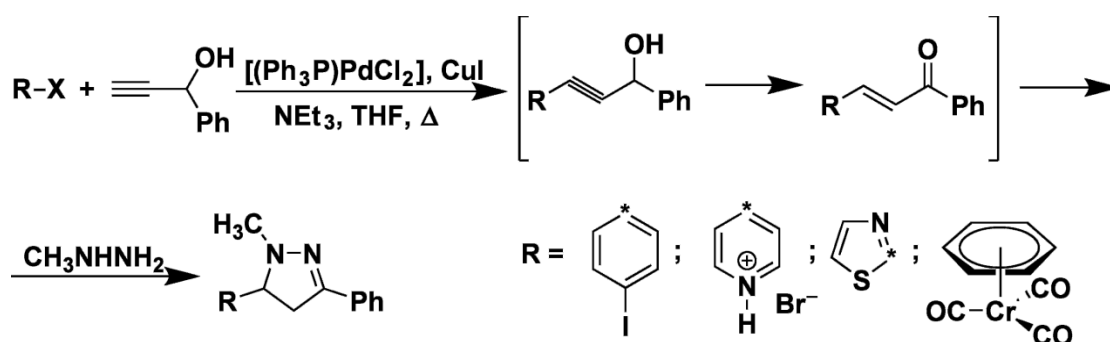
Σχήμα 18 : Παρασκευή πυραζολινών με συμπύκνωση που περιλαμβάνει α , β -ακόρεστα καρβονύλια και 1,2-διπυρηνόφιλες ενώσεις υπό όξινες συνθήκες.

Για να επιταχυνθούν οι ρυθμοί των αντιδράσεων και να αυξηθούν οι αποδόσεις τους, ορισμένες φορές εφαρμόζονται διαδικασίες υποβοηθούμενες από μικροκύματα. Οι Kidwai κ.α. [77] περιέγραψαν τη σύνθεση 1,3,5-τριαρυλοπυραζολινών μέσω της κυκλοποίησης των χαλκονών με φαινυλδραζίνη με τη βοήθεια βασικού στερεού υποστρώματος από αλούμινα. Οι ετεροκυκλικές ενώσεις-στόχοι συνετέθησαν κάτω από ακτινοβολία με μικροκύματα σε υψηλές αποδόσεις (έως 85%) σε 1-2 λεπτά, σε αντίθεση με τις 3h στην περίπτωση θερμικής ενεργοποίησης. Μια άλλη δημοσίευση [78] ασχολείται με την ταχύτατη (2-12min) κυκλοποίηση σε υγρή φάση ναφθυλο-υποκατεστημένων χαλκονών και υδραζινών σε περιβάλλον με μικροκύματα, προς την παρασκευή των κατάλληλων πυραζολινών.



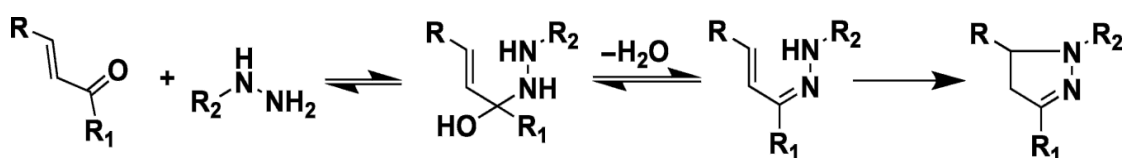
Σχήμα 19 : Κυκλοποίηση σε υγρή φάση ναφθυλο-υποκατεστημένων χαλκονών και υδραζινών σε περιβάλλον με μικροκύματα, προς την παρασκευή των κατάλληλων πυραζολινών

Η σύνθεση των πυραζολινών μπορεί να επιτευχθεί και με μια διαδικασία ενός βήματος, χωρίς την αρχική απομόνωση της α, β-ακόρεστης κετόνης. Για παράδειγμα, η διαδοχική αντίδραση αρυλαλογονιδίων, που φέρουν ισχυρούς υποκαταστάτες δότες ηλεκτρονίων, με αλκυνολο-αλκοόλες και στη συνέχεια με μεθυλδραζίνη δίνει πυραζολίνες σε υψηλές αποδόσεις. Φαίνεται ότι η αντίδραση αρχικά σχηματίζει ενδιάμεσο προϊόν αντίδρασης Sonogashira, το οποίο σε τετραϋδροφουράνιο με την παρουσία NEt₃ οδηγεί στην παραγωγή χαλκόνης. Στη συνέχεια το προϊόν υποβάλλεται σε προσθήκη Michael με υδραζίνη σχηματίζοντας την πυραζολίνη .



Σχήμα 20 : Σύνθεση πυραζολινών σε ένα στάδιο χωρίς την αρχική απομόνωση της α, β-ακόρεστης κετόνης

Ο μηχανισμός της αντίδρασης που περιλαμβάνει τις α, β-ακόρεστες κετόνες και τις υδραζίνες έχει μελετηθεί εκτενώς, με βάση τις σχετικές βιβλιογραφικές αναφορές [68],[79-87]. Το πρώτο βήμα είναι η προσθήκη της υδραζίνης στην καρβονυλομάδα της κετόνης. Η κυκλοποίηση που ακολουθεί με την προσθήκη ενός πυρηνόφιλου κέντρου στο δεσμό αιθυλενίου κάτω από όξινες συνθήκες είναι το καθοριστικό για την ταχύτητα στάδιο. Η ταχύτητα αυτής της αντίδρασης επηρεάζεται σημαντικά από τη στεreoχημεία και την ηλεκτρονιακή δομή της ενδιάμεσης υδραζόνης.

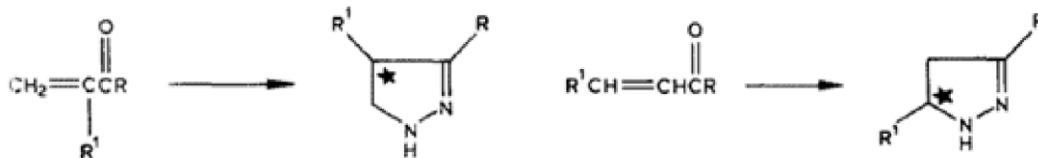


Σχήμα 21 : Μηχανισμός σχηματισμού πυραζολινών από α, β-ακόρεστες κετόνες και τις υδραζίνες

Παρά το γεγονός ότι τα ενδιάμεσα παράγωγα συνήθως δεν απομονώνονται από το μίγμα της αντίδρασης, το συμπέρασμα για το σχηματισμό της υδραζόνης (τουλάχιστον σε όξινες συνθήκες) στις περισσότερες περιπτώσεις βασίζεται σε πειραματικά δεδομένα και είναι αδιαμφισβήτητο. Η εξάρτηση της διεύθυνσης του πρώτου σταδίου της αντίδρασης των παραγώγων υδραζίνης με τις ακόρεστες κετόνες, από το όξινο περιβάλλον και άλλους παράγοντες, έχει μελετηθεί εκτενώς [88],[89].

Το στεreoχημικό αποτέλεσμα της γενικής αντίδρασης των α,β-ακόρεστων κετονών με τις υδραζίνες που οδηγεί στο σχηματισμό 2-πυραζολινών, μπορεί σε γενικές γραμμές να ποικίλει ανάλογα με τον αριθμό και τη θέση των υποκαταστατών στο αρχικό μόριο της κετόνης.

Η εισαγωγή δευτέρου υποκαταστάτη στη θέση 2 ή 3 της ακόρεστης κετόνης οδηγεί σε 3,4-εναντιομερή ή αντίστοιχα σε 3,5 δισυποκατεστημένες 2-πυραζολίνες με χειρόμορφο κέντρο στη θέση 4 ή 5.



Σχήμα 22 : Σύνθεση 3,4-εναντιομερών ή 3,5 δισυποκατεστημένων 2-πυραζολίνες με χειρόμορφο κέντρο στη θέση 4 ή 5.

Ο τρίτος υποκαταστάτης στη 2 θέση της ακόρεστης κετόνης οδηγεί σε 1,2 ασύμμετρη επαγωγή σχετική με τη θέση 4 ή 5 της σχηματισμένης πυραζολίνης, προκαλώντας το σχηματισμό 3,4,5-τρισυποκατεστημένων 2-πυραζολινών.



Σχήμα 23 : Σύνθεση 3,4,5-τρισυποκατεστημένων 2-πυραζολινών

Οι 1,3,3-τρισυποκατεστημένες α,β-ακόρεστες κετόνες σχηματίζουν εναντιομερείς 3,5,5-τρισυποκατεστημένες 2-πυραζολίνες.



Σχήμα 24: Σύνθεση εναντιομερών 3,5,5-τρισυποκατεστημένων 2-πυραζολινών.

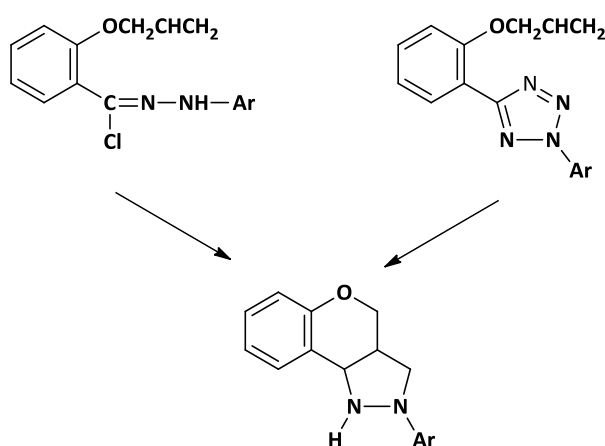
Τελικά ο σχηματισμός διαστερομερών πυραζολινών είναι επίσης χαρακτηριστικός για τις 1,2,3,3-τετραϋποκατεστημένες α,β-ακόρεστες κετόνες.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η διαμόρφωση της αρχικής α,β-ακόρεστης κετόνης και η ακόλουθη ακυλίωση στο άτομο του αζώτου στην 1 θέση δεν επηρεάζουν το στερεοχημικό αποτέλεσμα της αντίδρασης σχηματισμού πυραζολίνης. Εάν

υπάρχουν χειρόμορφα κέντρα στην αρχική α,β-ακόρεστη κετόνη, η στεreoχημεία του σχηματισμού της πυραζολίνης γίνεται πιο περίπλοκη [90].

1.3.4.3 Σύνθεση 2-πυραζολινών μέσω κυκλοπροσθήκης αμινών νιτριλίου

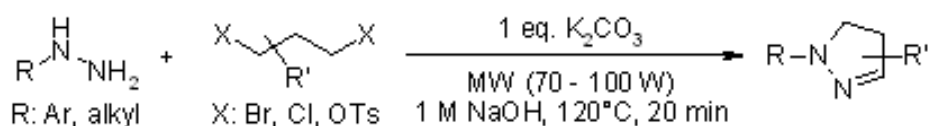
Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σύνθεση των τρικυκλικών 2-πυραζολινών, που πραγματοποιείται μέσω ενδομοριακής 1,3-διπολικής κυκλοπροσθήκης ιμινών νιτριλίου [91-93]. Μέσω της διαδικασίας αυτής έχουν παρασκευαστεί 2, 3, 3α, 4-τετραϋδρο-2-αρυλο[1]βενζοπυρανο[4,3-c]πυραζολίνες, είτε από το 1-(ο-αλλυλοξυφαινυλ)-N-(αρυλhydrazidoyl) χλωρίδιο σε επεξεργασία με τριαιθυλαμίνη, είτε από την ακτινοβολία της 2-αρυλ-5-(ο-αλλυλοξυφαινυλ) τετραζόλης.



Σχήμα 25 : Σύνθεση τρικυκλικών 2-πυραζολινών μέσω ενδομοριακής 1,3-διπολικής κυκλοπροσθήκης ιμινών νιτριλίου

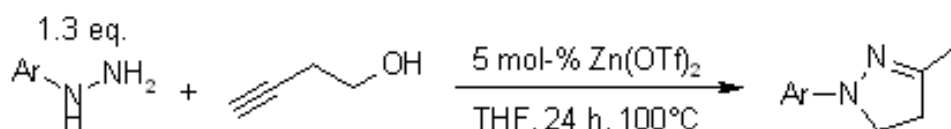
1.3.4.4 Άλλες μέθοδοι σύνθεσης πυραζολινών

Πρόσφατα, οι Varma κ.α. πραγματοποίησαν τη σύνθεση αζωτούχων ετεροκυκλικών ενώσεων από αλκυλο-διαλογονίδια, πρωτοταγείς αμίνες και υδραζίνες, μέσω μιας απλής και αποτελεσματικής αντίδρασης κυκλοσυμπύκνωσης, χρησιμοποιώντας μικροκυματική ακτινοβολία [94].



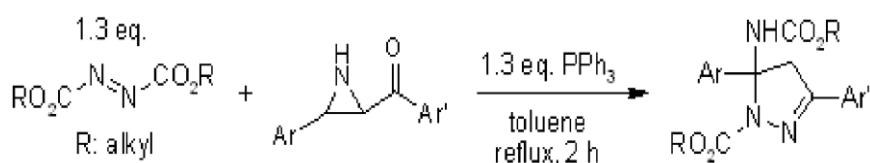
Σχήμα 26 : Σύνθεση πυραζολινών μέσω κυκλοσυμπύκνωσης με τη χρήση μικροκυμάτων

Σύμφωνα με τους Alex, Tillack, Schwarz, και Beller, οι αρυλοδραζίνες αντιδρούν τοποεκλεκτικά με την 3-βουτινόλη παρουσία καταλυτικής ποσότητας τριφλικού ψευδαργύρου και παρέχουν αρυλοϋποκατεστημένες πυραζολίνες. Τα προκύπτοντα προϊόντα εύκολα οξειδώνονται σε μια διαδικασία ενός σταδίου στις αντίστοιχες πυραζόλες [95].



Σχήμα 27 : Σύνθεση αρυλοϋποκατεστημένων πυραζολινών

Μία καινούρια, αποτελεσματική και σειριακή αντίδραση μεταξύ 2-ακυλοαζιριδινών και Huisgen zwitterions οδηγεί στο σχηματισμό 2-πυραζολινών σε εξαιρετικές αποδόσεις [96].



Σχήμα 28 : Σύνθεση 2-πυραζολινών από 2-ακυλοαζιριδίνες και Huisgen zwitterions

1.4 ANΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

1.4.1 Γενικά

Τα αντιοξειδωτικά αποτελούν αναστολείς της διαδικασίας οξείδωσης, ακόμη και σε σχετικά μικρές συγκεντρώσεις και έτσι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Τα αντιοξειδωτικά συστατικά από τα φυτά δρουν ως δεσμευτές των πολύ δραστικών ελευθέρων ριζών, βοηθώντας έτσι στη μετατροπή τους σε λιγότερο δραστικές ενώσεις. Οι ενώσεις αυτές στα τρόφιμα διαδραματίζουν αξιοσημείωτο ρόλο ως παράγοντες προστασίας της υγείας. Επιστημονικά στοιχεία δείχνουν ότι τα αντιοξειδωτικά μειώνουν τον κίνδυνο για χρόνιες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου και των καρδιακών παθήσεων. Πρωτογενείς πηγές των φυσικών αντιοξειδωτικών είναι τα δημητριακά ολικής αλέσεως, τα φρούτα και τα λαχανικά. Φυτικά τρόφιμα που προέρχονται από αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, τα καροτένια, τα φαινολικά οξέα και τα φυτοοιστρογόνα έχουν αναγνωριστεί ως βασικοί παράγοντες μείωσης του κινδύνου κάποιας ασθένειας. Οι περισσότερες από τις αντιοξειδωτικές ενώσεις σε μια τυπική διαίτα προέρχονται από φυτικές πηγές και ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες ενώσεων με μια ευρεία ποικιλία φυσικών και χημικών ιδιοτήτων.

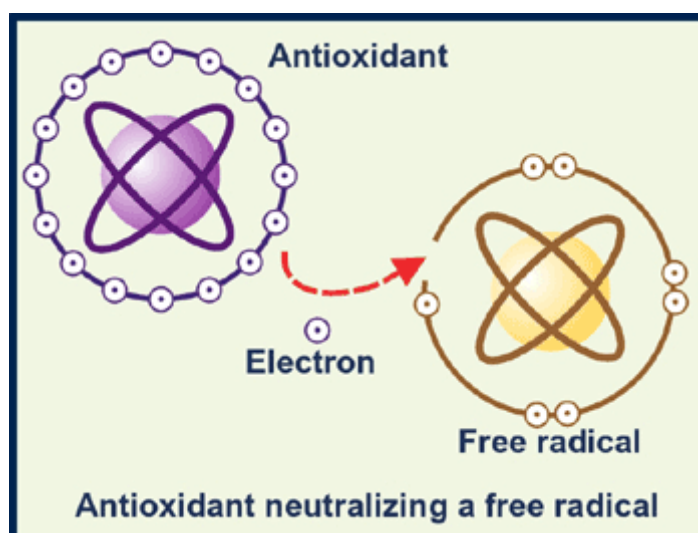
Το κύριο χαρακτηριστικό ενός αντιοξειδωτικού είναι η ικανότητά του να παγιδεύει τις ελεύθερες ρίζες. Οι υψηλής δραστηριότητας ελεύθερες ρίζες και οι δραστικές ομάδες οξυγόνου βρίσκονται σε βιολογικά συστήματα από μία ευρεία ποικιλία πηγών. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να οξειδώνουν τα νουκλεϊκά οξέα, τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια ή το DNA και μπορούν ακόμη να ενεργοποιήσουν μία εκφυλιστική ασθένεια. Αντιοξειδωτικά όπως είναι τα φαινολικά οξέα, οι πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή παγιδεύουν τις ελεύθερες ρίζες, όπως το υπεροξειδίο, το υδροϋπεροξειδίο ή το λιπίδιο υπεροξυλίου και έτσι αναστέλλουν τους οξειδωτικούς μηχανισμούς που οδηγούν σε εκφυλιστικές ασθένειες.

Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα ή μόρια που φέρουν ένα μονήρες ηλεκτρόνιο. Όταν μια ελεύθερη ρίζα προσβάλλει ένα μόριο, τότε αυτό θα γίνει μια ελεύθερη ρίζα το

ίδιο, προκαλώντας μια αλυσιδωτή αντίδραση η οποία μπορεί να οδηγήσει στην καταστροφή του κυττάρου. Οι δραστικές ομάδες οξυγόνου, ROS, εμπλέκονται ουσιαστικά στην αποτοξίνωση, όταν χημικές ουσίες εισβάλλουν σε έναν οργανισμό, αλλά η περίσσειά τους προκαλεί την υπεροξειδωση λιπιδίων σε υγιή κύτταρα. Τα αντιοξειδωτικά είναι ουσίες, οι οποίες όταν υπάρχουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις καθυστερούν ή αποτρέπουν την οξείδωση του εν λόγω υποστρώματος. Ο βασικός ρόλος των αντιοξειδωτικών είναι να παρακολουθούν και να αντιδρούν με ελεύθερες ρίζες, αποτρέποντας τις αλυσιδωτές συνέπειες διάδοσης των ROS, μέσω της δωρεάς πρωτονίων του αντιοξειδωτικού στα ROS. Ωστόσο, όταν το αντιοξειδωτικό εξουδετερώνει μια ελεύθερη ρίζα καθίσταται ανενεργό. Ως εκ τούτου, το σώμα μας θα πρέπει να εφοδιάζεται συνεχώς με αντιοξειδωτικά [97].

Η αντιοξειδωτική δράση μιας ουσίας αποδிகνύεται από τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Σάρωση ριζών οξυγόνου
- Αναστολή κυτταρικής οξείδωσης
- Καταστολή του σχηματισμού του ROS. [97]



Εικόνα 10 : Προσφορά του ηλεκτρονίου από την αντιοξειδωτική ένωση, προς εξουδετέρωση της ελεύθερης ρίζας.

Η πρόσληψη αντιοξειδωτικών ουσιών που απαντώνται στις τροφές είναι ένας βασικός παράγοντας υγείας. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά στις τροφές και σε άλλα βιολογικά υλικά τυγχάνουν ιδιαίτερου ενδιαφέροντος λόγω του γεγονότος ότι αφενός μεν είναι ασφαλής η πρόσληψή τους αφετέρου δε, παρουσιάζουν σημαντικά θρεπτικά και θεραπευτικά αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό, διάφορα καρυκείματα τροφών και βότανα που περιέχουν αντιοξειδωτικές ουσίες, παρουσιάζονται ως σημαντικοί παράγοντες ανανέωσης και νεότητας. Πολλές κλινικές μελέτες υποδηλώνουν ότι τα αντιοξειδωτικά στα φρούτα, τα λαχανικά, το τσάι και το κόκκινο κρασί είναι οι κύριοι παράγοντες για την παρατηρούμενη αποτελεσματικότητα αυτών των τροφίμων στη μείωση της συχνότητας εμφάνισης των χρόνιων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων των καρδιακών παθήσεων και μερικών ειδών καρκίνου [98].

Οι Miller και Rigelhof είναι αυτοί που κυρίως μελέτησαν την δραστικότητα παγίδευσης των ελευθέρων ριζών, των αντιοξειδωτικών, στα τρόφιμα [99],[100].



Εικόνα 11 : Τροφές πλούσιες σε αντιοξειδωτικά

Κατά τα τελευταία χρόνια, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες δοκιμές για την ικανότητα απορρόφησης των ριζών οξυγόνου, καθώς και προσδιορισμοί ενισχυμένης χημειοφωταύγιας, έτσι ώστε να αξιολογηθεί η αντιοξειδωτική δράση

των τροφίμων, των ορών και άλλων βιολογικών υγρών. Οι μέθοδοι αυτοί απαιτούν ειδικό εξοπλισμό και τεχνικές ικανότητες για την ανάλυση. Τα διαφορετικά είδη μεθόδων που έχουν δημοσιευτεί για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των τροφίμων εμπεριέχουν ηλεκτρόνια μαγνητικού συντονισμού, καθώς και μεθόδους χημειοφωταύγειας. Αυτές οι αναλυτικές μέθοδοι μελετούν την δραστικότητα των αντιοξειδωτικών κατά των ελευθέρων ριζών, όπως είναι η 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ρίζα, η ρίζα ανιόντος υπεροξειδίου (O₂), η ρίζα υδροξυλίου (OH), ή η ρίζα υπεροξυλίου (ROO). Τα αποτελέσματά τους ποικίλουν ανάλογα με την ελεύθερη ρίζα που χρησιμοποιείται ως αντιδρών.

1.4.2 Ταξινόμηση αντιοξειδωτικών

Ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους:

- Αναστολείς λιπιδικής υπεροξείδωσης-αρωματικές ενώσεις με ένα αδύναμο δεσμό -OH, -NH
- Αναστολείς οξειδωσης με την παγίδευση ριζών αλκυλίου
- Αποσυνθετές υδροϋπεροξειδίου: δρουν χωρίς το σχηματισμό ελευθέρων ριζών
- Χημικές ενώσεις: σχηματισμός συμπλόκων με μεταλλικά ιόντα
- Πολλαπλά στάδια δράσης: περιέχουν ενώσεις (αλκοόλες και αμίνες) που μπορούν να αναγεννηθούν κατά την διαδικασία της οξειδωσης.
- Αναστολείς με συνδυασμένη δράση : δύο ή περισσότερες λειτουργικές ομάδες, που αντιδρούν σε διαφορετικές αντιδράσεις.

Ανάλογα με τη φύση τους:

- Φυσικά αντιοξειδωτικά
- Συνθετικά αντιοξειδωτικά

Ανάλογα με την βιολογική τους δραστικότητα:

- Βιο-αντιοξειδωτικές ενώσεις με βιολογικές και αντιοξειδωτικές δράσεις
- Αντιοξειδωτικά χωρίς βιολογική δράση

Ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών ομάδων:

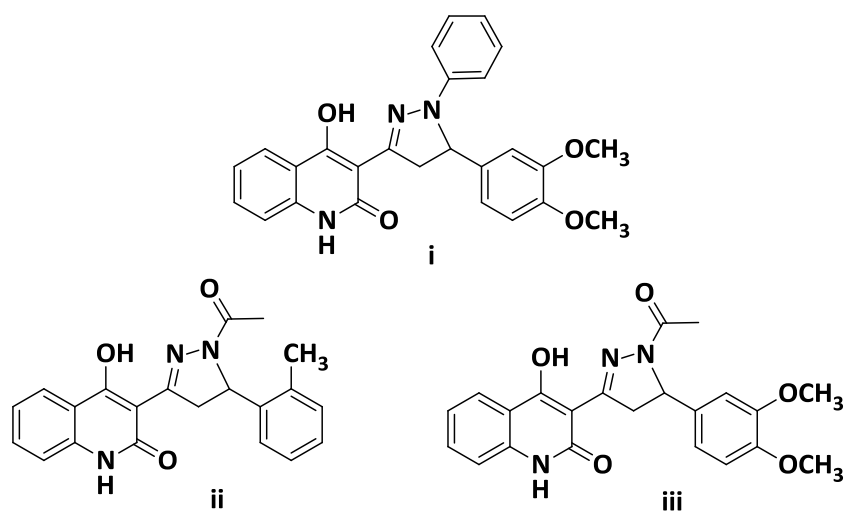
- Απλές φαινόλες
- Διφαινύλια
- Πολυφαινόλες [101]

2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο : ΣΧΕΔΙΑΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

2.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΝΕΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει σαν στόχο τη σύνθεση νέων πυραζολινικών αναλόγων, τα οποία θα εξεταστούν για πιθανή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.

Ο σχεδιασμός και η σύνθεση των νέων πυραζολινικών αναλόγων πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιώντας ως ενώσεις-οδηγούς, τις ενώσεις (i-iii) του παρακάτω σχήματος. Οι ενώσεις αυτές αποτελούν μέρος ερευνητικής δραστηριότητας του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ΕΜΠ, και εμφανίζουν αξιόλογη βιολογική δράση [102].



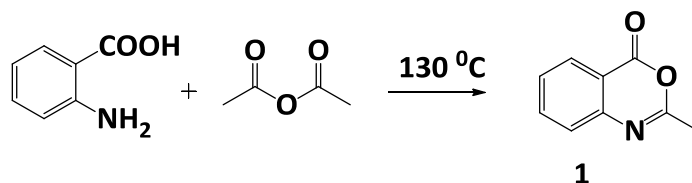
Σχήμα 29: Πυραζολινικά ανάλογα με αξιόλογη βιολογική δράση

2.1.1 Σύνθεση 3-υποκατεστημένων-4-υδροξυ-2-κινολινονών

Η μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται για τη σύνθεση μιας κατάλληλα 3-υποκατεστημένης-4-υδροξυ-2-κινολινόνης έχει αναπτυχθεί παλαιότερα στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας [103] και βασίζεται σε αντιδράσεις C-ακυλίωσης ενώσεων ενεργού μεθυλίου με επιλογή των κατάλληλων ακυλιωτικών μέσων, ώστε να επιτευχθεί η σύνθεση του επιθυμητού κάθε φορά ετεροκυκλικού καρβονυλικού παραγώγου.

2.1.1.1 Σύνθεση της 2-μεθυλο-4H-3,1-βενζοξαζιν-4-όνης (1)

Για τη σύνθεση της αρχικής ένωσης, 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνης (3), χρησιμοποιήθηκε ως ακυλιωτικό μέσο η 2-μεθυλο-4H-3,1-βενζοξαζιν-4-όνη (1), η οποία παρασκευάζεται με θέρμανση του ανθρανιλικού οξέος με οξικό ανυδρίτη (Σχήμα 30).



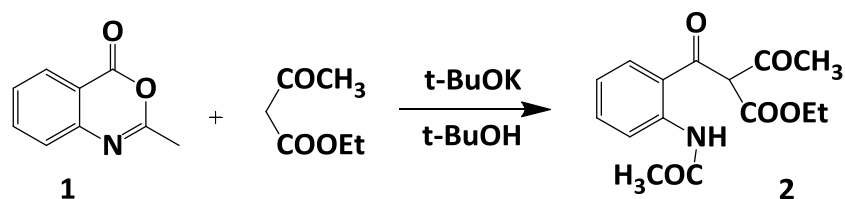
Σχήμα 30 : Σύνθεση της 2-μεθυλο-4H-3,1-βενζοξαζιν-4-όνης

Η 2-μεθυλο-4H-3,1-βενζοξαζιν-4-όνη (1) δεν είναι ιδιαίτερα σταθερή με αποτέλεσμα να πρέπει να χρησιμοποιείται άμεσα, καθώς εκτεθειμένη στην ατμόσφαιρα μετατρέπεται προς N-ακέτυλο ανθρανιλικό οξύ.

2.1.1.2 Σύνθεση του N-ακετυλανθρανυλο-ακετοξικού αιθυλεστέρα (2)

Με αντίδραση C-ακυλίωσης του ακετοξικού αιθυλεστέρα με ακυλιωτικό μέσο τη 2-μεθυλο-4H-3,1-βενζοξαζιν-4-όνη (1) σε βασικό περιβάλλον (διάλυμα tert-βουτοξυκαλίου σε διαλύτη tert-βοτυλική αλκοόλη) και ανάδευση 1.5 – 2 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος απομονώνεται το αντίστοιχο προϊόν C-ακυλίωσης, το

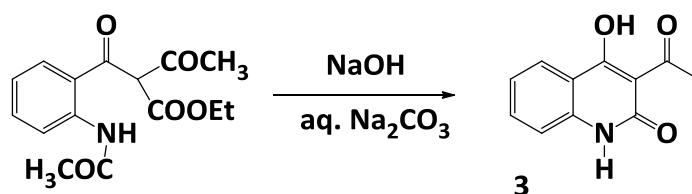
οποίο λαμβάνεται σε καθαρή στερεή μορφή και υψηλή απόδοση (70-90 %) (Σχήμα 31).



Σχήμα 31 : Αντίδραση C-ακυλίωσης ενώσεων ενεργού μεθυλίου

2.1.1.3 Σύνθεση της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνης (3)

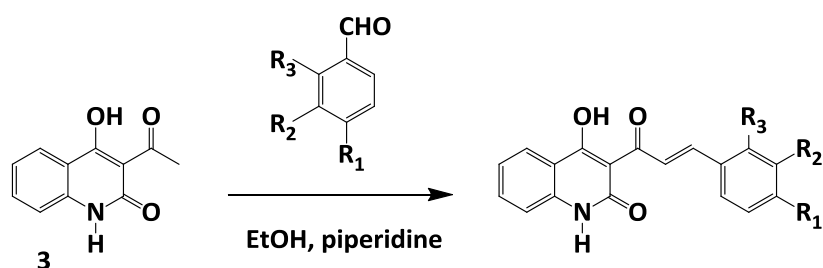
Με αντίδραση κυκλοποίησης του προϊόντος C-ακυλίωσης (2) σε αλκαλικό περιβάλλον (Na₂CO₃/NaOH), υπό ανάδευση 2 ωρών και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, λαμβάνεται σε στερεή μορφή η 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνη, χωρίς να απαιτεί περαιτέρω διεργασίες καθαρισμού.



Σχήμα 32 : Σύνθεση της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνης

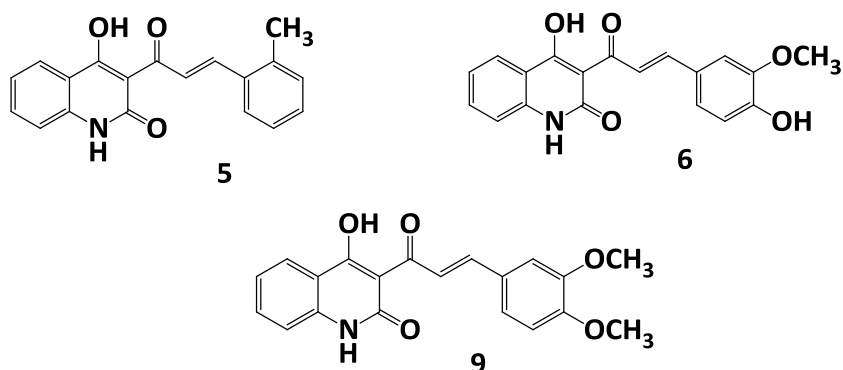
2.1.2 Σύνθεση υβριδικών μορίων κινολινών-χαλκόνων

Η σύνθεση των κινολινο-χαλκόνων πραγματοποιήθηκε μέσω αλδολικής συμπύκνωσης της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνης (3) με κατάλληλα υποκατεστημένες αρωματικές αλδεΐδες, παρουσία καταλυτικής ποσότητας πιπεριδίνης με θέρμανση στους 78⁰C (Σχήμα 33).



Σχήμα 33 : Σύνθεση κινολινο-χαλκονών (3)

Παρασκευάστηκαν συνολικά τρία υβριδικά μόρια κινολινο-χαλκονών (ενώσεις 5,6,9), τα οποία περιέχουν ομάδες με +R φαινόμενο (CH₃, OCH₃, OH, H) σε διάφορες θέσεις του δακτυλίου B.



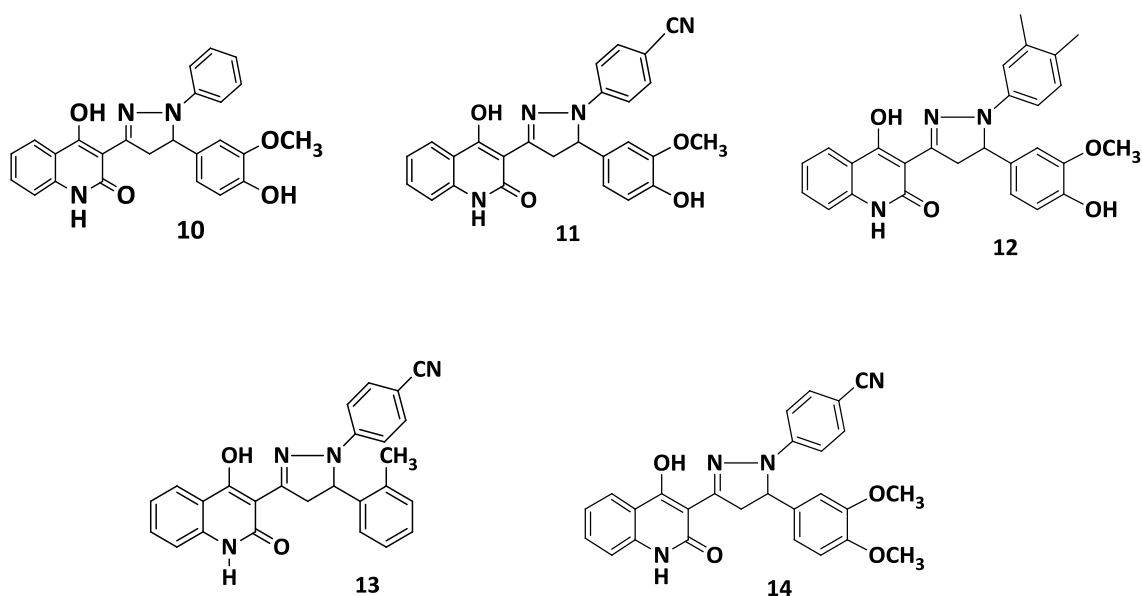
Σχήμα 34 : Υβριδικά ανάλογα κινολινο-χαλκονών

Οι ενώσεις αυτές παρασκευάστηκαν μέσω αντίδρασης αλδολικής συμπύκνωσης (Claisen – Schmidt condensation), όπως περιγράφεται στη θεωρία των κινολινο-χαλκονών.

