

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας (I) Χημικών Επιστημών



**ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΔΟΜΗΣ ΝΕΩΝ
ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΟΥ ΦΥΣΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ
ΗΥΜΕCROMONE ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ
ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥΣ**

Διπλωματική Εργασία

Αλέξανδρος Καλοσπύρος

Επιβλέπουσα: Α. Δέτση, Αναπλ. Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας

Αθήνα, Ιούνιος 2019

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2017-2019.

Πρωτίστως, οφείλω να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. Αναστασία Δέτση, επιστημονική υπεύθυνη της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Η πολύτιμη βοήθειά της, η επίβλεψη και η καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, αποτέλεσαν καταλυτικό παράγοντα στην ολοκλήρωσή της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στον Λέκτορα Φώπιο Τσόπελα και στον Επίκουρο Καθηγητή Ε.Μ.Π. Αστέριο Καραγιάννη – Μπακόλα για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή και για τον χρόνο που διέθεσαν για την κριτική ανάγνωση της εργασίας μου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στη Δρ. Ελένη Καβέτσου του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. για τη συνεχή στήριξή της, τις συμβουλές της και την άψογη συνεργασία που καλλιεργήθηκε τα δύο χρόνια αυτά, καθώς και για τις πολλές ώρες που αφιέρωσε στο εργαστήριο και τη σημαντική βοήθειά της στη μελέτη αυτή.

Ευχαριστώ, επίσης, την υποψήφια διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. Αννίτα Κατωπόδη για τη βοήθεια και τις καίριες παρατηρήσεις της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Δήμητρα Χατζηπαύλου–Λίτινα, του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, για την διεξαγωγή των *in vitro* βιο-δοκιμασιών για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης των νέων κουμαρινικών παραγώγων.

Επίσης, ευχαριστώ την Δρ. Ελένη Αλεξανδράτου, του Εργαστηρίου Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών του Ε.Μ.Π., για την διεξαγωγή των *in vitro* κυτταροτοξικών δοκιμών στην κυτταρική σειρά καρκίνου ανθρώπινου προστάτη (LNCap).

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις ευχαριστίες σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π., προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς φοιτητές, υποψήφιους διδάκτορες και μέλη ΕΔΙΠ για την αρμονική συνεργασία μας στο πλαίσιο της διπλωματικής μου εργασίας. Το πάντα ευχάριστο κλίμα διευκόλυνε τη διεκπεραίωση των πειραμάτων.

Τέλος, βαθιά ευγνωμοσύνη αποδίδω στην οικογένειά μου για την αμέριστη στήριξη, υπομονή και συμπαράστασή τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου στο Ε.Μ.Π. Ευχαριστώ, επίσης, το φιλικό μου περιβάλλον για τη στήριξή τους.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας προέκυψαν:

❖ **Ανακοινώσεις σε Διεθνή Συνέδρια με πρακτικά:**

1. A. Katopodi, E. Kavetsou, **A. Kalospyros**, E. Pontiki, D. Hadjipavliou-Litina, A. Chroni, A. Detsi, 3-aryl-coumarins and coumarin-chalcone hybrids possessing dual bioactivity, Athens Conference on Advances in Chemistry (ACAC 2018), 30 October-2 November 2018, Athens, Greece
2. A. Katopodi, E. Kavetsou, **A. Kalospyros**, E. Pontiki, D. Hadjipavliou-Litina, A. Chroni, A. Detsi "New bioactive compounds sharing the coumarin framework as a common structural feature", 8th International Conference on Oxidative Stress in Skin Medicine and Biology, 6 - 9 September 2018, Andros, Greece

❖ **Ανακοίνωση σε Πανελλήνιο Συνέδριο με πρακτικά:**

- **A. Καλοσπύρος**, E. Καβέτσου, A. Κατωπόδη, E. Ποντίκη, Δ. Χατζηπαύλου-Λίτινα, E. Αλεξανδράτου, A. Δέτση, "Σύνθεση, χαρακτηρισμός δομής και αξιολόγηση της βιοδραστικότητας νέων αναλόγων της 4-μεθυλο-ουμπελιφερόνης και υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών", 12^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Χημικής Μηχανικής, Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, 29-31 Μαΐου 2019, Αθήνα

Οι κουμαρίνες είναι ετεροκυκλικές ενώσεις που ανήκουν στην οικογένεια των βενζοπυρονών και απαντώνται σε πολλά είδη φυτών, είτε σε ελεύθερη μορφή, είτε υπό μορφή γλυκοζιτών. Παρουσιάζουν πληθώρα βιολογικών δράσεων, μεταξύ των οποίων η αντιοξειδωτική, η αντιφλεγμονώδης, η αντιμικροβιακή κι η αντικαρκινική, κεντρίζοντας συνεχώς το επιστημονικό ενδιαφέρον. Επίσης, δομικές τροποποιήσεις στον δομικό σκελετό πολλών φυσικών κουμαρινών έχουν οδηγήσει σε μόρια με αξιολογη βιολογική δράση. Οι χαλκόνες αποτελούν και αυτές φυσικά προϊόντα που ανήκουν στην οικογένεια των φλαβονοειδών και διακρίνονται για την ισχυρή βιολογική τους δράση. Ο συνδυασμός δύο φαρμακοφόρων δομών σε ένα μόριο αποτελεί συνήθη τεχνική στη φαρμακευτική χημεία καθώς οδηγεί σε μόρια με βελτιωμένες βιολογικές ιδιότητες.

