



ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ (I) ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΝΕΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ
ΧΑΛΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΤΟΥΣ
ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ**

Χολέβα Δανάη

Επιβλέπουσα : Δέτση Αναστασία

Αναπλ. Καθηγήτρια

Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ 2018

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Στο πλαίσιο αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν κοινά εργαστηριακά όργανα και διατάξεις φασματοσκοπικής ανάλυσης Μαγνητικού Πυρηνικού Συντονισμού (NMR). Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η σύνθεση νέων αναλόγων πρενυλιωμένων χαλκονών με διάφορους υποκαταστάτες, ο μοριακός χαρακτηρισμός και ταυτοποίηση των νέων ενώσεων, καθώς και η μελέτη της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην επιστημονική υπεύθυνο Δρ. Αναστασία Δέτση, Αναπλ. Καθηγήτρια ΕΜΠ, για την ανάθεση του θέματος της διπλωματικής μου εργασίας, την εμπιστοσύνη της για την ανάληψη ευθυνών εντός του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας και την υποστήριξη της κατά την ερευνητική δραστηριότητά μου, την υπομονή κατά την εκπόνηση της εργασίας και την καθοδήγησή της καθόλη της διάρκειά της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην Υπ. Διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ιωάννα Κωστοπούλου για την βοήθεια της στην ερμηνεία και κατανόηση των φασματοσκοπικών αποτελεσμάτων, καθώς και την καθοδήγηση της καθ'όλη τη διάρκεια συγγραφής της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους/ες για την ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχαν. Ειδικότερα, τους Μήτσο, Ιωάννα, Νατάσσα, Ελεάνα, Μαρία και Κόρα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ABSTRACT	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	5
ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ.....	5
1.1 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΟΜΗ	5
1.2. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	7
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 1	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	13
ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ.....	13
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΠΟ ΤΑ ΦΥΤΑ.....	14
2.3 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΩΝ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ	14
2.3 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΩΝ.....	19
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 2	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	22
ΧΑΛΚΟΝΕΣ.....	22
3.1 Η ΠΡΟΝΟΜΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΧΑΛΚΟΝΩΝ	22
3.2 ΦΥΣΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΧΑΛΚΟΝΩΝ	24
3.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΧΑΛΚΟΝΩΝ	26
3.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ CLAISEN- SCHMIDT.....	28
3.5 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΧΑΛΚΟΝΩΝ	31
3.6 ΠΡΕΝΥΛΙΩΜΕΝΕΣ ΧΑΛΚΟΝΕΣ.....	36
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 3	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	42
ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ.....	42
4.1 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	42
4.2 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	44
4.3 ΔΡΑΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΩΝ ROS	46
4.4 Το ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΟ ΠΑΡΑΔΟΞΟ.....	47
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 4	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	50
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ	50
5.1 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	50
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ 5	54
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	55
6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	55
6.2 ΌΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ	56
6.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΜΗ ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΔΙΑΘΕΣΙΜΩΝ ΑΚΕΤΟΦΑΙΝΟΝΗΣ ΚΑΙ ΒΕΝΖΑΛΛΕΨΔΗΣ	57
6.4 ΣΥΝΘΕΣΗ ΧΑΛΚΟΝΩΝ	60
6.5 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΔΟΜΗΣ ΧΑΛΚΟΝΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ¹ H NMR.....	70

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.....	75
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ.....	75
7.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΧΗΜΕΙΟΦΩΤΑΥΓΕΙΑΣ.....	75
7.2 ΜΕΘΟΔΟΣ DPPH.....	76
7.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8.....	79
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	79
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ.....	81

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1. Δομές φαρμάκων από φυσικά προϊόντα
Σχήμα 2. Παραδείγματα αρωματικών φυτών-πηγών αιθέριων ελαίων του μεσογειακού οικοσυστήματος
Σχήμα 3. Κατάταξη αλκαλοειδών
Σχήμα 4. Βιοσύνθεση των φαινυλοπροπανοειδών
Σχήμα 5. Φαινυλοβενζοπυρανικός δομικός σκελετός φλαβονοειδών
Σχήμα 6. Δομές φλαβονοειδών
Σχήμα 7. Βιοσυνθετικό μονοπάτι φλαβονοειδών του φυτού <i>Arabidopsis thaliana</i> και του καλαμποκιού
Σχήμα 8. Γενική δομή χαλκονών
Σχήμα 9. Φυσικές πηγές χαλκονών
Σχήμα 10. Παραδείγματα βιοδραστικών χαλκονών
Σχήμα 11. Σύνθεση χαλκονών με τη βασικά καταλύμενη αντίδραση Claisen-Schmidt
Σχήμα 12. Σύνθεση χαλκονών με τη χρήση μικροκυμάτων
Σχήμα 13. Σύνθεση χαλκονών με αντίδραση Suzuki
Σχήμα 14. Καταλυτική σύνθεση διυδροχαλκονών με παλλάδιο
Σχήμα 15. Σύνθεση χαλκονών με λειοτριβήση
Σχήμα 16. Μηχανισμός αντίδρασης συμπύκνωσης Claisen-Schmidt
Σχήμα 17. Διάφορες βιολογικές λειτουργίες αναλόγων χαλκονών
Σχήμα 18. α-Τριαζολο-χαλκόνες με αντιβακτηριακή δράση
Σχήμα 19. Ανάλογα χαλκονών και κινολινών με αντιπαρασιτικές ιδιότητες
Σχήμα 20. 3-μεθυλο-2-βουτεν-1-υλο ομάδα (πρενυλο- ομάδα)
Σχήμα 21. Χαρακτηριστικές πρενυλιωμένες χαλκόνες
Σχήμα 22. Αρχή του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού
Σχήμα 23. Σχηματική λειτουργία ενός φασματομέτρου NMR
Σχήμα 24. (α) Γενική δομή χαλκονών, (β) 3-μεθυλο-2-βουτεν-1-υλο ομάδα: πρενυλο-ομάδα.
Σχήμα 25. 4'πρενυλό-2'υδροξύ-χαλκόνες που συντέθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας
Σχήμα 26. Γενική πορεία σύνθεσης της 4-O-πρενυλο-2-υδροξύ-ακετοφαινόνης
Σχήμα 27. Ισοπρενυλοβρωμίδιο
Σχήμα 28. Γενική πορεία σύνθεσης της 3,4-O-διμεθοξύ-μεθυλο-βενζαλδεύδης
Σχήμα 29. 3,4-O-διμεθοξύ-μεθυλο-βενζαλδεύδη

Σχήμα 30. Γενική πορεία σύνθεσης των χαλκονών
Σχήμα 31. Χημικός τύπος της χαλκόνης 4
Σχήμα 32. Χημικός τύπος της χαλκόνης 5
Σχήμα 33. Το φυτό <i>Dalbergia sissoo</i>
Σχήμα 34. Χημικός τύπος της χαλκόνης 6
Σχήμα 35. Χημικός τύπος της χαλκόνης 7
Σχήμα 36. Χημικός τύπος της χαλκόνης 8
Σχήμα 37. Αντίδραση σύνθεσης της 2,3-Ο-μεθοξυ-μεθυλο -4'-Ο-πρενυλο-2'-υδροξυ-χαλκόνης (χαλκόνη 9)
Σχήμα 38. Χημικός τύπος της χαλκόνης 9
Σχήμα 39. Υδρογόνο του υδροξυλίου της θέσης 2' των χαλκονών
Σχήμα 40. Βινυλικά υδρογόνα του α, β ακόρεστου καρβονυλικού συστήματος
Σχήμα 41. Φάσμα ^1H NMR (300MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) της χαλκόνης 7

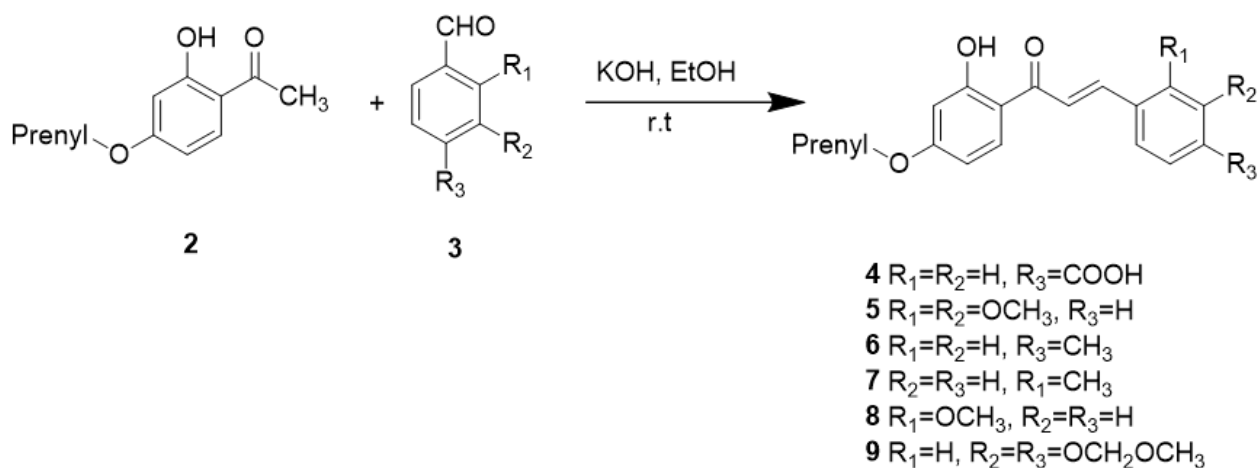
ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η σύνθεση νέων ανάλογων χαλκονών, ο φασματοσκοπικός τους χαρακτηρισμός και ο έλεγχος της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας.

Οι χαλκόνες αποτελούν υποκατηγορία των φυσικών φλαβονοειδών και τις πρώτες ενώσεις που σχηματίζονται κατά το βιοσυνθετικό μονοπάτι. Στην προνομιακή τους δομή οφείλουν μια σειρά από σημαντικές βιολογικές ιδιότητες στα φυτά, ενώ η χρήση τους για φαρμακευτικούς σκοπούς απαντάται ιστορικά σε διάφορους λαούς. Υπό αυτό το πρίσμα, τα συνθετικά ανάλογα των χαλκονών και η απομόνωσή τους από φυσικές πηγές αποτελούν αντικείμενο ερευνών παγκοσμίως για την ανάπτυξη ικανών και αποτελεσματικών φαρμάκων για την θεραπεία πολλών ασθενειών όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, ο ιός HIV, η φυματίωση και η ελονοσία κ.α. Ειδικότερα, οι πρενυλιωμένες χαλκόνες αποτελούν ιδιαίτερο αντικείμενο έρευνας χάρη στη δυσκολία απομόνωσής τους και τις σημαντικές φαρμακολογικές τους ιδιότητες.

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 ανθράκων. Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας η σύνθεση των νέων αναλόγων πραγματοποιήθηκε μέσω της αλδοολικής αντίδρασης συμπύκνωσης Claisen-Schmidt μεταξύ κατάλληλα υποκατεστημένων 2-υδροξυ-ακετοφαινονών και βενζαλδεϋδών, κατά το γενικό Σχήμα I. Τα νέα ανάλογα περιείχαν την πρενυλομάδα στη θέση 4' του δακτυλίου A και διαφορετικούς υποκαταστάτες στον δακτύλιο B. Οι αποδόσεις των αντιδράσεων κυμαίνονταν από 20-75%. Οι έξι πρενυλιωμένες χαλκόνες εξετάστηκαν ως προς την καθαρότητα και δομή τους μέσω φασματοσκοπίας ^1H και ^{13}C NMR. Στη συνέχεια, μελετήθηκαν ως προς ενδεχόμενη αντιοξειδωτική τους δράση

μέσω της ικανότητας εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών του DPPH και μέσω της ικανότητας δέσμευσης του H₂O₂.



Σχήμα I. Γενική πορεία σύνθεσης των πρενυλιωμένων χαλκονών στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας.

Λέξεις Κλειδιά: φλαβονοειδή , χαλκόνες, πρενυλομάδα, αντίδραση Claisen-Schmidt, αντιοξειδωτική δράση,

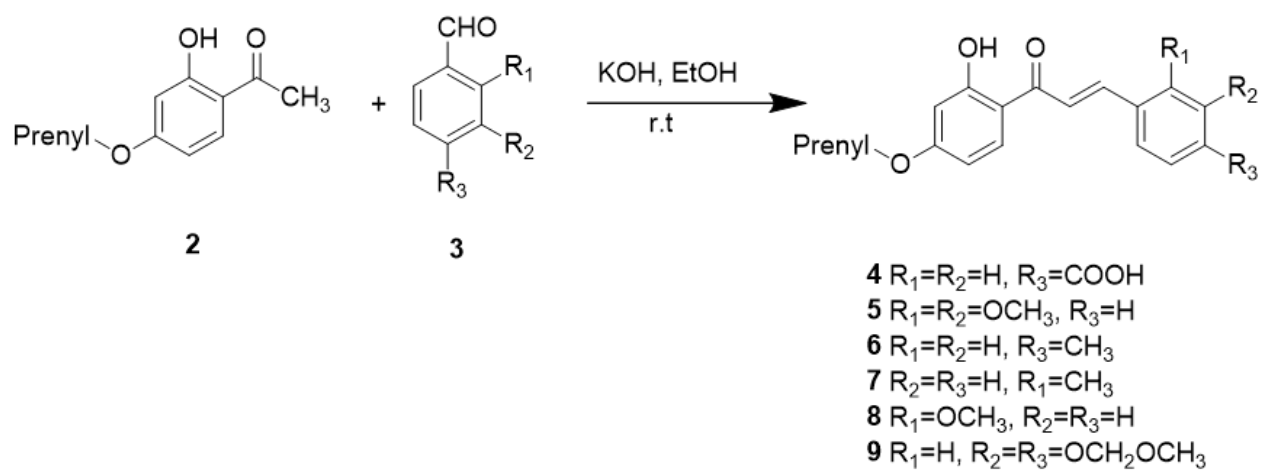
ABSTRACT

The objective of the present diploma thesis was the synthesis of new synthetic analogues of chalcones, their spectroscopic characterization and their evaluation as antioxidant agents.

Chalcones constitute a subcategory of natural flavonoids and are formed in the first step of the biosynthetic path of flavonoids. Due to their privileged structure, they possess a series of important biological functions, while their use for traditional therapeutical purposes is common among different populations. Under this prism, synthetic manipulations of chalcones and their isolation from natural sources are being investigated worldwide for the development of efficient drugs for the treatment of several dreadful diseases such as cancer, diabetes, HIV, tuberculosis, malaria etc. More in particular, prenylated chalcones consist subject of research due to their isolation difficulty and their distinct pharmaceutical properties.

The structural scaffold of chalcones includes two aromatic rings (A and B) and an α,β -unsaturated carbonyl system of three carbons. Within the framework of the present work, the synthesis of chalcones was achieved via the Claisen-Schmid aldol condensation reaction between appropriately substituted 2'-hydroxy-acetophenones and benzaldehydes. The new products bear the prenyl group in the position 4' of A ring and several substituents in the B ring, as showed at Scheme I.

The yield of the reactions ranged between 20-75 %. The six prenylated chalcones synthesized were examined for their purity and molecular identification through NMR ^1H and ^{13}C spectroscopy. Furthermore, they were studied for their potential antioxidant activity through their ability to scavege the stable DPPH free radicals and H_2O_2 .



Scheme I. General synthetic procedure of prepylated chalcones.

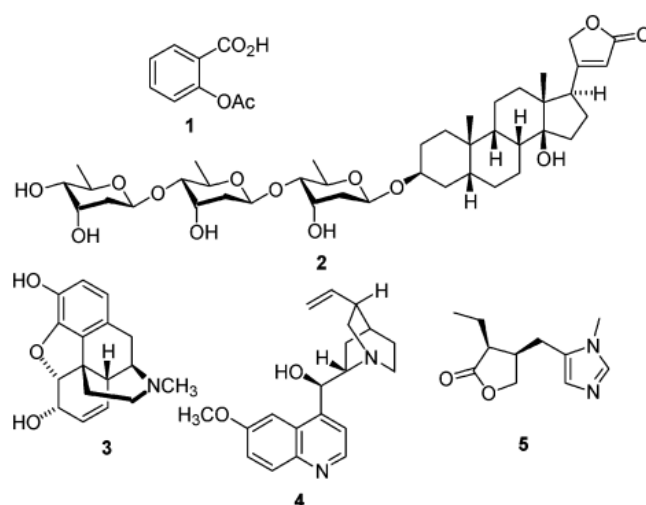
Key words: flavonoids, chalcones, prenyl-group, Claisen-Schmidt reaction, antioxidant activity.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ

1.1 Προέλευση και δομή

Η χρήση και η σημασία των φυσικών προϊόντων για θεραπευτικούς σκοπούς είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη, όπως αποδεικνύεται από το πλούσιο ιστορικό αρχείο από αρχαίους επιστήμονες για το πώς είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν τα φυσικά προϊόντα μόνα τους ή και σε συνδυασμό, γεγονός που μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων [1]. Κλινικές, φαρμακολογικές και χημικές μελέτες των παραδοσιακών αυτών φαρμάκων τα οποία προήλθαν κυρίως από φυτά, αποτέλεσαν τη βάση των πρώτων φαρμάκων όπως η ασπιρίνη (1), η διγιοτοξίνη (2), η μορφίνη (3), η κινίνη (4) και η πιλοκαρπίνη (5) (Σχήμα 1) [2], [3].



Σχήμα 1. Δομές φαρμάκων από φυσικά προϊόντα [3].

Ως φυσικό προϊόν χαρακτηρίζεται μια χημική ένωση ή ουσία που παρασκευάζεται από ένα ζωντανό οργανισμό στη φύση και συνήθως παρουσιάζει φαρμακολογική ή βιολογική δράση. Για το λόγο αυτό, τα φυσικά προϊόντα χρησιμοποιούνται για την ανακάλυψη και το σχεδιασμό νέων φαρμάκων. Τα φυσικά προϊόντα απομονώνονται

από φυτά και ζώα. Τα ακατέργαστα εκχυλίσματα τους, συνήθως περιέχουν χημικές ενώσεις που διαφέρουν δομικά ανάλογα με την πηγή προέλευσής τους [3], [4].

Βασικό στοιχείο των φυσικών προϊόντων το οποίο τα καθιστά ενώσεις μεγάλης σημασίας που αξίζει να μελετηθούν, είναι το γεγονός ότι πολλά από αυτά αποτελούν «προνομιακές δομές». Ο ορισμός των «προνομιακών δομών» κατά IUPAC αναφέρει ότι είναι οι δομές που αποτελούνται από ένα ημιάκαμπτο δομικό σκελετό (scaffold) ο οποίος είναι σε θέση να διαθέτει πολλαπλούς υδρόφοβους υποκαταστάτες χωρίς να υποβάλλεται σε υδρόφοβη κατάρρευση.

Τα φυτά παράγουν μια τεράστια ποικιλία οργανικών ενώσεων, η μεγάλη πλειονότητα των οποίων δε συμμετέχει άμεσα στην ανάπτυξη τους. Οι ουσίες αυτές αναφέρονται παραδοσιακά ως δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι λειτουργίες τους, πολλές από τις οποίες παραμένουν άγνωστες, διερευνώνται με αυξανόμενη συχνότητα. Σε αντίθεση, οι πρωτογενείς μεταβολίτες, όπως οι φυτοστερόλες, τα ακυλο-λιπίδια, τα νουκλεοτίδια, τα αμινοξέα και τα οργανικά οξέα βρίσκονται στα πάσης φύσεως φυτά και εκτελούν μεταβολικούς ρόλους που είναι απαραίτητοι για την ανάπτυξή τους.

Τα φυσικά προϊόντα διαθέτουν από μόνα τους την δραστικότητα, την επιλεκτικότητα και τα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά που τα καθιστούν, κλινικά χρήσιμους, φαρμακευτικούς παράγοντες. Ενώ αρχικά τα φυσικά προϊόντα θεωρούνταν μόρια-στόχοι, δηλαδή ερευνούνταν με σκοπό να χρησιμοποιηθούν τα ίδια σε θεραπείες, άρχισαν να μελετώνται τρόποι με τους οποίους συνθετικά μόρια μπορούν να παραχθούν βασισμένα πάνω στα πρότυπα φυσικά προϊόντα, δηλαδή πώς τα φυσικά προϊόντα μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για τη συνθετική και φαρμακευτική χημεία (ενώσεις-οδηγούς) [4].

1.2. Κατηγορίες φυσικών φυτικών προϊόντων

Με βάση τη βιοσυνθετική τους προέλευση, τα φυτικά φυσικά προϊόντα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν στις εξής μεγάλες ομάδες: τα τερπενοειδή, τα αλκαλοειδή, τα φαινυλοπροπανοειδή και τις φαινολικές ενώσεις .

Τερπενοειδή

Τα τερπενοειδή ή ισοπρενοειδή αποτελούν οργανικές ενώσεις υψηλής πτητικότητας και συγκροτούν μια μεγάλη κατηγορία φυσικών προϊόντων που προέρχονται από μονάδες ισοπρενίου που συνδέονται μεταξύ τους με πολλούς συνδυασμούς. Πάνω από 29.000 διαφορετικές δομές, κυκλικές ή άκυκλες και διαφόρου βαθμού οξυγόνωσης, περιλαμβάνουν ενώσεις όπως: i) καροτενοειδή (χρωστικές της φωτοσύνθεσης), ii) πλαστοκινόνη, ουμπικινόνη (φορείς e στη φωτοσύνθεση), iii) γιβερριλίνες, αμπισικό οξύ (ορμόνες), iv) φυτοστερόλες (δομικά συστατικά των μεμβρανών) [5]. Τα γνωστά αιθέρια έλαια είναι μίγμα τερπενοειδών ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους (μονοτερπένια, σεσκιτερπένια, σπανιότερα διτερπένια) με έντονη οσμή που συντίθενται σε διάφορους φυτικούς ιστούς και η παρουσία τους χαρακτηρίζει τα αρωματικά φυτά. Στα αιθέρια έλαια μπορεί επιπλέον να συνυπάρχουν πτητικές φαινολικές ενώσεις (φαινυλοπροπανοειδή) και σπανιότερά άλλες ενώσεις (πχ πτητικές ενώσεις με S ή N). Απαντώνται σε 2000 είδη φυτών, τόσο γυμνόσπερμα όσο και αγγειόσπερμα, από 60 οικογένειες, με τα πλέον διαδεδομένα στις Οικ. *Labiatae*, *Umbelliferae* και *Compositae*. Η παρουσία τους χαρακτηρίζει τα αρωματικά φυτά (Σχήμα 2)[6].

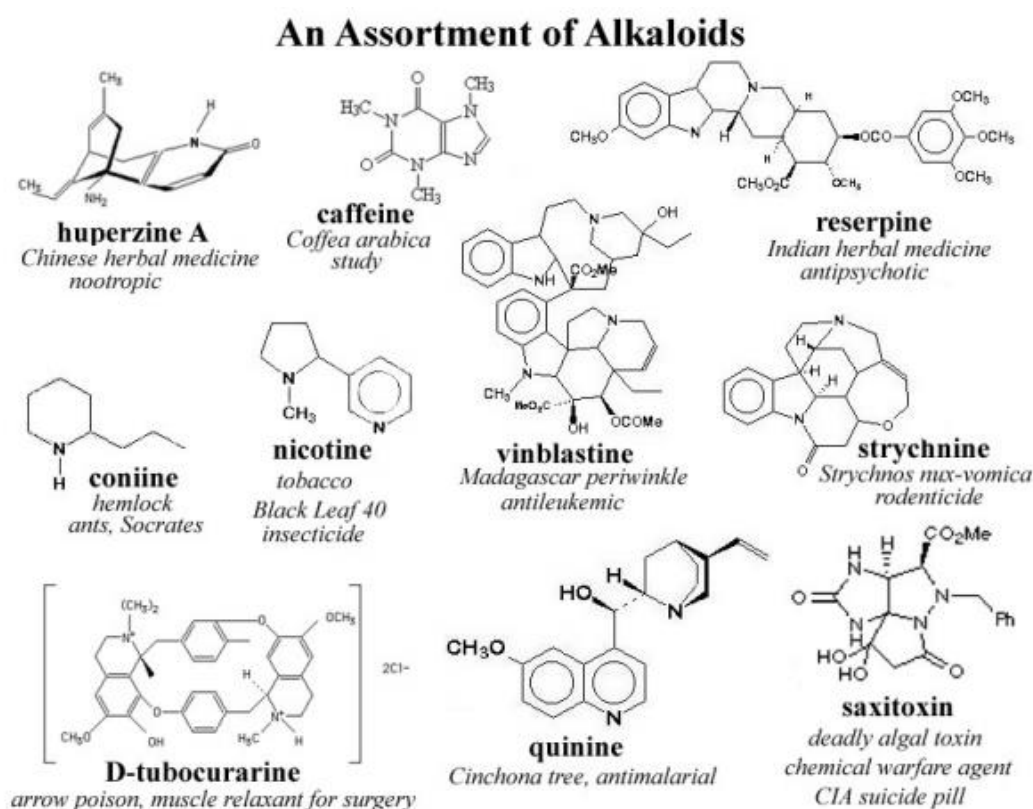


Σχήμα 2. Παραδείγματα αρωματικών φυτών-πηγών αιθέριων ελαίων του μεσογειακού οικοσυστήματος: α) *Lavandula hybrida super* [7] , b) *origanum hirtum* [8].

Αλκαλοειδή [9]

Τα αλκαλοειδή είναι οργανικές ενώσεις αζώτου που διαθέτουν βασικές ιδιότητες. Απαντώνται κυρίως στα φυτά, αν και σε μικρότερη έκταση έχουν επίσης απομονωθεί από μικροοργανισμούς και ζώα. Ένα ή περισσότερα άζωτα είναι παρόντα στα αλκαλοειδή με τη μορφή πρωτοταγών, δευτεροταγών ή τριτοταγών αμινών και αυτές είναι που προσδίδουν τη βασικότητα του αλκαλοειδούς. Το ΡΗ τους εξαρτάται από τη δομή τους και την παρουσία άλλων λειτουργικών ομάδων στο μόριο τους. Η βιολογική τους δράση εξαρτάται άμεσα από τη δυνατότητα πρωτονίωσης της αμίνης στο φυσιολογικό ΡΗ. Τα αλκαλοειδή συνήθως κατατάσσονται σύμφωνα με τη φύση του αζώτου που φέρουν π.χ. πυρρολιδίνες, πιπεριδίνες, κινολίνες, ινδόλια κ.α. αν και εξαιτίας της μεγάλης πολυπλοκότητας τους είναι δύσκολη η κατηγοριοποίηση τους (Σχήμα 3). Ένας εναλλακτικός τρόπος κατάταξης αφορά στη βιοσύνθεση των αλκαλοειδών με βάση το πρόδρομο αμινοξύ σχηματισμού τους, για παράδειγμα οι πυρρολιδίνες και αλκαλοειδή τροπανίου βιοσυντίθενται από την ορνιθίνη, οι πιπεριδίνες και κινολιζιδίνες από τη λυσίνη, τα αλκαλοειδή πυριδίνης όπως οι κινολίνες

και ναφθυριδίνες από το νικοτινικό οξύ κ.τ.λ.. Φυσικά η βιοσύνθεση των αλκαλοειδών συνήθως εμπεριέχει δομικές μονάδες και από άλλα βιοσυνθετικά μονοπάτια όπως αυτά του οξικού, σικιμικού και μεβαλονικού. Μια μεγάλη κατηγορία αλκαλοειδών προέρχονται μέσω αντιδράσεων αμίνωσης, κατά συνέπεια μόνο η διάθεση του αζώτου προέρχεται από το αμινοξύ ενώ όλη η υπόλοιπη βιοσύνθεση από τα προηγούμενα αναφερόμενα μονοπάτια [9].