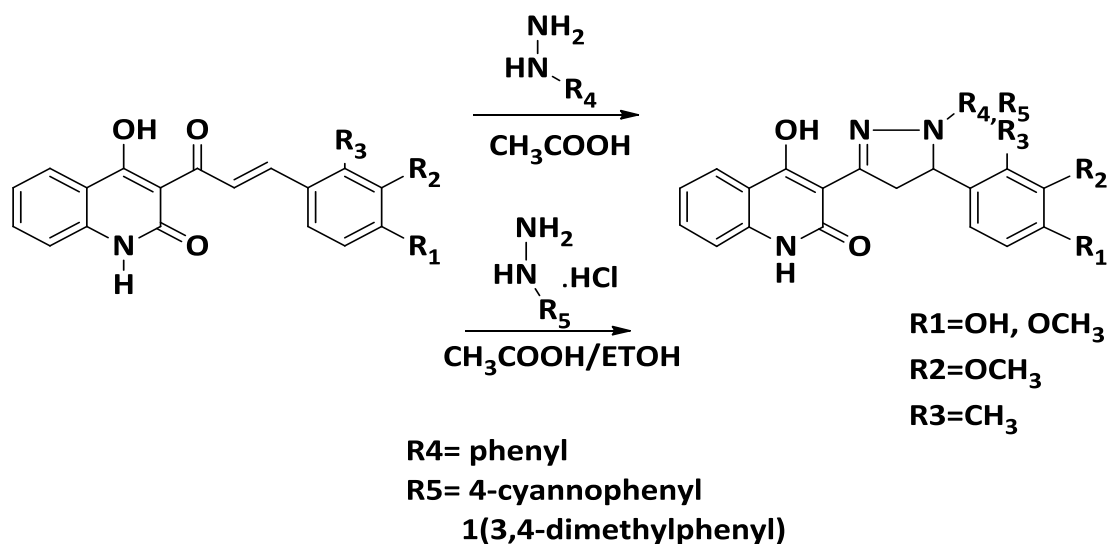
2.1.3 Πυραζολινικά ανάλογα

Η χημική τροποποίηση του α,β-ακόρεστου καρβονυλικού συστήματος των χαλκονών περιλαμβάνει την αντίδραση με παράγωγα υδραζίνης, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό ετεροκυκλικών πυραζολινικών αναλόγων.

Το πυραζολινικό ανάλογο **10** παρασκευάστηκε με θέρμανση χαλκόνης **6** με φαινυλυδραζίνη σε διαλύτη οξικό οξύ. Τα πυραζολινικά ανάλογα, **11-14**, παρασκευάστηκαν με θέρμανση της κινολινο-χαλκόνης, σε διαλύτη οξικό οξύ, με την αντίστοιχη υδραζίνη, σε διαλύτη απόλυτη αιθανόλη.

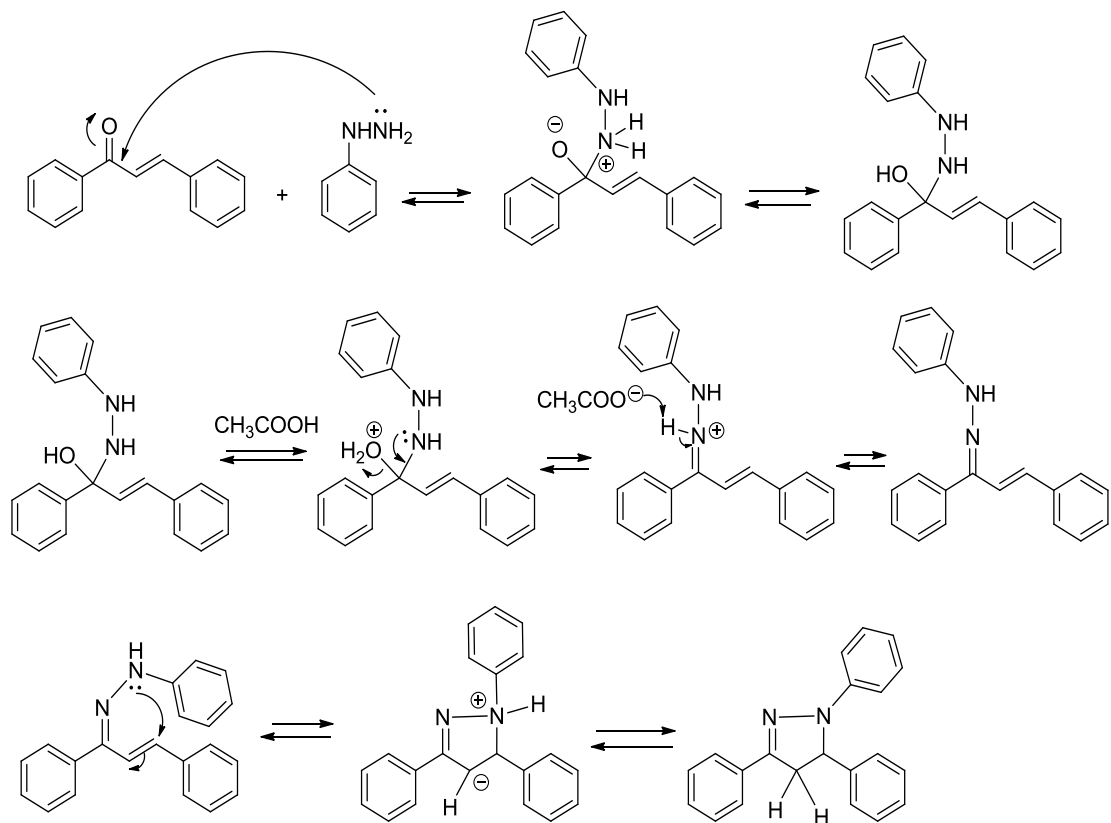


Σχήμα 35 : Πυραζολινικά ανάλογα κινολινο-χαλκονών.



Σχήμα 36 : Αντιδράσεις σχηματισμού πυραζολινικών παραγώγων.

Η τελική κύκλωση των ενδιάμεσων μορίων προς τον σχηματισμό των τελικών προϊόντων πραγματοποιείται λόγω των δύο ηλεκτρονιόφιλων κέντρων στο α,β-ακόρεστο καρβονυλικό σύστημα χαλκόνης.



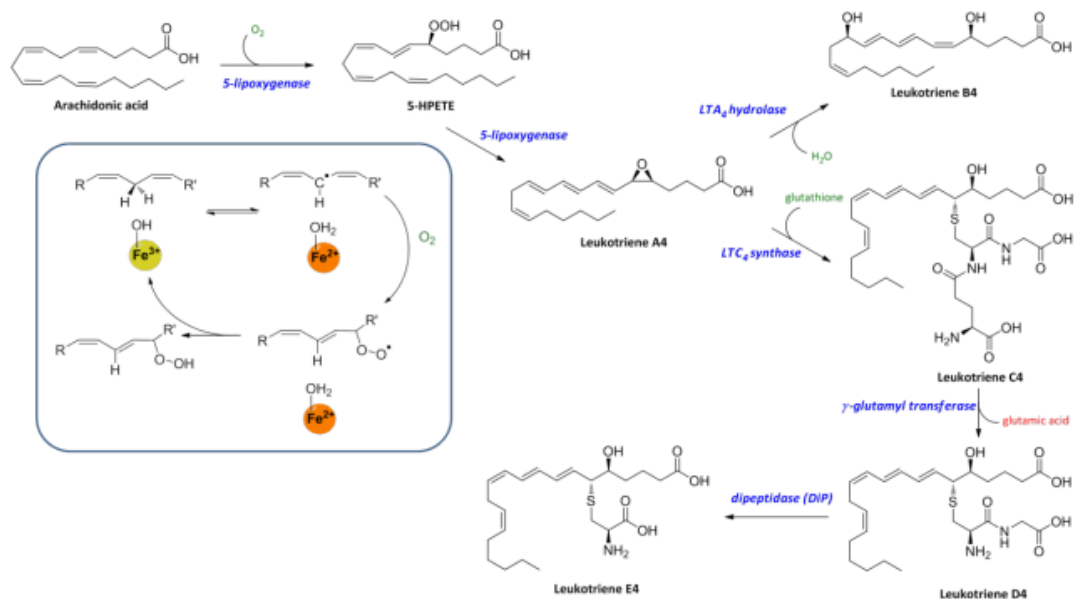
Σχήμα 37: Μηχανισμός σχηματισμού πυραζολίνης.

Αρχικά με πυρηνόφιλη προσθήκη της υδραζίνης (ή της φαινυλυδραζίνης) στον άνθρακα της καρβονυλομάδας της χαλκόνης, που ακολουθείται από μεταφορά ενός πρωτονίου από το άζωτο στο οξυγόνο, σχηματίζεται μια ενδιάμεση ενολική ένωση. Η πρωτονίωση του υδροξυλίου από τον όξινο καταλύτη το μετατρέπει σε καλύτερη αποχωρούσα ομάδα. Με αποβολή νερού λόγω του μονήρους ζεύγους ηλεκτρονίων του αζώτου σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο κατιόν. Η απόσπαση ενός πρωτονίου από το άζωτο του διπλού δεσμού, οδηγεί στην αναγέννηση του όξινου καταλύτη και στο σχηματισμό μιας ένωσης η οποία στη συνέχεια υφίσταται κυκλοποίηση. Το προϊόν της κυκλοποίησης είναι η ζητούμενη πυραζολίνη.

2.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΥΡΑΖΟΛΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

2.2.1 Αντιφλεγμονώδης δράση

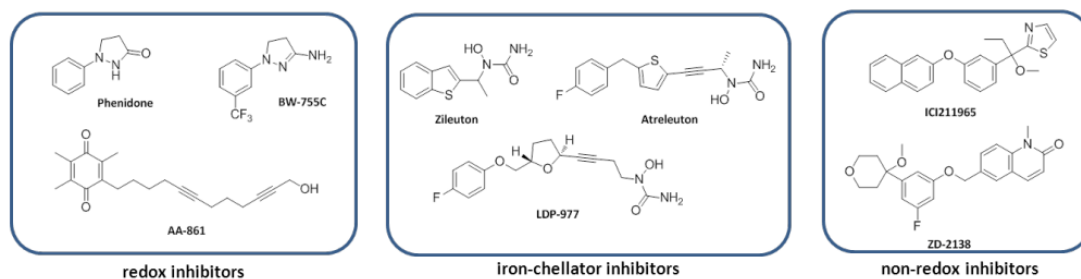
Οι λιποξυγονάσες (LO) είναι μια ομάδα οξειδωτικών ενζύμων, που συναντώνται ευρέως στα φυτά και τα ζώα και αποτελούνται από ένα, μη-αίμης, άτομο σιδήρου στην ενεργό θέση τους. Εμπλέκονται στη ρύθμιση των φλεγμονωδών αποκρίσεων από την παραγωγή των προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών, γνωστών ως λευκοτριένια ή των αντι-φλεγμονωδών μεσολαβητών, γνωστών ως λιποξίνες. Αυτά τα ένζυμα καταλύουν την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA), όπως το λινολεϊκό, το α-λινολενικό και το αραχιδονικό οξύ, τα οποία δίνουν υδροϋπεροξειδία. Η καταλυτική αντίδραση των λιποξυγονασών περιλαμβάνει την εναλλαγή των ιόντων Fe^{3+} του ενεργού κέντρου στην ανενεργή μορφή Fe^{2+} [104]. Η αναγωγή αυτή πραγματοποιείται με ταυτόχρονη οξείδωση του υποστρώματος των λιπιδίων, ύστερα από αφαίρεση υδρογόνου από ένα αλλυλικό μεθυλένιο προς σχηματισμό μιας πενταδιενυλικής ρίζας. Η ρίζα αυτή διατάσσεται εκ νέου, ώστε να παράξει ένα 1-cis, 3-trans-συζευγμένο διένιο. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μια στερεο-ειδική εισαγωγή του οξυγόνου στην πενταδιενυλική ρίζα για να σχηματιστεί μια υδροϋπεροξειδική ρίζα λιπαρού οξέος. Η ενδιάμεση αυτή ρίζα ανάγεται προς το αντίστοιχο ανιόν με ταυτόχρονη επανοξείδωση σιδήρου προς Fe^{3+} [105],[106].



Σχήμα 38 : Αντιδράσεις οξείδωσης των λιποξυγενασών.

Η 5-λιποξυγονάση (5-LO) αποτελεί ένα ένζυμο-κλειδί, στη βιοσύνθεση των λευκοτριενίων. Το ένζυμο αυτό καταλύει τη μετατροπή του αραχιδονικού οξέος (AA) σε 5(S)-υδροϋπερόξυ-εικοσατετραενοϊκό οξύ (5-HPETE) και σε λευκόνια LTA₄ με τη βοήθεια της FLAP, μιας 5-LO-πρωτεΐνης ενεργοποίησης. Το ασταθές LTA₄, στη συνέχεια, είτε μετατρέπεται σε LTB₄ μέσω της υδρολάσης LTA₄ ή σε LTC₄ μέσω της συνθάσης LTC₄. Η αναστολή της 5-LO μπορεί να μειώσει τη μεσολάβηση λευκοτριενίων με φλεγμονώδεις αποκρίσεις και να συμβάλει στην ανάπτυξη αλλεργικών ασθενειών, όπως το άσθμα [107]. Κατά τις τελευταίες δεκαετίες, διάφορες μελέτες έχουν εμπλέξει τη δραστηριότητα της 5-LO στην ογκογένεση, ειδικά στον καρκίνο του προστάτη και ορισμένων μορφών λευχαιμίας [108], [109].

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



Εικόνα 12 : Αναστολείς λιποξυγονάσης

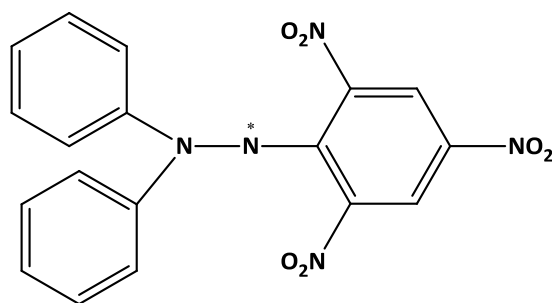
Η πλειοψηφία των αναστολέων LO είναι αντιοξειδωτικά ή σαρωτές ελευθέρων ριζών, καθώς η δράση της λιποξυγονάσης δημιουργεί ελεύθερες ρίζες άνθρακα, οπότε τα αντιοξειδωτικά μπορούν να αναστείλουν τη δημιουργία της ρίζας ή να την παγιδεύσουν μόλις σχηματιστεί [110], [106].

2.2.2 Αντιοξειδωτική δράση

2.2.2.1 Ικανότητα δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH

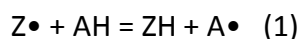
Οι μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας σε δείγματα τροφίμων και σε βιολογικά υγρά βασίζονται κυρίως στην αντίδραση μεταξύ μιας χρωμογόνου ένωσης και ενός αντιοξειδωτικού. Μετά την αντίδραση, η υπολειμματική συγκέντρωση της χρωμογόνου ένωσης προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά ή χρωματομετρικά. Μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες χρωματογόνες ενώσεις περιλαμβάνει την 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), καθώς αντιδρά απευθείας με το αντιοξειδωτικό [111].

Το μόριο του 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) χαρακτηρίζεται ως μία σταθερή ελεύθερη ρίζα, λόγω της απομάκρυνσης του αποσπόμενου ηλεκτρονίου συνολικά από το μόριο, έτσι ώστε τα μόρια να μην διαμερίζονται, όπως συμβαίνει στις περισσότερες άλλες ελεύθερες ρίζες. Η απομάκρυνση αυτή προσδίδει ακόμη το βαθύ βιολετί χρώμα στο μόριο, που χαρακτηρίζεται από μια ζώνη απορρόφησης σε διάλυμα αιθανόλης στα 520nm.



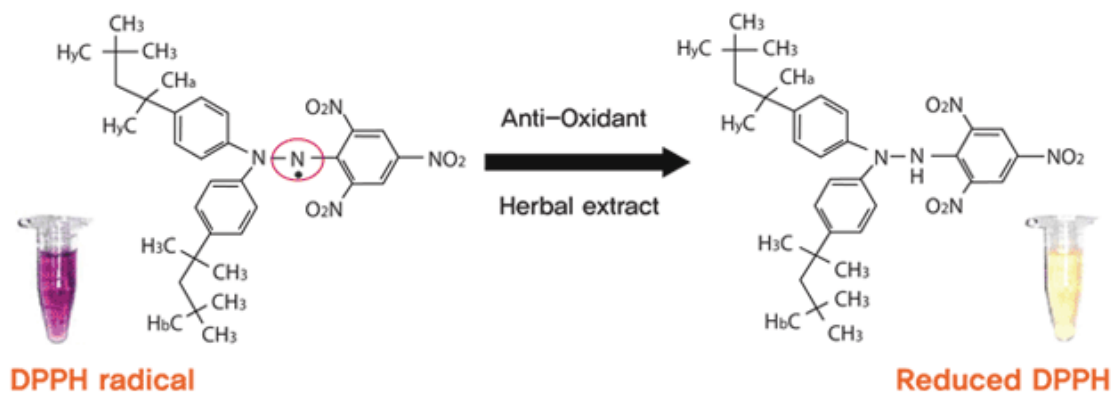
Σχήμα 39 : Χημική δομή DPPH

Όταν ένα διάλυμα DPPH αναμιγνύεται με διάλυμα ουσίας που μπορεί να δώσει ένα άτομο υδρογόνου, τότε λαμβάνεται η ανηγμένη μορφή της ένωσης, έχοντας χάσει το βιολετί χρώμα. Αναπαριστώντας τη ρίζα DPPH με $Z \bullet$ και το μόριο-δότη με AH, η κύρια αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η εξής:



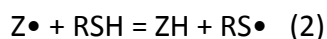
Ως ZH περιγράφεται η ανηγμένη μορφή και ως $A \bullet$ οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται στο πρώτο αυτό στάδιο. Οι ρίζες αυτές υπόκεινται ύστερα σε περαιτέρω αντιδράσεις, οι οποίες ελέγχουν τη συνολική στοιχειομετρία, τον αριθμό, δηλαδή, των ανηγμένων μορίων DPPH, ανά μόριο το αναγωγικού μέσου.