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν 28 νέα μόρια, εκ των οποίων 17 υδροξυ- και αλκοξυ- ανάλογα φυσικών κουμαρινών και 11 νέα υβριδικά μόρια κουμαρινών – χαλκονών. Συγκεκριμένα, συντέθηκαν δύο ανάλογα της φυσικής κουμαρίνης ουμπελιφερόνης, μέσω αντίδρασης Pechmann, παρουσία FeCl_3 , αποφεύγοντας τη χρήση οργανικών διαλυτών, τα οποία στη συνέχεια μέσω δομικής τροποποίησης στο υδροξύλιο της θέσης 7 οδήγησαν σε οκτώ νέα αλκοξυ- παράγωγα (αντίδραση Williamson).

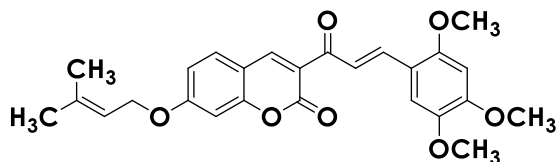
Τα 11 υβριδικά μόρια κουμαρινών – χαλκονών προέκυψαν ύστερα από τρία στάδια. Αρχικά, συντέθηκε η 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνη μέσω αντίδρασης Knoevenagel, η οποία μέσω αντιδράσεων αλκυλίωσης οδήγησε σε πέντε νέα αλκοξυ- ανάλογά της. Τέλος, η 3-ακετυλο-7-υδροξυ- κουμαρίνη και επιλεγμένα πρενυλοξυ- ανάλογά της αντέδρασαν μέσω αλδολικής συμπύκνωσης, οδηγώντας στα 11 νέα υβριδικά μόρια κουμαρινών – χαλκονών, τα οποία χαρακτηρίζονται από καινοτόμο σχεδιασμό, λόγω των τριών φαρμακοφόρων δομών (πρενυλοξυ-ομάδα, κουμαρινικός σκελετός, α,β-ακόρεστο καρβονυλικό σύστημα της χαλκόνης) που φέρουν στο ίδιο μόριο.

Η δομή των ενώσεων ταυτοποιήθηκε μέσω φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ^1H και ^{13}C NMR και φασματομετρίας Μάζας Υψηλής Ανάλυσης (HR-MS).

Για τα κουμαρινικά παράγωγα που συντέθηκαν, μελετήθηκε η σχέση δομής – *in vitro* βιολογικής δράσης. Συγκεκριμένα, τα νέα παράγωγα αξιολογήθηκαν για την πιθανή αντιοξειδωτική τους δράση μέσω της ικανότητάς τους να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH και να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση (LP). Η αντιφλεγμονώδης δράση των ενώσεων εκφράστηκε από την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια (LOX), ενώ η

κυτταροτοξικότητά τους αξιολογήθηκε μέσω της δοκιμασίας ΜΤΤ χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά καρκίνου ανθρώπινου προστάτη (LNCap).

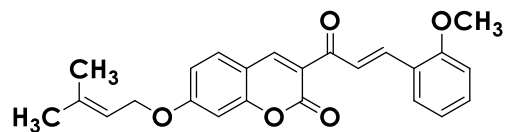
Από την αξιολόγηση προέκυψαν σημαντικά αποτελέσματα για τη σχέση δομής – βιολογικής δράσης. Ορισμένα από τα παράγωγα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αναστολής της υπεροξειδωσης του λινελαϊκού οξέος (76-94%) και ικανοποιητική αντιφλεγμονώδη δράση – μέσω της ικανότητας αναστολής της LOX – (IC_{50} 32-39 μ M). Αναφορικά με την κυτταροτοξικότητα έναντι της κυτταρικής σειράς καρκίνου ανθρώπινου προστάτη, η *in vitro* αξιολόγηση των κουμαρινικών αναλόγων οδήγησε σε αξιοσημείωτα συμπεράσματα σχετικά με την επίδραση των δομικών τροποποιήσεων στην κυτταροτοξική δράση. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι τα υβριδικά μόρια κουμαρινών – χαλκόνων **10b** και **10c** διαθέτουν συνδυασμένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.