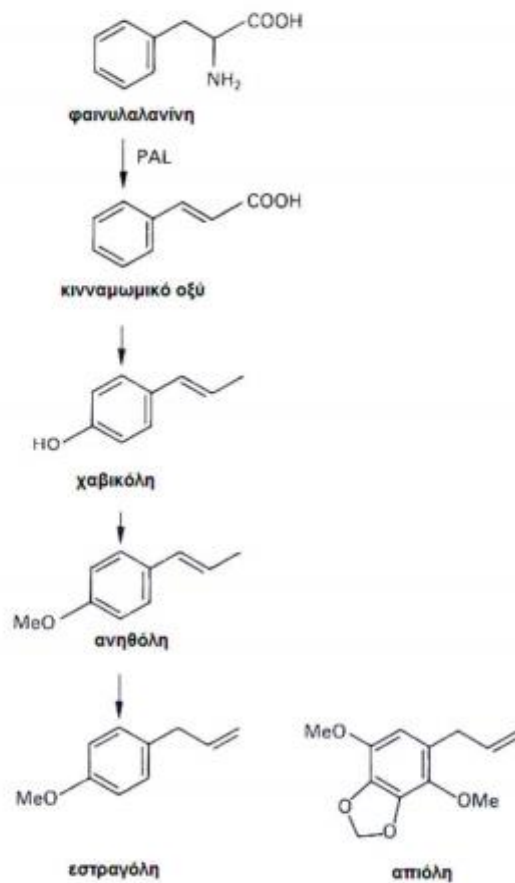
Σχήμα 3. Κατάταξη αλκαλοειδών [9].

Φαινολπροπανοειδή - Φαινολικές ενώσεις

Τα φυτά κατάγονται από το υδάτινο περιβάλλον: η επιτυχημένη εξελικτική προσαρμογή τους στην ξηρά επιτεύχθηκε σε ένα μεγάλο βαθμό από την μαζική δημιουργία των φυτικών φαινολικών ενώσεων. Στο καταμετρημένο 40% του οργανικού άνθρακα που υπάρχει στην βίοςφαιρα, αυτές οι φαινολικές ενώσεις προέρχονται κατά κύριο λόγο από τα φαινολπροπανοειδή και τις σχετικές βιοχημικές

οδούς όπως αυτές που οδηγούν στις υδρολυόμενες τανίνες. Ως φυτικά φαινολικά παράγωγα γενικά χαρακτηρίζονται οι αρωματικοί μεταβολίτες που κατέχουν, ή παλαιότερα κατείχαν μία ή περισσότερες όξινες ομάδες υδροξυλίου συνδεδεμένες στον αρωματικό φαινολικό δακτύλιο. Αυτές οι ενώσεις απασχόλησαν τους φυτοβιολόγους για χρόνια, παρεμβαίνοντας με πειραματικές μεθόδους. Για παράδειγμα, όταν εκτίθενται στον αέρα, τα φυτικά φαινολικά παράγωγα εύκολα οξειδώνονται και μαυρίζουν, δημιουργώντας προϊόντα που σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες και αναστέλλουν την ενζυμική δραστηριότητα. Τα καλλιεργημένα φυτά μπορούν επίσης να απελευθερώσουν φαινολικά παράγωγα που εμποδίζουν την ανάπτυξη των κάλλων και την αναγέννηση των βλαστών. Την ίδια στιγμή, παρατηρείται ότι οι φαινολικές ενώσεις έχουν σημαντική συμβολή στην ανάπτυξη, αναπαραγωγή και άμυνα των φυτών.

Ο κύκλος του σικιμικού οξέος οδηγεί στη σύνθεση των φαινυλοπροπανοειδών (Σχήμα 4). Οδηγεί αρχικά στην παραγωγή της φαινυλαλανίνης (αρωματικό αμινοξύ) η οποία μέσω του ενζύμου λυάση της φαινυλαλανίνης (PAL) δρα επί του αζώτου του αμινοξέος και μετατρέπεται σε trans-κινναμωμικό οξύ. Αυτό το βιοχημικό μονοπάτι οδηγεί στη βιοσύνθεση αλκαλοειδών, λιγνανών, φλαβονοειδών και κουμαρινών. Τα φαινυλοπροπανοειδή αποτελούν τα απλούστερα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος. Μετατροπές επί αυτού του μορίου αφορούν στην απώλεια οξυγόνου είτε από την πλευρική αλυσίδα είτε στη θέση του διπλού δεσμού της ίδιας αλυσίδας. Η θέση του διπλού δεσμού καθορίζει το σχηματισμό των δύο ισομερών της ανηθόλης και της εστραγόλης [6].



Σχήμα 4. Βιοσύνθεση των φαινυλοπροπανοειδών [6].

Βιβλιογραφία Κεφαλαίου 1

1. Ji, K., Chen, J., Li, M., Liu, Z., Xia, L., Wang, C. & Wu, X. (2009). Comments on serious anaphylaxis caused by nine Chinese herbal injections used to treat common colds and upper respiratory tract infections. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 55(2), 134-138.
2. Butler, M. S. (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of natural products*, 67(12), 2141-2153.
3. Πριμικήρη Αλεξάνδρα, (2013), Μελέτη βιοδραστικών ενώσεων φυσικών προϊόντων με υψηλής ευαισθησίας φασματοσκοπία NMR κρυογενικής τεχνολογίας και έλεγχος της αντινεοπλασματικής και αντιαγγειογενετικής τους δράσης, Διδακτορική Διατριβή ΑΠΘ.
4. Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, 75(3), 311-335.
5. <https://opencourses.auth.gr/modules/document/file.php/OCRS510/%CE%A0%CE%B1%CF%81%CE%BF%CF%85%CF%83%CE%B9%CE%AC%CF%83%CE%B5%CE%B9%CF%82/%CE%95%CE%BD%CF%8C%CF%84%CE%B7%CF%84%CE%B1%202.pdf> (Ηλεκτρονική πηγή, τελευταία επίσκεψη 13/04/2018)
6. Ελένη Καραστεργίου, (2015), Χημική ανάλυση αιθερίων ελαίων στον κύκλο βλάστησης του φυτού *Dittrichia viscosa ssp. Viscosa*, Μεταπτυχιακή εργασία ΑΠΘ.
(<http://ikee.lib.auth.gr/record/282795/files/GRI-2016-16463.pdf>)
7. <https://www.nhrorganicoils.com/products.php?id=2823> (Ηλεκτρονική πηγή, τελευταία επίσκεψη 13/04/2018)
8. <http://www.pfaf.org/user/plant.aspx?latinname=Origanum+vulgare+hirtum>
(Ηλεκτρονική πηγή, τελευταία επίσκεψη 13/04/2018)
9. *Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach*, John Dewick, 2nd Ed. Wiley & Sons Ltd. 2002.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ

2.1 Εισαγωγή

Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές ενώσεις, πολύ διαδεδομένες στα φυτά και πολλές από αυτές είναι υπεύθυνες για το χρώμα διαφόρων καρπών και ανθέων. Έχουν χαρακτηριστεί περισσότερα από 6000 φλαβονοειδή, και αυτός ο αριθμός αυξάνει συνεχώς λόγω της μεγάλης δομικής ποικιλομορφίας. Είναι ευρέως διαδεδομένα σε όλο το φυτικό βασίλειο και είναι άφθονα σε πολλά φυτά, φρούτα και φύλλα. Ο κύριος ρόλος τους είναι ο σχηματισμός των κόκκινων και μωβ χρωστικών ουσιών ανθοκυάνης, ενώ μη-χρωστικές ενώσεις φλαβονοειδών χρησιμεύουν ως σήματα για επικονιαστές και για άλλους ωφέλιμους οργανισμούς, παίζουν έναν ουσιώδη ρόλο στην αναπαραγωγή συμμετέχοντας στη σηματοδότηση με φυτικές ορμόνες και στη βλάστηση του σωλήνα της γύρης, προστατεύουν τα φυτά από την UV-B ακτινοβολία, και λειτουργούν ως φυτοαλεξίνες και αλληλοπαθητικές ενώσεις [1]. Οι φυτοαλεξίνες είναι αντιμικροβιακές ενώσεις ή εντομοκτόνα μικρού μοριακού βάρους που παράγονται και συσσωρεύονται ταχύτατα στα φυτά στις περιοχές εκείνες που έχουν μολυνθεί από παθογόνους μικροοργανισμούς. Η παραγωγή των τοξινών αυτών αποτελεί τον κυριότερο αμυντικό μηχανισμό των φυτών. Οι αλληλοπαθητικές ενώσεις προάγουν ή καταστέλλουν σε έναν οργανισμό την ανάπτυξη, την φωτοσύνθεση, την εξατμισοδιαπνοή, την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και νερού, την πρωτεινοσύνθεση και άλλες λειτουργίες.

Στις λειχήνες και στο ζωικό βασίλειο δεν έχουν βρεθεί φλαβονοειδή μέχρι σήμερα, εκτός από μερικά φλαβονοειδή που βρέθηκαν στα φτερά μιας πεταλούδας. Επίσης, δεν απαντούν στα φύκη και τους μύκητες, αν και υπάρχει μια αναφορά για μια φλαβόνη

που απαντά στα φύκη του γένους *Nitella* και ενός άλλου που βρέθηκε στο μύκητα *Aspergillus candidus*. Στα φυτά απαντούν είτε σε ελεύθερη μορφή είτε σε μορφή γλυκοζιτών. Οι γλυκοζίτες είναι Ο-γλυκοζίτες και μικρός αριθμός είναι C-γλυκοζίτες. Επειδή είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση συνιστούν μέρος της διατροφής του ανθρώπου. Υπολογίζεται ότι ο άνθρωπος παίρνει με την τροφή του 1 gr ημερησίως [2].

2.2 Απομόνωση από τα φυτά

Τα φλαβονοειδή και οι γλυκοζίτες τους είναι σταθερές ενώσεις και παραλαμβάνονται από τα φυτά με εκχύλιση χρησιμοποιώντας ψυχρούς ή θερμούς διαλύτες. Οι διαλύτες μπορεί να είναι νερό, οργανικοί διαλύτες (μεθανόλη, αιθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας, βουτανόλη, ακετόνη) ή συνδυασμός αυτών. Μετά την παραλαβή τους μέσω εκχύλισης ακολουθεί ο διαχωρισμός τους με εφαρμογή μεθόδων χρωματογραφίας όπως: PC (Planar chromatography), TLC (Thin layer chromatography), CC (Column chromatography), HPLC (High-performance liquid chromatography), χρησιμοποιώντας διάφορα συστήματα χρωματογραφίας (διαλύτες). Στη συνέχεια με μεθόδους φασματοσκοπίας γίνεται η ταυτοποίηση των ουσιών. Τέτοιες φασματοσκοπικές μέθοδοι είναι: UV (ultraviolet radiation), IR (infrared radiation) , NMR (nuclear magnetic resonance) , MS (mass spectrometry).

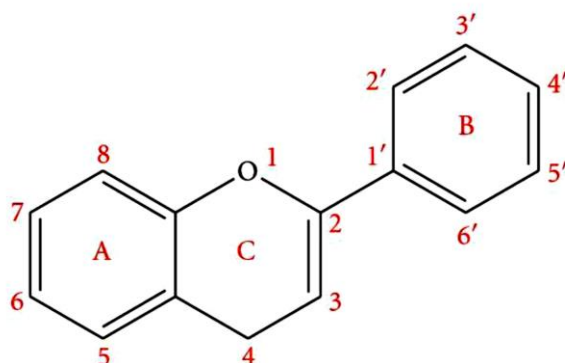
2.3 Δομή και κατάταξη των φλαβονοειδών

Ο όρος φλαβονοειδή χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα ευρύ σύνολο φυσικών προϊόντων που σχηματίζουν έναν ανθρακικό σκελετό με 15 άτομα άνθρακα διατεταγμένα σε δύο αρωματικούς δακτυλίους που ενώνονται με μία γέφυρα τριών ανθράκων (C6-C3-C6) (Σχήμα 5) [3].

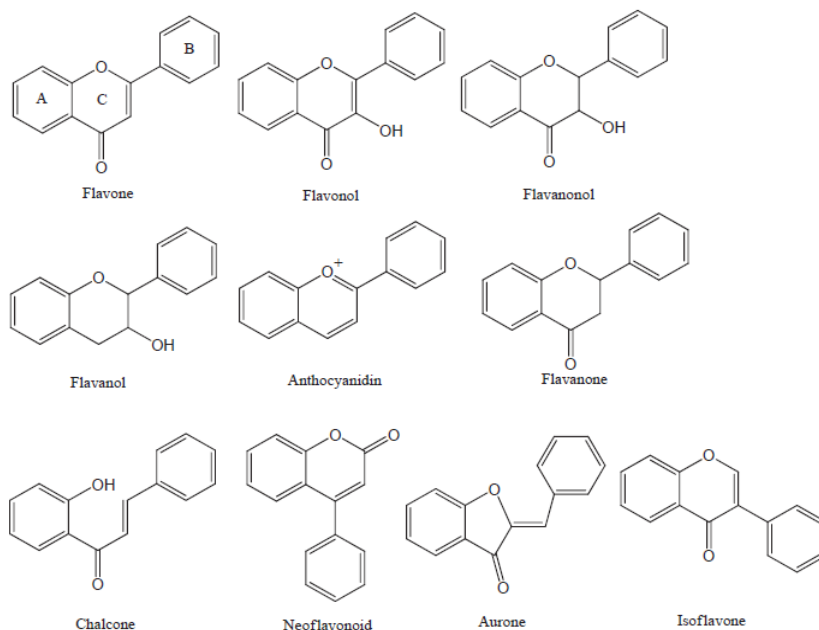
Τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά τους είναι δύο βενζολικοί δακτύλιοι (δακτύλιος Α και Β) συνδεδεμένοι από μία 3-ανθρακική γέφυρα, για τις χαλκόνες, ή από από έναν

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

Το κυριότερο κριτήριο για την κατάταξη των φλαβονοειδών είναι η θέση πρόσδεσης του αρωματικού δακτυλίου στη βενζοπυρανική ομάδα, σύμφωνα με την οποία τα φλαβονοειδή χωρίζονται σε 3 βασικές κατηγορίες. Τα φλαβονοειδή (2-φαινυλοβενζοπυράνες), τα ισοφλαβονοειδή (3-βενζοπυράνες) και τα νεοφλαβονοειδή (4-βενζοπυράνες). Και οι τρεις κατηγορίες προέρχονται από την ίδια χαλκόνη, η οποία ανήκει στην κατηγορία των ήσσονων φλαβονοειδών και συνεπώς είναι δομικά και λειτουργικά συγγενείς. Τα φλαβονοειδή διακρίνονται σε επιμέρους ομάδες όπως ανθοκυανίνες, φλαβόνες, φλαβονόνες, διϋδροφλαβονόλες, χαλκόνες, φλαβονόλες, φλαβάνες, προανθοκυανιδίνες (Σχήμα 6).



Σχήμα 5. Φαινυλοβενζοπυρανικός δομικός σκελετός φλαβονοειδών [3].



Σχήμα 6. Δομές φλαβονοειδών [3].

Ανθοκυανίνες και Ανθοκυανιδίνες

Πολλά φρούτα όπως τα μούρα, τα λαχανικά, τα πέταλα των φυτών και διάφορες ποικιλίες σιτηρών όπως το μαύρο ρύζι, διαθέτουν ένα εύρος χρωμάτων όπως μπλε, μωβ, κόκκινο κ.α. τα οποία οφείλονται στην παρουσία ομάδας χρωστικών που ονομάζονται ανθοκυανίνες. Αυτές οι ενώσεις βρίσκονται σε όλους τους ιστούς των ανωτέρων φυτών, συμπεριλαμβανομένων των φρούτων, των φύλλων, των λουλουδιών και των ριζών. Οι ανθοκυανίνες θεωρούνται ως οι γλυκοζίτες των ανθοκυανιδινών (πολυδρόξυ- και πολυμεθόξυ- παραγώγων των 2- phenylbenzopyrylium). Βασίζονται δομικά στο κατιόν φλαβυλίου και αποτελούνται από μια ανθοκυανιδίνη δεσμευμένη σε ένα ή περισσότερα τμήματα σακχάρων. Οι ανθοκυανιδίνες προκύπτουν σε πολλές γλυκοσυλιωμένες μορφές, ωστόσο εκείνη στη θέση C-3 (3 -O -γλυκοζίτες ανθοκυανιδίνης) είναι που θεωρείται κομβικό σημείο για τη βιοσύνθεση των ανθοκυανών. Επίσης είναι εφικτή η προσθήκη περισσότερων σακχάρων στις θέσεις C-5 και C-7, και η τροποποίηση των γλυκοζιτών μέσω ακυλίωσης και συμπλοκοποίησης

με μη κυανικά φλαβονοειδή και μεταλλικά ιόντα. Οι ανθοκυανίνες διαθέτουν ένα εύρος φαρμακευτικών ιδιοτήτων ενάντια σε φλεγμονές, νευρολογικές ασθένειες, τον καρκίνο, τον διαβήτη, βακτηριακές μολύνσεις, την ινοκυστική νόσο κ.α.[4], [5].

Φλαβανόνες

Δύο δομικά στοιχεία είναι που χαρακτηρίζουν τις φλαβανόνες και τις κάνουν να ξεχωρίζουν από τα υπόλοιπα φλαβονοειδή, η απουσία του διπλού δεσμού μεταξύ των θέσεων C-2 και C-3 και η παρουσία χειρόμορφου κέντρου στον C-2. Παρόλο που οι φλαβανόνες ανήκουν στα λιγότερα άφθονα φλαβονοειδή στη φύση πολλές από αυτές παρουσιάζουν ένα μεγάλο εύρος βιολογικών ιδιοτήτων. Η βουτίνη για παράδειγμα έχει αναφερθεί ότι αποτελεί ισχυρό αντιοξειδωτικό παράγοντα ενάντια σε ασθένειες σχετιζόμενες με οξειδωτικό στρες, όπως ο καρκίνος, ασθένειες του ήπατος, και ο διαβήτης. Η ναρινγκενίνη και η εσπερετίνη συναντώνται στα εσπεριδοειδή και παρουσιάζουν αντιοξειδωτική και αντιπολλαπλασιαστική δράση. Η ναρινγκενίνη είναι μία από τις πιο κοινές φλαβανόνες και το πρώτο κυκλοποιημένο φλαβονοειδές που συντίθεται κατά το βιοσυνθετικό μονοπάτι.

Φλαβόνες και Φλαβονόλες

Αν και βιοσυνθετικά οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες παράγονται ξεχωριστά, μπορούν να μπουν στην ίδια κατηγορία λόγω της χημικής τους συγγένειας. Οι φλαβόνες διαθέτουν υποκαταστάτες στον Α και Β δακτύλιο, αλλά στερούνται οξυγόνου στον C-3. Δύο πολύ κοινές φλαβόνες η λουτεολίνη και η απιγκενίνη παρουσιάζουν δραστηριότητα αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη, αντιαγγειογενετική κ.α. Η λουτεολίνη θεωρείται αποτελεσματική στη βελτίωση της πολλαπλής σκλήρωσης, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και της εγκεφαλικής ισχαιμίας [6].

Οι φλαβονόλες γνωστές και ως 3-υδροξυφλαβόνες χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας υδροξυλομάδας στη θέση 3 του δακτυλίου C καθώς και από την παρουσία διπλού δεσμού μεταξύ των C-2 και C-3. Παρουσιάζουν μεγάλη αφθονία στα φύλλα των ανώτερων φυτών και μέχρι στιγμής έχουν αναφερθεί 450 διαφορετικά είδη άγλυκων φλαβονολών στα ανώτερα φυτά, ενώ η κερσετίνη και η κεμφερόλη είναι οι πιο συχνά απαντώμενες ενώσεις.

Ισοφλαβονοειδή

Πρόκειται για μια συγκεκριμένη κατηγορία φλαβονοειδών, η οποία χαρακτηρίζεται από την παρουσία του φαινυλχρωμανικού σκελετού στη θέση C-3 του B δακτυλίου. Σε αυτή την κατηγορία ξεχωρίζουν οι ισοφλαβόνες και οι ισοφλαβανόνες. Οι ισοφλαβόνες επιδεικνύουν τον ίδιο βαθμό οξειδωσης στον ετεροκυκλικό δακτύλιο με τις φλαβόνες, αλλά πιο σύνθετους υποκαταστάτες στους άλλους δύο. Οι ισοφλαβανόνες έχουν τον ίδιο βαθμό συγγένειας με τις ισοφλαβόνες, όπως και οι φλαβανόνες με τις φλαβόνες. Αυτή τη φορά το χειρικό κέντρο των ισοφλαβονών είναι στον C-3.

Νεοφλαβονοειδή

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

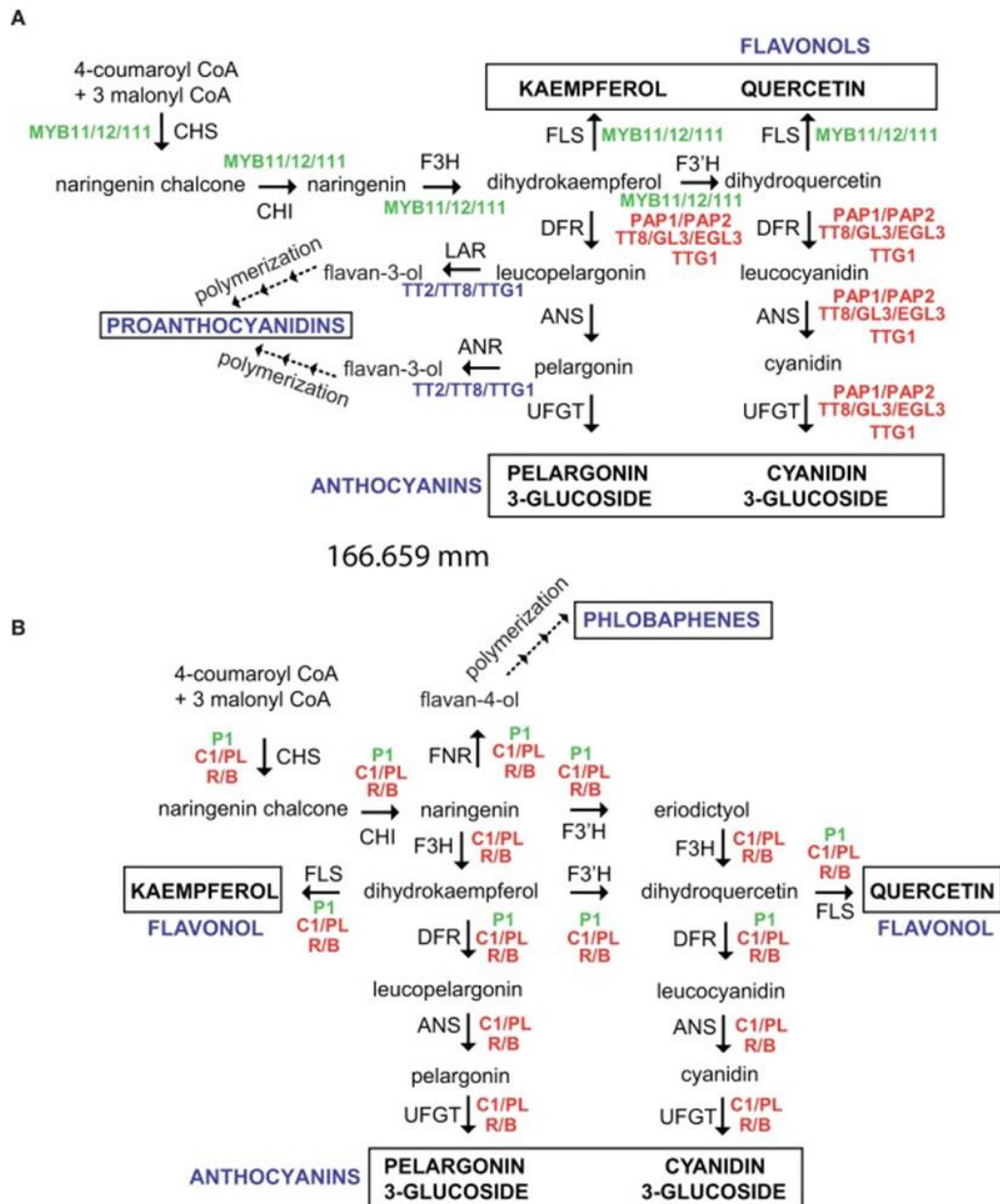
Ήσσονα φλαβονοειδή

Σε αυτή την κατηγορία φλαβονοειδών, ανήκουν οι χαλκόνες, οι διϋδροχαλκόνες, οι φλαβανόνες, οι ωρόνες και οι ωρονόλες. Από ιστορική σκοπιά, οι χαλκόνες και οι ωρόνες είναι κυρίως γνωστές ως οι κίτρινες προς πορτοκαλί χρωστικές των άνθεων, σε κάποια είδη του *Coreopsis* και άλλες τάξεις της οικογένειας *Asteraceae*. Η κατανομή

αυτών των φλαβονοειδών δεν περιορίζεται μόνο στα άνθη, αλλά έχουν παρατηρηθεί και σε πολλούς ιστούς φυτών.

2.3 Βιοσύνθεση φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή συντίθενται μέσω του φαινυλοπροπανοειδούς μονοπατιού, με βασικούς προκέρσορες την φαινυλαλανίνη και το μαλονυλικό CoA (Σχήμα). Το βιοσυνθετικό μονοπάτι των φλαβονοειδών αποτελεί τμήμα του ευρύτερου φαινυλοπροπανοειδούς μονοπατιού, από το οποίο παράγονται πολλοί δευτερεύοντες μεταβολίτες, όπως τα φαινολικά οξέα, οι λιγνίνες, οι λιγνάνες και οι στυλβένες. Κάθε παράγωγο μιας αντίδρασης, μπορεί να λειτουργήσει ως υπόστρωμα για ένα ή περισσότερα από τα επόμενα βήματα του μονοπατιού. Επίσης, το προϊόν κάθε ενζυμικής δράσης κατά τη διάρκεια του μονοπατιού είναι δυνατό να παίζει το ρόλο της πρόδρομης ένωσης για διαφορετική αντίδραση, ανάλογα με τις φυσιολογικές συνθήκες που επικρατούν εκείνη τη στιγμή στο φυτό. Από τις δομές των χαλκονών προέρχονται όλα τα φλαβονοειδή. Παρά το γεγονός ότι το κεντρικό βιοσυνθετικό μονοπάτι των φλαβονοειδών διατηρείται στα φυτά ανάλογα με το είδος, μια ομάδα ενζύμων όπως οι ισομεράσες, οι αναγωγάσες, οι υδροξυλάσες και κάποιες $Fe^{2+}/2^-$ οξογλουταρικοεξαρτώμενες διοξυγενάσες τροποποιούν τον βασικό σκελετό και οδηγούν σε διαφορετικές υποκατηγορίες. Ακόμη, οι τρανσφεράσες τροποποιούν τον σκελετό του φλαβονοειδούς με σάκχαρα, μεθυλομάδες και ακυλομάδες, ρυθμίζοντας την φυσιολογική δράση του και μεταβάλλοντας την διαλυτότητα, την δραστικότητα και την αλληλεπίδραση με κυτταρικούς στόχους [7], [8].



Σχήμα 7. Βιοσυνθετικό μονοπάτι φλαβονοειδών του φυτού *Arabidopsis thaliana* (A) και του καλαμποκιού (B). Τα ένζυμα και τα ενδιάμεσα προϊόντα σημειώνονται με μαύρο ενώ διάφοροι ρυθμιστές σημειώνονται με χρώμα. Τα τελικά προϊόντα αναγράφονται με κεφαλαία [7].

Βιβλιογραφία Κεφαλαίου 2

1. Tan, G., Gyllenhaal, C., & Soejarto, D. D. (2006). Biodiversity as a source of anticancer drugs. *Current drug targets*, 7(3), 265-277.
2. Βενετσάνου Αφροδίτη, (2011), Φυσικές και συνθετικές χαλκόνες και παράγωγα τους με αντιοξειδωτική δράση , Διπλωματική εργασία, ΕΜΠ, Αθήνα.
3. Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203.
4. Πριμικήρη Αλεξάνδρα, (2013), Μελέτη βιοδραστικών ενώσεων φυσικών προϊόντων με υψηλής ευαισθησίας φασματοσκοπία NMR κρυογενικής τεχνολογίας και έλεγχος της αντινεοπλασματικής και αντιαγγειογενετικής τους δράσης, Διδακτορική Διατριβή ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη.
5. Wang, Y., Chen, X., Zhang, Y., & Chen, X. (2012). Antioxidant activities and major anthocyanins of myrobalan plum (*Prunus cerasifera* Ehrh.). *Journal of food science*, 77(4).
6. Zarebczan, B., Pinchot, S. N., Kunnimalaiyaan, M., & Chen, H. (2011). Hesperetin, a potential therapy for carcinoid cancer. *The American Journal of Surgery*, 201(3), 329-333.
7. Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S., & Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in plant science*, 3, 222.
8. Άλκηστις Τζιόλα Μπάρα, (2016), Σύνθεση νέων βενζυλόξυ – αναλόγων χαλκονών και ωρονών και μελέτη της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους ικανότητάς τους Διπλωματική εργασία, ΕΜΠ, Αθήνα.