Η αντίδραση (1), λοιπόν, παρέχει τη σύνδεση με τις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα σε ένα οξειδωτικό σύστημα, όπως η αυτο-οξείδωση ενός λιπιδίου, ή άλλων ακόρεστων ουσιών. Έτσι, το μόριο $Z \bullet$ αντιπροσωπεύει τις ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται σε ένα σύστημα του οποίου η δραστηριότητα πρόκειται να κατασταλεί από την ουσία AH [112].

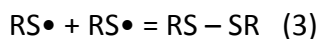


Εικόνα 13 : Η ρίζα DPPH και η αποχρωματισμένη και ανηγμένη μορφή της, μετά τη δράση του αντιοξειδωτικού.

Τη μέθοδο DPPH εισήγαγε πριν από περίπου 50 χρόνια ο Marsden Blois, χρησιμοποιώντας ως αντιοξειδωτικό την κυστεΐνη. Έτσι, αναπαριστώντας τη ρίζα DPPH με $Z \bullet$ και το μόριο της κυστεΐνης με RSH, η αρχική αντίδραση έχει ως εξής:

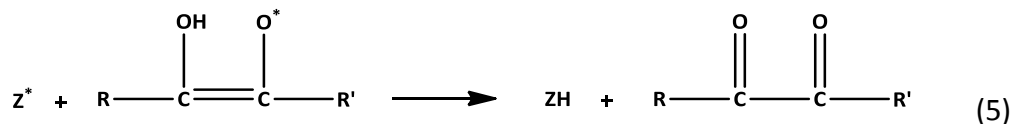
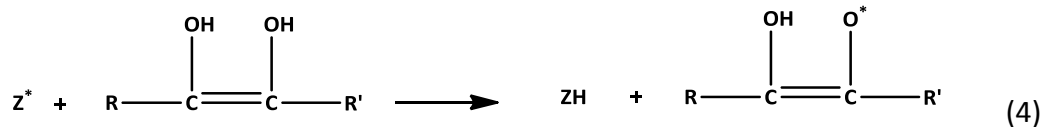


Η ελεύθερη ρίζα $RS \bullet$ αντιδρά στη συνέχεια με ένα άλλο μόριο του ίδιου είδους που παρήχθη από μια παράλληλη αντίδραση.



Κάτι τέτοιο, λοιπόν, οδηγεί στην παρατηρούμενη αναγωγή δύο μορίων DPPH από δύο μόρια κυστεΐνης, και επομένως σε στοιχειομετρία 1:1.

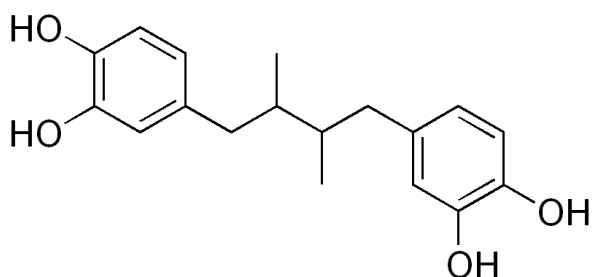
Εάν, ωστόσο, το μόριο διαθέτει δύο παρακείμενες θέσεις για αφαίρεση του υδρογόνου που συνδέονται εσωτερικά, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C), τότε μπορεί να υπάρξει μια περαιτέρω αντίδραση:



Κάτι τέτοιο οδηγεί σε στοιχειομετρία 2:1, όπου δύο μόρια DPPH ανάγονται από ένα μόριο ασκορβικού οξέος [113].

Συμπερασματικά, λοιπόν, η μέθοδος DPPH αποτελεί μία ταχεία, απλή, οικονομική και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο για τον προσδιορισμό της ικανότητας των ενώσεων να δρουν ως δεσμευτές των ελευθέρων ριζών ή ως δότες υδρογόνου, και για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των τροφίμων. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση των αντιοξειδωτικών σε πολύπλοκα βιολογικά συστήματα, για στερεά ή υγρά δείγματα. Η DPPH μέθοδος έχει ακόμη χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τη διερεύνηση αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων σε δημητριακά σιταριού, λαχανικά, βότανα και σε βρώσιμα έλαια σπόρων και αλεύρων σε αρκετά διαφορετικά συστήματα διαλυτών που περιλαμβάνουν αιθανόλη, υδατική ακετόνη, μεθανόλη, υδατική αλκοόλη και βενζόλιο [114],[115]. Πρόκειται, επίσης, για μία εύκολα χρησιμοποιούμενη μέθοδο στην αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης της κυστεΐνης, της γλουταθειόνης, του ασκορβικού οξέος, της τοκοφερόλης, καθώς και πολυ-υδροξυ αρωματικών ενώσεων [116].

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

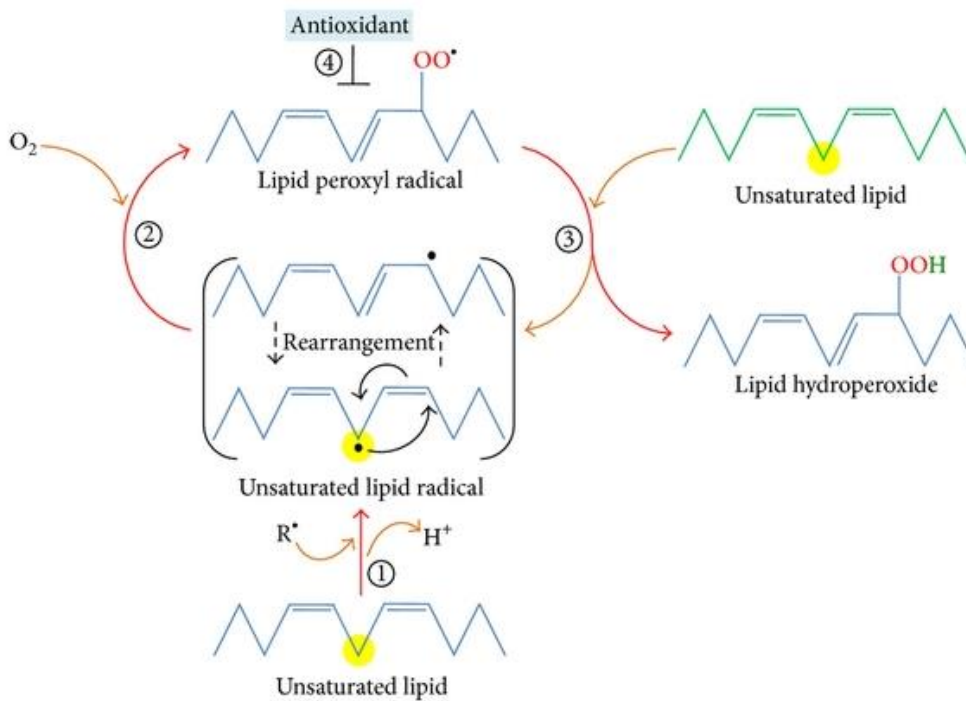


Σχήμα 40: Χημική δομή NDGA

2.2.2.2 Αναστολή λιπιδικής υπεροξειδωσης

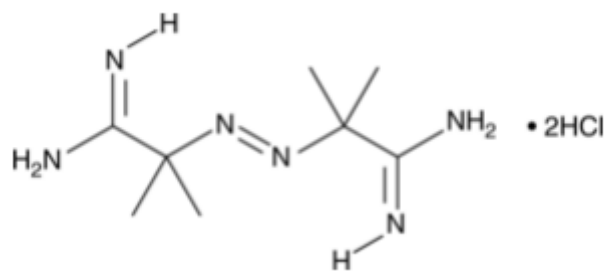
Η λιπιδική υπεροξειδωση μπορεί να περιγραφεί, γενικά, ως μια διαδικασία σύμφωνα με την οποία, οξειδωτικά μέσα, όπως ελεύθερες ρίζες επιτίθενται σε λιπίδια που περιέχουν διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα(C=C), ιδιαίτερα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) που συνήθως είναι δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών.

Η συνολική διαδικασία της λιπιδικής υπεροξειδωσης αποτελείται από τρία στάδια: την έναρξη, πολλαπλασιασμό, και τον τερματισμό. Κατά το στάδιο της έναρξης, τα προ-οξειδωτικά αποσπών το αλλυλικό υδρογόνο και σχηματίζουν τη λιπιδική ρίζα στον κεντρικό άνθρακα. Έπειτα, στην φάση του πολλαπλασιασμού, η λιπιδική ρίζα αντιδρά ταχέως με οξυγόνο σχηματίζοντας υπεροξυλική ρίζα, η οποία αποσπά ένα υδρογόνο από ένα άλλο μόριο λιπιδίου δημιουργώντας μια νέα λιπιδική ρίζα και στη συνέχεια ένα νέο λιπιδικό υδροϋπεροξείδιο. Τέλος, κατά το στάδιο του τερματισμού, τα αντιοξειδωτικά δίνουν ένα άτομο υδρογόνου στην υπεροξυλική ρίζα του λιπιδίου με αποτέλεσμα το σχηματισμό των μη δραστικών προϊόντων [117].



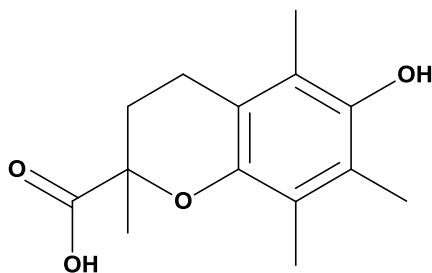
Εικόνα 14 : Μηχανισμός λιπιδικής υπεροξειδωσης.

Το 2,2 αζοδιο-(2-αμιδινοπροπανο)υδροχλωρίδιο (AAPH) είναι ένας 'εκκινητής ελευθέρων ριζών' (Σχήμα 41) που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες στο διάλυμα οι οποίες προκαλούν την οξείδωση του λινολεϊκού οξέος. Η μέθοδος μέτρησης της αντιοξειδωτικής δράσης με AAPH είναι μία γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος που χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης πρώτων υλών βοτάνων και μύρας. Βασίζεται στην αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης του λινολεϊκού οξέος, και είναι ένα μέτρο του πόσο αποδοτικά τα αντιοξειδωτικά προστατεύουν ενάντια στην λιπιδική υπεροξειδωση *in vitro*. Η οξείδωση του εξωγενούς λινολεϊκού οξέος από ένα θερμικό παραγωγό ελευθέρων ριζών (AAPH) ακολουθείται από φασματοσκοπία UV σε πολύ διαλυτοποιημένο δείγμα [19].



Σχήμα 41 : Χημική δομή AAPH.

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



Σχήμα 42 : Χημική δομή Trolox

3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Για τον χαρακτηρισμό των νέων προϊόντων χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητισμού συντονισμού NMR. Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, NMR ^1H , έχουν καταγραφεί με τα όργανα Varian Gemini του ευθνικού ιδρύματος ερευνών. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO).

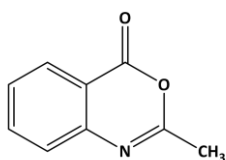
Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων δίνονται σε ppm. Η πολλαπλότητα των σημάτων στα φάσματα ^1H NMR αναφέρονται ως: s(singlet, απλό), d (doublet, διπλό), t (triplet, τριπλό), q (quartet, τετραπλό), m (multiplet, πολλαπλό), br(broad, ευρύ). Οι σταθερές συζεύξεως J δίνονται σε Hz.

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).

3.2 ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

3.2.1 2-μεθυλο-4H-3,1-βενζοξαζιν-4-όνη (1)

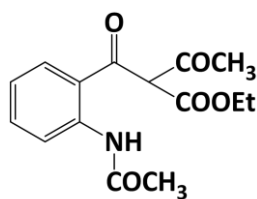


(1) 161,16 [C₉H₇NO₂]

0.02 mol (2.74 g) ανθρανλικού οξέος προστίθενται σε 20 ml οξικού ανυδρίτη και το μίγμα αναδεύεται στους 130 °C για περίπου μία ώρα μέχρι να διαλυθεί πλήρως το στερεό. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, σε σύστημα διαλυτών πετραλαϊκού αιθέρα:οξικού αιθυλεστέρα - 6:4. Το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια ο διαλύτης εξατμίζεται. Στο καστανοκίτρινο στερεό ίζημα που σχηματίζεται, προστίθεται πετρελαϊκός αιθέρας και το ίζημα διηθείται υπό κενό και εκπλένεται στον ηθμό με πετρελαϊκό αιθέρα. Έτσι λαμβάνεται η 2-μεθυλο-4H-3,1-βενζοξαζιν-4-όνη, με τη μορφή καφέ στερεού. Το προϊόν χρησιμοποιείται για τις αντιδράσεις C-ακετυλίωσης χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

[απόδοση: 82,5% (2.26g), σημείο τήξης: 79 °C, σ.τ. βιβλιογραφίας: 77-78 °C]

3.2.2 α-ακετυλο-2-(ακετυλαμινο)-β-οξο-βενζολο προπανοϊκός αιθυλεστέρας (2)

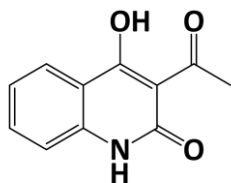


(2) 291,30 [C₁₅H₁₇NO₅]

0.012 mol (2g) 2-μεθυλο-4H-3,1-βενζοξαζιν-4-όνη (1) προστίθενται στο μίγμα βάσης ενώσεως ενεργού μεθυλενίου, το οποίο αποτελείται από 0.024 mol (2.68g) t-BuOK και 0.024 mol (3.12g) ακετοξικού αιθυλεστέρα σε 60 ml t-BuOH και το προκύπτον μίγμα αναδεύεται για περίπου 2 ώρες. Στο διάλυμα, έπειτα, προστίθεται ποσότητα νερού και αιθέρα, ενώ ακολουθεί εκχύλιση απ' όπου συλλέγεται η υδατική φάση. Το προκύπτον διάλυμα οξινίζεται με ποσότητα HCl 10% υπό ψύξη προς καταβύθιση λευκού στερεού, το οποίο παραλαμβάνεται ύστερα από διήθηση.

[απόδοση: 86% (1.72g), σημείο τήξης: 100°C, σ.τ. βιβλιογραφίας: 97-99°C]

3.2.3 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνη (3)



(3) 203.19 [C₁₁H₉NO₃]

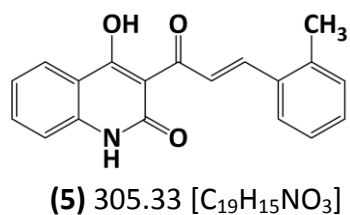
0.007 mol (2g) του προϊόντος C-ακυλίωσης (2) διαλύονται σε 75 ml υδατικού διαλύματος ανθρακικού νατρίου 7% και το μίγμα προστίθεται σε 19 ml υδατικού διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου 45%. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για περίπου 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και λαμβάνει ανοιχτό καφέ χρώμα. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, σε σύστημα διαλυτών πετραλαϊκού:οξικού - 6:4. Στο μίγμα προστίθεται ποσότητα νερού και το υδατικό διάλυμα οξινίζεται με αρκετή ποσότητα HCl 10% υπό ψύξη, οπότε καταβυθίζεται στερεό. Το επιθυμητό αυτό προϊόν της αντίδρασης παραλαμβάνεται με τη μορφή λευκού ιζήματος το οποίο διηθείται και εκπλένεται με μικρές ποσότητες ψυχρού νερού.

[απόδοση: 37% (0.74g), σημείο τήξης: 261⁰C, σ.τ. βιβλιογραφίας: 258-259⁰C]

3.2.4 Γενική μέθοδος σύνθεσης κινολινονο-χαλκονών

Σε κατάλληλη ποσότητα απόλυτης αιθανόλης διαλύονται ισομοριακές ποσότητες της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνη (3) και της κατάλληλης βενζαλδεΐδης και προστίθεται καταλυτική ποσότητα πιπεριδίνης. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 3 ώρες στους 78⁰C με τη βοήθεια κάθετου ψυκτήρα. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα ψύχεται σε παγόλουτρο και οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% w/v. το προϊόν λαμβάνεται από το οξινισμένο υδατικό διάλυμα με τη μορφή στερεού.