10b

76% LP

IC_{50} 32.5 μ M (LOX)



10c

67% LP

IC_{50} 36 μ M (LOX)

Χημική δομή των παραγώγων με συνδυασμένη βιολογική δράση.

Λέξεις – κλειδιά: Φαρμακευτική Χημεία, Κουμαρίνες, Χαλκόνες, Υβριδικά μόρια, Πρενυλοξυ-παράγωγα, Αντιοξειδωτική δράση, Αντιφλεγμονώδης δράση, Κυτταροτοξική δράση.

ABSTRACT

Coumarins are heterocyclic compounds that belong to the benzopyrone family and have been found in many plant species, either in free-state or as glucosides. They present a variety of biological activities, including antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and anti-cancer, continuously stimulating scientific interest. Structural modifications to the coumarin skeleton of many naturally occurring coumarins have led to molecules with remarkable biological activity. Chalcones are natural products, as well, and members of the flavonoid family. Their significant biological activity has highlighted them as remarkable pharmacological agents. The combination of two pharmacophore structures in one molecule is a common technique in pharmaceutical chemistry, as it leads to molecules with improved biological properties.

In the present diploma thesis, 28 new molecules were designed and synthesized, including 17 coumarin analogues with hydroxy- or aryloxy-substitution on the coumarin ring, as well as 11 new hybrid molecules with a coumarin-chalcone structure. In particular, two analogues of the naturally occurring 4-methyl-umbelliferone were synthesized via Pechmann condensation reaction using FeCl_3 as a catalyst, leading to a more environmental-friendly process. Eight new derivatives were produced by alkylation of the hydroxyl groups of the two analogues above (Williamson reaction).

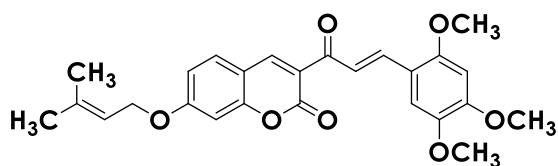
The coumarin-chalcone hybrid molecules were synthesized via three steps. Initially, 3-acetyl-7-hydroxy-coumarin was synthesized, which, through alkylation reactions, resulted in its five novel derivatives. 3-acetyl-7-hydroxy coumarin and its selected prenyloxy analogues reacted through aldol condensation reactions, leading to 11 novel coumarin-chalcone hybrid molecules. These derivatives are characterized by novel design, bearing three pharmacophore structures (prenyloxy-group, coumarin skeleton, chalcone α,β -unsaturated carbonyl system) in the same molecule.

The structure of all the compounds was identified by ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) and High-Resolution Mass Spectrometry (HR-MS).

The synthesized coumarin derivatives were evaluated for their *in vitro* biological activity in order to study the structure-activity relationship. In particular, the new derivatives were evaluated for their potential antioxidant activity through their ability to interact with free radical DPPH and their ability to inhibit lipid peroxidation (LP). The anti-inflammatory activity of the compounds was evaluated by their ability to inhibit the activity of the soybean lipoxygenase (LOX), an enzyme which is associated with the production of pro-inflammatory

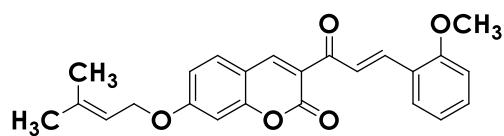
compounds such as leukotrienes in the human body. The cytotoxicity of the new coumarins was evaluated via the MTT assay using the human prostate cell line LNCap.

The evaluation provided significant observations for the structure-activity relationship. A number of coumarin derivatives were efficient inhibitors of lipid peroxidation (67-94%) and showed significant LOX inhibitory activity (IC_{50} of 32-39 μM). In reference to cytotoxicity against cancer cells, the *in vitro* evaluation of the tested coumarin analogues have led to remarkable deductions regarding the effect of structural modifications on cytotoxic activity. The results pointed out hybrid molecules **10b** and **10c** due to their combined antioxidant and anti-inflammatory activity.



10b

76% Inhibition of LP
 IC_{50} 32.5 μM (LOX Inhibition)



10c

67% Inhibition of LP
 IC_{50} 36 μM (LOX Inhibition)

Keywords: Medicinal Chemistry, Coumarins, Chalcones, Hybrid molecules, Prenyloxy-derivatives, Antioxidant activity, Anti-inflammatory activity, Cytotoxicity.