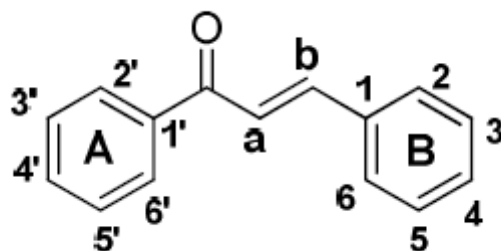
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΧΑΛΚΟΝΕΣ

3.1 Η προνομιακή δομή των χαλκονών

Οι χαλκόνες ή 1,3-διαρυλο-2-προπεν-1-όνες (Σχήμα 8) είναι δευτερογενείς φυτικοί μεταβολίτες και πρόδρομες ενώσεις των φλαβονοειδών και των ισοφλαβονοειδών και οι πρώτες ενώσεις που απομονώνονται από το βιοσυνθετικό μονοπάτι. Δεν μπορούν να αποθηκευτούν σε ικανοποιητική ποσότητα γιατί η ισομεράση της χαλκόνης καταλύει την κυκλοποίηση της χαλκόνης προς φλαβονόνη. Συγκαταλέγονται στους φυτοχημικούς παράγοντες. Το όνομα τους δόθηκε από τους Kostanecki και Tambor το 1899, από την ελληνική λέξη χαλκός λόγω του χρώματος των ενώσεων.

Η βιοσύνθεσή τους στα φυτά πραγματοποιείται για να τα προστατεύει από το φωτοσυνθετικό στρες, τις δραστικές μορφές οξυγόνου και τα παράσιτα [1]. Ο δομικός σκελετός των χαλκονών αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους (Α και Β) που συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός α,β -ακόρεστου καρβονυλικού συστήματος τριών ατόμων άνθρακα (enone linker). Η παρουσία της κετο-αιθυλενομάδας είναι σημαντικό χαρακτηριστικό αυτής της κατηγορίας ενώσεων [2]. Η παρουσία του διπλού δεσμού σε συνδυασμό με την καρβονυλική λειτουργία είναι υπεύθυνη για μια σειρά από βιολογικές δράσεις των χαλκονών, καθώς η απουσία αυτής τις καθιστά ανενεργές. Έχουν την τάση να υπάρχουν και σε cis- και trans- δομές και κυκλοποιούνται εύκολα σε φλαβανόνες μέσω προσθήκης Michael.



Σχήμα 8. Γενική δομή χαλκονών.

Οι θέσεις στις συγκεκριμένες ενώσεις επισημαίνονται χρησιμοποιώντας ένα σύστημα αρίθμησης μοναδικό για αυτές τις ενώσεις και αντίστροφο της αρίθμησης των φλαβονοειδών. 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 Α-δακτύλιο επισημαίνονται με τονισμένους αριθμούς, ενώ στο Β-δακτύλιο με απλούς αριθμούς. Στις χαλκόνες οι α και β θέσεις συνδέονται με διπλό δεσμό· αυτό δε συμβαίνει στις διυδροχαλκόνες. Οι φυσικές χαλκόνες περιέχουν κυρίως υδροξυ-, μεθοξυ-, πρενυλο- και μεθυλο- ομάδες ως υποκαταστάτες στους δακτυλίους Α και Β. 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.

3.2 Φυσικές πηγές χαλκονών

Οι κυριότεροι εκπρόσωποι των φυσικών χαλκονών είναι αυτές που λαμβάνονται ως εκχυλίσματα από διάφορες ποικιλίες φυτών όπως τα *Angelica*, *Glycyrrhiza*, *Humulus* και *Scutellaria*, που χρησιμοποιούνται ευρέως στην παραδοσιακή ιατρική πολλών χωρών.

Από τα εκχυλίσματα των φυτών του είδους *kava* απομονώνονται μεθοξυλιωμένες χαλκόνες, οι λεγόμενες *flavokawains* A, B και C, που χρησιμοποιούνται παραδοσιακά από τους κατοίκους των νησιών του Ειρηνικού ωκεανού και εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική και αγχολυτική δράση [3]. Επίσης, τα εκχυλίσματα από τις ρίζες της γλυκόριζας (*Liquorice*), που χρησιμοποιούνται από την παραδοσιακή Κινεζική ιατρική, για τη θεραπεία του βρογχικού άσθματος, δερματικών παθήσεων και δηλητηριάσεων και βρίσκουν σήμερα εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων, περιέχουν ως κύρια συστατικά χαλκόνες, όπως οι *lischalcones* A και C που εμφανίζουν αξιόλογη αντιβακτηριακή και αντιπαρασιτική δράση [4].

Άλλα χαρακτηριστικά παραδείγματα φυσικών βιοδραστικών χαλκονών (Σχήματα 9, 10) είναι:

- η ξανθοχουμόλη (*xanthohumol*), ένα πρενυλιωμένο φλαβονοειδές που αποτελεί το κύριο συστατικό του λυκίσκου και χαρακτηρίζεται ως χημειοπροληπτικός αντικαρκινικός παράγοντας ευρέως φάσματος και ως προστατευτικός παράγοντας απέναντι σε εγκεφαλικές βλάβες λόγω γήρανσης [5], [6].
- η καρδαμονίνη (*cardamonin*) που απομονώνεται από φυτά του είδους *zingiber*, εμφανίζει αντιφλεγμονώδεις και αντιμυτωτικές ιδιότητες [7], ενώ ερευνάται ως προς την προστατευτική της δράση έναντι στην ελκώδη κολίτιδα [8] και την ρευματοειδή αρθρίτιδα [9].

- πολυ-υδροξυλιωμένες χαλκόνες, όπως η χαλκοναρινγκενίνη (chalconaringenin) που αποτελεί το κύριο φλαβονοειδές της τομάτας με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση [10].



Angelica



Glycyrrhiza

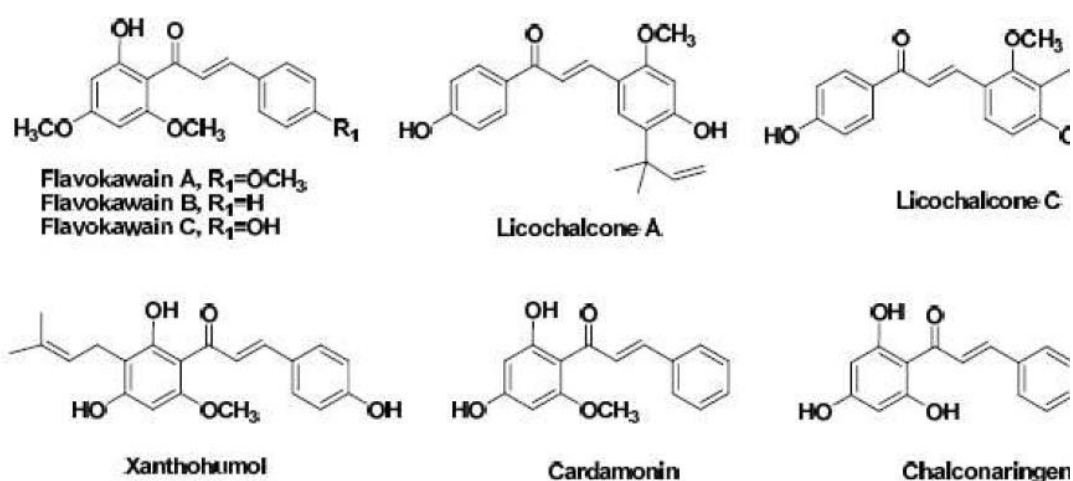


Κώνος λυκίσκου



Ντομάτα

Σχήμα 9. Φυσικές πηγές χαλκονών.

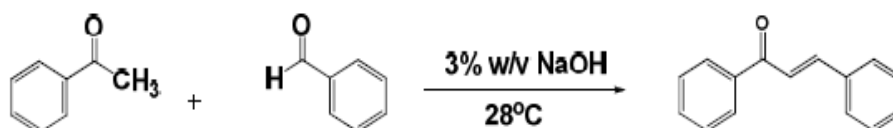


Σχήμα 10. Παραδείγματα βιοδραστικών χαλκονών.

3.3 Μέθοδοι σύνθεσης των χαλκονών

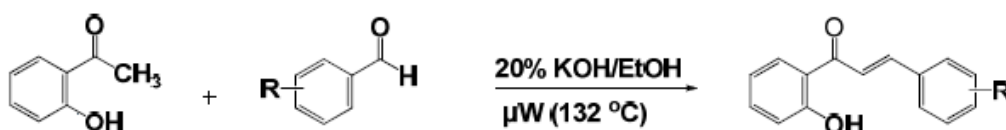
Οι πιο διαδεδομένοι μέθοδοι σύνθεσης των χαλκονών είναι οι εξής:

- Η πιο συνηθισμένη μέθοδος είναι η βασικά καταλυόμενη αντίδραση συμπύκνωσης Claisen-Schmidt μεταξύ μίας κατάλληλα υποκατεστημένης κετόνης και μίας αλδεΐδης, σε διάλυμα πολικού διαλύτη όπως αιθανόλη ή μεθανόλη (Σχήμα 11). Χρησιμοποιούνται διάφοροι καταλύτες για βελτιστοποίηση των συνθηκών και αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης. Η μέθοδος είναι εύχρηστη, ενώ οι αποδόσεις φτάνουν το 90% [11].



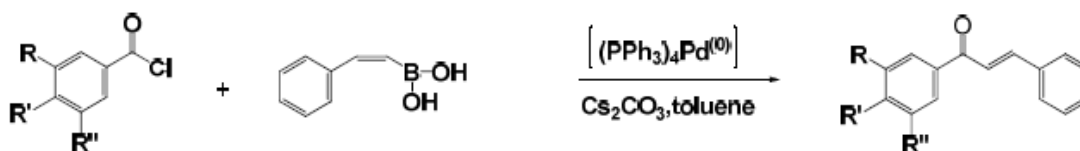
Σχήμα 11. Σύνθεση χαλκονών με τη βασικά καταλυόμενη αντίδραση Claisen-Schmidt.

- Για την σύνθεση 2-υδροξυ-χαλκονών ακολουθήθηκε η μέθοδος Claisen-Schmidt με τη χρήση μικροκυμάτων, παρουσία 20% w/v KOH και αιθανόλης (Σχήμα 12). Τα πλεονεκτήματα ανέρχονται στο μικρότερο χρόνο αντίδρασης, την ευκολότερη προετοιμασία των αντιδραστηρίων και τα καθαρότερα προϊόντα. Στην αντίστοιχη μελέτη, ο Srivastava (2008) εφάρμοσε αυτή την τεχνική και χρησιμοποίησε έναντι των ισχυρών βάσεων NaOH και KOH άνυδρο ανθρακικό κάλιο (K_2CO_3), με ικανοποιητική απόδοσή 85-90% και χρόνο ολοκλήρωσης της αντίδρασης 3-5 min [12]. Η αύξηση της θερμοκρασίας, με ταυτόχρονη μείωση του χρόνου θέρμανσης, βελτιώνουν την απόδοση της αντίδρασης.



Σχήμα 12. Σύνθεση χαλκονών με τη χρήση μικροκυμάτων.

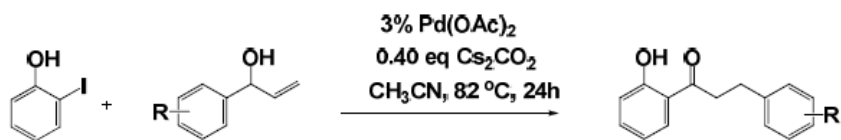
- Η αντίδραση Suzuki μεταξύ του βενζουλοχλωριδίου και του φαινυλοβινυλοβορονικού οξέος παρουσία συμπλόκων του παλλαδίου ως καταλύτη (Σχήμα 13).



Σχήμα 13. Σύνθεση χαλκονών με αντίδραση Suzuki.

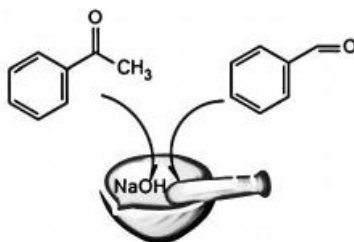
- Η αλδολική συμπύκνωση τύπου Mukaiyama μεταξύ μη κυκλικών κετονών και βενζαλδεΐδης παρουσία ιωδιούχου σαμαρίου και τριμεθυλοσιλυλό χλωριδίου.

- Η καταλυτική σύζευξη με παλλάδιο ο-αλογόνο υποκατεστημένων φαινολών και 1-αρυλό-2-προπέν-1-ολών (Σχήμα 14).



Σχήμα 14. Καταλυτική σύνθεση διυδροχαλκονών με παλλάδιο.

- Έχει αναφερθεί , στο πλαίσιο εφαρμογών πράσινης χημείας, η σύνθεση μιας σειράς χαλκονών με NaOH, με λειοτριβήση των πρώτων υλών σε ιγδίο απουσία διαλύτη (Σχήμα 15).



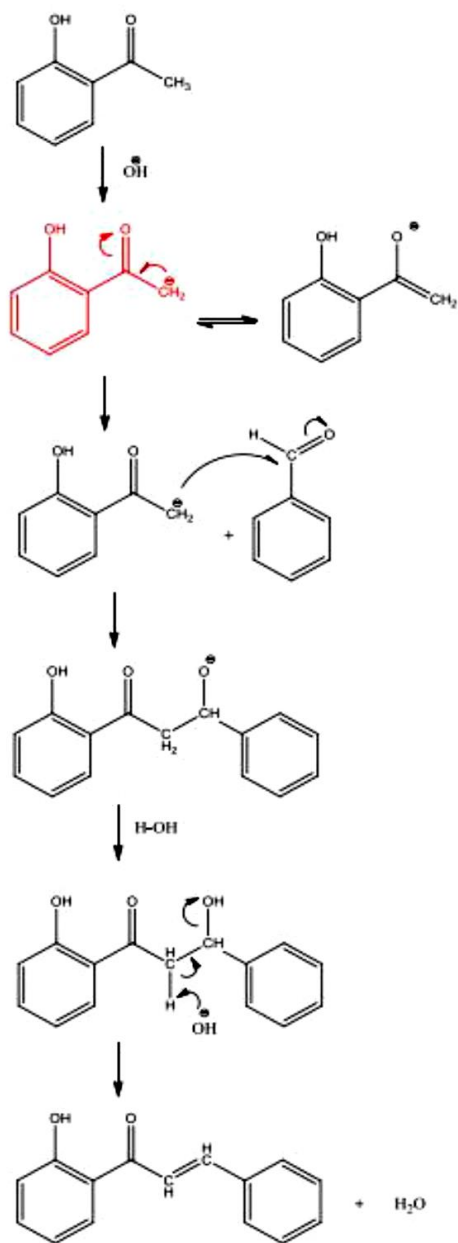
Σχήμα 15. Σύνθεση χαλκονών με λειοτριβήση.

3.4 Μηχανισμός Claisen- Schmidt

Από τις διάφορες συνθετικές οδούς για τη σύνθεση των χαλκονών η βασικότερη είναι η μέθοδος σύνθεσης μέσω αντιδράσεων συμπύκνωσης Claisen-Schmidt υπό ομοιογενείς συνθήκες παρουσία οξέος ή βάσης. Γενικά, για τη σύνθεσή τους έχουν χρησιμοποιηθεί ισχυρά αλκαλικά μέσα, όπως φυσικά φωσφορικά, $\text{Ba}(\text{OH})_2$, KOH , NaOH κ.ά., όπως επίσης και οξέα συμπεριλαμβανομένων του *p*-τολουολο-σουλφονικού οξέος, AlCl_3 , BF_3 , RuCl_3 και ξηρού HCl [13] . Παρακάτω περιγράφονται

τα διάφορα στάδια του μηχανισμού συμπύκνωσης Claisen-Schmidt (Σχήμα 16) που χρησιμοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας.

Αρχικά, το ισχυρά βασικό ανιόν HO^- αποσπά ένα όξινο υδρογόνο από το CH_3 της ακετοφαινόνης, οπότε σχηματίζεται το αντίστοιχο ενολικό ιόν. Μέσω μιας αντίδρασης πυρηνόφιλης προσθήκης, το ενολικό ιόν προσβάλλει τον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του καρβονυλίου της βενζαλδεΰδης και σχηματίζεται το ενδιάμεσο αλδολικό προϊόν (β-υδροξυ-κετόνη). Στο βασικό περιβάλλον της αντίδρασης πραγματοποιείται στη συνέχεια απόσπαση ενός μορίου H_2O οπότε σχηματίζεται το τελικό προϊόν της αλδολικής συμπύκνωσης, η α,β-ακόρεστη κετόνη [14].



Απόσπαση όξινου Η της ακετοφαινόνης από το HO^- και σχηματισμός **ενολικού ιόντος**

Πυρηνόφιλη προσθήκη του **ενολικού ιόντος** στον ηλεκτρονιόφιλο άνθρακα του καρβονυλίου ($\text{C}=\text{O}$)

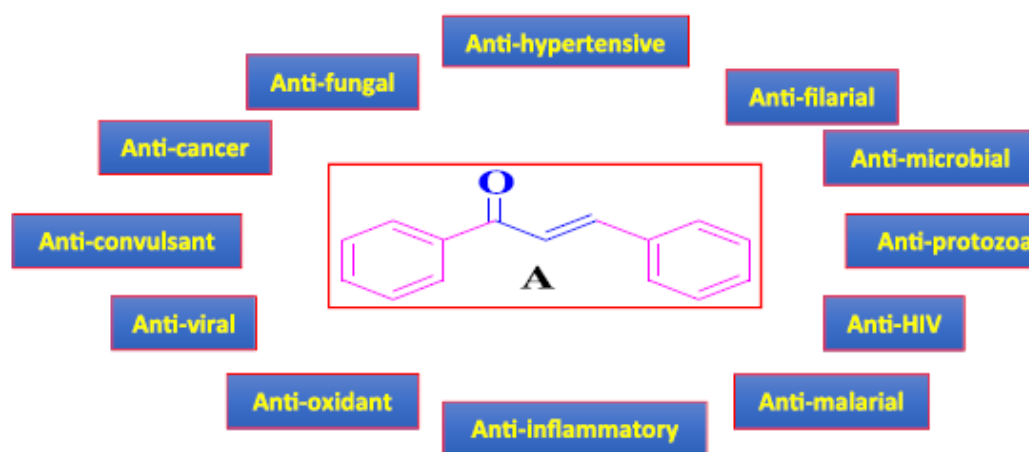
Αντίδραση οξέος - βάσεως και σχηματισμός του προϊόντος αλδολικής συμπύκνωσης

Απόσπαση όξινου Η και αφυδάτωση με συνέπεια το σχηματισμό της τελικής χαλκόνης

Σχήμα 16. Μηχανισμός αντίδρασης συμπύκνωσης Claisen-Schmidt.

3.5 Βιολογικές και φαρμακευτικές ιδιότητες χαλκονών

Τα συνθετικά ανάλογα των χαλκονών και η απομόνωσή τους από φυσικές πηγές αποτελούν αντικείμενο ερευνών παγκοσμίως για την ανάπτυξη ικανών και αποτελεσματικών φαρμάκων για την θεραπεία πολλών ασθενειών όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, ο ιός HIV, η φυματίωση και η ελονοσία. Έχει αναφερθεί ότι οι χαλκόνες διαθέτουν πολλές χρήσιμες βιολογικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων αντιφλεγμονωδών, αντιμικροβιακών, αντιμυκητιστακών, αντιοξειδωτικών, κυτταροτοξικών και αντικαρκινικών δράσεων [15, 16] (Σχήμα 17).



Σχήμα 17. Διάφορες βιολογικές λειτουργίες αναλόγων χαλκονών [15].

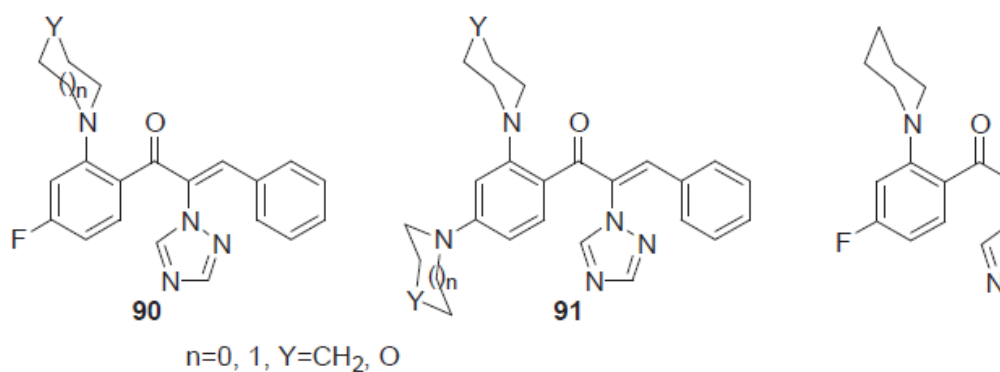
3.5.1 Αντιβακτηριακές ιδιότητες

Οι αντιβακτηριακές ιδιότητες σχετίζονται με την ικανότητα της α,β -ακόρεστης κετόνης να υφίσταται μια αντίδραση προσθήκης Michael από πυρηνόφιλες ομάδες, όπως μια ομάδα θειόλης σε μια πρωτεΐνη.

Η φυματίωση, που προκαλείται από το *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), έναν ενδοκυττάριο βάκιλο, συγκαταλέγεται στις πρώτες αιτίες θανάτου μεταξύ των μολυσματικών ασθενειών παγκοσμίως. Η δράση του *M. tuberculosis*, παρεμποδίστηκε

σημαντικά από την licochalcone 1A [4]. Η μελέτη των Lin et al. (2002) σε χαλκόνες ως προς την αντιφυματική τους δράση έδειξε ότι η υποκατάσταση με αλογόνο στον Α-δακτύλιο της 2'-υδροξυχαλκόνης οδηγεί σε αύξηση της δραστηριότητας. Ισχυρότερη δράση έδειξαν οι 2'-υδροξυχαλκόνες που περιείχαν Cl ή I στη θέση 3' του δακτυλίου Α [17].

Μια σειρά α-τριαζολο-χαλκονών (Σχήμα 18) συντέθηκαν και μελετήθηκαν έναντι μιας σειράς βακτηρίων (MRSA-χρυσίζων σταφυλόκοκκος ανθεκτικός στην πενικιλίνη, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Bacillus typhi*, *P. aeruginosa*, *Bacillus proteus*) και στελεχών μυκήτων (*Candida albicans*, *Candida mycoderma*). Το πιο ενεργό συστατικό (92) επέδειξε μέγιστη δραστηριότητα ενάντια σε MRSA (MIC = 4 mg/mL), *M. luteus* (MIC = 4 mg/mL) και *C. Mycoderma* (MIC = 8 mg/mL), σε επίπεδο συγκρίσιμο ή και καλύτερο από φάρμακα όπως Chloromycin, Norfloxacin and Fluconazole [18].



Σχήμα 18. α-Τριαζολο-χαλκόνες με αντιβακτηριακή δράση [17].

Πρόσφατα, κατιονικά μόρια, αποτελούμενα από τον σκελετό των χαλκονών και μια υδρόφοβη αλκυλο-αλυσίδα σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν από τους Chu et al. (2018).

Τα υβριδικά μόρια έδειξαν ευρεία αντιβακτηριακή δράση απέναντι σε διάφορα ανθεκτικά σε φάρμακα βακτήρια [19].

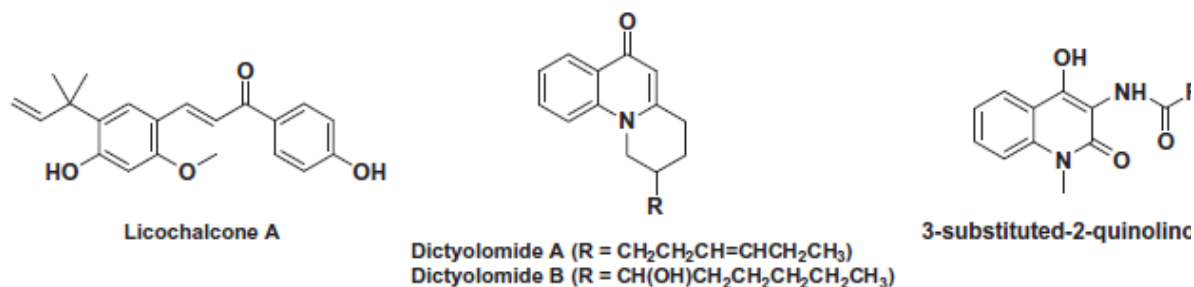
3.5.2 Αντιπαρασιτικές ιδιότητες

Η λειψμανίαση είναι μια ομάδα ασθενειών που προκαλούνται από τα παρασιτικά πρωτόζωα του γένους *Leishmania*. Είναι ενδημικές ασθένειες των τροπικών και υποτροπικών περιοχών και κατατάσσονται ανάμεσα στις έξι πιο παραμελημένες σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, με σοβαρές χημειοθεραπευτικές ελλείψεις. Ωστόσο από την δεκαετία του 1990, φυσικές χαλκόνες με υποσχόμενες **αντιλειψμανιακές ιδιότητες** έχουν αναφερθεί και αρκετές συνθετικές χαλκόνες και υβριδικά μόρια χαλκονών έχουν μελετηθεί ως προς την αντιλειψμανιακή τους δράση [20]. Η λικοχαλκόνη Α που έχει απομονωθεί από τη κινέζικη γλυκόριζα *Glycyrrhiza spp.*, παρουσιάζει ισχυρή αντιλειψμανιακή δράση έναντι των προμαστιγοτών και αμαστιγοτών *L. donovani* και *L. major*. In vivo μελέτη της δράσης της λικοχαλκόνης Α σε μολυσμένα χάμστερ ανέδειξε την ικανότητά της να μειώνει το παρασιτικό φορτίο ως και 96% σε σπλήνα και ήπαρ. Η λικοχαλκόνη Α και άλλες παρόμοιες χαλκόνες είναι ικανές να καταστρέφουν τη δομή του κινητοπλάστη επάγοντας τον παρασιτικό κυτταρικό θάνατο, ενώ είναι ταυτοχρόνως ισχυροί αναστολείς της ρεδοκτάσης του φουμαρικού οξέος της *L. major*, βασικό ένζυμο της αναερόβιας αναπνοής. Μία άλλη χαλκόνη, η 2',6'-διϋδροξυ-4'-μεθοξυχαλκόνη που έχει απομονωθεί από το φυτό *Piper aduncum*, έχει δράση έναντι προμαστιγοτών και αμαστιγοτών του είδους *L. Amazonensis* [21].

Αντίστοιχα και η αντιμετώπιση μιας ομάδας ασθενειών που προκαλούνται από τα παρασιτικά πρωτόζωα του είδους *Tyranosoma* χαρακτηρίζονται από έλλειψη κονδυλίων και έρευνας για την ανάπτυξη κατάλληλου εμβολίου, παρά τους υψηλούς δείκτες θνησιμότητας και νοσηρότητας εξαιτίας τους. Η αφρικανική τρυπανοσωμίωση

ή ασθένεια του ύπνου είναι μια παρασιτική ασθένεια των ανθρώπων ή άλλων ζώων, που εμφανίζεται εκτεταμένα σε περιοχές της υπο-σαχάριας Αφρικής. Προκαλείται από ένα παράσιτο της κατηγορίας *Trypanosoma brucei*, ενώ υπάρχουν δύο τύποι που μολύνουν τους ανθρώπους: *Trypanosoma brucei gambiense* και *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Και οι δύο μεταδίδονται συνήθως από το τσίμπημα μολυσμένης μύγας τσετσέ και εμφανίζονται συχνότερα σε αγροτικές περιοχές.

Εκτός από τις χαλκόνες, διάφορα συστατικά με βάση την ομάδα της κινολίνης παρουσιάζουν αντιπαρασιτικές ιδιότητες, κυρίως τα φυσικά προϊόντα dictyolomide A και B, τα οποία παρουσιάζουν αντιλεισμανιακές ιδιότητες απέναντι στους τύπους *L. donovani* και *T. Brucei*. Οι Roussaki et al. (2013) μελέτησαν μια σειρά από υβριδικά μόρια από χαλκόνες και 4-υδροξύ-2-κινολινόνες και συμπέραναν την σημασία της N-H ομάδας για την αντιπαρασιτική δράση των νέων αναλόγων (Σχήμα 19) [20].