3.2.4.1 4-υδροξυ-3-[3-(2-μεθυλοφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-2(1H)-κινολινόνη (5)

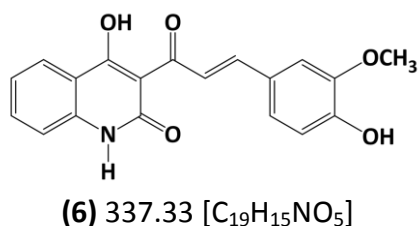


Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο, χρησιμοποιώντας 0.625 mmol (0.127g) της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνης (3), 0.625 mmol (0.075g) της 2-μεθυλοβενζαλδεΐδης (o-tolualdehyde) και 5 σταγόνες πιπεριδίνης σε 2.54

ml απόλυτης αιθανόλης. Το προϊόν λαμβάνεται από το οξινισμένο υδατικό διάλυμα με τη μορφή κίτρινου στερεού.

[απόδοση: 49% (0.6g), σημείο τήξεως: 277-282 °C]

3.2.4.2 4-υδροξυ-3-[3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-2(1H)-κινολινόνη (6)

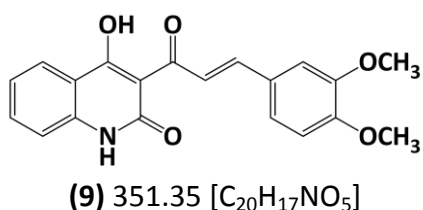


Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο, χρησιμοποιώντας 1.968 mmol (400 mg) της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνης (3), 1.968 mmol (299.43 mg) της 4-υδροξυ-3-μεθυλοβενζαλδεΐδης (vanillin) και 16 σταγόνες

πιπεριδίνης σε 8ml απόλυτης αιθανόλης. Το προϊόν λαμβάνεται από το οξινισμένο υδατικό διάλυμα με τη μορφή πορτοκαλί στερεού.

[απόδοση: 58% (230 mg), σημείο τήξεως: 292-293 °C]

3.2.4.3 4-υδροξυ-3-[3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-2(1H)-κινολινόνη (9)

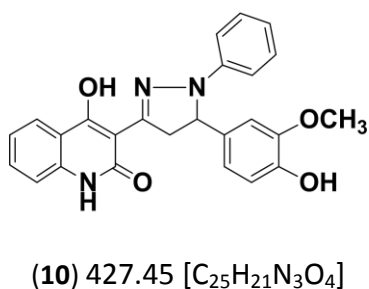


Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο, χρησιμοποιώντας 0.0049 mol (1g) της 3-ακετυλο-4-υδροξυ-2(1H)-κινολινόνης (3), 0.0049 mol (0.81g) της 3,4-διμεθοξυβενζαλδεΐδης και 40 σταγόνες

πιπεριδίνης σε 20ml απόλυτης αιθανόλης. Το προϊόν λαμβάνεται από το οξιμισμένο υδατικό διάλυμα με τη μορφή κίτρινου στερεού.

[απόδοση: 52% (0.52g), σημείο τήξεως: 270-272 °C]

3.2.5 5-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)-1-φαινυλο-3-(4,5-διυδρο-1H-πυραζολ-3-υλ)-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνη (10)



Σε 4.5 ml οξικού οξέος διαλύονται 0.15 mmol (50 mg) της 4-υδροξυ-3-[3-(4-υδροξυ-3 μεθοξυφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-2(1H)-κινολινόνης (6), και 0.30 mmol (32.4 mg) της φαινυλδραζίνης. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 4 ώρες στους 118°C με τη βοήθεια κάθετου ψυκτήρα. Η πορεία

της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Μετά το τέλος της αντίδρασης στο μίγμα προστίθεται υδατικό διάλυμα EtOH 50% και παρατηρείται καταβύθιση στερεού. Το τελικό προϊόν λαμβάνεται ύστερα από διήθηση, με τη μορφή πορτοκαλί στερεού.

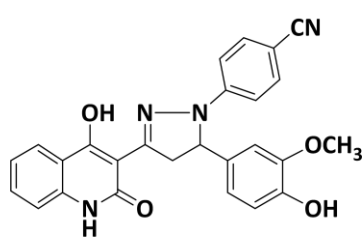
[απόδοση: 34% (17 mg), σημείο τήξεως: 253°C]

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.450 (s, 1H), 11.519 (s, 1H), 8.942 (s, 1H), 7.957 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.547 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 7.427-7.223 (m, 4H), 7.196-6.903 (m, 3H), 6.795 (t, J=7.2 Hz, 1H), 6.726-6.648 (m, 2H), 5.249 (dd, j= 7.5 Hz, J= 11.7 Hz, 1H), 4.19 (dd, j= 12Hz, J= 18.9Hz, 1H), 3.738 (s, 3H), 3.54 (dd, j= 19.2Hz, J= 26.4Hz, 1H)

3.2.6 Γενική Μέθοδος σύνθεσης των πυραζολινικών αναλόγων 11-14

Η τελική ένωση παρασκευάζεται από την κινολινονο-χαλκόνη, **(5)**, **(6)** ή **(9)**, και την αντίστοιχη υδραζίνη σε αναλογία 1:2,5. Αρχικά, σε σφαιρική φιάλη και σε κατάλληλη ποσότητα οξικού οξέος διαλύεται η κινολινονο-χαλκόνη. Σε διαφορετική σφαιρική φιάλη και σε κατάλληλη ποσότητα απόλυτης αιθανόλης προστίθεται στάγδην η υδραζίνη. Στη συνέχεια, το διάλυμα του οξικού οξέος με την κινολινονο-χαλκόνη προστίθεται στάγδην στη σφαιρική με το διάλυμα της απόλυτης αιθανόλης με την υδραζίνη. Το προκύπτον διάλυμα τίθεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 120 °C για 24 ώρες, υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Το διάλυμα που προκύπτει προστίθεται σε ποτήρι ζέσεως με πάγο, οπότε καταβυθίζεται στερεό. Αν δεν καταβυθιστεί στερεό, τότε ακολουθεί εκχύλιση με την προσθήκη διαλύτη διχλωρομεθάνιο, από όπου και λαμβάνεται η οργανική φάση. Ακολουθεί ξήρανση της οργανικής φάσης με NaSO₄ και εξάτμιση του διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Η καθαρότητα του στερεού που προκύπτει ελέγχεται με φασματοσκοπία NMR. Τυχόν προσμίξεις στο στερεό απομακρύνονται με ανακρυστάλλωση σε διάλυμα MeOH/DCM.

3.2.6.1 5-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)-1-(4-κυανοφαινυλο)-3-(4,5-διυδρο-1H-πυραζολ-3-υλ)-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνη (**11**)



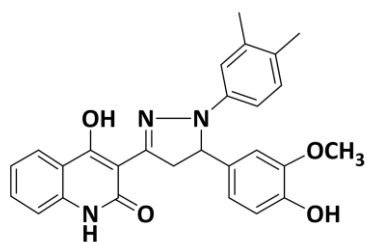
(11) 452.46 [C₂₆H₂₀N₄O₄]

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.207 mmol (70 mg) της 4-υδροξυ-3-[3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-2(1H)-κινολινόνης **(6)** σε 1.31 ml οξικού οξέος, και 0.518 mmol (87.77 mg) της 4-κυανοφαινυλυδραζίνης σε 0.66 ml απόλυτης αιθανόλης. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα αποχύνεται σε ποτήρι ζέσης με πάγο, όπου καταβυθίζεται στερεό. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται κατόπιν διήθησης, με τη μορφή κίτρινου στερεού.

[απόδοση: 41% (28.7 mg), σημείο ζέσεως: 259-260 °C]

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.040 (s, 1H), 11.599 (s, 1H), 8.539-8.48 (m), 8.016-7.900 (m), 7.740-7.501 (m), 7.389-7.086 (m), 7.027-6.463 (m), 5.429 (dd, j= 5.4Hz, J= 12Hz, 1H), 4.207 (dd, j= 12Hz, J= 19.2Hz, 1H), 3.960-3.836 (m), 3.818-3.542 (m), 2.730-2.476 (m)

3.2.6.2 5-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαιτυλο)-1-(3,4-διμεθυλοφαιτυλο)-3-(4,5-διυδρο-1H-πυραζολ-3-υλ)-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνη (12)



(12) 455.51 [C₂₇H₂₅N₃O₄]

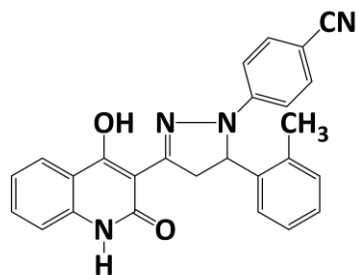
Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.207 mmol (70 mg) της 4-υδροξυ-3-[3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαιτυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-2(1H)-κινολινόνης (6) σε 1.31 ml οξικού οξέος, και 0.518 mmol (89.44 mg) της 3,4διμεθυλοφαιτυλυδραζίνης σε 0.66 ml

απόλυτης αιθανόλης. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα αποχύνεται σε ποτήρι ζέσης με πάγο, όπου καταβυθίζεται στερεό. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται κατόπιν διήθησης, με τη μορφή κίτρινου στερεού.

[απόδοση: 48% (33.6 mg), σημείο ζέσεως: 239-240 °C]

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.514 (s, 1H), 11.521 (s, 1H), 8.924 (s, 1H), 7.96 (d, J= 7.8Hz, 1H), 7.542 (t, J= 7.8Hz, 1H), 7.289-7.198 (m, 2H), 6.941 (t, J= 8.4Hz, 2H), 6.774 (s, 1H), 6.688-6.598 (m, 3H), 5.195 (pseudotriplet, J= 9.6Hz, 1H), 4.163 (dd, j= 12Hz, J= 18.9Hz, 1H), 3.736 (s, 3H), 3.477 (dd, j= 7.5Hz, J= 18.9Hz, 1H)

3.2.6.3 5-(2-μεθυλοφαινυλο)-1-(4-κυανοφαινυλο)-3-(4,5-διυδρο-1H-πυραζολ-3-υλ)-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνη (13)



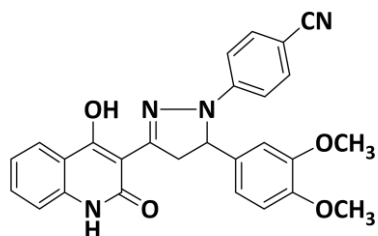
(13) 422.48 [C₂₆H₂₂N₄O₂]

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.37 mmol (112.6 mg) της 4-υδροξυ- 3 - [3 - (2-μεθυλοφαινυλο)-1-οξο-2-προπεν-1-υλο]-2(1H)-κινολινόνης (5) σε 2.35 ml οξικού οξέος, και 0.92 mmol (156.37 mg) της 4-κυανοφαινυλδραζίνης σε 1.17 ml απόλυτης αιθανόλης. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα αποχύνεται σε ποτήρι ζέσης με πάγο, όπου καταβυθίζεται στερεό. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται κατόπιν διήθησης και κατεργασίας με MeOH, με τη μορφή κίτρινου στερεού.

[απόδοση: 29% (32,65 mg), σημείο τήξεως: 295 °C]

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.011 (s, 1H), 11.545 (d, J= 30Hz, 1H), 7.965 (d, J= 7.5Hz, 2H), 7.688-7.545 (m, 3H), 7.377-6.978 (m, 5H), 6.888 (d, J= 8.1Hz, 2H), 5.673 (dd, j= 5.4Hz, J= 13.5Hz, 1H), 4.31 (dd, j= 12.6Hz, J= 16.5Hz, 1H), 3.469 (dd, j= 5.1Hz, J= 19.2Hz, 1H), 2.727 (s, 3H)

3.2.6.4 5-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-1-(4-κυανοφαινυλο)-3-(4,5-διυδρο-1H-πυραζολ-3-υλ)-4-υδροξυ-2-(1H)-κινολινόνη (14)



(14) 466.49 [C₂₇H₂₂N₄O₄]

Παρασκευάζεται σύμφωνα με τη Γενική Μέθοδο χρησιμοποιώντας 0.21 mmol (73 mg) της 4-υδροξυ- 3 - [3 - (3 , 4 - διμεθοξυφαινυλο) – 1-οξο- 2- προπεν -1-υλο]- 2(1H)-κινολινόνης (9) σε 1.33 ml οξικού οξέος, και 0.525 mmol (89.05 mg) της 4-κυανοφαινυλδραζίνης σε 0.67 ml απόλυτης αιθανόλης. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα αποχύνεται σε ποτήρι ζέσης με πάγο, όπου καταβυθίζεται στερεό. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται κατόπιν διήθησης, με τη μορφή κίτρινου στερεού.

[απόδοση: 49% (35.8 mg), σημείο τήξεως: 296⁰C]

¹HNMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.020 (s, 1H), 11.492 (s, 1H), 9.017 (s, 1H), 7.986-7.953 (m), 7.633-7.558 (m), 7.236-7.162 (m), 7.021-6.833 (m), 6.763-6.657 (m), 5.507-5.434 (m), 4.269-4.155 (m), 3.726 (d, J= 7.8Hz, 6H), 3.639-3.559 (m)

3.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΛΙΠΟΕΥΓΩΝΑΣΗΣ ΑΠΟ ΣΟΓΙΑ

Οι υπό εξέταση ουσίες διαλύονται σε DMSO και αφήνονται να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου με λινολεϊκό νάτριο (0.1 mL) και 0.2 mL ενζυμικού διαλύματος ($1/9 \times 10^{-4}$ w/v σε φυσιολογικό ορό) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH= 9. Η μετατροπή του sodium λινολεϊκού νατρίου σε 13-υδροπεροξυλινολεϊκό οξύ στα 234 nm καταγράφεται και συγκρίνεται με το κατάλληλο πρότυπο αναστολέα. [118]

3.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΡΙΖΑΣ DPPH

Οι ουσίες διαλύονται σε DMSO, και στη συνέχεια προστίθενται σε αιθανολικό διάλυμα DPPH (0.05 mM) απόλυτης αιθανόλης μέχρι τελικής συγκέντρωσης 0.1 mM. Το μείγμα αναδεύεται έντονα και αφήνεται σε ηρεμία 20 ή 60 λεπτά. Καταγράφεται η απορρόφηση στα 517 nm και υπολογίζεται μέσω αυτής το ποσοστό της αντιοξειδωτικής δράσης. Όλα τα τεστ γίνονται τρεις φορές και τα αποτελέσματα του προκύπτουν μετά από τον υπολογισμό του μέσου όρου. [118]

3.5 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΛΙΠΙΔΙΚΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗΣ (AAPH).

Η αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης από τις ενώσεις που παρασκευάστηκαν υπολογίζεται από την οξειδωση του λινολεϊκού οξέος σε υδατικό αιώρημα, κάτι που παρατηρείται στα 234 nm. Το 2,2,- αζοδις- (2-αμιδινοπροπανο) διυδροχλωρίδιο (AAPH) χρησιμοποιείται σαν εκκινήτης των ελευθέρων ριζών. [119]

Συγκεκριμένα , δέκα μικρόλιτρα από το αιώρημα των 16 mM του λινολεϊκού οξέος προστίθενται στην UV κυψελίδα που περιέχει 0.93 mL από το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων 0.05 M με pH= 7.4 το οποίο έχει προθερμανθεί στους 37 0 C. Η αντίδραση οξειδωσης ξεκινά στους 37 0 C υπό ατμοσφαιρική πίεση με την προσθήκη 50 µL του διαλύματος AAPH των 40 mM. Η οξειδωση πραγματοποιείται παρουσία δόσεων 10 µL της υπό εξέταση ένωσης. Στην δοκιμασία χωρίς προσθήκη του αντιοξειδωτικού, η λιπιδική οξειδωση μετράται με την παρουσία ίδιας ποσότητας DMSO. Ο ρυθμός οξειδωσης στους 37 °C παρακολουθείται καταγράφοντας την αύξηση της απορρόφησης στα 234 nm που προκαλείται από τα συζευγμένα διενικά υδροϋπεροξειδία.

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο : ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ, ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΝΕΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ

4.1.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

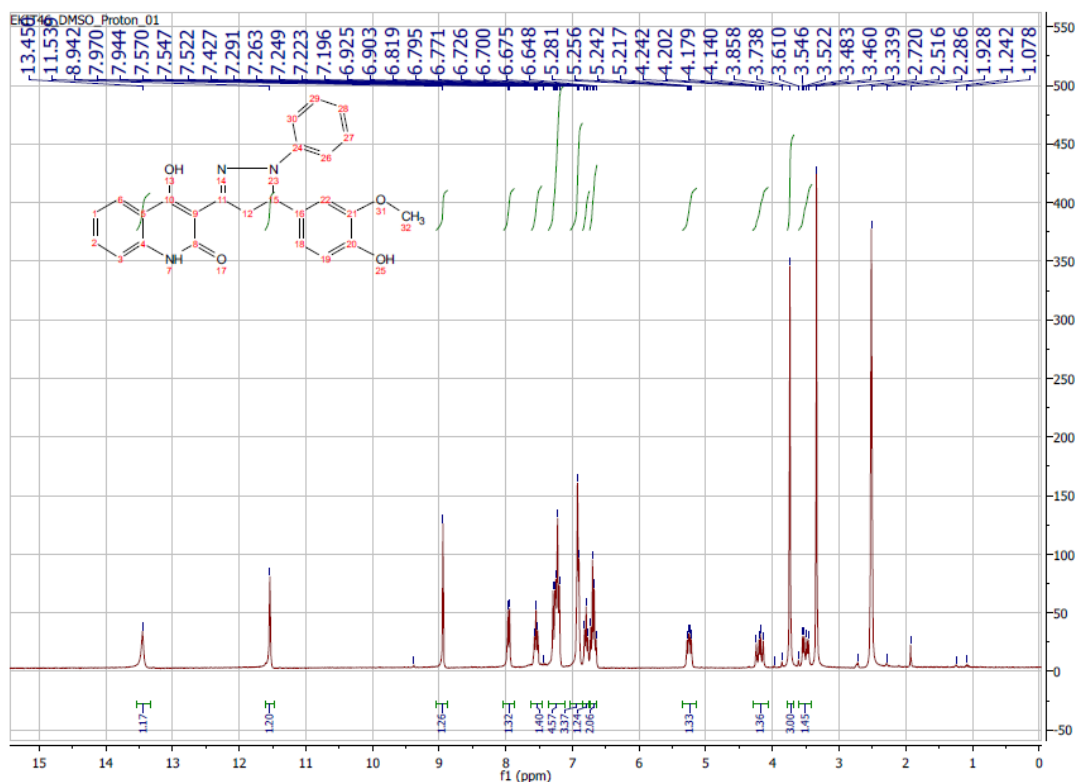
Η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός της δομής όλων των νέων μορίων πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία NMR (^1H NMR), τα οποία ελήφθησαν στο Φασματογράφο NMR Varian Gemini 300 του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Στο υποκεφάλαιο αυτό περιγράφεται ο τρόπος ταυτοποίησης των νέων πυραζολινικών παραγώγων από τα προκύπτοντα φάσματα NMR για το αντιπροσωπευτικό μόριο της ένωσης **10**. Σημειώνεται πως η λήψη των φασμάτων των πυραζολινών **11** και **14** παρουσίασε δυσκολίες, λόγω της μειωμένης διαλυτότητας των μορίων.