Περιεχόμενα

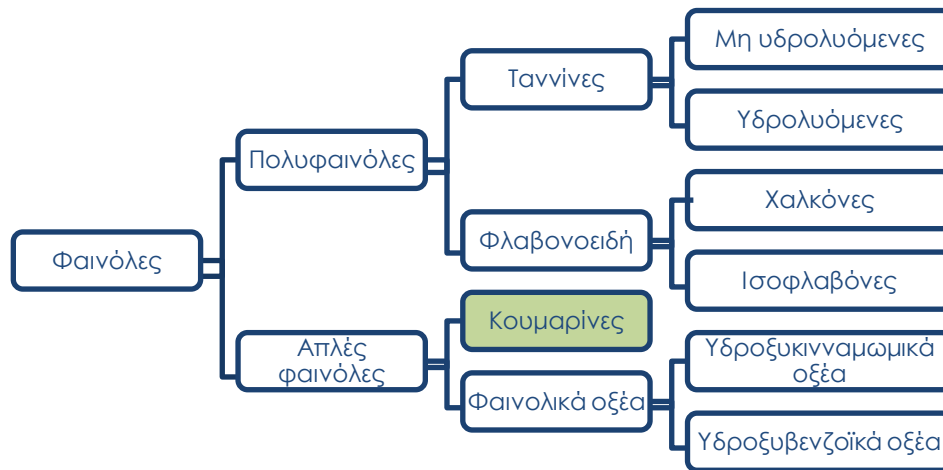
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1. ΚΟΥΜΑΡΙΝΕΣ	11
1.1. Προέλευση κουμαρινών	11
1.2. Χημική δομή και ταξινόμηση κουμαρινών	12
1.3. Βιοσύνθεση κουμαρινών	15
1.4. Κουμαρίνες στα βότανα	16
1.5. Βιολογική δράση των κουμαρινών	17
1.5.1. Αντιοξειδωτική δράση	17
1.5.2. Αντιφλεγμονώδης δράση.....	18
1.5.3. Αντιμυκητιακή δράση.....	20
1.6. Προφίλ πρενυλοξυ-κουμαρινών	24
2. ΧΑΛΚΟΝΕΣ.....	27
2.1. Προέλευση και δομή χαλκονών	27
2.2. Φαρμακευτικό προφίλ και βιολογική δράση χαλκονών	29
2.2.1. Αντικαρκινική δράση χαλκονών	31
3. ΥΒΡΙΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΚΟΥΜΑΡΙΝΩΝ – ΧΑΛΚΟΝΩΝ.....	32
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ	35
ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ	42
ΣΚΟΠΟΣ	54
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	58
1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ	58
1.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ – ΥΛΙΚΑ.....	58
1.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΤΗΣ ΟΥΜΠΕΛΙΦΕΡΟΝΗΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ RECHMANN.....	59
1.3. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΚΝΟΕΒΕΝΑΓΕΛ (ΜΕΘΟΔΟΣ Α)	60
1.4. ΓΕΝΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΑΛΚΟΕΥ-ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ(ΜΕΘΟΔΟΣ Β).....	61
2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ.....	74
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	78
1. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ	78

2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ.....	85
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	93
ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ	96
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	97

1. ΚΟΥΜΑΡΙΝΕΣ

1.1. Προέλευση κουμαρινών

Οι κουμαρίνες είναι οργανικές ενώσεις που απαντώνται ευρέως στη φύση και κατηγοριοποιούνται στις απλές φαινόλες (Διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1 Κατηγοριοποίηση φαινολικών ενώσεων.

Η απλούστερη κουμαρίνη απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1820 από τον Vogel ^[1] από τους καρπούς (tonka beans) του φυτού *Dipteryx odorata Willd*, Fabaceae, ενώ η ονομασία της προέρχεται από το γαλλικό όρο "coumarou" για το γιγάντιο δέντρο (Εικόνα 1). Στα ελληνικά, το φυτό είναι γνωστό με το όνομα «διπτέρυξ η εύοσμος» (κοινώς τόνκα), το οποίο προδίδει το ευχάριστο άρωμά της, χαρακτηριστικό στο φρεσκοκομμένο γρασίδι.

Κουμαρίνες έχουν βρεθεί σε πολλά είδη φυτών, στις ρίζες, στα φύλλα, στα κλαδιά αλλά και στα έλαιά τους (όπως στο λάδι λεβάντας και το λάδι από φλοιό κανέλας), αφθονούν κυρίως στα χόρτα και ιδιαίτερα στο λευκό τριφύλλι, στις ορχιδέες, στα όσπρια και στα φύλλα των εσπεριδοειδών.^{[1],[2]} Επίσης, απαντώνται σε φρούτα όπως οι φράουλες, η μαύρη σταφίδα, τα βερίκοκα, τα κεράσια, το μύρτιλο, αλλά και στα ραδίκια και το πράσινο τσάι.^{[3],[4]}

Από το 1820 μέχρι και σήμερα, πάνω από χίλιες παράγωγες ενώσεις της οικογένειας των κουμαρινών έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί από πολλά είδη φυτών και μικροοργανισμών (*Angiospermae*, *Monocotyledoneae*, *Dicotyledoneae*). Ανάλογα κουμαρινών μείζονος σημασίας στον τομέα της

φαρμακολογίας, της φαρμακευτικής και της χημείας τροφίμων έχουν απομονωθεί σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε περισσότερες από 40 οικογένειες φυτών, όπως Apiaceae (Umbelliferae), Rutaceae, Asteraceae (Compositae), Fabaceae (Leguminosae), Oleaceae, Moraceae, και Thymelaeaceae. Μεταξύ άλλων, έχουν βρεθεί σε φυτά *Anthoxanthum odoratum*, *Melilotus officinalis*, *Dipterix oppositifolia* και *Dipterix oppositifoli*, καθώς και από βότανα όπως η φλαμουριά (*Fraxinus excelsior*) και το αγριοράδι (*Taraxacum officinalis*).^[2]



Εικόνα 1 *Dipteryx odorata* (tonka beans).