Σχήμα 19. Ανάλογα χαλκονών και κινολινών με αντιπαρασιτικές ιδιότητες.

3.5.3 Αντικαρκινικές ιδιότητες

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις βασικές αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες η διάγνωση διαφόρων τύπων καρκίνου σε ασθενείς έχει σχεδόν διπλασιαστεί και αναμένεται να αυξηθεί ακόμα περισσότερο. Παρά την ύπαρξη διαφόρων θεραπειών διαθέσιμων, οι εγγενείς περιορισμοί αυτών και οι παρενέργειές τους, καθιστούν αναγκαία την ανάπτυξη νέων, βελτιωμένων και εκλεκτικών αντικαρκινικών παραγόντων. Σε αυτό το πλαίσιο, η παρουσία των χαλκονών είτε ως κύριο

συστατικό, είτε ως υποκαταστάτες, είτε ως πλευρική αλυσίδα σε διάφορα βιοδραστικά μόρια αποτελεί αντικείμενο έρευνας. Σημαντικό είναι, ακόμη, το γεγονός ότι δεδομένου ότι ένας μεγάλος αριθμός κλινικά χρήσιμων αντικαρκινικών φαρμάκων παρουσιάζουν γενετοξικά αποτελέσματα λόγω της αλληλεπίδρασης τους με τα αμινοξέα των νουκλεϊκών οξέων, οι χαλκόνες διατείνεται ότι στερούνται αυτής της σημαντικής παρενέργειας.

Έχει παρατηρηθεί ότι μόρια που περιέχουν πάνω από μία φαρμακοφόρες ουσίες είναι εξαιρετικά χρήσιμα αναφορικά με την θεραπεία του καρκίνου. Υπό αυτό το πρίσμα, η σύνθεση 5 υβριδικών μορίων χαλκονών-κουμαρινών και η *in vitro* αξιολόγησή τους έναντι μιας σειράς ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων [KB (ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα στόματος), C33A (τραχηλικό καρκίνωμα), MCF-7 (αδενοκαρκίνωμα μαστού), trA549 (πνεύμονα)] και ινοβλαστικών κυττάρων (NIH3T3) πραγματοποιήθηκε από τους Sashidhara et al.(2010) [21]. Παρόλο που οι ενώσεις 4 και 5 έδειξαν δραστικότητα για όλες τις σειρές καρκινικών κυττάρων, ήταν περισσότερο δραστικές έναντι των C33A (οι τιμές IC₅₀s κυμάνθηκαν μεταξύ 3.59 mM and 8.12 mM). Η ένωση 5 με μία μεθυλομάδα (CH₃) στον δακτύλιο A ήταν το πιο δραστικό πρωτίστως έναντι του C33A (IC₅₀=3.59 mM), με αμέσως επόμενα το KB (IC₅₀=17.97 mM), το A549 (IC₅₀ = 32.80 mM) και το MCF7 (IC₅₀ = 81.10 mM) , ενώ δεν επέδειξε καμμία δραστικότητα έναντι του NIH3T3. Οι τιμές IC₅₀ εκφράζουν την ποσότητα του δείγματος που απαιτείται για τη μείωση της συγκέντρωσης των ελεύθερων ριζών κατά 50%. Η παρουσία της εστερικής δραστικότητας, ειδικότερα του μεθυλεστέρα στη θέση 3 και ο κουμαρινικός δακτύλιος έπαιξαν κρίσιμο ρόλο στην αντικαρκινική δραστικότητα αυτών των ενώσεων.

3.5.4 Αναστολείς της α-γλυκοσιδάσης-Θεραπεία σακχαρώδους διαβήτη

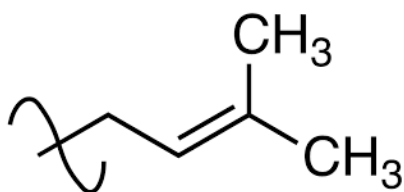
Ο σακχαρώδης διαβήτης (*Diabetes mellitus*) αποτελεί μια ομάδα μεταβολικών ασθενειών η οποία χαρακτηρίζεται από αύξηση της συγκέντρωσης του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) και διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης. Ανάμεσα στα φάρμακα για την θεραπεία του διαβήτη, οι αναστολείς της α-γλυκοσιδάσης [(α-glucosidase inhibitors (AGIs)] είναι τα πλέον κατάλληλα για την αντιμετώπιση της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας, με υποσχόμενη την χρήση ξανθονών, χαλκονών και bis- χαλκονών ως κατάλληλοι αναστολείς [23].

3.6 Πρενυλιωμένες χαλκόνες

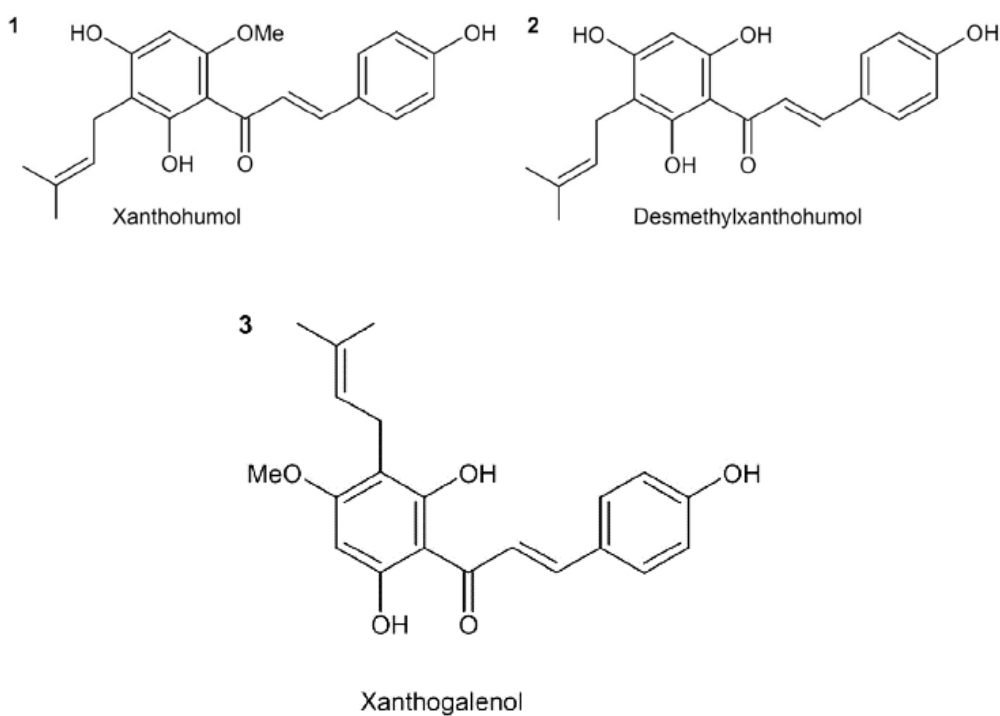
3.6.1 Δομή και φυσικές πηγές

Οι πρενυλιωμένες χαλκόνες και τα πρενυλιωμένα φλαβονοειδή κατέχουν μία ή περισσότερες πρενυλο-ομάδες, συνδεδεμένες με ομοιοπολικό δεσμό στον σκελετό τους (Σχήμα 20). Αυτές οι πρενυλιωμένες ενώσεις παράγονται από έναν μικρό αριθμό φυτικών οικογενειών, κυρίως από *Asclepiadaceae*, *Asteraceae*, *Berberidaceae*, *Cannabaceae*, *Clusiaceae*, *Fabaceae*, *Leguminosae*, *Moraceae*, *Platanaceae*, *Ptaeroxylaceae*, *Rutaceae*, *Sapindaceae*, and *Scrophulariaceae*. Περίπου το 80% των περίπου 1100 πρενυλιωμένων φλαβονοειδών προέρχονται από τα φυτά των οικογενειών *Asteraceae*, *Cannabinaceae*, *Leguminosa*. Έως τώρα όλες οι πρενυλιωμένες χαλκόνες έπρεπε να απομονωθούν από το λυκίσκο (Σχήμα 21). Η xanthohumol είναι η πιο διαδεδομένη πρενυλιωμένη χαλκόνη στο λυκίσκο (*Humulus lupulus* L.) και επιδεικνύει ένα ευρύ φάσμα φαρμακολογικών ιδιοτήτων. Στο λυκίσκο επίσης περιέχονται διάφορες άλλες πρενυλιωμένες και δομικώς παρεμφερείς χαλκόνες όπως οι xanthogalenol, , xanthohumol B, and C. Τα φαρμακολογικά τους όμως δεδομένα δεν είναι τόσο πολλά εξαιτίας της δυσκολίας απομόνωσής τους. Σταδιακά

εξελίσσεται και η σύνθεση μη-φυσικών πρενυλιωμένων χαλκονών, ούτως ώστε να υπάρχουν ικανές ποσότητες για τη διεξαγωγή βιοδοκιμασιών [24], [25].



Σχήμα 20. 3-μεθυλο-2-βουτεν-1-υλο ομάδα (πρενυλο- ομάδα).



Σχήμα 21. Χαρακτηριστικές πρενυλιωμένες χαλκόνες.

3.6.2 Βιολογικές ιδιότητες

Η παρουσία ισοπρενοϊκών αλυσίδων ποικίλων μηκών και ειδών είναι καθοριστικής σημασίας για τη βιοδραστικότητα των πρενυλιωμένων φλαβονοειδών. Οι αξιοσημείωτες ιδιότητες τους οφείλονται στην ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με βιολογικές μεμβράνες, και στην ύπαρξη συγγένειας με τις πρωτεΐνες-στόχους,

συγκριτικά με τα μη πρενυλιωμένα ανάλογά τους. Όσο αυξάνεται ο αριθμός των πρενυλομάδων στο μόριο αυξάνονται η λιποφιλικότητα, η σύνδεση στη μεμβράνη και η μεταφορά διαμέσου της μεμβράνης, γεγονός που πιθανώς συνδέεται με αυξημένη βιοδραστικότητα.

Διακρίνονται για ένα πλήθος βιολογικών ιδιοτήτων όπως αντιβακτηριακή, αντιελονοσιακή, αντιμυκητιακή, αντιδιαβητική, αντικαρκινική, αντιοξειδωτική, και αντιφλεγμονώδη δράση. Οι πρενυλιωμένες χαλκόνες και τα κυκλικά ανάλογά τους αποδείχτηκε ότι έχουν καλές αντιμικροβιακές, αντικές, και εντομοκτόνες ιδιότητες. Η αντιφλεγμονώδης δράση των Ο-πρενυλιωμένων χαλκονών εκφράζεται με την παρεμπόδιση της λιποξυγενάσης (LOX), ένζυμο που μεταβολίζει το αραχιδονικό οξύ. Τα προϊόντα του 5- LOX μονοπατιού επομένως είναι σημαντικοί μεσολαβητές για τη φλεγμονή. Αποδείχτηκε ότι οι πρενυλιωμένες χαλκόνες μπορούν να δράσουν αποτελεσματικά ως πιθανοί παρεμποδιστές της 5- LOX. Οι πρενυλιωμένες χαλκόνες επίσης έδειξαν ότι περιορίζουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Οι δι-Ο πρενυλιωμένες χαλκόνες φάνηκε ότι είναι πιο αποτελεσματικές σε σχέση με τις μονο-ο- πρενυλιωμένες χαλκόνες. Η ζανθοχουμόλη είναι η καλύτερα μελετημένη φυτοχημική ένωση για την πρόληψη του καρκίνου που απομονώνεται από το λυκίσκο. Αυτή δρα σε τρία στάδια: παρεμποδίζει τη μεταβολική ενεργοποίηση των προκαρκινωμάτων, ενεργοποιεί τα ένζυμα που δρουν τοξικά για τα καρκινώματα και παρεμποδίζει την ανάπτυξη των όγκων στο αρχικό στάδιο [26].

Βιβλιογραφία Κεφαλαίου 3

1. Zdzisława Nowakowska, "A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2007,42, 125-137.
2. Tajuddeen, N., Isah, M. B., Suleiman, M. A., van Heerden, F. R., & Ibrahim, M. A. (2017). The chemotherapeutic potential of chalcones against leishmaniasis: a review. *International journal of antimicrobial agents*.
3. Detsi, A., Majdalani, M., Kontogiorgis, C. A., Hadjipavlou-Litina, D., & Kefalas, P. (2009). Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(23), 8073-8085.
4. Friis-Møller, A., Chen, M., Fursted, K., Christensen, S. B., & Kharazmi, A. (2002). In vitro antimycobacterial and antilegionella activity of licochalcone A from Chinese licorice roots. *Planta medica*, 68(05), 416-419.
5. Stevens, J. F., & Page, J. E. (2004). Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health!. *Phytochemistry*, 65(10), 1317-1330.
6. Rancán, L., Paredes, S. D., García, I., Muñoz, P., García, C., de Hontanar, G. L. & Tresguerres, J. A. (2017). Protective effect of xanthohumol against age-related brain damage. *The Journal of nutritional biochemistry*, 49, 133-140.
7. Lee, J. H., Jung, H. S., Giang, P. M., Jin, X., Lee, S., Son, P. T. & Lee, J. J. (2006). Blockade of nuclear factor- κ B signaling pathway and anti-inflammatory activity of cardamomin, a chalcone analog from *Alpinia conchigera*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 316(1), 271-278.
8. Ali, A. A., Al Haleem, E. N. A., Khaleel, S. A. H., & Sallam, A. S. (2017). Protective effect of cardamonin against acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *Pharmacological Reports*, 69(2), 268-275.
9. Voon, F. L., Sulaiman, M. R., Akhtar, M. N., Idris, M. F., Akira, A., Perimal, E. K. & Ming-Tatt, L. (2017). Cardamonin (2', 4'-dihydroxy-6'-methoxychalcone) isolated from *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. inhibits CFA-induced rheumatoid arthritis in rats. *European journal of pharmacology*, 794, 127-134.

10. Hunt, G. M., & Baker, E. A. (1980). Phenolic constituents of tomato fruit cuticles. *Phytochemistry*, 19(7), 1415-1419.
11. Κατσώρη Άννα-Μαρία, (2012), Σύνθεση και φαρμακοχημική μελέτη ετεροκυκλικών ενώσεων (χαλκονών και παραγώγων) με πιθανή αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική, αντικαρκινική δράση. Μέθοδος QSAR., Διδακτορική Διατριβή, ΑΠΘ, Θεσσαλονίκη.
12. Srivastava, Y. K. (2008). Ecofriendly microwave assisted synthesis of some chalcones. *Rasayan J. Chem*, 1(4), 884-886.
13. Singh, P., Anand, A., & Kumar, V. (2014). Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. *European journal of medicinal chemistry*, 85, 758-777.
14. John McMurry, "Οργανική Χημεία, Τόμος ΙΙ" , Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2006.
15. Singh, P., Anand, A., & Kumar, V. (2014). Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. *European journal of medicinal chemistry*, 85, 758-777.)
16. Nowakowska, Z. (2007). A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *European journal of medicinal chemistry*, 42(2), 125-137.
17. Lin, Y. M., Zhou, Y., Flavin, M. T., Zhou, L. M., Nie, W., & Chen, F. C. (2002). Chalcones and flavonoids as anti-tuberculosis agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 10(8), 2795-2802.
18. Yin, B. T., Yan, C. Y., Peng, X. M., Zhang, S. L., Rasheed, S., Geng, R. X., & Zhou, C. H. (2014). Synthesis and biological evaluation of α -triazolyl chalcones as a new type of potential antimicrobial agents and their interaction with calf thymus DNA and human serum albumin. *European journal of medicinal chemistry*, 71, 148-159.
19. Chu, W. C., Bai, P. Y., Yang, Z. Q., Cui, D. Y., Hua, Y. G., Yang, Y., ... & Qin, S. (2018). Synthesis and antibacterial evaluation of novel cationic chalcone derivatives possessing broad spectrum antibacterial activity. *European journal of medicinal chemistry*, 143, 905-921.
20. Roussaki, M., Hall, B., Lima, S. C., da Silva, A. C., Wilkinson, S., & Detsi, A. (2013). Synthesis and anti-parasitic activity of a novel quinolinone–chalcone series. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23(23), 6436-6441.

21. Ιωάννης Κυριαζής, (2014), Μελέτη της δράσης φυσικών προϊόντων έναντι ενδοκυττάρων παρασιτικών οργανισμών, Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών.
22. Sashidhara, K. V., Kumar, A., Kumar, M., Sarkar, J., & Sinha, S. (2010). Synthesis and in vitro evaluation of novel coumarin–chalcone hybrids as potential anticancer agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(24), 7205-7211.
23. Cai, C. Y., Rao, L., Rao, Y., Guo, J. X., Xiao, Z. Z., Cao, J. Y., ... & Wang, B. (2017). Analogues of xanthenes, Chalcones and bis-chalcones as α -glucosidase inhibitors and anti-diabetes candidates. *European journal of medicinal chemistry*, 130, 51-59.
24. Venturelli, S., Burkard, M., Biendl, M., Lauer, U. M., Frank, J., & Busch, C. (2016). Prenylated chalcones and flavonoids for the prevention and treatment of cancer. *Nutrition*, 32(11), 1171-1178.
25. Yang, X., Jiang, Y., Yang, J., He, J., Sun, J., Chen, F., ... & Yang, B. (2015). Prenylated flavonoids, promising nutraceuticals with impressive biological activities. *Trends in Food Science & Technology*, 44(1), 93-104.
26. Reddy, N. P., Aparoy, P., Reddy, T. C. M., Achari, C., Sridhar, P. R., & Reddanna, P. (2010). Design, synthesis, and biological evaluation of prenylated chalcones as 5-LOX inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18(16), 5807-5815.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

4.1 Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου

Οι δραστικές ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού, είναι γνωστές ως προοξειδωτικά και παίζουν διττό ρόλο, άλλοτε είναι ευεργετικές για τα κύτταρα και τους οργανισμούς και άλλοτε βλαπτικές. Οι ευεργετικές δράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου παρατηρούνται σε χαμηλές/μέτριες συγκεντρώσεις και αφορούν σε φυσιολογικούς ρόλους στην κυτταρική απόκριση στο stress, στη μεταγωγή σήματος, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στη μεταγραφή γονιδίων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη φλεγμονή και στην απόπτωση [1]. Οι βλαβερές δράσεις των δραστικών ριζών οξυγόνου ασκούνται στα βιομόρια, στις πρωτεΐνες, στα νουκλεϊνικά οξέα, στα λιπίδια και μπορεί να προκαλέσουν κυτταρική/ ιστική βλάβη, από την οποία ο οργανισμός προστατεύεται με μια σειρά αντιοξειδωτικών ουσιών. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες παράγονται ενδογενώς ή προέρχονται από εξωτερικές πηγές και περιλαμβάνουν ένζυμα όπως η καταλάση, η δισμουτάση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, η αναγωγή της γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, μέταλλα όπως το Se, το Mn, ο Cu και ο Zn, βιταμίνες όπως οι A, C και E, καθώς και άλλες ουσίες όπως η γλουταθειόνη. Ως οξειδωτικό stress ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προοξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών ουσιών του κυττάρου και οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου είτε σε ανεπάρκεια των κυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Το οξειδωτικό stress ενοχοποιείται στην παθοφυσιολογία πολλών νοσημάτων καθώς και στη διεργασία της γήρανσης, με αποτέλεσμα να παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον η προσπάθεια

φαρμακολογικής τροποποίησης της απόκρισης των οργανισμών στο οξειδωτικό stress [2].

Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα ή μόρια που φέρουν ένα μονήρες ηλεκτρόνιο, γεγονός που τους δίνει τη δυνατότητα να ξεκινούν μια ταχεία σειρά αντιδράσεων οι οποίες αποσταθεροποιούν άλλα μόρια, δημιουργώντας περισσότερες ελεύθερες ρίζες. Στα φυτά και τα ζώα αυτές οι ελεύθερες ρίζες απενεργοποιούνται από τα αντιοξειδωτικά. Δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species – ROS) είναι ένας συλλογικός όρος που περιλαμβάνει τόσο τις ρίζες οξυγόνου, όπως ρίζες υπεροξειδίου (O_2^-), υδροξυλίου (OH^\cdot), περοξυλίου (RO^\cdot), και υδροπεροξυλίου (RO_2^\cdot), όσο και συγκεκριμένους μη-ριζικούς οξειδωτικούς παράγοντες, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το υποχλωρικό οξύ ($HOCl$) και το όζον (O_3), οι οποίοι μπορούν να μετατραπούν εύκολα σε ρίζες [3], [4].

Τα ROS εμπλέκονται στην παθογένεση πλήθους κυτταρικών καταστρεπτικών διαδικασιών και ασθενειών. Ωστόσο, παράγονται και κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού μεταβολισμού και εμπλέκονται στις ενζυμικές αντιδράσεις, τη μεταφορά μιτοχονδριακών ηλεκτρονίων, τη μεταγωγή σήματος, την ενεργοποίηση των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων την έκφραση γονιδίων και την αντιμικροβιακή δράση των ουδετερόφιλων και των μακροφάγων.

Οι οργανισμοί διαθέτουν ενδογενείς μηχανισμούς προστασίας (όπως βιταμίνες και ένζυμα) έναντι αυτών των δραστικών μορφών οξυγόνου και σε φυσιολογικές καταστάσεις οι μηχανισμοί αυτοί είναι ικανοί για να τις δεσμεύσουν. Σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις όμως οι μηχανισμοί αυτοί δεν αρκούν με αποτέλεσμα να υπάρχει περίσσεια δραστικών μορφών οξυγόνου. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται 'οξειδωτικό στρες' και απαιτεί τη χορήγηση εξωγενών αντιοξειδωτικών.

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη διαφόρων διαταραχών όπως είναι η αρθρίτιδα, ο καρκίνος, η αρτηριοσκλήρυνση κτλ. Η οξειδωτική βλάβη στο DNA πιθανώς είναι ζωτικής σημασίας στην εμφάνιση της γήρανσης, ενώ και η παρουσία του ενδοκυτταρικού οξυγόνου μπορεί να είναι υπεύθυνη για την έναρξη μιας αλυσίδας αντιδράσεων σε κυτταρικό επίπεδο που προκαλούν καταστροφή σημαντικών βιομορίων. Αυτές οι ρίζες είναι ιδιαίτερος τοξικές και προκαλούν το οξειδωτικό στρες στα φυτά.

4.2 Αντιοξειδωτικά

Η συνεχής έκθεση στις βλαπτικές δράσεις των ελευθέρων ριζών έχει οδηγήσει τους οργανισμούς στην ανάπτυξη μιας σειράς προστατευτικών μηχανισμών. Οι μηχανισμοί αυτοί αφορούν σε προληπτικούς μηχανισμούς, σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης, σε φυσικά μέτρα προστασίας και σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να χαρακτηριστεί οποιαδήποτε ουσία, η οποία, όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες των υποστρωμάτων που πρόκειται να οξειδωθούν, καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωση αυτών των υποστρωμάτων. Ο φυσιολογικός ρόλος των αντιοξειδωτικών, όπως προκύπτει από τον ορισμό, είναι η αποφυγή της βλάβης των κυτταρικών συστατικών, ως συνέπεια των χημικών αντιδράσεων από τις οποίες προκύπτουν ελεύθερες ρίζες και η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης. Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, τα αντιοξειδωτικά που διασπούν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις και τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν τα μεταβατικά μέταλλα.

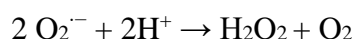
Το αναγωγικό περιβάλλον στο εσωτερικό του κυττάρου εμποδίζει τις βλάβες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες. Αυτό το αναγωγικό περιβάλλον υποστηρίζεται από τη δράση του αντιοξειδωτικού συστήματος των φυτών που περιλαμβάνει ενζυμικά και μη ενζυμικά συστήματα. Το μη ενζυμικό σύστημα περιλαμβάνει το ασκορβικό οξύ

(βιταμίνη C), την α-τοκοφερόλη, τα καροτενοειδή κτλ. Το ενζυμικό σύστημα περιλαμβάνει τη υπεροξειδική δισμουτάση (superoxide dismutase, SOD), την καταλάση (catalase, CAT), την υπεροξειδάση (peroxidase, POX), την ασκορβική υπεροξειδάση (ascorbate peroxidase, APX), την αναγωγή της γλουταθειόνης (glutathione reductase, GR) και την πολυφαινολική οξειδάση (polyphenol oxidase, PPO) κ.α. Μεταβολές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου και εξάντληση των αντιοξειδωτικών μετά από έκθεση σε οξειδωτικά, οδηγούν σε οξειδωτικό στρες και επακόλουθη οξειδωτική βλάβη.

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. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά απαντώνται σε όλα τα μέρη των φυτών και περιλαμβάνουν τα καροτενοειδή, τις βιταμίνες, τις φαινόλες, τα φλαβονοειδή, τη διαιτητική γλουταθειόνη, και ενδογενείς μεταβολίτες. Τα φρούτα και τα λαχανικά περιέχουν διαφορετικές αντιοξειδωτικές ενώσεις όπως η βιταμίνη C, η βιταμίνη E και τα καροτενοειδή, των οποίων οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες επιβεβαιώθηκαν τα τελευταία χρόνια. Τα φλαβονοειδή, οι ταννίνες και άλλα φαινολικά συστατικά που βρίσκονται στα φαγητά φυτικής προέλευσης έχουν επίσης σημαντική αντιοξειδωτική δράση.

4.3 Δράση και αναστολή των ROS

Το ερευνητικό ενδιαφέρον γύρω από τις ελεύθερες ρίζες ξεκινά το 1968 με την ανακάλυψη της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD), ένα ένζυμο εξειδικευμένο για την απομάκρυνση του περισσεύοντος $O_2^{\cdot-}$ και άρα ένας σημαντικός μηχανισμός άμυνας στους αερόβιους οργανισμούς. Οι ισόμορφες της SOD μετατρέπουν το $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 :



Το υπεροξείδιο είναι ένας ασθενής οξειδωτικός παράγοντας, αντίθετα όμως με το $O_2^{\cdot-}$, διαπερνά εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες. Δεν διαθέτει ασύζευκτα ηλεκτρόνια, οπότε δεν θεωρείται ρίζα, αλλά μπορεί να λειτουργήσει ως μεταβολικό σήμα κάτω από ορισμένες περιστάσεις, πιθανόν οξειδώνοντας θειολικές ομάδες συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Ακόμη, έχει την ικανότητα να καταστρέφει και τα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού, με τη μετατροπή του στην πολύ δραστική ρίζα υδροξυλίου, η οποία προκαλεί λιπιδική υπεροξείδωση, αναστολή της δράσης πρωτεϊνών και μεταλλάξεις του DNA. Οι ρίζες υπεροξειδίου σχηματίζονται με την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας ή κατά την επαφή του H_2O_2 με μεταλλικά ιόντα στοιχείων μετάπτωσης, κυρίως σιδήρου. Είναι γενικώς αποδεκτό ότι το H_2O_2 είναι τοξικό *in vivo* σε συγκεντρώσεις πάνω από 50 μM . Για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες που προκαλεί το H_2O_2 οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει μεγάλη ποικιλία μηχανισμών άμυνας. Για παράδειγμα, οι αντιδράσεις που οδηγούν στο σχηματισμό H_2O_2 ελαχιστοποιούνται με την απομάκρυνση των μεταλλικών ιόντων (κυρίως ιόντα σιδήρου), που δρουν καταλυτικά σε αυτές, μέσω συμπλοκοποίησης των ιόντων από πρωτεΐνες όπως η φερριτίνη, η τρανφερρίνη, η αιμοσιδερίνη και η αίμη που δεσμεύουν τον Fe^{2+} και προστατεύουν τα κύτταρα από την οξειδωτική καταστροφή. Πολλά ακόμη μόρια μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικά για τη δέσμευση του H_2O_2 όπως τα ένζυμα

υπεροξειδάσες και καταλάσες αλλά και οι βιταμίνες E, C και η προβιταμίνη A, η ορμόνη μελατονίνη κ.ά.