Στην Εικόνα 15 παρουσιάζεται το φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) της πυραζολίνης **10** σε διαλύτη δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO – d_6). Στα χαμηλά πεδία του φάσματος, τα πιο αποπροστατευμένα πρωτόνια εμφανίζονται με τρεις απλές κορυφές, οι οποίες ολοκληρώνονται για ένα πρωτόνιο η καθεμία. Πιο συγκεκριμένα, στα 13.450 ppm απορροφά το πρωτόνιο της υδροξυλομάδας της 4'' θέσης του δακτυλίου A. Στα 11.519 ppm απορροφά το πρωτόνιο της 1'' θέσης του δακτυλίου A, που αναπτύσσει δεσμό με το άζωτο, και στα 8.942 ppm εμφανίζεται το πρωτόνιο της υδροξυλομάδας της 4' θέσης του δακτυλίου B. Στη συνέχεια, στο εύρος χημικών μετατοπίσεων από 7.957 ppm έως 6.648 ppm εμφανίζονται όλα τα αρωματικά πρωτόνια της ένωσης.

Το σήμα του πρωτονίου της θέσης 5 του πυραζολινικού δακτυλίου αναμένεται να εμφανίζεται με τη μορφή μιας κορυφής διπλής διπλών (dd), λόγω της σύζευξης με τα γειτονικά υδρογόνα της θέσης 4 του πυραζολινικού δακτυλίου, τα οποία είναι διαστερεοτοπικά και επομένως δεν είναι χημικά ισοδύναμα. Πράγματι, όπως φαίνεται στην Εικόνα 15, στα 5.249 ppm υπάρχει μια κορυφή αυτής της μορφής που ολοκληρώνεται για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της θέσης 5. Τα σήματα

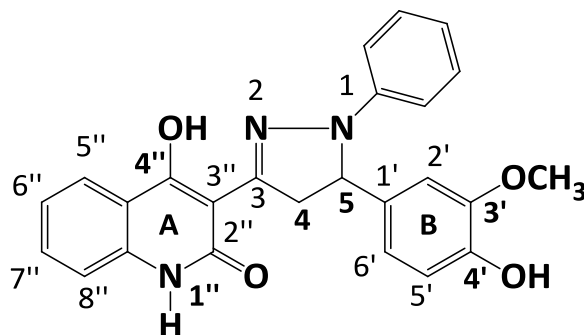
που οφείλονται στα διαστερεοτοπικά πρωτόνια της θέσης 4 εμφανίζονται επίσης με τη μορφή κορυφών dd στα 4.19 και 3.54 ppm.

Τέλος, τα πιο προστατευμένα πρωτόνια απορροφούν στα 3.738 ppm, όπου εμφανίζεται μία απλή κορυφή η οποία ολοκληρώνεται για 3H. Αυτά αντιστοιχούν στην μεθοξυ-ομάδα της 3' θέσης του δακτυλίου Β.



Εικόνα 15 : Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) της πυραζολίνης **10**

Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται η αρίθμηση που χρησιμοποιήθηκε για την ένωση **10** του φάσματος.

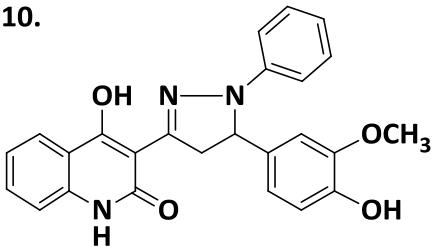
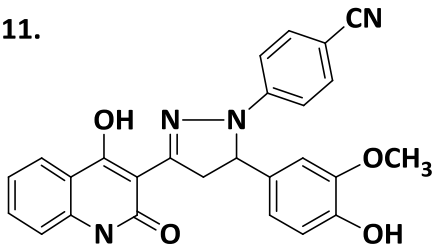
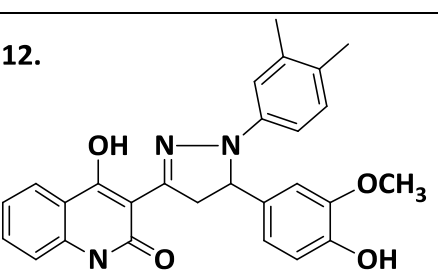


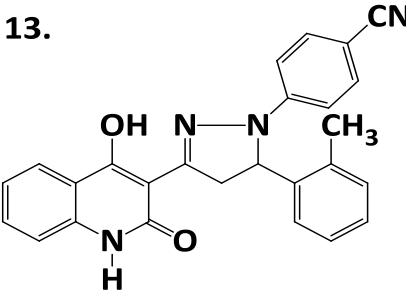
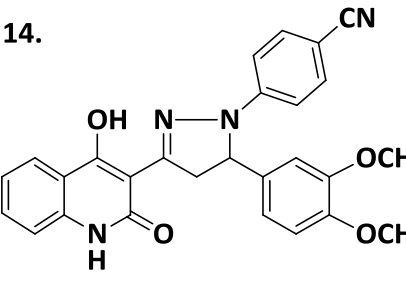
Σχήμα 43: Αρίθμηση δακτυλίων της πυραζολίνης **10**

4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

Τα νέα πυραζολινικά παράγωγα αξιολογήθηκαν για την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση τους στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του ΑΠΘ (Καθ. Δ. Χατζηπαύλου-Λίτινα). Τα αποτελέσματα των τριών in vitro δοκιμασιών των νέων μορίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1 : Αποτελέσματα της in vitro αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης των νέων πυραζολινικών αναλόγων.

ΠΡΟΪΟΝ	ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΕΛΕΥΘΕΡΗ ΡΙΖΑ DPPH(%)		ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΟ ΛΙΝΟΛΕΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (% 0.1mM)	ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ ΤΗΣ ΛΙΠΟΞΥΓΟΝΑΣΗΣ (% 0.1mM)	IC ₅₀ μM
	0.1mM /20 min	0.1mM /60 min			
<p>10.</p> 	74.5	85.5	59.1		90
<p>11.</p> 	95.0	95.3	83.8		52
<p>12.</p> 	95.3	91.7	20.3	29.5	

<p>13.</p> 	3.5	-	51.4	-	
<p>14.</p> 	27.3	12.7	74.7	27.3	
NDGA	81	82.6	-	83.7	0.55
Trolox	-	-	63	-	-

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

4.2.1 Συζήτηση αποτελεσμάτων αντιοξειδωτικής δράσης των νέων μορίων

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι τα παράγωγα της βανιλίνης (ενώσεις **10,11,12**), συγκριτικά με τα παράγωγα της 2-μεθυλοβενζαλδεΐδης (ένωση **13**) και της 3,4-διμεθοξυβενζαλδεΐδης (ένωση **14**) παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH. Το γεγονός αυτό οφείλεται

πιθανόν στην παρουσία της υδροξυλομάδας στην 4' θέση του δακτυλίου της πυραζολίνης, καθώς η ένωση λειτουργεί ως δότης υδρογόνου και δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες.

Ακόμη, παρατηρούμε τη διαφορετική δράση που παρουσιάζουν τα πυραζολινικά ανάλογα τα οποία προήλθαν από την 4-κυανοϋδραζίνη (ενώσεις **11**, **13**, **14**). Πιο συγκεκριμένα, είναι φανερό πως την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση εμφανίζει η ένωση **12**, που σχηματίστηκε από την χαλκόνη **6** (παράγωγο βανιλίνης), η οποία διαθέτει υδροξυλομάδα στην 4' θέση του δακτυλίου. Στην περίπτωση της ένωσης **14**, όπου η υδροξυλομάδα στην 4' θέση του δακτυλίου καλύπτεται από την μεθοξυομάδα, παρατηρούμε πως η ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH μειώνεται πολύ σημαντικά. Τέλος, απουσία υποκαταστατών στις θέσεις 3' και 4' του δακτυλίου και παράλληλα παρουσία μεθυλο-ομάδας στην 2' θέση, οδηγεί σε παράγωγο χωρίς αντιοξειδωτική δράση (ένωση **13**).

Όσο αναφορά την αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης, τα περισσότερα από τα νέα μόρια που μελετήθηκαν έχουν αξιολογημένη δράση.

Στην αξιολόγηση της δραστηριότητας των παραγώγων της βανιλίνης, (ενώσεις **10,11,12**), σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η φύση των υποκαταστατών στον δακτύλιο της υδραζίνης. Πιο συγκεκριμένα, η ένωση **10** που προήλθε από την φαινυλυδραζίνη και δεν διαθέτει υποκαταστάτη στον αρωματικό δακτύλιο, παρουσιάζει μια ικανοποιητική δράση, συγκρίσιμη με αυτήν της ένωσης αναφοράς (Trolox 63 %). Στη συνέχεια, προσθέτοντας στον αρωματικό δακτύλιο της υδραζίνης δύο υποκαταστάτες δότες τύπου άλκυλο- (ένωση **12**), παρατηρούμε πως η δράση μειώνεται σημαντικά. Ενώ, στην περίπτωση της ένωσης **11**, όπου στον δακτύλιο βρίσκεται το CN, ένας υποκαταστάτης δέκτης ηλεκτρονίων, είναι φανερό πως η δραστηριότητα του μορίου αυξάνεται κατά πολύ (83.4%), ξεπερνώντας αυτήν του Trolox. Αναφορικά, λοιπόν, με τα παράγωγα της βανιλίνης, συμπεραίνουμε πως η παρουσία του CN ως δομικό χαρακτηριστικό στον δακτύλιο της υδραζίνης ευνοεί σημαντικά την αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης της ένωσης.

Έτσι, στη συνέχεια της αξιολόγησης των αποτελεσμάτων της αντιοξειδωτικής δράσης μέσω της μεθόδου AAPH, μελετάται η εναλλαγή που παρασιάζουν τα υπόλοιπα πυραζολινικά ανάλογα που προήλθαν από την 4-κυανοϋδραζίνη (ενώσεις

13,14), σε σχέση με την ένωση **11**. Στην περίπτωση της ένωσης **14**, λοιπόν, παρατηρούμε πως η αντικατάσταση του υδροξυλίου της 4' θέσης του δακτυλίου Β από μία δευτέρα μεθοξυ-ομάδα, δεν μεταβάλλει ιδιαίτερα τη δραστικότητα του μορίου. Ενώ, απουσία υποκαταστατών στις θέσεις 3' και 4' του δακτυλίου και παράλληλα παρουσία μεθυλο-ομάδας στην 2' θέση οδηγεί σε μείωση της δραστικότητας του μορίου (ένωση **13**, 51.4%), συγκρίσιμης όμως με αυτής της ένωσης αναφοράς.

Παρατηρούμε λοιπόν, πως οι υποκαταστάτες στον δακτύλιο Β της πυραζολίνης δεν διαδραματίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην αναστολή της λιπιδικής υπεροξείδωσης της ένωσης.

Συμπερασματικά, έχοντας αναλύσει τα αποτελέσματα της μελέτης της αντιοξειδωτικής δράσης των νέων μορίων σύμφωνα με τις μεθόδους DPPH και AAPH, το πυραζολινικό ανάλογο που διαθέτει την καλύτερη δραστικότητα είναι η ένωση **11**.

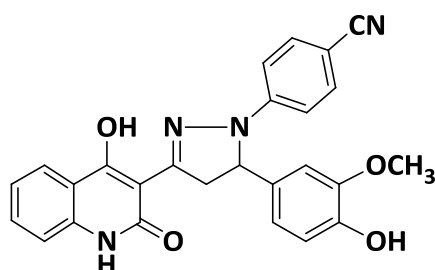
4.2.2 Συζήτηση αποτελεσμάτων αντιφλεγμονώδους δράσης των νέων μορίων

Η μελέτη για την ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης από σόγια των νέων μορίων απέδωσε κάποια ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

Η φύση του υποκαταστάτη στον δακτύλιο της υδραζίνης δείχνει και πάλι να επηρεάζει το αποτέλεσμα της δραστικότητας των μορίων. Από τις ενώσεις **10,11,12** που αποτελούν παράγωγα βανιλίνης, αυτή που παρουσιάζει την καλύτερη αντιφλεγμονώδη δράση είναι η ένωση **11**, η οποία προήλθε από αντίδραση με την 4-κυάνουδραζίνη. Στην περίπτωση της ένωσης **10** όπου το κυάνιο αφαιρείται και ο αρωματικός δακτύλιος μένει σκέτος, παρατηρούμε πως ο δείκτης IC₅₀ ανεβαίνει, όμως η δραστικότητας της ένωσης θεωρείται και πάλι ικανοποιητική. Τέλος, προθέτοντας δύο μεθολο-υποκαταστάτες στον δακτύλιο της υδραζίνης, η αντιφλεγμονώδης δράση της ένωσης μειώνεται σημαντικά και θεωρείται αμελητέα (ένωση **12**).

Στη συνέχεια της αξιολόγησης της αντιφλεγμονώδους δράσης των νέων μορίων συγκρίνονται τα πυραζολινικά ανάλογα **11,13,14** τα οποία προήλθαν από την αντίδραση διαφορετικής χαλκόνης με την 4-κυάνουϋδραζίνη. Είναι φανερό πως το παράγωγο της βανιλίνης, που διαθέτει μια μεθοξυ- ομάδα στην 3' θέση του δακτυλίου Β και μία υδροξυλομάδα στην 4' θέση του ίδιου δακτυλίου είναι αυτό με την καλύτερη δράση ($IC_{50}=52$). Στην περίπτωση της ένωσης **14**, όπου η υδροξυλομάδα του δακτυλίου καλύπτεται από μια ακόμη μεθοξυ ομάδα παρατηρούμε πως η δραστηριότητα μειώνεται πολύ. Ενώ στην ένωση **13**, η οποία διαθέτει μόνο μια μεθυλομάδα στην 2' θέση του δακτυλίου Β η αντιφλεγμονώδης δράση του μορίου χάνεται τελείως.

Συμπερασματικά λοιπόν, από τα νέα πυραζολινικά ανάλογα που μελετήθηκαν ως προς την βιολογική τους δραστηριότητα, αυτό με την καλύτερη συνδυασμένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση είναι η ένωση **11**.



Σχήμα 44 : Πυραζολινικό ανάλογο με την καλύτερη συνδυασμένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.

4.3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός τριών κινολινονο-χαλκονών και πέντε πυραζολινών. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η πιθανή αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδης δράση των πυραζολινικών παραγώγων.

Σε πρώτο στάδιο παρασκευάστηκε η 3-ακετυλο-4-υδρόξυ-2-κινολινόνη (**3**), η οποία μέσω αλδολικής συμπύκνωσης με κατάλληλες αρωματικές αλδεΐδες παρουσία καταλυτικής ποσότητας πιπεριδίνης οδήγησε στο σχηματισμό των νέων κινολινονών-χαλκονών.

Στη συνέχεια, τα νέα ετεροκυκλικά πυραζολινικά ανάλογα συντέθηκαν μέσω δύο διαφορετικών μεθόδων. Η ένωση **10** παρασκευάστηκε μέσω θέρμανσης της χαλκόνης **6** με φαινυλδραζίνη σε οξικό οξύ. Ενώ οι ενώσεις **11-14** σχηματίστηκαν μέσω θέρμανσης της αντίστοιχης χαλκόνης με παράγωγα υδραζίνης, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη οξικό οξύ και αιθανόλη.

Τα παράγωγα που προέκυψαν και από τις δυο μεθόδους παρουσίασαν ικανοποιητικές αποδόσεις και υψηλή καθαρότητα. Μόνο το πυραζολινικό παράγωγο που προήλθε από την χαλκόνη **5** υποβλήθηκε σε περαιτέρω διεργασίες καθαρισμού (ένωση **13**).

Συμπερασματικά, συγκριτικά και με τις ενώσεις-οδηγούς (**i-iii**), τα πυραζολινικά παράγωγα παρασκευάστηκαν σε αρκετά ικανοποιητικά αποδόσεις.

Τα πυραζολινικά ανάλογα που σχηματίστηκαν, μελετήθηκαν έπειτα ως προς την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση τους. Τα αποτελέσματα των *in vitro* δοκιμασιών οδήγησαν σε χρήσιμα συμπεράσματα για τη σχέση δομής-βιολογικής δράσης των νέων μορίων. Από τη μελέτη αυτή προσδιορίστηκαν τα απαραίτητα δομικά χαρακτηριστικά των νέων παραγώγων με συνδυασμένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, ώστε να χρησιμεύσουν ως μόρια-οδηγοί για την ανάπτυξη νέων πιο αποτελεσματικών βιοδραστικών μορίων.