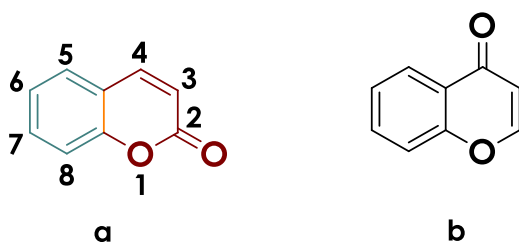
Στα φυτά απαντώνται είτε σε ελεύθερη κατάσταση είτε ως δευτερογενείς μεταβολίτες (γλυκοζίτες), ενώ συχνότερα βρίσκεται μόνο ένα είδος κουμαρινικού παραγώγου σε ένα είδος φυτού. Η ποσότητα κουμαρινών που περιέχεται, εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης του φυτού: σε ορισμένα φυτά συναντώνται σε μεγαλύτερη ποσότητα κατά τη βλάστηση, ενώ συνήθως η περιεχόμενη ποσότητα είναι μεγαλύτερη στα νεότερα φύλλα. Ο ρόλος τους δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, πιθανώς διευκολύνουν την ωρίμανση των σπόρων, ενώ ίσως να είναι αναγκαίες για την προστασία των φυτών ενάντια σε ορισμένες ασθένειες.

Ειδικότερα, συσσώρευση των κουμαρινών στα χόρτα και στις ορχιδέες οδηγεί στην αποτροπή διάφορων λοιμώξεων. Χαρακτηριστικά, η ασθένεια *Melilotus Infesta* αποφεύγεται λόγω της παρουσίας υψηλών συγκεντρώσεων κουμαρίνης και κουμαρινικών παραγώγων. Επίσης, κουμαρινικά παράγωγα που βρίσκονται συνήθως στο χορτάρι, στο καλαμπόκι και σε άλλα είδη φυτών, φαίνεται πως δρουν ως απωθητικά κατά των σκαθαριών και άλλων χερσαίων ασπόνδυλων. Επιπρόσθετα, οι κουμαρίνες μπορούν να δράσουν έναντι τραυματικών βλαβών που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας του μαρασμού.^{[2],[5]}

1.2. Χημική δομή και ταξινόμηση κουμαρινών

Οι κουμαρίνες είναι ετεροκυκλικές οργανικές ενώσεις και ανήκουν στην οικογένεια των βενζοπυρονών, οι οποίες διακρίνονται στις βενζο-α-πυρόνες (όπου ανήκουν οι κουμαρίνες) και στις βενζο-γ-πυρόνες στις οποίες ανήκουν

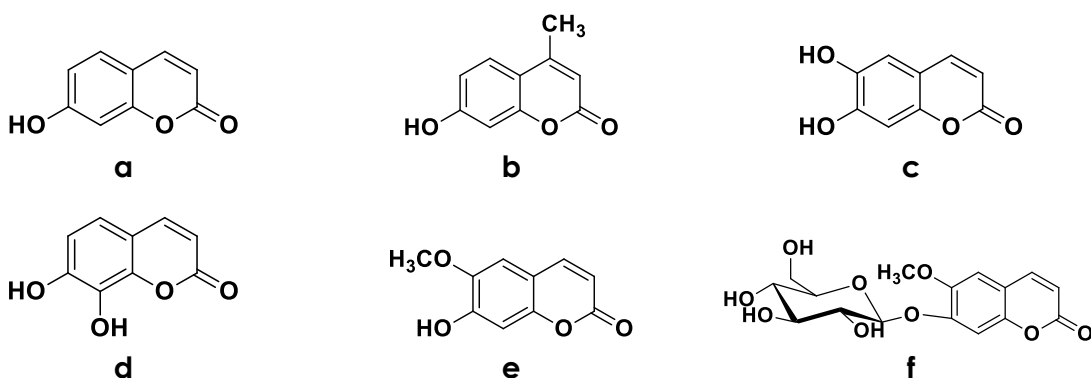
άλλες ομάδες όπως τα φλαβονοειδή. Αποτελούνται από δύο εξαμελείς δακτυλίους, ένα άτομο οξυγόνου και ένα γειτονικό σε αυτό καρβονύλιο. Προκύπτουν από τη συμπύκνωση ενός **βενζολικού δακτυλίου** με την [e] πλευρά μιας **α-πυρόνης** (Σχήμα 1). Διάφορες ονομασίες για την κουμαρίνη είναι οι: 2H-χρωμεν-2-όνη, ή 1,2-βενζοπυρόνη (κατά IUPAC), 2-οξο-1,2-βενζοπυράνιο, 2H-1-βενζοπυραν-2-όνη, λακτόνη του cis-ο-κουμαρινικού οξέος και κουμαρινικός ανυδρίτης.