Ένα πλήθος ενζυμικών και μη ενζυμικών διεργασιών είναι δυνατό να προκαλέσουν την παραγωγή των ROS στα ζωϊκά κύτταρα. Μεταξύ των πιο σημαντικών πηγών είναι οι καταλυόμενες αντιδράσεις από τα ένζυμα NADPH οξειδάση, οξειδορεντουκτάση της ξανθίνης (XOR) και μυελοπεροξειδάση (MPO). Η NADPH οξειδάση είναι ένα σύμπλεγμα πολλαπλών υπομονάδων που παράγει $O_2^{\cdot-}$ στην αναγωγή του οξυγόνου (ενός ηλεκτρονίου), χρησιμοποιώντας ηλεκτρόνια από την NADPH. Αν και η NADPH οξειδάση των λευκοκυττάρων είναι ανενεργή κάτω από συνθήκες ανάπαυσης, με την εφαρμογή διαφορετικών ερεθισμάτων, όπως λιποπολυσακχαρίτες ή διάφοροι προφλεγμονώδεις μεσολαβητές (παράγοντας α νέκρωσης όγκων, ιντερλευκίνη -1 β και ιντερλευκίνη -6), ενεργοποιείται. Διέγερση των λευκοκυττάρων οδηγεί στη μετατόπιση των κυτταροπλασματικών υπομονάδων της NADPH οξειδάσης και στη μαζική παραγωγή $O_2^{\cdot-}$. Η NADPH οξειδάση είναι κρίσιμη για την εξολόθρευση των μικροοργανισμών με τη δημιουργία ROS στα λευκοκύτταρα. Επίσης, είναι παρούσα και σε μη γαφοκυτταρικά κύτταρα, όπως τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα των λείων μυών και τους ινοβλάστες.

4.4 Το οξειδοαναγωγικό παράδοξο

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

διαβήτη, η νόσος του Alzheimer και άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, αλλά και στον καρκίνο και τις καρδιαγγειακές νόσους, κυρίως με τέτοιο τρόπο που η παραγωγή τους γίνεται ανεξέλεγκτη [5].

Ο σχηματισμός των ROS είναι φυσική απόρροια του αερόβιου μεταβολισμού και αναπόσπαστο τμήμα για τη διατήρηση της ομοιόστασης του οξυγόνου στους ιστούς. Η ομοιόσταση του οξυγόνου –η ισορροπία μεταξύ των συστατικών οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών –διατηρείται μέσω μιας φυσιολογικής σειράς οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, που περιλαμβάνουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ δύο χημικών ειδών: εκείνων που χάνουν ηλεκτρόνια (οξειδώνονται) και εκείνων που προσλαμβάνουν (ανάγονται). Όταν η ομοιόσταση του οξυγόνου διαταραχθεί, το κυτταρικό περιβάλλον γίνεται οξειδωτικά φορτισμένο. Η ενδοκυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση καθορίζεται πρωταρχικά από τη γλουταθειόνη (GSH) και τηθειορεδοξιδίνη (TRH). Το οξειδοαναγωγικό ζεύγος της γλουταθειόνης (GSSH/2GSH) αποτελεί το κύριο οξειδοαναγωγικό ρυθμιστικό του κυττάρου και συνεπώς έναν αντιπροσωπευτικό δείκτη της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του.

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

ρόλο στη ρύθμιση προς το ελάχιστο των ανοσοποιητικών αποκρίσεων και τον περιορισμό των μετασχηματισμένων κυττάρων (καταστολή των όγκων) [6, 7].

Βιβλιογραφία Κεφαλαίου 4

1. Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American journal of medicine*, 91(3), S14-S22.
2. Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95.
3. Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*, 224, 164-175.
4. Γάλαρης, Δ. 2015. ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΟΞΥΓΟΝΟΥ - ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ. [Κεφάλαιο Συγγράμματος]. Στο Γάλαρης, Δ. 2015. *Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες*. [ηλεκτρ. βιβλ.] Αθήνα:Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. κεφ 2. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/5115>
5. Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American journal of medicine*, 91(3), S14-S22.
6. Castro, L., & Freeman, B. A. (2001). Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition*, 17(2), 161-165.
7. Klaunig, J. E., & Kamendulis, L. M. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 44, 239-267.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

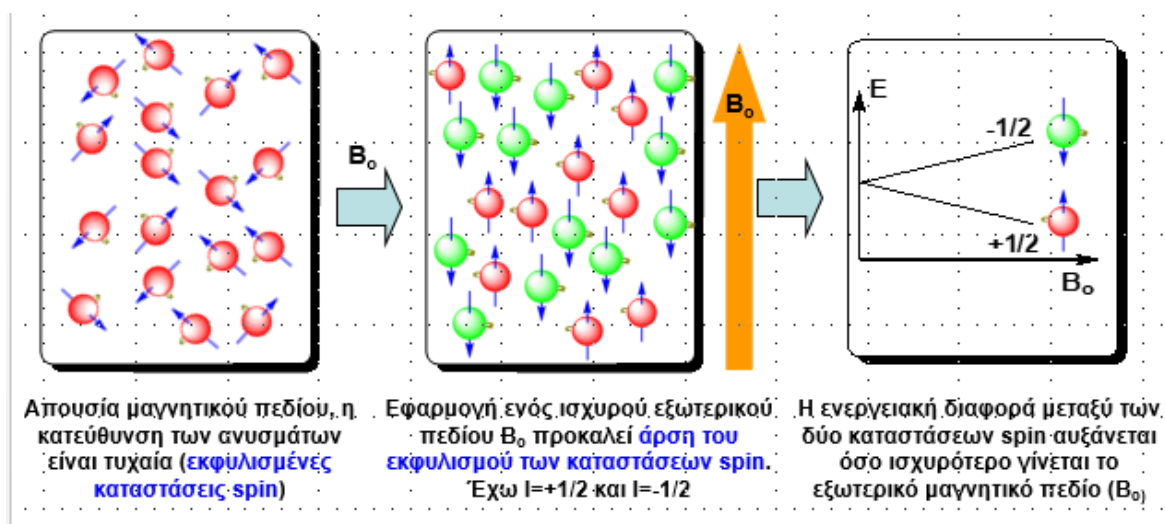
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ

Όπως σε άλλους φασματοσκοπικούς κλάδους, έτσι και στη φασματοσκοπία NMR μελετάται η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη. Στην περίπτωση της φασματοσκοπίας NMR γίνεται χρήση του φαινομένου NMR για τη μελέτη φυσικών, χημικών και βιολογικών ιδιοτήτων της ύλης. Έτσι, η φασματοσκοπία NMR βρίσκει εφαρμογές σε πολλούς επιστημονικούς κλάδους. Η φασματοσκοπία NMR μιας διάστασης χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά από τους χημικούς στη μελέτη της δομής χημικών ενώσεων. Τεχνικές NMR δύο ή περισσότερων διαστάσεων (πολυδιάστατο NMR) χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της δομής πολυπλοκότερων μορίων, π.χ. πρωτεϊνών. Τεχνικές NMR στο χώρο του χρόνου (πυρηνικής μαγνητική αποδιέγερση) χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της δυναμικής ενώσεων σε διαλύματα. Τέλος, η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη της δομής και δυναμικής ενώσεων σε στερεά κατάσταση. Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αποτελεί την σημαντικότερη φασματοσκοπική τεχνική που έχουν στη διάθεση τους οι οργανικοί χημικοί και παρέχει έναν χάρτη του όλου ανθρακικού σκελετού με τα υδρογόνα σε ένα οργανικό μόριο. Σε συνδυασμό με την φασματομετρία μάζας και υπερέθρου, δίνει την δυνατότητα προσδιορισμού ακόμα και της πιο πολύπλοκης δομής [1, 3].

5.1 Αρχή της μεθόδου

Πολλά είδη πυρήνων συμπεριφέρονται σαν να περιστρέφονται γύρω από κάποιον άξονα και δεδομένου ότι είναι θετικά φορτισμένοι λειτουργούν ως μικροσκοπικοί μαγνήτες. Έτσι, αλληλεπιδρούν με ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο (H_0). Όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό πρωτονίων και όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό νετρονίων εκδηλώνουν μαγνητικές ιδιότητες.

Τα πυρηνικά σπιν των μαγνητικών πυρήνων προσανατολίζονται, απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, κατά τυχαίο τρόπο. Όταν, όμως, δείγμα που περιέχει αυτούς τους πυρήνες τοποθετηθεί ανάμεσα στους πόλους ενός ισχυρού μαγνήτη, οι πυρήνες αποκτούν συγκεκριμένους προσανατολισμούς. Αν οι προσανατολισμένοι πυρήνες ακτινοβοληθούν με κατάλληλης συχνότητας ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας λαμβάνει χώρα απορρόφηση ενέργειας και η κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας αλλάζει φορά προς την κατάσταση υψηλότερης ενέργειας (αναστροφή σπιν). Όταν πραγματοποιηθεί αυτή η αναστροφή οι πυρήνες έχουν συντονιστεί με την εξωτερική εφαρμοζόμενη ακτινοβολία και εξ ου ο όρος Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (Σχήμα 24). Η ακριβής συχνότητα που απαιτείται για τον συντονισμό εξαρτάται από την ισχύ του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και από το είδος του πυρήνα. Όσο ισχυρότερο το επιβαλλόμενο μαγνητικό πεδίο, τόσο υψηλότερης συχνότητας, άρα και ενέργειας, ακτινοβολία απαιτείται για την αναστροφή του σπιν.



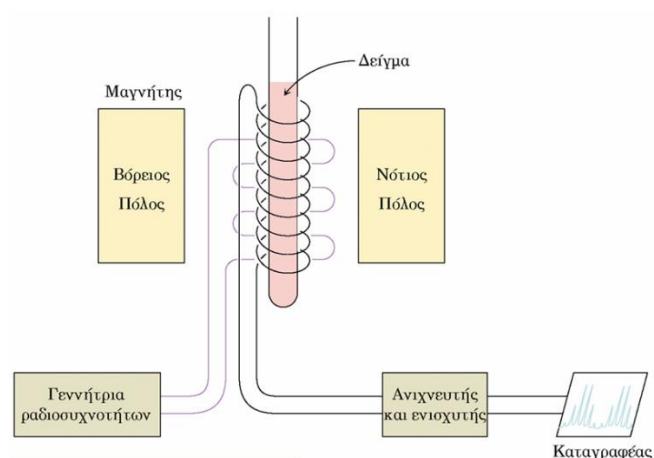
Σχήμα 22. Αρχή του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού [2].

Οι τιμές ΔE είναι εξαιρετικά μικρές. Έτσι, για ένα μαγνητικό πεδίο 1.41 Tesla η τιμή ΔE είναι μόλις 0.0057 cal/mol για έναν πυρήνα ^1H . Σε αυτό το πεδίο, ο πυρήνας ^1H απαιτεί ακτινοβολία συχνότητας 60 MHz (η αποκαλούμενη ενέργεια ραδιοσυχνότητας

rf) για να συντονιστεί, ενώ ο πυρήνας ^{13}C απαιτεί 15 MHz. Σε ένα πεδίο 60 MHz, απαιτείται η ανίχνευση πολύ μικρών ΔΕ, τόσο μικρών που η ευαισθησία του ανιχνευτή οδηγεί σε δυσδιάκριτα σήματα (πολύ θόρυβος). Γι'αυτό επιδιώκονται μεγαλύτερα μαγνητικά πεδία. Κάθε πυρήνας περιβάλλεται από ηλεκτρόνια τα οποία εντός του μαγνητικού πεδίου δημιουργούν ένα μικρό τοπικό μαγνητικό πεδίο Ητοπικό αντιπαράλληλο με το Ηο. Αυτά τα τοπικά μαγνητικά πεδία δρουν αντίθετα προς το εφαρμοζόμενο πεδίο, έτσι ώστε το πραγματικό πεδίο στον πυρήνα να είναι λίγο μικρότερο από το εξωτερικό. Οι πυρήνες, δηλαδή, προστατεύονται από την πλήρη επίδραση του επιβαλλόμενου πεδίου λόγω των ηλεκτρονίων που τους περιβάλλουν. Δεδομένου ότι κάθε πυρήνας (π.χ. ^1H) σε ένα μόριο έχει διαφορετικό ηλεκτρονιακό περιβάλλον, η απόκλιση από το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο θα είναι διαφορετική, οπότε κάθε πυρήνας θα συντονίζεται σε διαφορετικές συχνότητες. Οι μικροδιαφορές του πραγματικά εφαρμοζόμενου πεδίου που γίνονται αισθητές σε κάθε πυρήνα ανιχνεύονται μέσω των ευαίσθητων οργάνων NMR, οπότε λαμβάνουμε διαφορετικό σήμα για κάθε χημικά διακριτό πυρήνα υδρογόνου ή άνθρακα. Στο Σχήμα 22 απεικονίζεται η αρχή λειτουργίας ενός φασματομέτρου NMR ενώ στο Σχήμα 23 η σχηματική λειτουργία ενός φασματομέτρου.

Ένα οργανικό δείγμα διαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη, συνήθως δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (άλλοι διαλύτες είναι D_2O , CD_3OD , $(\text{CD}_3)_2\text{S}=\text{O}$, $(\text{CD}_3)_2\text{C}=\text{O}$, κ.α.) και τοποθετείται σε ένα λεπτό γυάλινο σωλήνα ανάμεσα στους πόλους ενός μαγνήτη. Εξαιτίας του ισχυρού μαγνητικού πεδίου οι πυρήνες ευθυγραμμίζονται και το δείγμα ακτινοβολείται. Εάν η συχνότητα αυτής της ακτινοβολίας παραμείνει σταθερή, ενώ η ισχύς του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου μεταβάλλεται, κάθε πυρήνας συντονίζεται σε ελαφρώς διαφορετική ισχύ πεδίου. Ένας ευαίσθητος ανιχνευτής καταγράφει την απορρόφηση της ενέργειας rf και στη συνέχεια το ηλεκτρονικό σήμα

ενισχύεται και εμφανίζεται ως κορυφή στον καταγραφέα. Για να προσδιορίσουμε τη θέση μιας απορρόφησης χρησιμοποιούμε ένα υλικό αναφοράς: στην πράξη προστίθεται στο δείγμα μικρή ποσότητα τετραμεθυλοσιλανίου (TMS, $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$) σε σχέση με το οποίο προσδιορίζεται η θέση μιας απορρόφησης στο γράφημα. Το TMS χρησιμοποιείται ως υλικό αναφοράς και για τις μετρήσεις ^1H και ^{13}C γιατί εμφανίζει μία μόνο κορυφή, σε υψηλότερο πεδίο από τις απορροφήσεις των περισσοτέρων οργανικών ενώσεων.



Σχήμα 23. Σχηματική λειτουργία ενός φασματομέτρου NMR [2].

Η θέση απορρόφησης ενός πυρήνα στο γράφημα καλείται χημική μετατόπιση. Οι περισσότεροι πυρήνες εμφανίζουν μετατοπίσεις κατά κανόνα αριστερά του TMS, του οποίου η μετατόπιση ορίζεται κατά σύμβαση μηδέν. Τα γραφήματα NMR βαθμολογούνται με την αυθαίρετη κλίμακα δέλτα. Μία μονάδα δ ισούται με την παρατηρούμενη χημική μετατόπιση / συχνότητα φασματομέτρου σε MHz. Η κλίμακα δ επινοήθηκε ώστε η συχνότητα συντονισμού ενός πυρήνα να μη διαφέρει από όργανο σε όργανο. Η χημική μετατόπιση δεν έχει μονάδες. Όμως, της αποδίδονται ως μονάδες τα ppm (parts per million, μέρη στο εκατομμύριο) που ουσιαστικά αντιστοιχεί σε τιμές Hz/MHz [1], [2], [3].

Βιβλιογραφία Κεφαλαίου 5

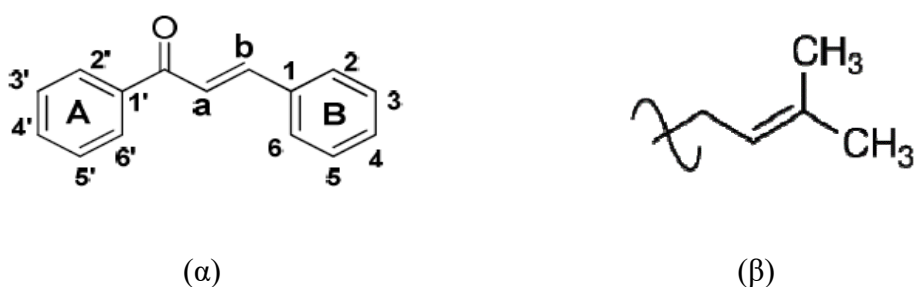
1. Φώτης Νταής, Διδακτικές σημειώσεις: “Βασικές Αρχές Φασματοσκοπίας NMR”, Τμήμα Χημεία, Πανεπιστήμιο Κρήτης. <http://www.chemistry.uoc.gr/nmr/lectures/Lecture1.pdf> (τελευταία πρόσβαση 16/06/2018)
2. Δ. Γεωργιάδης, Διδακτικές σημειώσεις Οργανικής Φασματοσκοπίας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Αθήνα, ΕΜΠ.
3. J. McMurry, Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2005.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

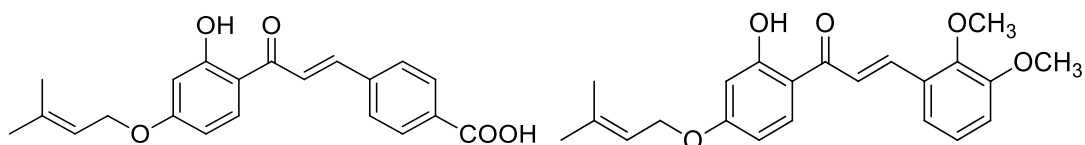
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6.1 Εισαγωγή

Οι πρενυλιωμένες χαλκόνες είναι μια υποκατηγορία φλαβονοειδών, ευρέως διαδεδομένων στη φύση. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η σύνθεση νέων αναλόγων πρενυλιωμένων χαλκονών, οι οποίες θα φέρουν την πρενυλο-ομάδα (Σχήμα 24) στη θέση 4' του Α δακτυλίου. Επίσης, δεδομένου ότι η θέση των υποκαταστατών του Β δακτυλίου και η δράση τους ως δότες ή δέκτες ηλεκτρονίων επηρεάζει τη σχέση δομής – δραστηριότητας (structure-activity Relationship-SAR) των χαλκονών, τα νέα ανάλογα θα διαθέτουν διάφορους υποκαταστάτες στις θέσεις 2, 3 και 4 του Β δακτυλίου (Σχήμα 25- 4'-Ο-πρενυλό-2'υδροξύ-χαλκόνες που συντέθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας). Τα νέα μόρια θα αξιολογηθούν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση, μέσω της ικανότητας δέσμευσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) με χρήση της μεθόδου της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης. Ακόμη, η αντιοξειδωτική τους δράση θα μελετηθεί και ως προς την ικανότητά τους να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH.

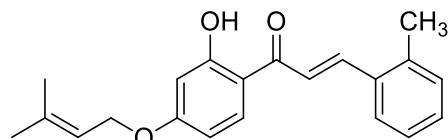
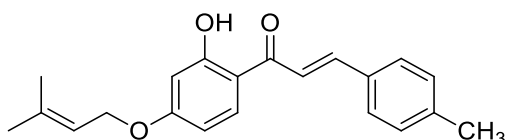


Σχήμα 24. (α) Γενική δομή χαλκονών, (β) 3-μεθυλο-2-βουτεν-1-υλο ομάδα: πρενυλο-ομάδα.



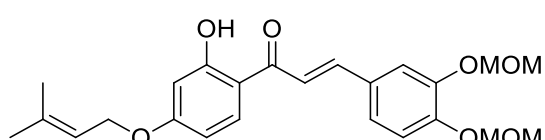
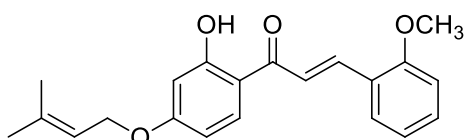
Χαλκόνη 4

Χαλκόνη 5



Χαλκόνη 6

Χαλκόνη 7



Χαλκόνη 8

Χαλκόνη 9

Σχήμα 25. 4'πρενυλό-2'υδροξύ-χαλκόνες που συντέθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας

6.2 Όργανα και συσκευές

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) έχουν καταγραφεί με τα εξής όργανα:

- Varian Gemini 300 MHz
- Varian 600 MHz

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)

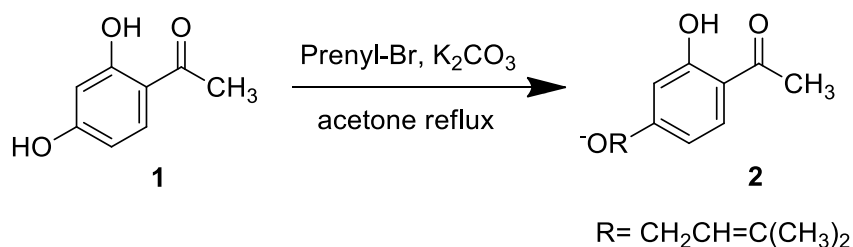
Οι σταθερές συζεύξεως J δίνονται σε Hz.

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

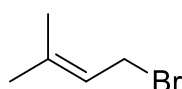
6.3 Σύνθεση μη εμπορικά διαθέσιμων ακετοφαινόνης και βενζαλδεΐδης

6.3.1 Σύνθεση της 4-πρενυλοξυ-2-υδροξυ-ακετοφαινόνης (ΔΧ8)

Οι πρενυλο-υποκατεστημένες ακετοφαινόνες δεν είναι εμπορικά διαθέσιμες και παρασκευάζονται με αλκυλίωση των αντίστοιχων υδροξυ-υποκατεστημένων ενώσεων σε βασικό περιβάλλον. Παρακάτω, παρουσιάζεται η ακετοφαινόνη που χρησιμοποιήθηκε και περιγράφεται αναλυτικά η διαδικασία σύνθεσής της (Σχήματα 26, 27).



Σχήμα 26. Γενική πορεία σύνθεσης της 4-πρενυλοξυ-2-υδροξυ-ακετοφαινόνης



Σχήμα 27. Ισοπρενυλοβρωμίδιο

Σε σφαιρική φιάλη που συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα και μπαλόνι που περιέχει N₂, προστίθενται σε διαλύτη ακετόνη, κατάλληλη ποσότητα της υδροξυ-υποκατεστημένης

ακετοφαινόνης (**1**), του ανθρακικού καλίου (K_2CO_3) και του αλκυλιωτικού μέσου σε γραμμομοριακή αναλογία 1:3:1,2. Έτσι, η 4-O-πρενυλο-2-υδροξυ-ακετοφαινόνη (**2**) παρασκευάζεται προσθέτοντας την 2,4-διϋδροξυ-ακετοφαινόνη (**1**) (0.013 mol, 2gr), το K_2CO_3 (0.039 mol, 5.38gr) και το ισοπρενυλοβρωμίδιο (0.0156mol, 2.32gr, Σχήμα), σε 40 mL ακετόνης. Το μίγμα αναδεύεται για 1,5 h, υπό θέρμανση στους 70 °C. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC - Thin Layer Chromatography). Όταν η αντίδραση ολοκληρωθεί, το K_2CO_3 απομακρύνεται με διήθηση και το διήθημα εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση ώστε να απομακρυνθεί ο διαλύτης.

Στο ελαιώδες υπόλειμμα προστίθεται διαιθυλαιθέρας και το μίγμα που προκύπτει τοποθετείται στο ψυγείο, όπου παρατηρείται καταβύθιση στερεού, που παραλαμβάνεται με διήθηση υπό κενό. Αναφέρεται ότι σε περίπτωση μη καταβύθισης στερεού, το μίγμα παραμένει ως έχει, και το ζητούμενο προϊόν απομονώνεται τελικώς και καθαρίζεται με χρωματογραφία στήλης, χρησιμοποιώντας κατάλληλο σύστημα διαλυτών. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με TLC και φασματοσκοπία 1H NMR. Λαμβάνονται τελικά 0.85 g λευκού στερεού, μετά από διήθηση υπό κενό, και τοποθετούνται σε ξηραντήρα.

Απόδοση: 30 %

Μοριακός τύπος (**2**): $C_{13}H_{16}O_3$

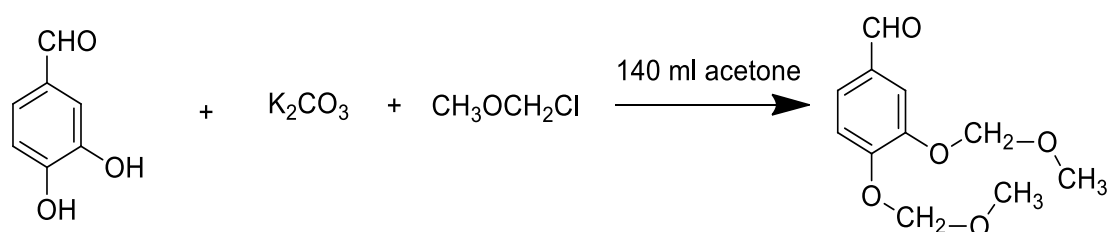
M.B.: 220.26

Σημείο τήξης: 69-71 °C

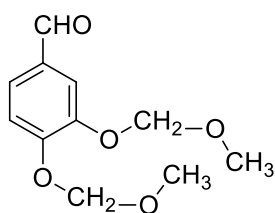
1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 12.74 (s, 1H, -OH), 7.62 (d, J=8.7Hz, 1H), 6.46 (m, 2H), 5.47 (t, J=6.9Hz, 1H, $CH=C(CH_3)_2$), 4.54 (d, J=6.6Hz, 2H, - CH_2O), 2.55 (s, 3H, - $COCH_3$), 1.78 (br, 6H, 2x - CH_3)

6.3.2 Σύνθεση της 3,4-δι(μεθοξυ-μεθοξυ)-βενζαλδεύδης (ΔX7)

Για την σύνθεση της χαλκόνης 9 χρησιμοποιήθηκε η 3,4-O-διμεθοξυ-μεθυλο-βενζαλδεύδη (Σχήμα 29), η οποία παρασκευάστηκε με βάση την παρακάτω αντίδραση (Σχήμα 28). Σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη με 140 ml ακετόνης προστίθενται η 3,4-διϋδροξυβενζαλδεύδη (7.2 mmol, 1 g), ανθρακικό κάλιο K_2CO_3 (30.6 mmol, 7 g) και χλωρομέθυλο μεθυλαιθέρας CH_3OCH_2Cl (18 mmol, 1.44 g). Το μίγμα τίθεται υπό ανάδευση με θέρμανση στους 57 °C. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μείγμα διηθείται και για τον καθαρισμό του στερεού προϊόντος χρησιμοποιείται η μέθοδος της ανακρυστάλλωσης. Το ίζημα διαλύεται εν θερμώ σε εξάνιο, με στάγδην προσθήκη οξικού αιθυλεστέρα. Μετά τοποθετείται στην κατάψυξη. Τελικά παραλαμβάνονται 0.75 g προϊόντος.