4.4 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα διπλωματική εργασία ανοίγουν νέους ορίζοντες για την έρευνα στο κομμάτι της σύνθεσης νέων πυραζολινικών αναλόγων, καθώς και δοκιμών τροποποιήσεων προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω η σχέση δομής-βιολογικής δράσης.

Μια πρώτη προσέγγιση για τη μελλοντική σύνθεση νέων πυραζολινικών αναλόγων αφορά στον σχηματισμό υβριδικών κινολινονών-χαλκονών. Η δράση διαφορετικά υποκατεστημένων αρωματικών αλδεϋδών στην ένωση **3**, θα μπορούσε να οδηγήσει στο σχηματισμό νέων πυραζολινικών μορίων με βελτιωμένες ιδιότητες.

Από όλες τις δομικές τροποποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν, στην παρούσα εργασία, στον δακτύλιο Β του μορίου της χαλκόνης, τα παράγωγα της κινολινονο-χαλκόνης **6 (10,11,12)** ήταν αυτά που παρουσίασαν την καλύτερη βιολογική δραστηριότητα. Επιπλέον, είναι φανερό πως οι ενώσεις αυτές απέδωσαν και τις πιο ικανοποιητικές αποδόσεις. Μια δεύτερη, λοιπόν, μελλοντική προσέγγιση θα ήταν η δράση και άλλων διαφορετικών παραγώγων υδραζίνης στην κινολινονο-χαλκόνη **6**, προς σχηματισμό νέων πυραζολινικών παραγώγων.

Τέλος, μια ακόμη δομική τροποποίηση προς τον σχηματισμό νέων βελτιωμένων πυραζολινικών αναλόγων, θα μπορούσε να επέλθει στον δακτύλιο Α των τελικών μορίων, αλλάζοντας τον υποκαταστάτη N-H. Μια πιθανή αντικατάστασή του θα ήταν από έναν άλκυλο- υποκαταστάτη.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Tapas A.R.; Sakarkar D.M.; Kakde R.B., "Flavonoids as Nutraceuticals: A Review" *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **2008**; 7 (3), 1089-1099.
- [2] Shohaib.T, M.Shafique, Dhanya.N, Madhu.C.Divakar, "IMPORTANCE OF FLAVONOIDES IN THERAPEUTICS", *HYGEIA :: JOURNAL FOR DRUGS AND MEDICINES Hygeia.J.D.Med.vol.3 (1)*, **2011**, pp.1-18.
- [3] Dey P.M. and Harborne J.B. (1989). "Methods in Plant Biochemistry" Vol. 1 pp. 197- 441, *Academic Press, London*.
- [4] Middleton EJ. "Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function". *Adv Exp Med Biol* **1998**;439:175–82.
- [5] Korkina LG, Afanas'ev IB. "Antioxidant and chelating properties of flavonoids." *Adv Pharmacol* **1997**;38:151–63.
- [6] Y. Nishizuka, "The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation," *Nature*, vol. 334, no. 6184, pp. 661–665, **1988**.
- [7] T. Hunter, "Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling," *Cell*, vol. 80, no. 2, pp. 225–236, **1995**.
- [8] R. P. Borris, "Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 51, no. 1–3, pp. 29–38, **1996**.
- [9] A. Mori, C. Nishino, N. Enoki, and S. Tawata, "Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*," *Phytochemistry*, vol. 26, no. 8, pp. 2231–2234, **1987**.
- [10] K. Osawa, H. Yasuda, T. Maruyama, H. Morita, K. Takeya, and H. Itokawa, "Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria," *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 40, no. 11, pp. 2970–2974, **1992**.
- [11] K. Brusselmans, E. de Schrijver, W. Heyns, G. Verhoeven, and J. V. Swinnen, "Epigallocatechin-3-gallate is a potent natural inhibitor of fatty acid synthase in intact cells and selectively induces apoptosis in prostate cancer cells," *International Journal of Cancer*, vol. 106, no. 6, pp. 856–862, **2003**.

- [12] Øyvind M. Andersen, Kenneth R. Markham, "Flavonoides: Chemistry, Biochemistry and applications", *Taylor and Francis Group*, **2006**.
- [13] Zdzisława Nowakowska, "A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones", *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2007**, *42*, 125-137.
- [14] Nimmanapalli P. Reddy, Polamarasetty Aparoy, T. Chandra Mohan Reddy, Chandrani Achari, P. Ramu Sridhar, Pallu Reddanna, "Design, synthesis, and biological evaluation of prenylated chalcones as 5-LOX inhibitors", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2010**, *18*, 5807–5815.
- [15] v. Kostanecki S., Tambor J. "Über die sechs isomeren Monooxybenzalacetophenone (Monooxychalkone)." *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **32 (1899)** 1921-1926.
- [16] Opletalova V., "Chalkones and their heterocyclic analogues as potential medicaments." *Folia Pharmaceutical Universities Carolinae*, **25 (2000)** 21-33.
- [17] Batovska, D.I.; Todorova, I. "Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones", *Current Clinical Pharmacology* **2010**, *5(1)*, 1.
- [18] Stevens J.F.; Page J.E. "Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health!", *Phytochemistry*, **2004**, *65*, 1317–1330.
- [19] Detsi, A.; Majdalani, M.; Kontogiorgis, C.A.; Hadjipavlou-Litina, D.; Kefalas, P. "Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity", *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 8073.
- [20] Jung, J.-C.; Jang, S.; Lee, Y.; Min, Y.; Lim, E.; Jung, H.; Oh, M.; Oh, S.; Jung, M. "Efficient Synthesis and Neuroprotective Effect of Substituted 1,3-Diphenyl-2-propen-1-ones", *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4054.
- [21] Claisen L.; Claparbde A. "Condensation von Ketonen mit Aldehyden" *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **1881**, *14*, 2460-2468.
- [22] Caddick, S. "Microwave assisted organic reactions" *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 10403–10432; (b) Nuchter, M.; Muller, U.; Ondruschka, B.; Tied, A.; Lautenschlager, "Microwave-assisted chemical reactions" *W. Chem. Eng. Technol.* **2003**, *26*, 1207–1216; (c) Mavandadi, F.; Lidstrom, P. Curr. "Microwave - assisted chemistry in drug discovery" *Top. Med. Chem.* **2004**, *4*, 773–792; (d) Nuchter, M.; Ondruschka, B.; Bonrath, W.; Gum, A., "Microwave assisted synthesis - a critical technology

overview" *Green Chem.* **2004**, *6*, 128–141; (e) Kappe, C. O. *Angew.*, "Controlled microwave heating in modern organic synthesis" *Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 6250–6284;

[23] Fan, X.-S.; Zhang, Y.-M., "A Simple Access to Chalcones via Modified Mukaiyama Aldol Condensation Promoted by SmI₂/TMSCl", *Chinese Journal of Chemistry*, **2002**, *20*, 198-201.

[24] Eddarir S., et al. "An efficient synthesis of chalcones based on the Suzuki reaction." *Tetrahedron Letters*, *44* (**2003**) 5359-5363.

[25] Rateb N.M., Zohdi H.F. "Atom-Efficient, Solvent-Free Green Synthesis of Chalcones by Grinding." *Synthetic Communications*, *40* (**2009**) 2789-2794.

[26] Loudon, J.D., "STUDIES ON PYRAZOLOTHIAZOLE DERIVATIVES" *Chemistry of Carbon Compounds, Elsevier Publishing Company, New York (1957)*.

[27] Md. Azizur Rahman, Anees A. Siddiqui, "Pyrazoline Derivatives: A Worthy Insight into the Recent Advances and Potential Pharmacological Activities", *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, **2010**,*2*,165-175.

[28] G. Rathish , Kalim Javed , Shamim Ahmad, Sameena Bano , M. S. Alam , K. K. Pillai , Surender Singh , Vivek Bagchi, "Synthesis and antiinflammatory activity of some new 1,3,5-trisubstituted pyrazolines bearing benzene sulfonamide", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*,**2009**,*19*,255–258.

[29] SK Sahu , M Banerjee , A Samantray , C Behera and MA Azam, "Synthesis, Analgesic, Anti-inflammatory and Antimicrobial Activities of Some Novel Pyrazoline Derivatives," *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, June **2008**; *7* (2): 961-968.

[30] Amir M, Kumar H, Khan SA. "Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazoline derivatives as new anti-inflammatory and analgesic agents". *Bioorg Med Chem Lett.* **2008**; *18*:918-922.

[31] Rani P, Srivastava VK, Kumar A. "Synthesis and anti-inflammatory activity of heterocyclic indole derivatives". *Eur J Med Chem.* **2004**; *39*:449-452.

[32] Palaska E, Aytamira M, Uzbay IT, Erola D. "Synthesis and antidepressant activities of some 3,5-diphenyl-2-pyrazolines." *Eur J Med Chem.* **2001**; *36*:539-543.

[33] Prasad YR, Rao AL, Prasoona L, Murali K, Kumar PR. "Synthesis and antidepressant activity of some 1,3,5-triphenyl-2-pyrazolines and 3-(2-

hydroxynaphthalen-1-yl)-1,5-diphenyl-2-pyrazolines". *Bioorg Med Chem Lett.* **2005**; 15:5030-5034.

[34] Udipi RH, Kushnoor AS. "Synthesis and biological evaluation of certain pyrazoline derivatives of naproxen." *Ind J Het Chem.* **1998**; 8:63-66.

[35] Bharmal FM, Kaneriya DJ, Parekh HH. "Synthesis of some pyrazoline derivatives as biologically active agents." *Ind J Het Chem.* **2000**; 10:189-192.

[36] Basawaraj R, Yadav B, Sangapure SS. "Synthesis of some 1Hpyrazolines bearing benzofuran as biologically active agents". *Ind J Het Chem.* **2001**; 11:31-34.

[37] Desai J, Nair KB, Misra AN. "Synthesis and antimicrobial activities of some new pyrazolines, phenyl pyrazolines, flavanones, and related compounds". *Ind J Het Chem.* **2001**; 10:261-266.

[38] Ozdemir A, TuranZitouni G, Kaplancıklı ZA, Revial G, Guven K. "Synthesis and antimicrobial activity of 1-(4-aryl-2-thiazolyl)-3-(2-thienyl)-5-aryl-2-pyrazoline derivatives." *Eur J Med Chem.* **2007**; 42:403-409.

[39] Abunada NM, Hassaneen HM, Kandile NG, Miqdad OA. "Synthesis and biological activity of some new pyrazoline and pyrrolo [3, 4-c] pyrazole-4, 6-dione derivatives: Reaction of nitrilimines with some dipolarophiles." *Molecules* **2008**; 13:1011-1024.

[40] Bhatt AH, Parekh HH, Parikh KA, Parikh AR. "Synthesis of pyrazolines and cyanopyridines as potential antimicrobial agents." *Ind J Chem.* **2001**; 40:57-61.

[41] Bhat BA, Dhar KL, Puri SC, Saxena AK, Shanmugavel M, Qazi GN. "Synthesis and biological evaluation of chalcones and their derived pyrazoles as potential cytotoxic agents." *Bioorg Med Chem Lett.* **2005**; 15:3177-3180.

[42] Manna F, Chimenti F, Fioravanti R, Bolasco A, Secci D, Chimenti P, Ferlini C, Scambi G. "Synthesis of some pyrazole derivatives and preliminary investigation of their affinity binding to P-glycoprotein". *Bioorg Med Chem Lett.* **2005**; 15:4632-4635.

[43] B. Gowramma, S. Jubie, R. Kalirajan, S. Gomathy and K. Elango, "Synthesis, Anticancer activity of some 1- (Bis N, N-(ChloroEthyl) - Amino Acetyl)-3, 5-Disubstituted 1, 2-Pyrazolines." *International Journal of PharmTech Research, Vol.1, No.2, pp 347-352.*

[44] Prasad R.Y., Kumar R.P., Rao L.A., Viswanadh K.R. "In vitro antioxidant activity and scavenging effects of some new 1,3,5-triphenyl-2-pyrazolines and 3-(2'-hydroxy naphthalen-1'-yl)-1, 5-diphenyl-2-pyrazolines" *Saudi Pharmaceutical Journal*, **2007**.

- [45] Mohamed Abdel-Aziz, Amira M. Gamal-Eldeen, "Synthesis and screening of anti-cancer, antioxidant, and anti-inflammatory activities of novel galloyl pyrazoline derivatives", *Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy)*, **2009**, Volume 47, Number 9, 854-863.
- [46] E. Fischer and O. Knövenagel, " Ultrasonics Promoted Synthesis of 5-(Pyrazol-4-yl)-4,5-Dihydropyrazoles Derivatives" *Ann.*, **239**, 194 (**1887**).
- [47] K. v. Auwers and K. Müller, " One-pot rapid and efficient synthesis of new spiro derivatives of 11H-indeno[1,2-b]quinoxalin-11-one, 6H-indeno[1,2-b]pyrido[3,2-e]pyrazin-6-one and isatin-based 2-pyrazolines" *Ber.*, **41**, 4230 (**1908**).
- [48] K. v. Auwers and A. Kreuder, *Ber.*, **58**, 1974 (**1925**).
- [49] W. M. Jones, " Pyrazolines. III. The Stereochemistry of the Decomposition of 2-Pyrazolines" *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 5153 (**1959**).
- [50] W. M. Jones and W. T. Tai, " Diazo Compounds: Properties and Synthesis" *J. Org. Chem.*, **27**, 1324 (**1962**).
- [51] C. G. Overberger and J. P. Anselme, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 869 (**1962**).
- [52] T. V. Van Anken and K. L. Rinehart, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 3736 (**1962**).
- [53] G. D. Kennedy, A. L. Baumstark, M. Dotrong, T. Thomas, and N. Narayanan, *J. Heterocycl. Chem.*, **28**, 1773 (**1991**).
- [54] H. v. Pechmann, *Ber.*, **27**, 1890 (**1894**).
- [55] A. Lévai and G. Tóth, *Trends in Heterocyclic Chemistry*, **4**, 89 (**1995**).
- [56] E. Bergmann and F. J. Bergmann, *Org. Chem.*, **3**, 125 (**1938**).
- [57] A. N. Nesmeyanov and N. K. Kochetkov, *Izv. Akad Nauk SSSR, Otd. Khim Nauk.*, **686** (**1951**).
- [58] L. N. Owen and M. V. S. Sultanbawa, *J. Chem. Soc.*, 3098 (**1949**).
- [59] Azarello, *J. Gazz. Chim. Ital.*, **1906**, 36, 50.
- [60] L. I. Smith and K. L. Howard, *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 165 (**1943**).
- [61] G. V. S. Raju and K. S. Rao, *Curr. Sci.*, **58**, 1030 (**1989**).
- [62] Smith, L. I.; Pings, W. B. *J. Org. Chem.*, **1937**, 2, 23.
- [63] Mustafa, A.; Freifel, A. M. *J. Org. Chem.*, **1959**, 24, 1470.
- [64] Sayed, G. H.; Kjoson, N. *Indian J. Chem.*, **1980**, 19B, 980.
- [65] Aleksandrova, I. A.; Dorofeeva, N. A.; Chernova, A. V.; Kharullin, V. K. *Zh. Org. Khim.*, **1978**, 14, 1974.

- [66] Levai, A. *Monatsh. Chem.*, **1995**, *126*, 1245.
- [67] Padmavathi, V.; Reddy, B. J. M.; Subbaiah, D. R. C. V. *New J. Chem.*, **2004**, *28*, 1479.
- [68] Levai, A. *Khim. Geterotskl. Soedin.*, **1997**, 579.
- [69] Toth, G.; Levai, A.; Duddeck, H. *Magn. Reson. Chem.*, **1992**, *30*, 235.
- [70] Toth, G.; Levai, A.; Szollosy, A.; Duddeck, H. *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 863.
- [71] Davood Azarifar* and Hassan Ghasemnejad, "Synthesis of Some 3,5-Arylated 2-Pyrazolines, Microwave-Assisted ." *Molecules* **2003**, *8*, 642-648.
- [72] Vounauwers, K.; Muller, A. *Ber. Dt. Chem. Ges.* **1908**, *41*, 4230.
- [73] Palaska, E.; Erol, D.; Demirdamar, R. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.*, **1996**, *31*, 43.
- [74] Fathi, T.; Dinh An, N.; Schmitt, G.; Cerutti, E.; Laude, B. *Tetrahedron*, **1988**, *44*, 4527.
- [75] Shaharyar, M.; Siddiqui, A. A.; Ali, M. A.; Sriram, D.; Yogeewari, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 3947.
- [76] Shahr, M. Y.; Siddiqui, A. A.; Ali, M. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 4571.
- [77] Kidwai, M.; Misra, P. *Synth., Commun.*, **1999**, *29*, 3237
- [78] Azarifar, D.; Ghasemnejad, H. *Molecules*, **2003**, *8*, 642.
- [79] Barton D., Ollis W.D. (Eds.) "The Synthesis and Reactions of Organic Compounds." *Comprehensive Organic Chemistry vol. 4. Heterocyclic Compounds, Pergamon: Oxford, 1979.*
- [80] Von Auwers, K.; Muller, K. *Chem. Ber.*, **1921**, *54*, 1000.
- [81] Suchchar, S. P.; Singh, A. K. *J. Indian Chem. Soc.*, **1985**, *62*, 142.
- [82] Ferres, H.; Hamdam, M. S.; Jackson, W. R. *J. Chem. Soc. B*, **1971**, 1892.
- [83] Bezuglyi, V. D.; Kotok, L. A.; Shimanskaya, N. P.; Bondarenko, V. E. *Zh. Obshch. Khim.*, **1969**, *39*, 2167.
- [84] Raiford, L. C.; Manley, R. H. *J. Org. Chem.*, **1940**, *5*, 345.
- [85] Bayer, H.; Dieterle, H. *Chem. Ber.*, **1911**, *44*, 2697.
- [86] Tsukerman, S. V.; Danil'chenko, E. V.; Lavrushin, V. F. *Ukr. Khim. Zh.*, **1976**, *42*, 383.
- [87] Lavrushin, V. F.; Bezugly, V. D.; Belous, G. G.; Tishchenko, V. G. *Zh. Obshch. Khim.*, **1964**, *34*, 7.
- [88] Yoshihara, N.; Hasegawa, T.; Hasegawa, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1991**, *64*, 719.