Σχήμα 1 Χημική δομή **a**: βενζο-α-πυρονών και **b**: βενζο-γ-πυρονών

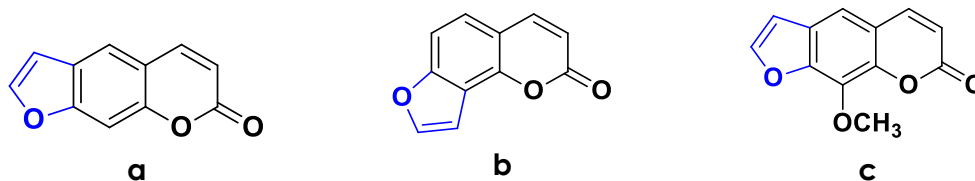
Οι κουμαρίνες θα μπορούσαν να ταξινομηθούν σε 4 ευρύτερες κατηγορίες: απλές κουμαρίνες, φουρανοκουμαρίνες, πυρανοκουμαρίνες και κουμαρίνες που είναι υποκατεστημένες στη θέση 3 ή 4 ή και στις δύο θέσεις. Ακολουθεί η περιγραφή κάθε κατηγορίας και παρατίθενται σχετικά χαρακτηριστικά παραδείγματα αντίστοιχων φυσικών κουμαρινών.

- I. Απλές κουμαρίνες: Την κατηγορία αυτή αποτελούν η απλή κουμαρίνη, τα υδροξυ-, αλκοξυ- και αλκυλο- υποκατεστημένα στον βενζολικό δακτύλιο παράγωγα της κουμαρίνης, καθώς και οι αντίστοιχοι γλυκοζίτες. Χαρακτηριστική κουμαρίνη της κατηγορίας αυτή αποτελεί η 7-υδροξυ-κουμαρίνη ή αλλιώς συμπελιφερόνη (umbelliferone) καθώς και η 4-μεθυλο-συμπηλιφερόνη ή αλλιώς υμεχρωμόνη (hymecromone).



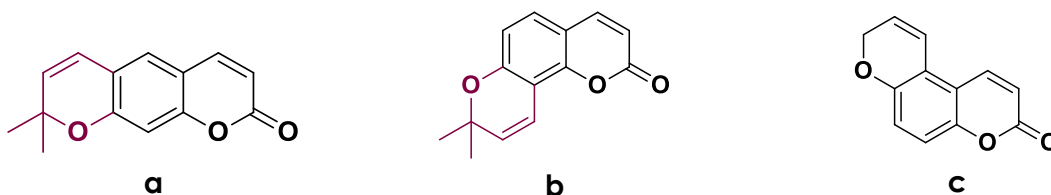
Σχήμα 2 Χημική δομή απλών κουμαρινών: **a**: συμπελιφερόνη, **b**: υμεχρωμόνη, **c**: εσκούλετινή, **d**: δαφνετινή, **e**: σκοπολετινή και **f**: σκοπολίνη.

- II. Φουρανοκουμαρίνες: Αποτελούνται από έναν πενταμελή **φουρανικό δακτύλιο** συνδεδεμένο με τον πυρήνα μίας κουμαρίνης. Ο δακτύλιος αυτός μπορεί να είναι συνδεδεμένος είτε γραμμικά (τύπου ψωραλλενίου) είτε υπό γωνία (τύπου αγγελικίνης) με τον πυρήνα της κουμαρίνης, στον οποίο μένουν δύο θέσεις προς υποκατάσταση.



Σχήμα 3 Χημική δομή φουρανοκουμαρινών: **a**: ψωραλλένιο, **b**: αγγελικίνη, **c**: ξανθοτοξίνη.

- III. Πυρανοκουμαρίνες: Δομικά παρόμοιες με τις φουρανοκουμαρίνες, με τη διαφορά ότι περιέχουν εξαμελή δακτύλιο (**πυρανικό**) συμπυκνωμένο στον κουμαρινικό πυρήνα. Συνήθως είναι παράγωγα γραμμικού τύπου (όπως η ξανθυλετίνη) και γωνιακού (όπως η σεσελίνη).



Σχήμα 4 Χημική δομή πυρανοκουμαρινών: **a**: ξανθυλετίνη, **b**: σεσελίνη, **c**: αλλοξανθυλετίνη.