Σχήμα 28. Γενική πορεία σύνθεσης της 3,4-O-διμεθοξυ-μεθυλο-βενζαλδεύδης



3,4-bis(methoxymethoxy)benzaldehyde
Chemical Formula: $C_{11}H_{14}O_5$

Σχήμα 29. 3,4-O-διμεθοξυ-μεθυλο-βενζαλδεύδη

Απόδοση: 78%

Μοριακός τύπος (**2**): C₁₁H₁₄O₅

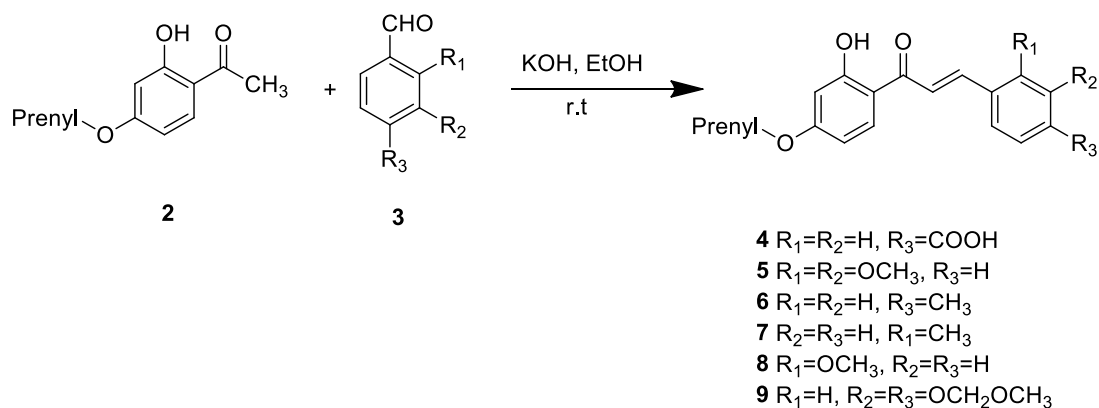
M.B.: 226.23

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 9.86 (s, 1H, -CHO), 7.67 (d, J=2.1 Hz, 1H), 7.50 (dd, J=8.4, 1.8 Hz, 1H), 7.27 (d, J=10.2 Hz, 1H), 5.32 (s, 2H, OCH₂O), 5.29 (s, 2H, -OCH₂O), 3.52 (s, 6H, 2x -OCH₃)

6.4 Σύνθεση χαλκονών

6.4.1 Γενική μέθοδος σύνθεσης χαλκονών

Στην παρούσα εργασία η σύνθεση χαλκονών έγινε μέσω της αντίδρασης αλδοολικής συμπύκνωσης Claisen –Schmidt, με βασικό καταλύτη το KOH, σύμφωνα με τη γενική αντίδραση του Σχήματος **30**:



Σχήμα 30. Γενική πορεία σύνθεσης των χαλκονών

6.4.2 Γενική πειραματική διαδικασία

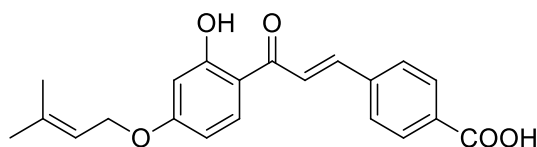
Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται, παρουσία αιθανόλης, ισομοριακές ποσότητες της ακετοφαινόνης **2** και μίας υποκατεστημένης βενζαλδεΐδης, και κατάλληλη αναλογία υδατικού διαλύματος KOH 20% ή 50 % w/v .

Το αντιδρόν μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για 1 μέρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η πορεία της αντίδρασης μελετάται με TLC σε τακτά χρονικά διαστήματα. Όταν η αντίδραση ολοκληρωθεί, η σφαιρική φιάλη ψύχεται σε παγόλουτρο και ακολουθεί οξίνιση του μίγματος με προσθήκη υδατικού διαλύματος HCl 10% v/v, όπου παρατηρείται καταβύθιση κίτρινου ιζήματος. Στη συνέχεια, το διάλυμα διηθείται υπό κενό, προς απομόνωση του στερεού, το οποίο και αφήνεται προς ξήρανση. Για τον καθαρισμό του στερεού προϊόντος χρησιμοποιείται η μέθοδος της ανακρυστάλλωσης. Το ίζημα διαλύεται εν θερμώ σε εξάνιο, με στάγδην προσθήκη οξικού αιθυλεστέρα. Το θερμό μίγμα ψύχεται, έως ότου καταβυθιστούν οι κρύσταλλοι του προϊόντος. Τέλος, για την παραλαβή του ανακρυσταλλωμένου προϊόντος, ακολουθεί διήθηση υπό κενό ή εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ^1H NMR και ^{13}C NMR.

Παρακάτω περιγράφεται αναλυτικά η διαδικασία σύνθεσης των χαλκονών που παρασκευάστηκαν στην παρούσα εργασία.

➤ ΔΧ3-ΧΑΛΚΟΝΗ 4

4-καρβοξύλο -4'-πρενυλοξυ-2'-υδροξυ- -γαλκόνη (4)



(E)-4-(3-(2-hydroxy-4-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)phenyl)-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzoic acid
Molecular Weight: 352.38

Σχήμα 31. Χημικός τύπος της χαλκόνης 4

Η χαλκόνη 4 (Σχήμα 31) παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης χαλκονών, προσθέτοντας την 4-πρενυλο-2-υδροξυ-ακετοφαινόνη (2) (0.91 mmol,

0.2gr), την 4-καρβοξυ-βενζαλδεΐδη (0.91 mmol, 0.137 gr) και 0.8 ml KOH 20% w/v, σε 2 ml αιθανόλης.

Το μείγμα εμφανίζει πορτοκαλοκόκκινο χρώμα. Το τελικό ανακρυσταλλώμενο προϊόν παραλαμβάνεται ύστερα από διήθηση. Τελικά, λαμβάνονται 33.5 mg στερεού. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία $^1\text{H NMR}$.

Σημείο τήξης: 126-128 °C

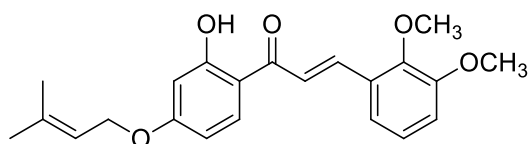
Απόδοση: 20 %

MB: 352.38

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7.94 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 7.71 (m, 2H), 7.54 (m, 3H), 6.42 (m, 3H), 5.38 (m, 1H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 4.46 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{O}$), 1.67 (br, 6H, 2x $-\text{CH}_3$)

➤ ΔΧ11-ΧΑΛΚΟΝΗ 5

2,3- διμεθοξυ -4'-πρενυλοξυ-2'-υδροξυ-γαλκόνη (5)



(*E*)-3-(2,3-dimethoxyphenyl)-1-(2-hydroxy-4-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)phenyl)prop-2-en-1-one
Molecular Weight: 368,4230

Σχήμα 32. Χημικός τύπος της χαλκόνης 5

Η χαλκόνη 5 (Σχήμα 32) παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης χαλκονών, προσθέτοντας την 4-πρενυλο-2-υδροξυ-ακετοφαινόνη (2) (0.91 mmol, 0.2gr), την 2,3- διμεθυλο-βενζαλδεΐδη (0.91 mmol, 0.15 gr) και 0.3 ml KOH 50% w/v, σε 4 ml αιθανόλης. Το μίγμα αναδεύεται για 1 ημέρα και το τελικό ανακρυσταλλωμένο προϊόν παραλαμβάνεται ύστερα από διήθηση υπό κενό και τελικά λαμβάνονται 80 mg

στερεού. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ^1H NMR και ^{13}C NMR.

Σημείο τήξης: 109-111 °C

Απόδοση: 24 %

MB: 368.42

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 13.50 (s, 1H, -OH), 8.16 (d, $J=15.9$ Hz, 1H, =CH-C), 7.82 (d, $J=9.9$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J=15.6$ Hz, 1H, =CH-), 7.11 (t, $J=8.1$ Hz, 2H), 6.99 (m, 2H), 6.48 (m, 1H), 5.49 (m, 1H, CH=C(CH₃)₂), 4.56 (d, $J=5.7$ Hz, 2H, CH₂-O), 3.90 (s, 6H, 2x O-CH₃), 1.78 (br, 6H, 2x -CH₃)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 192.267, 166.769, 165.649, 153.389, 149.168, 139.359, 131.176, 129.159, 124.331, 122.058, 119.931, 118.827, 114.439, 108.376, 101.856, 65.332, 61.479, 56.061, 31.051, 25.955, 18.388

Είναι φυσικό προϊόν που απομονώνεται από τις ρίζες του φυτού *Dalbergia sissoo*¹ (Σχήμα 33). Οι *Narahari et al* (2008) στη σχετική τους εργασία, απομόνωσαν από τον φλοιό της ρίζας του εν λόγω φυτού διάφορα φλαβονειδή παράγωγα.

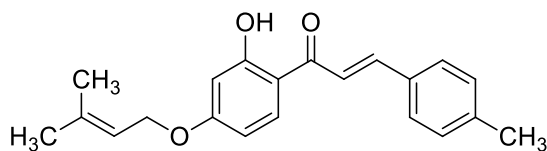
¹ Narahari Reddy et al., "O-Prenylated flavonoids from *Dalbergia sissoo*", *Phytochemistry Letters* I, 2008, 23-26.



Σχήμα 33. Το φυτό *Dalbergia sissoo*².

➤ **ΔΧ12-ΧΑΛΚΟΝΗ 6**

4-μεθυλο- 4'-πρενυλοξυ-2'-υδροξυ-γαλκόνη (6)



(*E*)-1-(2-hydroxy-4-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)phenyl)-3-(*p*-tolyl)prop-2-en-1-one
Molecular Weight: 322.40

Σχήμα 34. Χημικός τύπος της χαλκόνης **6**

Η χαλκόνη **6** (Σχήμα 34) παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης χαλκονών, χρησιμοποιώντας την ακετοφαινόνη **2** και την κατάλληλη βενζαλδεΐδη σε αναλογία 1;2, παρουσία υδατικού διαλύματος ΚΟΗ και αιθανόλης. Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται η 4-πρενυλοξυ-2-υδροξυ-ακετοφαινόνη (**2**) (0.91 mmol, 0.2gr), η *p*-

² Πηγή φωτογραφίας: <https://en.wikipedia.org> (τελευταία πρόσβαση 16/06/2018)

τολουαλδεϋδη (1.82 mmol, 0.219 gr) και 0.6 ml KOH 50% w/v, παρουσία 4 ml αιθανόλης. Το μίγμα αναδεύεται για 1 ημέρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, το τελικό ανακρυσταλλωμένο προϊόν παραλαμβάνεται ύστερα από διήθηση υπό κενό και τελικά, λαμβάνονται 100mg καθαρού στερεού. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ^1H NMR.

Σημείο τήξης: 72-75 °C

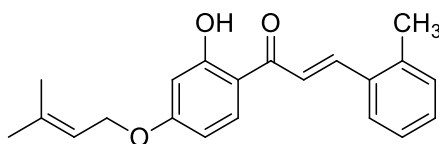
Απόδοση: 34%

MB: 322.40

^1H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 13.47 (s, 1H, -OH), 7.87 (d, J=15.6Hz, 1H), 7.85 (m, 1H), 7.54 (d, J=15.3Hz, 1H), 7.53 (m, 1H), 7.19 (m, 3H), 6.49 (m, 2H), 5.49 (m, 1H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 4.57 (d, J=7.8Hz, 2H, - $\text{CH}_2\text{-O-}$), 2.41 (s, 3H, Ar- CH_3), 1.815 (s, 3H, CH_3), 1.764 (s, 3H, CH_3)

➤ ΔΧ16-ΧΑΛΚΟΝΗ 7

2-μεθυλο -4'-πρενυλοξυ-2'-υδροξυ- -γαλκόνη (7)



(E)-1-(2-hydroxy-4-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)phenyl)-3-(o-tolyl)prop-2-en-1-one
Molecular Weight: 322,3976

Σχήμα 35. Χημικός τύπος της χαλκόνης 7

Η χαλκόνη 7 (Σχήμα 35) παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης χαλκονών, προσθέτοντας την 4-πρενυλοξυ-2-υδροξυ-ακετοφαινόνη (2) (1.81 mmol, 0.4 gr), την ο-τολουαλδεΐδη (1.81 mmol, 0.218 gr) και 0.6 ml KOH 50% v/v, σε 4 ml αιθανόλης. Το τελικό ανακρυσταλλώμενο προϊόν παραλαμβάνεται ύστερα από διήθηση υπό κενό και τελικά λαμβάνονται 0.44 g. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ^1H NMR και ^{13}C NMR.

Σημείο τήξης: : 68-72 °C

Απόδοση: 75%

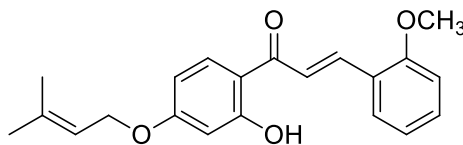
MB: 322.40

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 13.48 (s, 1H, -OH), 8.20 (d, J=15.3Hz, 1H), 7.84 (d, J=9.6Hz, 1H), 7.70 (d, J=7.5Hz, 1H), 7.51 (d, J=15.3Hz, 1H), 7.29 (m, 3H), 6.51 (m, 2H), 5.51 (t, J=5.4Hz, 1H, CH=C(CH₃)₂), 4.58 (d, J=6.9 Hz, 2H, -CH₂-O-), 2.51 (s, 3H, Ar-CH₃), 1.83 (s, 3H), 1.78 (s, 3H)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 191.993, 166.825, 165.737, 142.114, 138.583, 134.023, 131.394, 131.123, 130.514, 126.627, 126.510, 121.674, 118.817, 114.149, 108.484, 101.887, 65.367, 25.972, 20.025, 18.406

➤ ΔΧ14, ΔΧ19-ΧΑΛΚΟΝΗ 8

4-μεθοξυ-4'-πρενυλοξυ-2'-υδροξυ--γαλκόνη (8)



(E)-1-(2-hydroxy-4-((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)phenyl)-3-(2-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one
Molecular Weight: 338.40

Σχήμα 36. Χημικός τύπος της χαλκόνης 8

Η χαλκόνη 8 (Σχήμα 36) παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης χαλκονών, προσθέτοντας την 4-πρενυλοξυ-2-υδροξυ-ακετοφαινόνη (2) (0.91 mmol, 0.2 gr), την 2-μεθοξυ-βενζαλδεΐδη (0.91 mmol, 0.124 gr) και 0.3 ml διαλύματος ΚΟΗ 50% w/v, σε 4 ml αιθανόλης. Το μίγμα αναδεύεται για 1 ημέρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και το τελικό ανακρυσταλλωμένο προϊόν παραλαμβάνεται σε χαμηλή απόδοση. Η ταυτοποίηση της δομής του πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία ^1H NMR και ^{13}C NMR, από όπου διαπιστώθηκε ότι πρόκειται για μίγμα του προϊόντος και των δύο αντιδρώντων, κι έτσι απαιτείται επιπλέον καθαρισμός.

Λόγω της χαμηλής απόδοσης και καθαρότητας του τελικού προϊόντος, επιχειρείται μία διαφορετική μέθοδος σύνθεσης για τη χαλκόνη 8, όπου ισομοριακές ποσότητες των αντιδρώντων αναδεύονται παρουσία διαλύτη διμεθυλοφορμαμίδιο (Dimethylformamide, DMF), σε βασικό περιβάλλον, για 24 ώρες. Πιο συγκεκριμένα, η 4-πρενυλο-2-υδροξυ-ακετοφαινόνη (2) (0.91 mmol, 0.2 gr), η 2-μεθοξυ-βενζαλδεΐδη (0.91 mmol, 0.124 gr) και διάλυμα υδριδίου του νατρίου (NaH) 60% w/v προσθέτονται σε σφαιρική φιάλη, παρουσία 4 ml DMF. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και το μίγμα αναδεύεται για 24 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης, ακολουθεί ψύξη και οξίνιση του μίγματος, όπου παρατηρείται

καταβύθιση στερεού, το οποίο παραλαμβάνεται με διήθηση υπό κενό και ύστερα ξηραίνεται. Τελικά παραλαμβάνονται 0,22 g καθαρού προϊόντος.

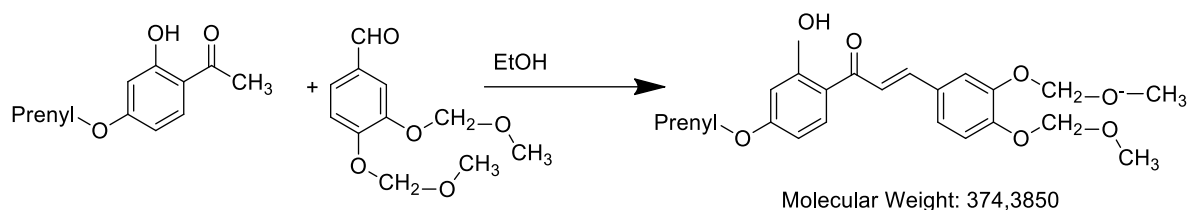
Σημείο τήξης: 67-70 °C

Απόδοση: 66 %

MB: 366.45

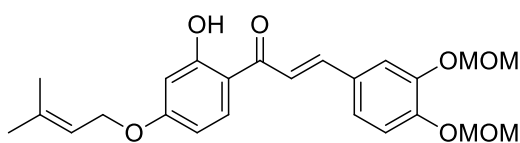
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) δ 13.54 (s, 1H, -OH), 8.19 (d, $J=15.6\text{Hz}$, 1H), 7.82 (d, $J=9.6\text{Hz}$, 1H), 7.70 (d, $J=15.6\text{Hz}$, 1H), 7.63 (d, $J=7.8, 1.5\text{Hz}$, 1H), 7.39 (t, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 6.96 (m, 2H), 6.49 (m, 2H), 5.49 (t, $J=8.1\text{Hz}$, 1H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 4.57 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 2H, $-\text{CH}_2\text{-O-}$), 3.94 (s, 3H, $-\text{O-CH}_3$), 1.79 (br, 6H, 2x $-\text{CH}_3$)

➤ ΔΧ18-ΧΑΛΚΟΝΗ 9



Σχήμα 37. Αντίδραση σύνθεσης της 2,3-μεθοξυ-μεθοξυ -4'-πρενυλοξυ-2'-υδροξυ-χαλκόνης

2,3-μεθοξυ-μεθοξυ -4'-πρενυλοξυ-2'-υδροξυ- -γαλκόνη (9)



(E)-3-(3,4-bis(methoxymethoxy)phenyl)-1-(2-hydroxy-4-(3-methylbut-2-en-1-yloxy)phenyl)prop-2-en-1-one
Molecular Weight: 428.47

Σχήμα 38. Χημικός τύπος της χαλκόνης 9

Η χαλκόνη 9 (Σχήμα 38) παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης χαλκονών, προσθέτοντας την 4-πρενυλοξυ-2-υδροξυ-ακετοφαινόνη (2) (0.91 mmol, 0.2 gr), την 2-μεθοξυ-βενζαλδεΐδη (0.91 mmol, 0.124 gr) και 0.3 ml διαλύματος ΚΟΗ 50% w/v, σε 4 ml αιθανόλης. Το μίγμα αναδεύεται για 1 ημέρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται ύστερα από εκχύλιση. Η ταυτοποίησή του πραγματοποιείται με φασματοσκοπία ^1H NMR και ^{13}C NMR, από όπου παρατηρείται πως πρόκειται για μίγμα του προϊόντος και των αντιδρώντων, κι έτσι απαιτείται καθαρισμός.

Σημείο τήξης: 29-32 °C

Απόδοση: 75 %

ΜΒ: 442.50

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 13.49 (s, 1H, -OH), 6.46 (d, $J=16.2$ Hz, 1H, =CH-), 5.29 (m, 4H, 2x OCH_2O), 3.56 (s, 3H, OCH_3), 3.530 (s, 3H, OCH_3)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 191.627, 166.498, 165.368, 149.480, 147.739, 143.993, 139.052, 132.143, 131.092, 129.189, 124.038, 118.567, 116.103, 108.132, 101.385, 95.452, 65.071, 56.265, 26.079, 25.710, 18.151

6.5 Χαρακτηρισμός δομής χαλκονών με φασματοσκοπία ^1H NMR

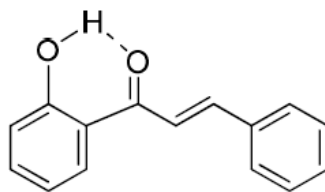
Ο χαρακτηρισμός της δομής όλων των ενώσεων που παρασκευάστηκαν σε αυτή την εργασία πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^1H NMR.

Συγκεκριμένα για τις χαλκόνες **4-9**, τα φάσματα ^1H NMR ελήφθησαν σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) και παρουσιάζουν ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά σήματα, ενδεικτικά της δομής των χαλκονών.

Πρόκειται για τα σήματα που περιγράφουν την παρουσία του ενολικού υδροξειδίου και των βινυλικών υδρογόνων στις θέσεις α – β του μορίου που αποτελούν τα βασικά χαρακτηριστικά των φασμάτων ^1H NMR των χαλκονών και συναντώνται σε συγκεκριμένες χημικές μετατοπίσεις του πεδίου. Ακόμη, χαρακτηριστικά είναι τα σήματα που αποδίδονται στα πρωτόνια της πρενυλο-ομάδας.

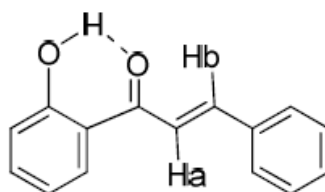
Συγκεκριμένα:

- Το ενολικό υδροξύλιο εμφανίζεται σε πολύ χαμηλό πεδίο (13-14 ppm), γεγονός που οφείλεται στο σχηματισμό ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ του υδρογόνου του υδροξυλίου της θέσης 2' και του οξυγόνου του καρβονυλίου. Ο δεσμός υδρογόνου σταθεροποιεί την ενολική μορφή και μειώνει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα γύρω από το πρωτόνιο, μετατοπίζοντας έτσι την απορρόφηση σε χαμηλότερο πεδίο.



Σχήμα 39. Υδρογόνο του υδροξυλίου της θέσης 2' των χαλκονών

- Διακρίνονται οι διπλές κορυφές που αποδίδονται στα βινυλικά πρωτόνια H_a και H_β του α,β-ακόρεστου καρβονυλικού συστήματος. Τα πρωτόνια αυτά δεν είναι χημικά ισοδύναμα οπότε συζεύγγονται μεταξύ τους και γι' αυτό εμφανίζονται με τη μορφή δύο διπλών κορυφών, στην περιοχή 7-8ppm. Ο σχηματισμός αποκλειστικά του E-γεωμετρικού ισομερούς είναι χαρακτηριστικό της αντίδρασης Claisen-Schmidt, όπως αναφέρεται και στη βιβλιογραφία³. Η σταθερά σύζευξης των κορυφών αυτών υπολογίζεται στα 15-16 Hz, και είναι ενδεικτική της ύπαρξης E-γεωμετρίας.



Σχήμα 40. Βινυλικά υδρογόνα του α, β ακόρεστου καρβονυλικού συστήματος.

- Παρατηρούνται στην περιοχή των 4.5-5.5ppm, μια τριπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του διπλού δεσμού της πρενυλο-ομάδας, και μια διπλή κορυφή που αποδίδεται στα δύο οξυγονομένα υδρογόνα της ομάδας.

³ Detsi et al., “Natural and synthetic 20-hydroxy-chalcones and auronones: Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17 (2009) 8073–8085.

Χαρακτηρισμός δομής της χαλκόνης 7 με φασματοσκοπία $^1\text{H NMR}$

Στο Σχήμα 41 παρουσιάζεται το φάσμα πρωτονίου $^1\text{H NMR}$ (300MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) της χαλκόνης 7 σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο ($\text{CDCl}_3\text{-d}_1$). Στα χαμηλά πεδία του φάσματος, το πιο αποπροστατευμένο πρωτόνιο της ένωσης εμφανίζεται με μία απλή κορυφή (13.48 ppm), η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο, και αντιστοιχεί σε αυτό του υδροξυλίου της θέσης 2'.

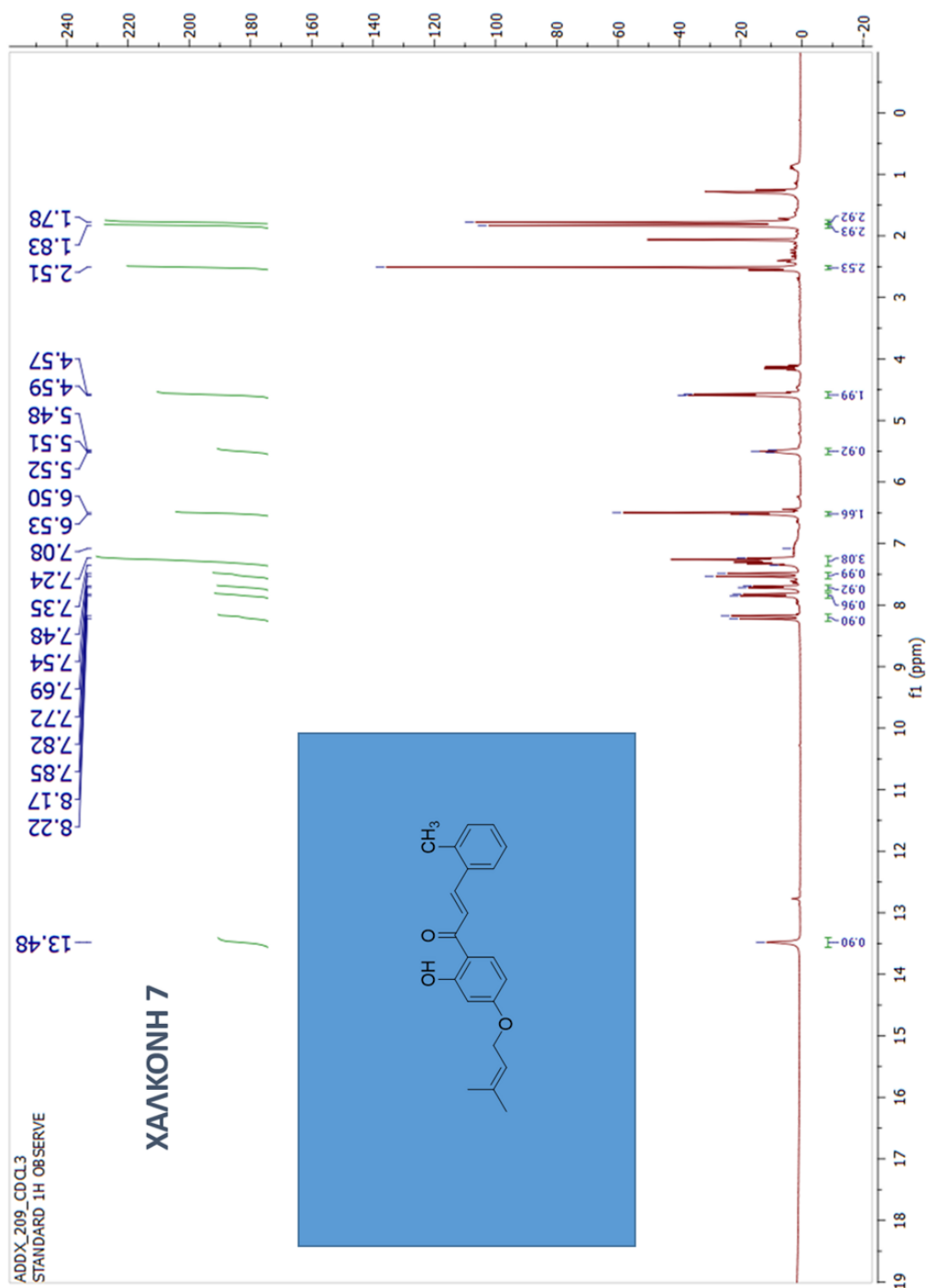
Στην συνέχεια του φάσματος, χαρακτηριστική είναι η εμφάνιση δύο διπλών κορυφών στα 8.20 ppm και 7.51 ppm με σταθερά σύζευξης $J=15.3\text{Hz}$, που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η κάθε μια και αντιστοιχούν στα βινυλικά πρωτόνια H_α και H_β του α,β -ακόρεστου καρβονυλικού συστήματος της χαλκόνης. Η υψηλή τιμή της σταθεράς σύζευξης αποτελεί ενδεικτικό του σχηματισμού ενός ισομερούς E γεωμετρίας, το οποίο προκύπτει από τη σύνθεση των χαλκονών. Σημειώνεται ότι η διπλή κορυφή που αποδίδεται στο πρωτόνιο H_β (Σχήμα 40) εμφανίζεται σε μεγαλύτερη χημική μετατόπιση από τη διπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο H_α . Αυτό το φαινόμενο εξηγείται λόγω της πόλωσης που δημιουργείται στο διπλό δεσμό άνθρακα, εξαιτίας της ύπαρξης της καρβονυλικής ομάδας η οποία καθιστά ηλεκτρονικά πιο πυκνό τα άτομα της θέσης a.

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος εμφανίζονται δύο διπλές και δύο πολλαπλές κορυφές, που ολοκληρώνουν συνολικά για επτά πρωτόνια και αποδίδονται στα αρωματικά πρωτόνια των δακτυλίων A και B.

Επιπλέον, προχωρώντας στα υψηλότερα πεδία του φάσματος, παρατηρούνται κορυφές που αποδίδονται στα πρωτόνια της πρενυλομάδας. Συγκεκριμένα στα 5.51 ppm εμφανίζεται μία τριπλή κορυφή που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του διπλού δεσμού. Στα 4.58 ppm παρουσιάζεται μία διπλή κορυφή που

ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στο οξυγονομένομεθυλένιο της πρενυλ-ομάδας. Ακόμη, τα δύο μεθύλια του τεταρτοταγούς άνθρακα της ομάδας εμφανίζονται με δύο απλές κορυφές στα 1.83 και 1.78 ppm, που ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η καθεμία.