- [89] Al-Farkh, Y. A.; Al-Hajjar, F. H.; Al-Shamali, F. S.; Hamoud, H. S. *Chem. Pharm. Bull.*, **1979**, *27*, 257.
- [90] V.G. Andrianov, Yu. T. Struchov, V. N. Postnov, E.I.Klimova and V.A. Sazonova, *Stare Univercity, Chemistry Department, Moscow (U.S.S.R.)*, **1983**.
- [91] Smith, G. and Laude, B., *Tetrahedron Lett.*, 3727 (**1978**).
- [92] Padwa, A., Nahm, S. and Sato, E., *J. Org. Chem.*, *43*, 1664 (**1978**).
- [93] Meier, H. and Heimgartner, H., *Helv. Chim. Acta.*, *68*, 1283 (**1985**).
- [94] Y. Ju, R. S. Varma, *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 135-141.
- [95] K. Alex, A. Tillack, N. Schwarz, M. Beller, *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 2377-2379.
- [96] S.-L. Cui, J. Wang, Y.-G. Wang, *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 13-16.
- [97] S. Malhotra, G. Shakya, A. Kumar, B.W. Vanhoecke, A.L. Cholli, H.G. Raj, L. Saso, B. Ghosh, M.E. Bracke, A.K. Prasad, S. Biswal, V.S. Parmar. "Antioxidant, anti-inflammatory and antiinvasice Activities of Biopolyphenolics". *ARKIVOC*, **2008**, (vi) 119-139.
- [98] Sulekha Mandal, Satish Yadav, Sunita Yadav, Rajesh Kumar Nema, "Antioxidants: A Review", *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **2009**, *1*, 102-104.
- [99] Miller, H.E., Rigelhof, F., Marquart, L., Prakash, A., and Kanter, M. (**2000**) *Cereal Foods World* *45*(2), 59-63.
- [100] Miller, H.E., Rigelhof, F., Marquart, L., Prakash, A., and Kanter, M. (**2000**) *J. Am. Coll. Nutr.* *19*(3), 312S-319S.
- [101] E.Y. Bissonnette, G.M. Tremblay, V. Turmel, B. Pirotte, M. Reboud-Ravaux, "Coumarinic derivatives show anti-inflammatory effects on alveolar macrophages, but their anti-elastase activity is essential to reduce lung inflammation in vivo", *International Immunopharmacology*, **2009**, *9*, 49-54.
- [102] Marina Roussaki a, Belinda Hall b, Sofia Costa Lima c, Anabela Cordeiro da Silva c,d, Shane Wilkinson b, Anastasia Detsi, "Synthesis and anti-parasitic activity of a novel quinolinone-chalcone series." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*.
- [103] A. Detsi, V.Bardakos, J.Markopoulos and O.Igglessi-Markopoulou, "Reactions of 2-methyl-3,1-benzoxazin-4-one with active methylene compounds. A new route to 3-substituted-4-hydroxy-quinolin-2-ones", *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1996**, 2909.

- [104] Haining, J.L.; Axelrod, B. "Induction period in the lipoxidase-catalyzed oxidation of linoleic acid and its abolition by substrate peroxide." *J. Biol. Chem.* **1958**, *232*, 193–202.
- [105] Solomon, E.I.; Zhou, J.; Neese, F.; Pavel, E.G. "New insights from spectroscopy into the structure/function relationships of lipoxygenases." *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 795–808.
- [106] Rosalina Wisastra and Frank J. Dekker, "Inflammation, Cancer and Oxidative Lipoxygenase Activity are Intimately Linked", *Cancers* **2014**, *6*, 1500-1521; doi:10.3390/cancers6031500.
- [107] Montuschi P. "Leukotrienes, antileukotrienes and asthma". *Mini Rev Med Chem* **2008**;8:647–56.
- [108] Chen Y, Hu Y, Zhang H, Peng C, Li S. "Loss of the Alox5 gene impairs leukemia stem cells and prevents chronic myeloid leukemia". *Nat Genet* **2009**;41:783–92.
- [109] Dieter Steinhilber and Bettina Hofmann, "Recent Advances in the Search for Novel 5-Lipoxygenase Inhibitors." *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **2014**, *114*, 70–77.
- [110] Detsi, A., "Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: synthesis characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity", *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*, 8073-8085.
- [111] N.J. Miller, C. Rice-Evans, M.G. Davies, V. Gopinathan, A. Milner, "A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates." *Clin. Sci.*, **84** (1993), pp. 407–412.
- [112] Stjepan Milardovića, Damir Ivekovićb, Božidar S. Grabarićb, "A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical". *Bioelectrochemistry Volume 68, Issue 2, May 2006, Pages 175–180*.
- [113] M.S. Blois, "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical." *Nature*, **181** (1958), pp. 1199–1200
- [114] Yu L J Agric "Free radical scavenging properties of conjugated linoleic acids". *Food Chem.* **2001 Jul**; *49*(7):3452-6.
- [115] Parry J, Su L, Luther M, Zhou K, Yurawecz MP, Whittaker P, Yu L J Agric "Fatty acid composition and antioxidant properties of cold-pressed marionberry,

boysenberry, red raspberry, and blueberry seed oils." *Food Chem.* **2005** Feb 9; 53(3):566-73.

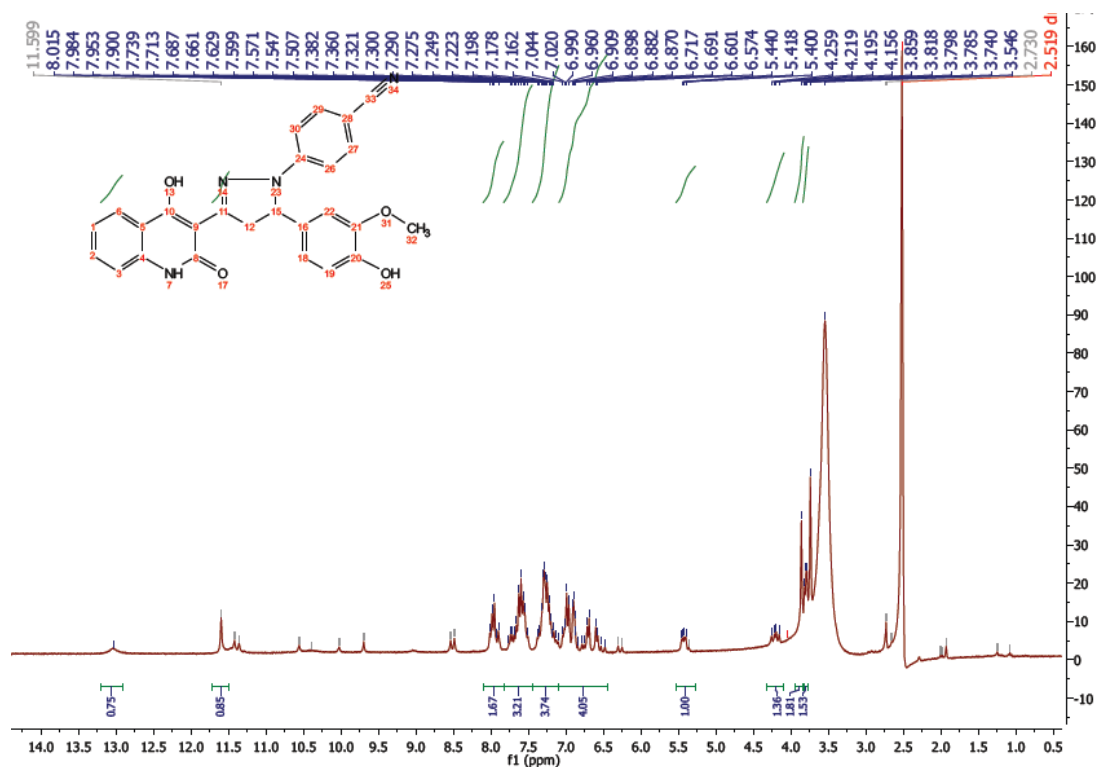
[116] Nishizawa M, Kohno M, Nishimura M, Kitagawa A, "Non-reductive scavenging of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) by peroxyradical: a useful method for quantitative analysis of peroxyradical." *Niwano Y Chem Pharm Bull (Tokyo)*. **2005** Jun; 53(6):714-6.

[117] A. Ayala, M.F. Muñoz, S. Argüelles, "Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2014**, 1-31.

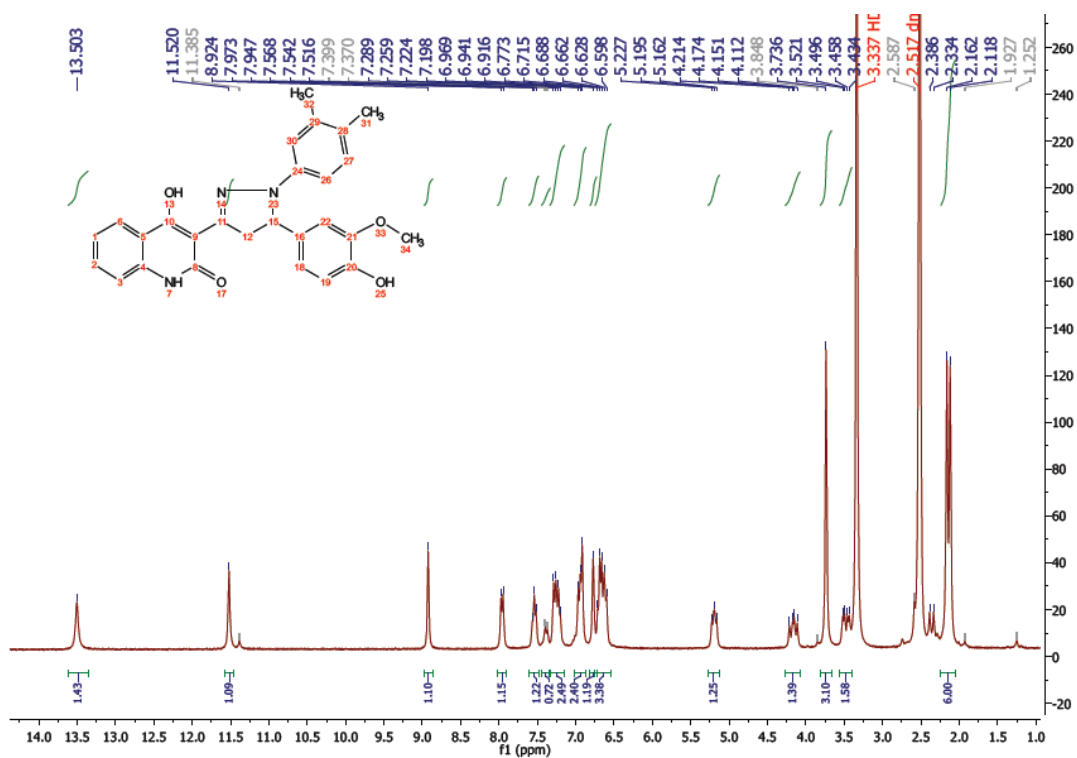
[118] C. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina, *J.Enzyme Inhib.Med.Chem* **2003** 18, 63.

[119] C. Liegeois , C. G. Lermusieau ,S. J. Collin ,*Agric. Food. Chem* **2000** 48 1129.

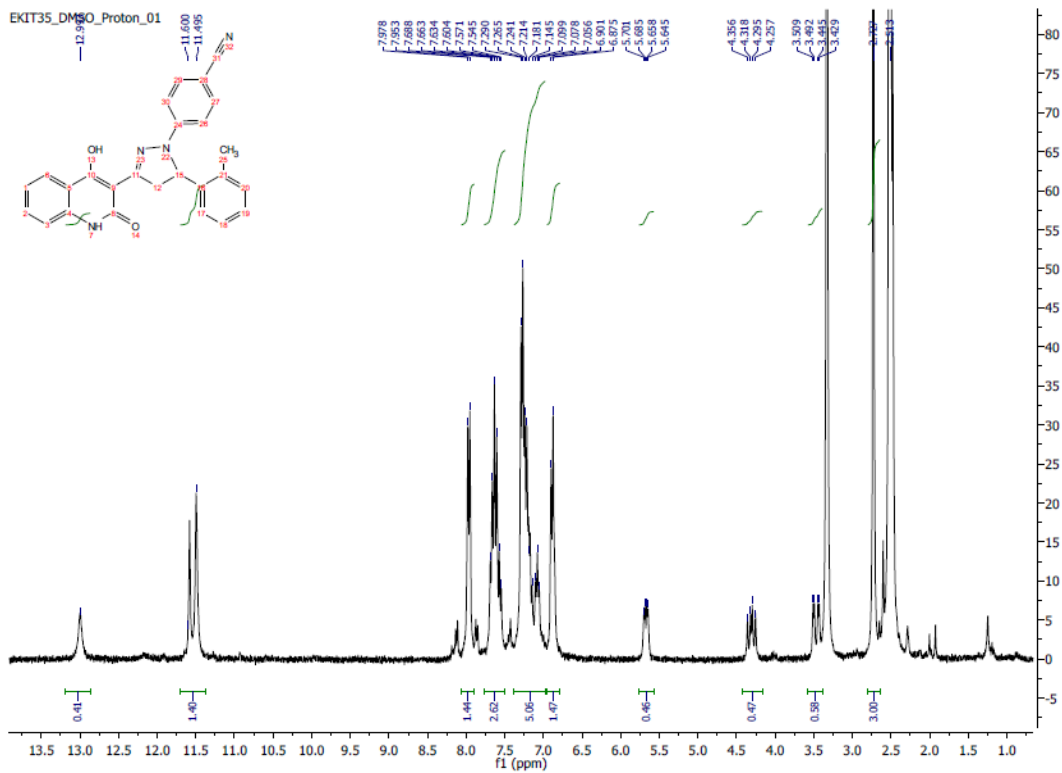
6 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΜΟΡΙΩΝ



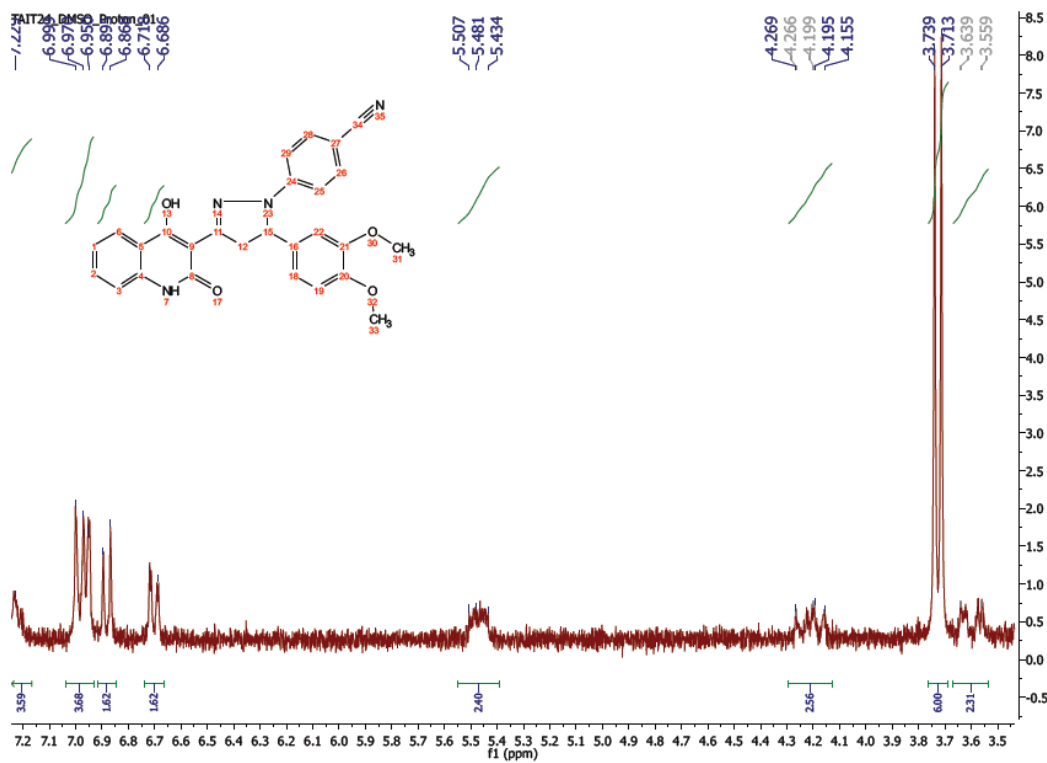
Εικόνα16 : Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) της πυραζολίνης 11



Εικόνα 17 : Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) της πυραζολίνης 12



Εικόνα 18 : Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) της πυραζολίνης 13



Εικόνα 19 : Φάσμα πρωτονίου ^1H NMR (300MHz, DMSO-d_6) της πυραζολίνης 14