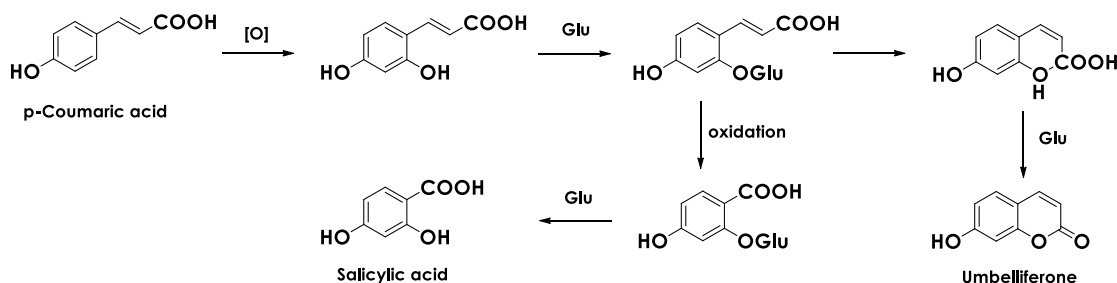
- IV. Κουμαρίνες υποκατεστημένες στον πυρονικό δακτύλιο: Περιλαμβάνονται οι υποκατεστημένες κουμαρίνες στην 3- ή στην 4- ή και στις δύο θέσεις του δακτυλίου, καθώς και οι 3,4-συμπυκνωμένες κουμαρίνες. Μία από τις πιο σημαντικές κουμαρίνες αυτής της κατηγορίας είναι η βαρφαρίνη (warfarin) η οποία εμπεριέχεται σε αντιπηκτικά σκευάσματα.



Σχήμα 5 Χημική δομή υποκατεστημένων στον πυρονικό δακτύλιο κουμαρινών: **a**: βαρφαρίνη, **b**: οστοναριόλη.

1.3. Βιοσύνθεση κουμαρινών

Κατά τη βιοσύνθεση του κουμαρινικού δακτυλίου, αρχικό στάδιο αποτελεί ο σχηματισμός του ετεροκυκλικού δακτυλίου από ένα ο-υδροξυλιωμένο κινναμωμικό οξύ. Το υδροξυλιωμένο κινναμωμικό οξύ παράγεται από τη σικιμική-φαινυλαλανίνη η οποία αποτελεί το κοινό ενδιάμεσο της βιοσύνθεσης της κουμαρίνης στα ανώτερα φυτά. Οι Ribeiro και Karlan (2002) απέδειξαν ότι η ποικιλία και η δομική πολυπλοκότητα των κουμαρινών αποτελούν δείγμα υψηλότερης φυτικής εξέλιξης.^[9] Η εξειδίκευση της μεθόδου είναι η υδροξυλίωση C-2, η οποία προκαλεί την αποσύνδεση (μέσω β-οξειδωσης) της πλευρικής αλυσίδας είτε ισομερισμό αλυσίδας και μετέπειτα λακτονίωση, δημιουργώντας την ουμπελιφερόνη (Umbelliferone) όπως στο Σχήμα 6.^[8]



Σχήμα 6 Μέθοδος βιοσύνθεσης απλών κουμαρινών.^[8]

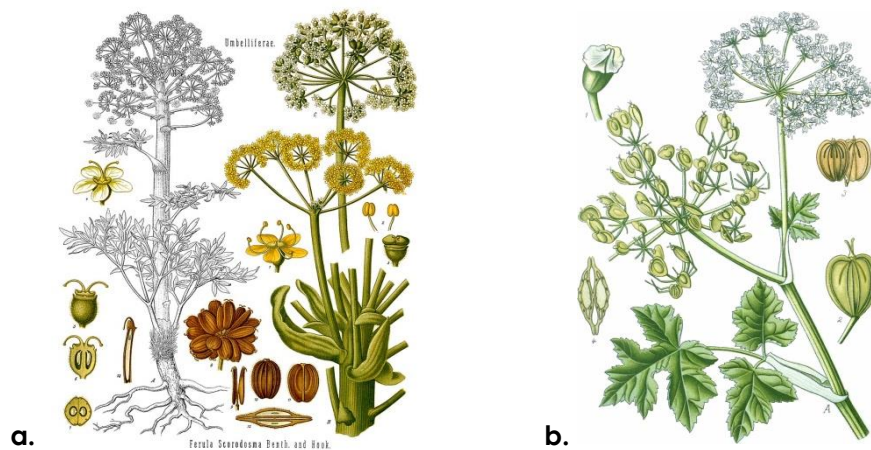
Η βιοσύνθεση της κουμαρίνης μέσω του υδροξυ-κινναμωμικού οξέος περιγράφεται ως η μεταβολική αλληλουχία που οδηγεί από το αρωματικό αμινοξύ L-φαινυλαλανίνη σε διάφορα κινναμωμικά οξέα με υποκατεστημένους δακτυλίους. Τα οξέα αυτά χαρακτηρίζονται από μια ελεύθερη φαινολική ομάδα υδροξυλίου στην πάρα θέση, ενώ κατά τη βιοσύνθεση των 7-υδροξυλιωμένων κουμαρινών, το *trans*-κινναμωμικό οξύ αρχικά μετατρέπεται σε *trans*-*p*-κουμαρικό οξύ. Οι 7-υδροξυ-κουμαρίνες παράγονται από το *p*-κουμαρικό οξύ, ενώ κρίνεται αναγκαίο να σημειωθεί ότι οι περισσότερες βιολογικά δραστικές κουμαρίνες που έχουν μελετηθεί διαθέτουν ένα 7-υδροξυ-κουμαρινικό τμήμα.