Τέλος, η απλή κορυφή στα 2.06 ppm που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια αντιστοιχεί στα πρωτόνια του αρωματικού μεθυλίου της ένωσης.



Σχήμα 41. Φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) της χαλκόνης 7

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των χαλκονών **4-7** πραγματοποιήθηκε με προσδιορισμό της ικανότητάς τους να δεσμεύουν το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οποίο παρουσιάζει υψηλή οξειδωτική δράση. Ο προσδιορισμός της ικανότητας των ενώσεων να δεσμεύουν το H_2O_2 πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας της λουμινόλης. Όσο πιο χαμηλή προκύπτει η τιμή της IC_{50} ($\mu g mL^{-1}$), τόσο καλύτερη είναι η ικανότητα δέσμευσης του H_2O_2 από το μόριο. Δηλαδή, η μικρή εκπομπή φωτός σημαίνει ότι το μόριο έχει καλή αντιοξειδωτική δράση.

Ακόμη, εξετάστηκε η ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τα μόρια ελευθέρων ριζών του DPPH.

7.1 Μέθοδος χημειοφωταύγειας

Η χημειοφωταύγεια αποτελεί μία από τις σημαντικότερες φασματοφωτομετρικές τεχνικές, λόγω της ευαισθησίας και της επιλεκτικότητας που παρουσιάζει. Με τον όρο χημειοφωταύγεια αναφερόμαστε σε κάθε φαινόμενο εκπομπής ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην ορατή ή κοντά στην υπέρυθρη περιοχή, που παράγεται από μία χημική αντίδραση. Στις αντιδράσεις χημειοφωταύγειας, δύο ουσίες αντιδρούν παράγοντας ένα διεγερμένο (υψηλής ενέργειας) ενδιάμεσο, το οποίο μεταπίπτει στη θεμελιώδη κατάσταση απελευθερώνοντας ενέργεια ως φωτόνια. Η ένταση της εκπομπής είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης των χημικών ενώσεων που συμμετέχουν στην αντίδραση. Έτσι, η μέτρηση της έντασης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αναλυτικούς σκοπούς.

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), είναι μια από τις δραστικές μορφές οξυγόνου που σχηματίζονται κατά τη μερική αναγωγή του μοριακού οξυγόνου. Αυτή η ένωση

παράγεται συνεχώς ως παραπροϊόν του αερόβιου μεταβολισμού, από αντιδράσεις με φάρμακα και περιβαλλοντικές τοξίνες ή όταν τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών μειώνονται σημαντικά, δημιουργώντας την κατάσταση του οξειδωτικού stress. Αυτό το πολύ δραστικό ενδιάμεσο του οξυγόνου μπορεί να προκαλέσει σοβαρές χημικές βλάβες στο DNA, στις πρωτεΐνες και στα ακόρεστα λιπίδια, οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο. Επίσης, ως δραστική μορφή οξυγόνου, όπως και οι υπόλοιπες, έχει συσχετισθεί με έναν αριθμό παθολογικών καταστάσεων συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου, της δημιουργίας φλεγμονής και της γήρανσης.

Η μέθοδος χημειοφωταύγειας της λουμινόλης χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην καταλυτική οξείδωση της λουμινόλης από Co^{2+} και στη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος βορικών σε pH 9, παρουσία EDTA ως μεταλλικό συμπλοκοποιητή. Τα σύμπλοκα του κοβαλτίου με το EDTA καταλύουν το σχηματισμό μιας ρίζας υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton.⁴

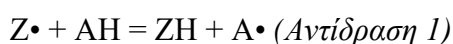
7.2 Μέθοδος DPPH

Μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους στηρίζεται στη χρήση της σταθερής ελεύθερης ρίζας του διφαινυλ -πικρυλδραζυλίου (DPPH). Το μόριο 1,1 -διφαινυλ -2 -πικρυλ -υδραζύλιο (α,α -διφαινυλ -β -πικρυλδραζύλιο (DPPH) χαρακτηρίζεται από μία σταθερή ελεύθερη ρίζα λόγω της απομάκρυνσης ενός ελεύθερου ηλεκτρονίου από το άνω μέρος του μορίου, έτσι ώστε τα μόρια να μη διμερίζονται (που είναι και το πιο συχνό φαινόμενο των ελεύθερων ριζών). Η

⁴ Yıldız, G., & Demiryürek, A. T. (1998). Ferrous iron-induced luminol chemiluminescence: a method for hydroxyl radical study. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 39(3), 179-184.

απομάκρυνση επίσης εκδηλώνεται με την εμφάνιση ιώδους χρώματος, λόγω του φάσματος απορρόφησης σε διάλυμα αιθανόλης στα 520nm.

Όταν ένα διάλυμα DPPH αναμειγνύεται με μία ουσία η οποία μπορεί να προσφέρει ένα άτομο υδρογόνου, τότε προκύπτει η ανηγμένη του μορφή η οποία εκδηλώνεται με την απώλεια του ιώδους χρώματος (αν και αναμένεται να παραμείνει ένα ωχρό χρώμα στο διάλυμα λόγω της παρουσίας της πικρυλικής ομάδας). Συμβολίζοντας τη ρίζα DPPH με Z• και το μόριο δότη με AH, η αρχική αντίδραση είναι:



Όπου ZH η ανηγμένη μορφή του DPPH και A• η ελεύθερη ρίζα που δημιουργείται από το πρώτο βήμα. η τελευταία ρίζα θα υποβληθεί σε διάφορες αντιδράσεις που ελέγχουν τη συνολική στοιχειομετρία, η οποία ουσιαστικά είναι ο αριθμός των μορίων του ανηγμένου DPPH (αποχρωματισμένου) από ένα μόριο αναγωγικού. Συνεπώς, η αντίδραση (1) στοχεύει στο να υποδείξει τη σχέση μεταξύ των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα σε ένα οξειδωτικό σύστημα, όπως η αυτοοξείδωση ενός λιπιδίου ή άλλης ακόρεστης ουσίας. Το μόριο Z• του DPPH συμβολίζει όλες τις ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται μέσα στο σύστημα, η δράση των οποίων καταστέλλεται από το μόριο AH⁵.

7.3 Αποτελέσματα

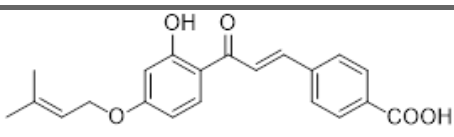
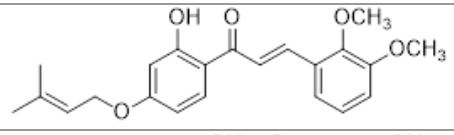
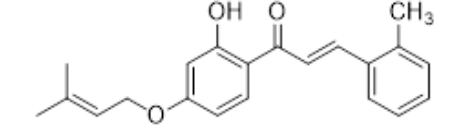
Τρεις από τις χαλκόνες που συντέθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας δοκιμάστηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους ικανότητα, μέσω των δύο προαναφερθεισών μεθόδων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

⁵ P. Molineux, «The use of the stable free radical diphenylpicryl -hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity», Songklanakarin Journal of Science and Technology, τόμ. 26, αρ. 2, pp. 211-219, 2004.

Αναφορικά με την ικανότητα δέσμευσης του H₂O₂ παρατηρείται ότι την χαμηλότερη τιμή IC₅₀, άρα την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση, την παρουσιάζει η πρενυλιωμένη χαλκόνη **7**, η οποία φέρει ως υποκαταστάτη την μεθυλομάδα στη θέση 2. Ακολουθεί η πρενυλιωμένη χαλκόνη **5** που είναι φυσικό προϊόν και φέρει δύο μεθοξυ-ομάδες στις θέσεις 2 και 3 του δακτυλίου B και έπειτα η πρενυλιωμένη χαλκόνη **4** που φέρει το καρβοξύλιο στη θέση 4 του B δακτυλίου.

Σχετικά με την ικανότητα δέσμευσης των ελευθέρων ριζών DPPH, δεν παρουσίασαν δράση οι χαλκόνες **4** και **5**. Για την χαλκόνη **7** ήταν χαμηλή η ικανότητα εξουδετέρωσης DPPH, άρα παρουσίασε χαμηλή αντιοξειδωτική ικανότητα.

Πίνακας 1: Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης των χαλκονών

ΚΩΔΙΚΟΣ ΧΑΛΚΟΝΗΣ	ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΧΑΛΚΟΝΗΣ	DPPH IC ₅₀ (mM)	Ικανότητα δέσμευσης H ₂ O ₂ IC ₅₀ (mM)
4		δεν εμφανίζει δράση	14682.9
5		Δεν εμφανίζει δράση	11914
7		88704	6353.5

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Συμπεράσματα- Προοπτικές

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση, μέσω αντίδρασης αλδολικής συμπύκνωσης Claisen-Schmidt, έξι χαλκονών που περιείχαν την πρενυλοξυμάδα στη θέση 4' του δακτυλίου A και διαφορετικούς υποκαταστάτες στον δακτύλιο B.

1. Οι αποδόσεις των ενώσεων που παρασκευάστηκαν, σε ορισμένες περιπτώσεις, είναι χαμηλές. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι πριν την παραλαβή του τελικού καθαρού προϊόντος προηγήθηκαν αρκετά στάδια -όπως περιγράφονται στο πειραματικό μέρος- κατά τη διάρκεια των οποίων είναι εύλογο να υπάρχουν απώλειες προϊόντος. Επίσης, οι αντιδράσεις διεξήχθησαν μία μόνο φορά στα πλαίσια αυτής της εργασίας, επομένως η επανάληψή τους με άλλες γραμμομοριακές αναλογίες αντιδρώντων ή πιθανώς άλλες συνθήκες αντίδρασης μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερες αποδόσεις.

2. Όλες οι ενώσεις χαρακτηρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν δομικά με φασματοσκοπία ^1H NMR και ^{13}C NMR. Από την ανάλυση των φασμάτων αυτών για όλες τις ενώσεις, προέκυψε για την χαλκόνη **9** πως περιέχει ποσότητα των αντιδρώντων της και απαιτείται καθαρισμός της με χρωματογραφία στήλης.

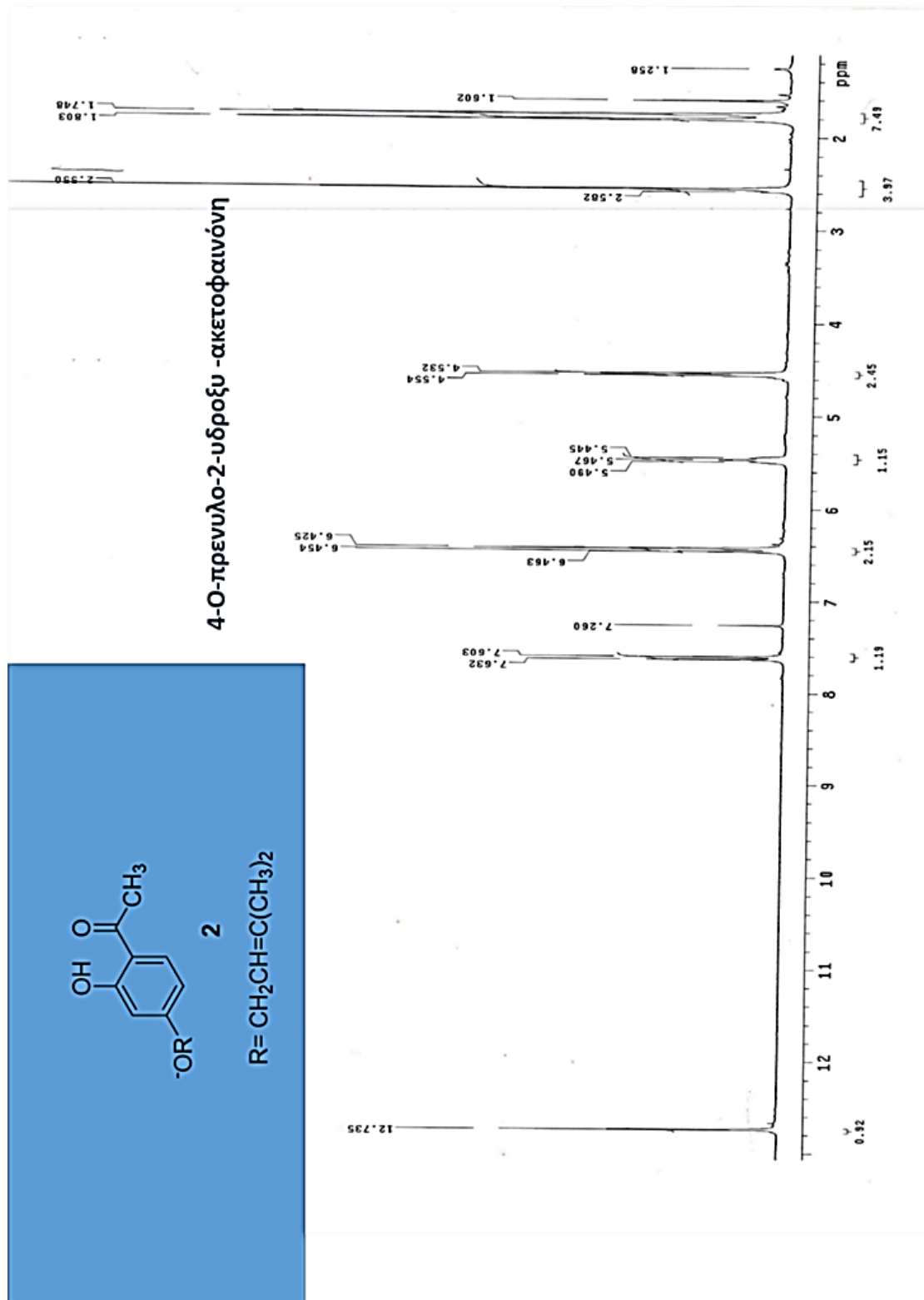
3. Η χαλκόνη **5** είναι φυσικό προϊόν που απομονώθηκε το 2008 από τους Ramireddy et al. και η χημική σύνθεσή της δεν έχει αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία.

4. Τα νέα μόρια αξιολογήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση, μέσω της ικανότητας δέσμευσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και της ελεύθερης ρίζας DPPH. Η χαλκόνη **7** εμφανίστηκε ως το καλύτερο αντιοξειδωτικό, επιδεικνύοντας την ισχυρότερη ικανότητα δέσμευσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου.

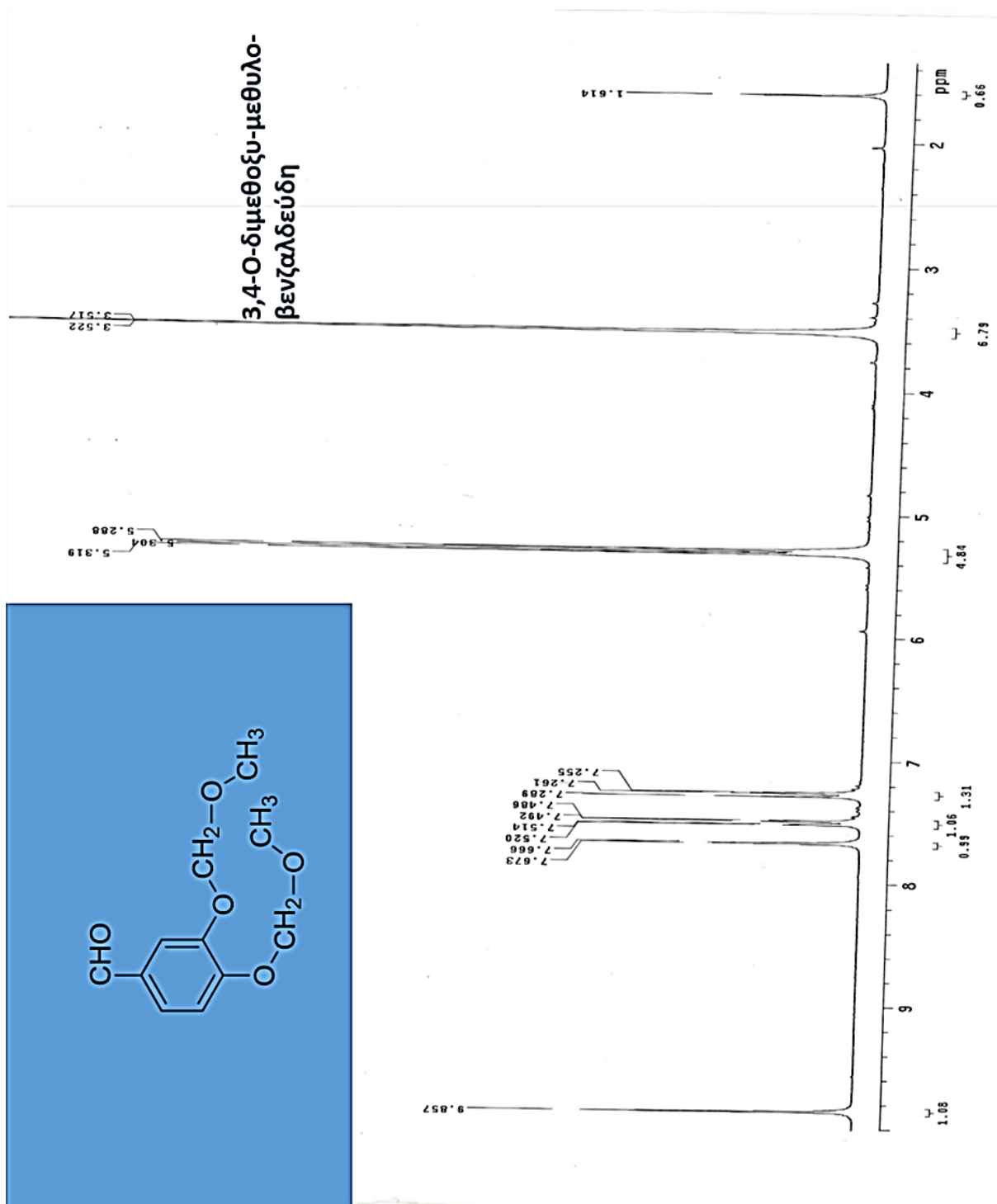
5. Οι χαλκόνες αποτελούν ελκυστικές ενώσεις -στόχοι για την παρασκευή μεγάλου αριθμού αναλόγων και τη μελέτη της σχέσης δομής -δράσης, καθώς ανήκουν στις

«προνομιούχες δομές», δηλαδή μπορούν να τροποποιηθούν δομικά με μεγάλη ποικιλία υποκαταστατών. Οι μεθοδολογίες σύνθεσης των παραπάνω ενώσεων είναι σχετικά απλές ενώ οι απαιτούμενες για την παρασκευή τους πρώτες ύλες είτε είναι εμπορικά διαθέσιμες, είτε παρασκευάζονται εύκολα στο εργαστήριο.. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση της βιολογικής τους δράσης και την εξαγωγή συμπερασμάτων για τη σχέση δομής –βιολογικής δραστηριότητας. Από τα παραπάνω συνάγεται η ανάγκη και η σημασία περαιτέρω έρευνας πληθώρας υποκαταστατών για την δομική τροποποίηση των Α και Β δακτυλίων και την ενδεχόμενη διαφοροποίηση στη φαρμακευτική τους δράση.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ

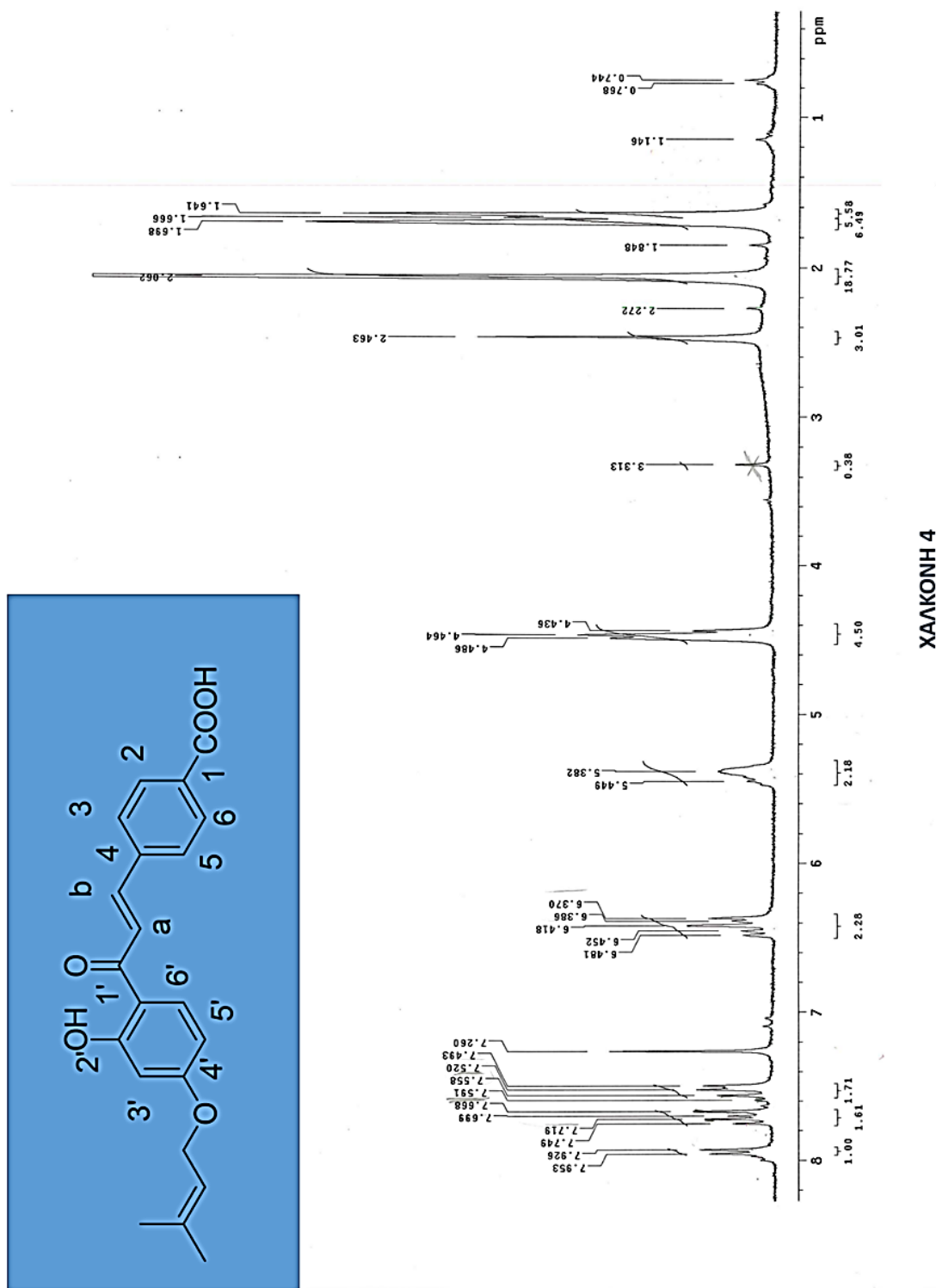


Φάσμα 1. Φάσμα ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) της 4-O-πρενυλο-2-υδροξυ-ακετοφαινόνης.



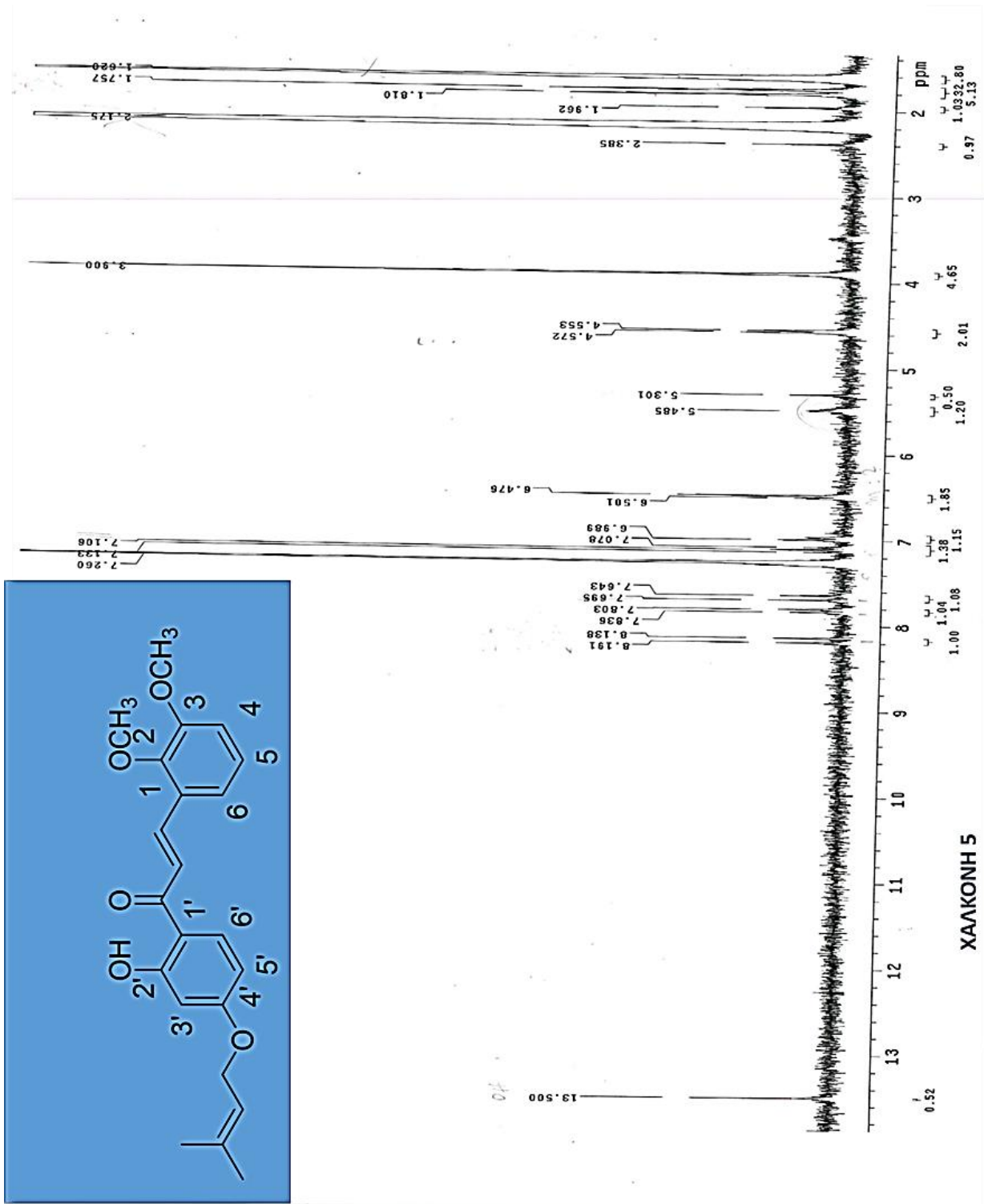
Φάσμα 2. Φάσμα ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) της 3,4-O-διμεθοξυ-μεθυλο-βενζαλδεύδης.

4-καρβοξυλο -4'-Ο-πρενυλο-2'-υδροξυ- -χαλκόνη (4)

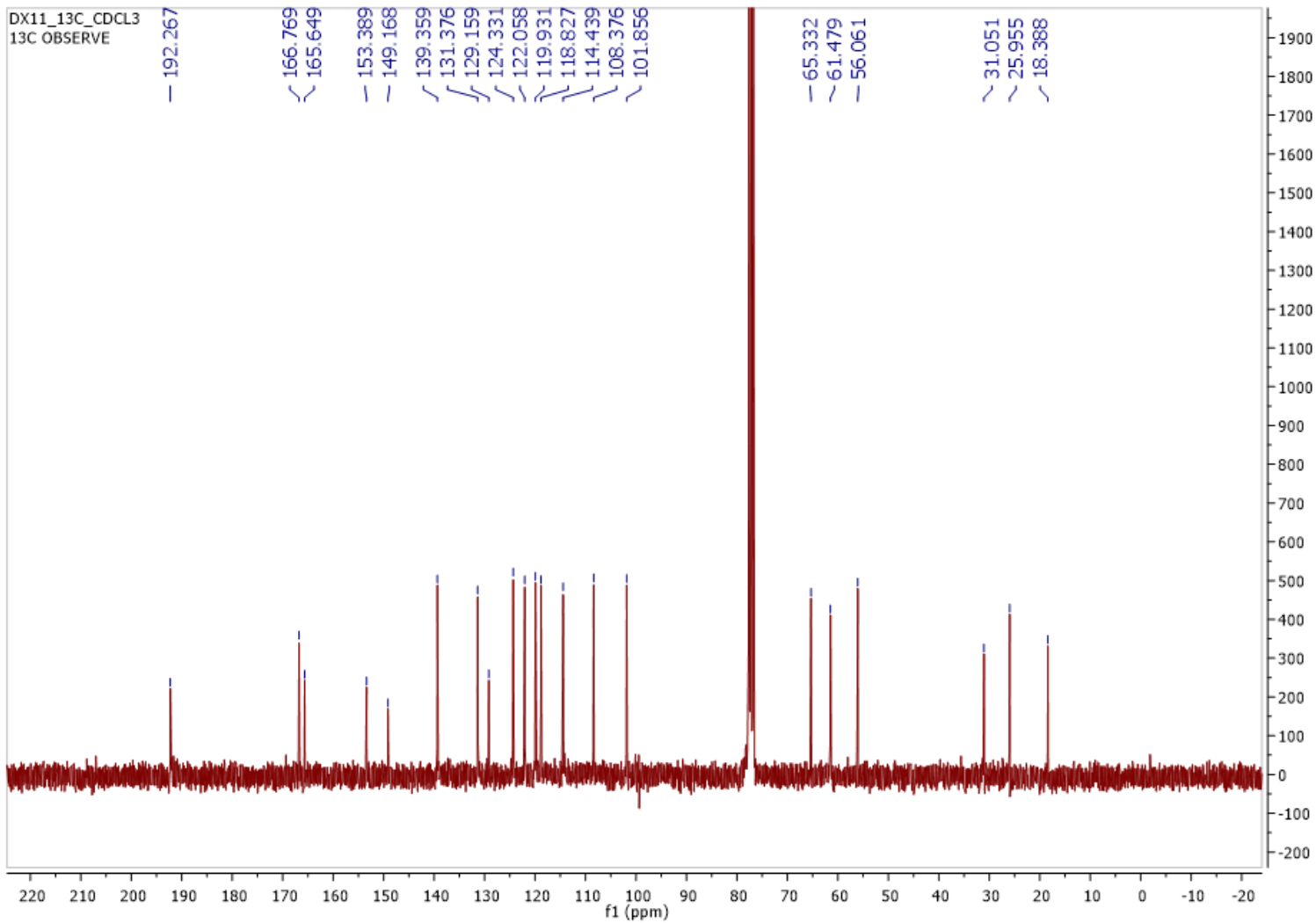


Φάσμα 3. Φάσμα ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) της χαλκόνης (4).

2,3- διμεθοξυ -4'-Ο-πρενυλ-2'-υδροξυ-γαλκόνη (5)

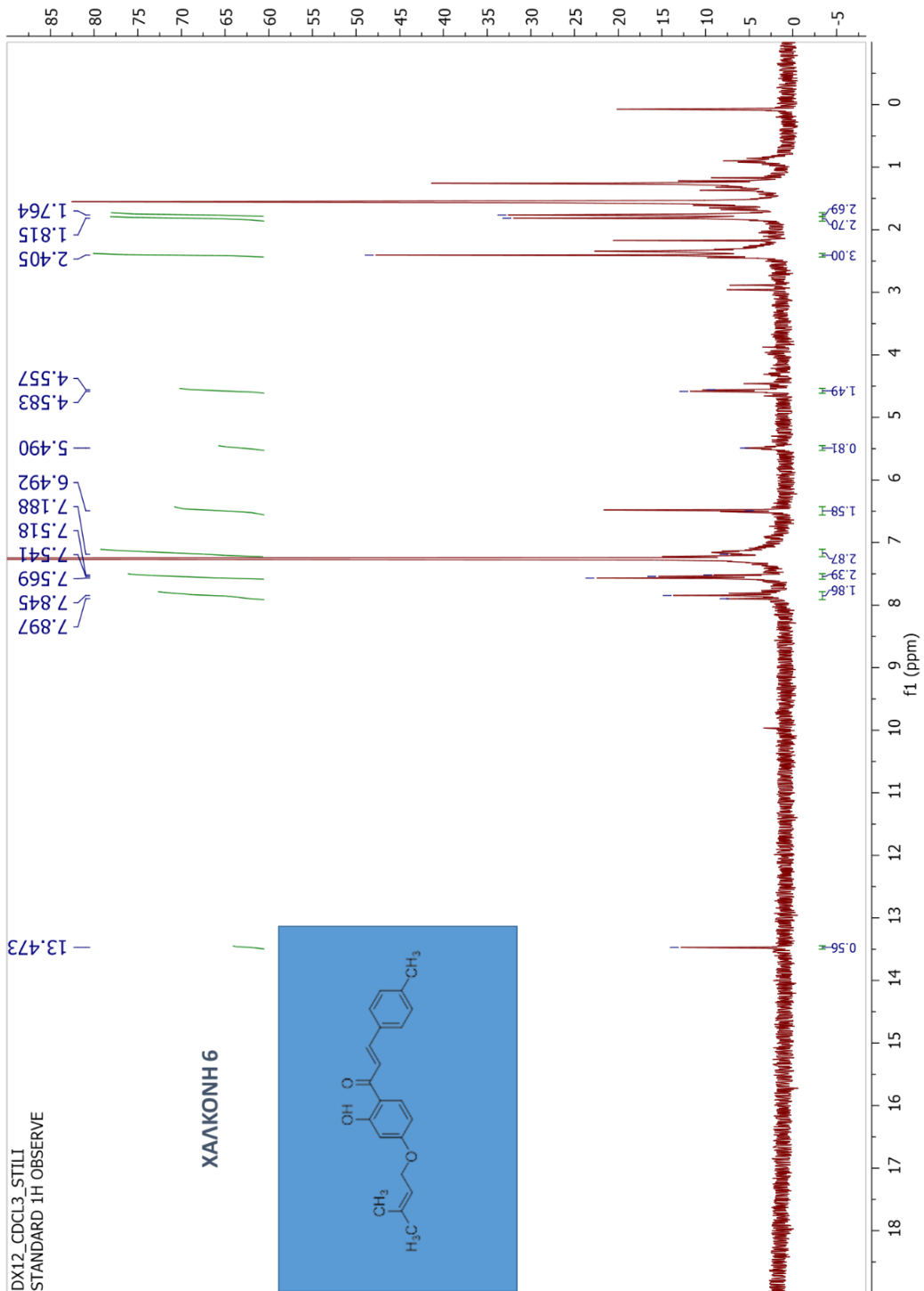


Φάσμα 4. Φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) της χαλκόνης (5).



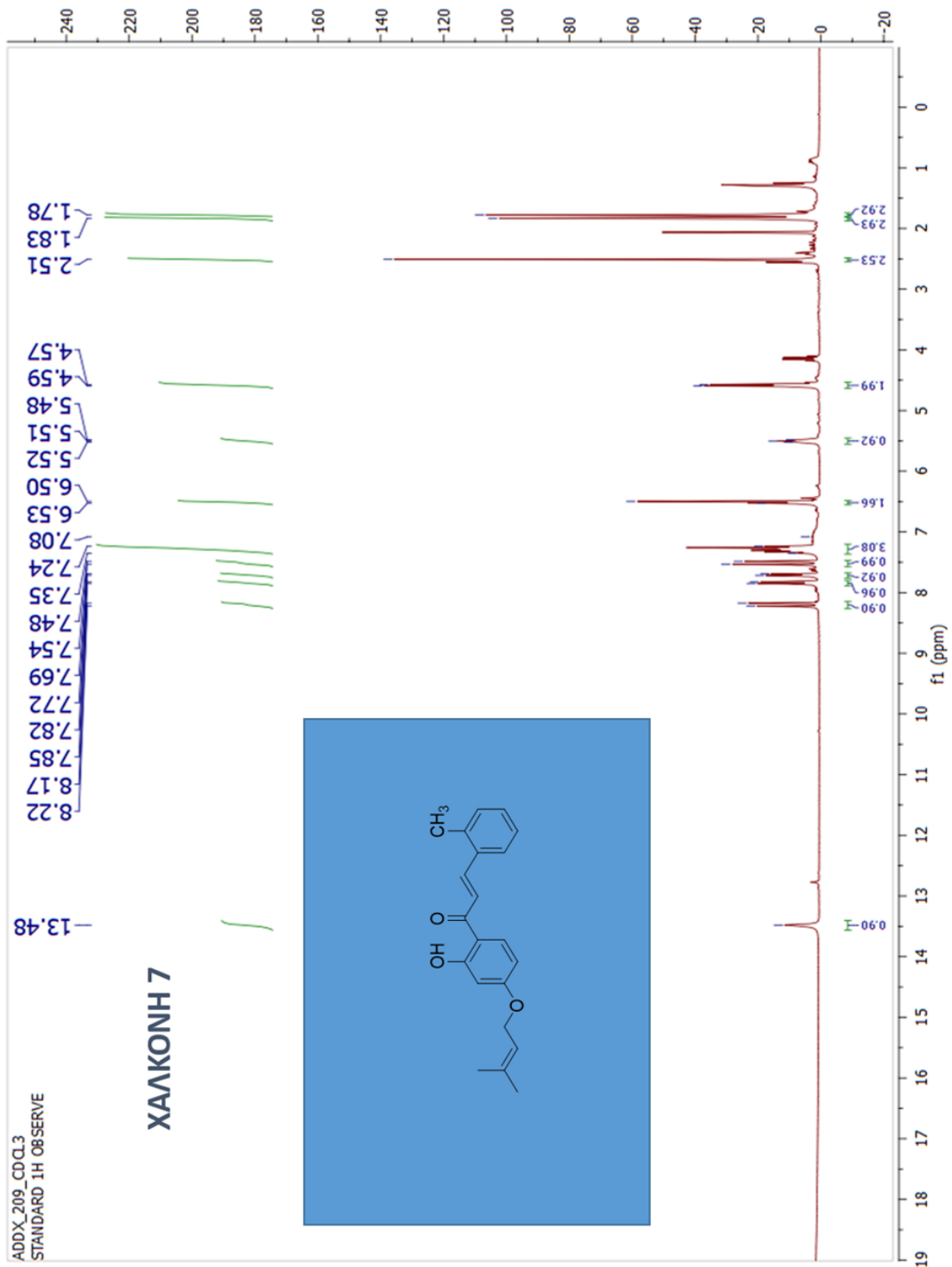
Φάσμα 5. Φάσμα ^{13}C NMR (CDCl_3 , 300 MHz) της χαλκόνης (**5**).

4-μεθυλο- 4'-Ο-πρενυλ-2'-υδροξυ-γαλκόνη (6)

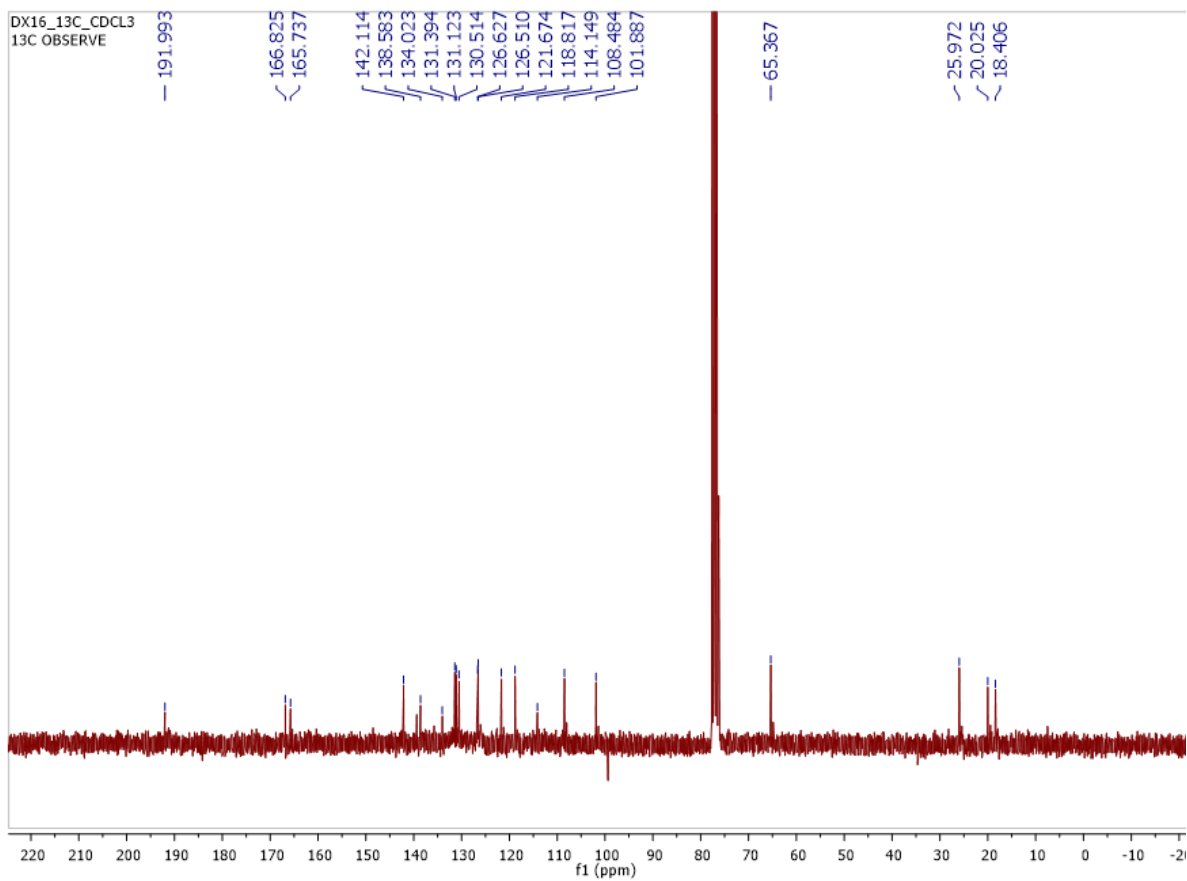


Φάσμα 6. Φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) της χαλκόνης (6).

2-μεθυλο -4'-Ο-πρενυλο-2'-υδροξυ- -γαλκόνη (7)

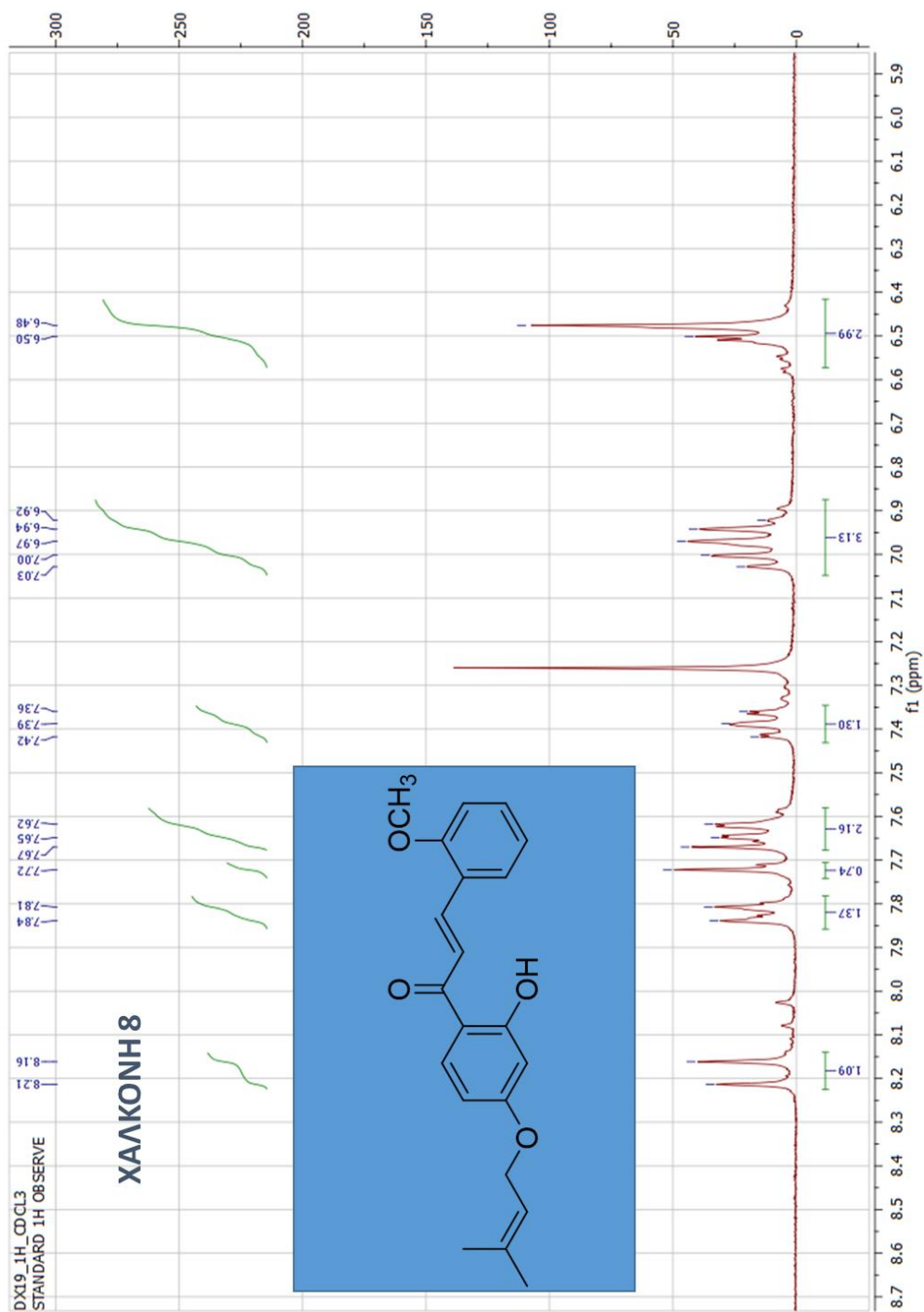


Φάσμα 7. Φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) της χαλκόνης (7).

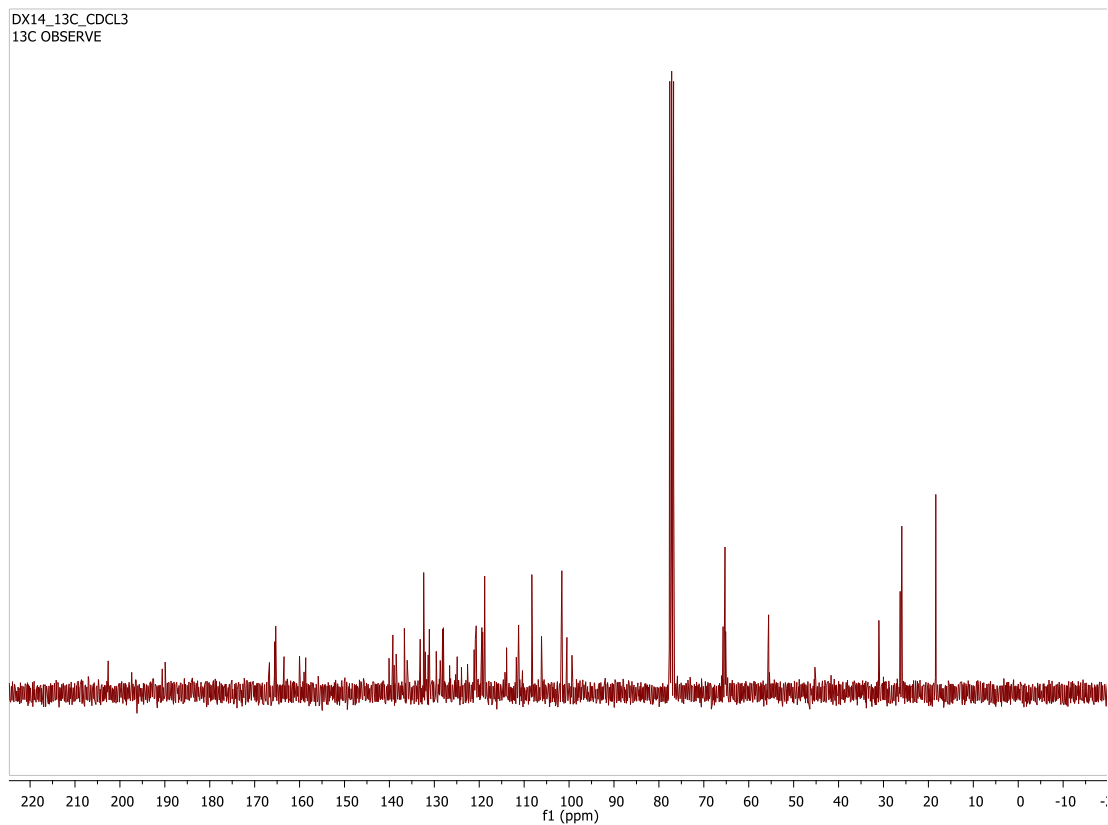


Φάσμα 8. Φάσμα ^{13}C NMR (CDCl_3 , 300 MHz) της χαλκόνης (**7**).

4-μεθοξυ-4'-Ο-πρενυλο-2'-υδροξύ--γαλκόνη (8)



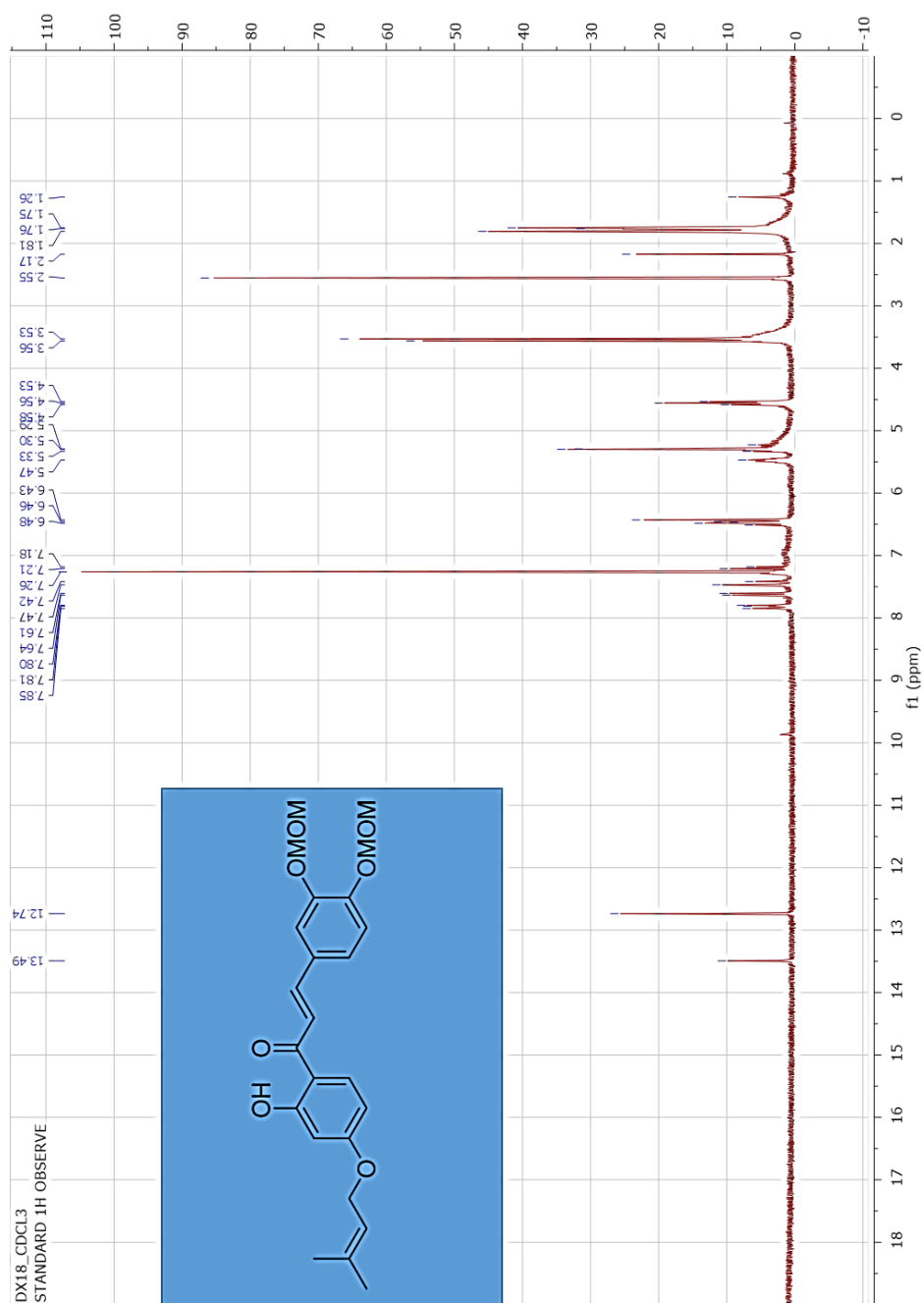
Φάσμα 9. Φάσμα ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) της χαλκόνης (8).



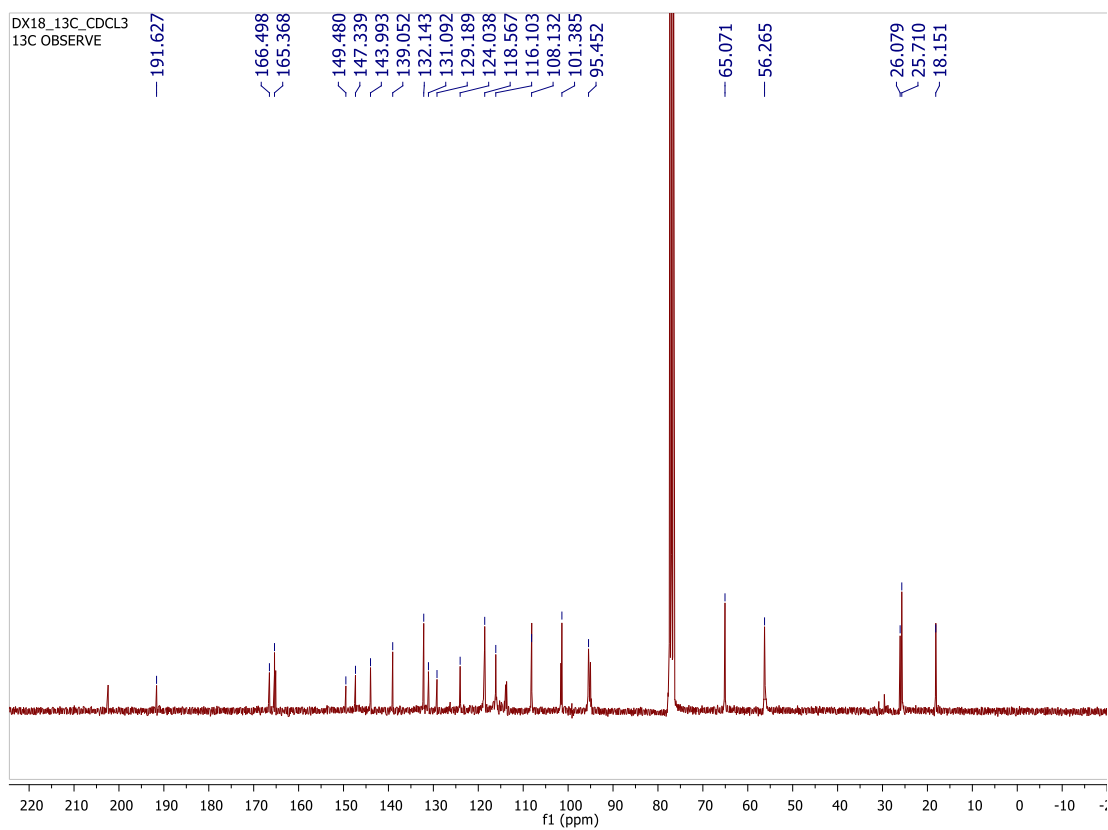
Φάσμα 10. Φάσμα ^{13}C NMR (CDCl_3 , 300 MHz) της χαλκόνης (**8**).⁶

⁶ Αυτό το φάσμα αναφέρεται στην πρώτη πορεία σύνθεσης της χαλκόνης **8** που δεν οδήγησε σε καθαρό προϊόν.

2,3-O-μεθοξυ-μεθυλο -4'-O-πρενυλο-2'-υδροξυ- -γαλκόνη (9)



Φάσμα 11. Φάσμα ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) της χαλκόνης (9).



Φάσμα 12. Φάσμα ^{13}C NMR (CDCl_3 , 300 MHz) της χαλκόνης (**9**)