Χορηγώντας κινναμωμικό οξύ σε καλλιέργειες λευκού τριφυλλιού (*Melilotus albus*), που περιέχουν κουμαρίνη, σχηματίζεται *cis-trans* ισομερές από την δράση του κινναμωμικού οξέος. Αρχικά, το ο-κουμαρικό οξύ οδηγεί σε γλυκοζιτη κουμαρικού οξέος, το οποίο υδρολύεται σε *cis*-ο-κουμαρικό οξύ και αυτό με την σειρά του κυκλοποιείται αυθόρμητα σε κουμαρίνη. Τα κινναμωμικά οξέα που παράγονται με αυτό τον τρόπο αποτελούν σημαντικά ενδιάμεσα για την βιοσύνθεση μιας πληθώρας φαινολικών φυσικών προϊόντων όχι μόνο ως τελικά προϊόντα του γενικού φαινυλοπροπανοειδούς μεταβολισμού, αλλά και ως τα πιο κεντρικά ενδιάμεσα ολόκληρου του μεταβολισμού των φυτών.

1.4. Κουμαρίνες στα βότανα

Μια πληθώρα φυσικών κουμαρινών που χρησιμοποιούνται συχνά ως βότανα έχουν παρουσιάσει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων. Πολλές οικογένειες βοτάνων είναι γνωστές για τις ευεργετικές τους ιδιότητες, ενώ αποτελούν ακόμα και σήμερα παραδοσιακές φαρμακευτικές τεχνικές (βοτανοθεραπείες) σε αρκετές περιοχές ανά τον κόσμο, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη μεγάλη ιστορική καταγραφή χρήσης τέτοιων βοτάνων σε παραδοσιακά συστήματα ιατρικής όπως η Παραδοσιακή Κινέζικη Ιατρική, η Ιατρική Υψηλή κ.ά. Επίσης, βότανα που περιέχουν κουμαρίνες χρησιμοποιούνται σε συμβατικές θεραπείες και σύγχρονες βοτανοθεραπείες, όπως η αγριοκαστανιά (*Aesculus hippocastanum*), το λουλούδι του πάθους (*Passiflora incarnate*), η αγριαψιθιά (*Achillea millefolium*), το βάλαμο (*Hypericum perforatum*), η φιλύρα (*Tilia cordata*) και το φυτό Cat's Claw (*Uncaria tomentosa*).

Η απλούστερη 7-υδροξυ-κουμαρίνη, ουμπελιφερόνη (umbelliferone), συναντάται σε πλήθος οικογενειών φυτών, όπως Umbelliferae (από όπου αντλεί την ονομασία της), Fabaceae, Rutaceae και Apiaceae. Στην οικογένεια Umbelliferae περιλαμβάνονται βότανα όπως το σέλινο, το κύμινο, ο μάραθος, ο μαϊντανός, το πολυετές φυτό, η αγγελική, η ασαφέτιδα και το ηράκλειο.^{[11],[12]} Η ουμπελιφερόνη έχει μελετηθεί και παρουσιάζει πληθώρα βιολογικών δράσεων, όπως αντιοξειδωτική, αντιπαρασιτική, αντιμυκητιασική και αντικαρκινική, αποτελώντας, παρά την απλή δομή της, μόριο – οδηγό για την ανάπτυξη νέων κουμαρινικών αναλόγων.^{[13]-[16]} Επιπροσθέτως, το ανάλογο υμεχρωμόνη (4-μεθυλο-ουμπελιφερόνη) της ουμπελιφερόνης, απαντάται σε φυτά της οικογένειας Apiaceae, όπως ο γλυκάνισος, το κύμινο, ο μαϊντανός και ο άνηθος, έχοντας σημειώσει βιολογικές δράσεις όπως αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντιβακτηριακή, ενώ αποτελεί έναν αξιόλογο αντιαγγειογόνο παράγοντα.^{[17]-[20]}



Εικόνα 2 Βότανα της οικογένειας Umbelliferae, **a:** ασαφέτιδα και **b:** ηράκλειο. (Εικονογράφηση του Franz Eugen Köhler, Köhler's Medizinal-Pflanzen, 1897)

1.5. Βιολογική δράση των κουμαρινών

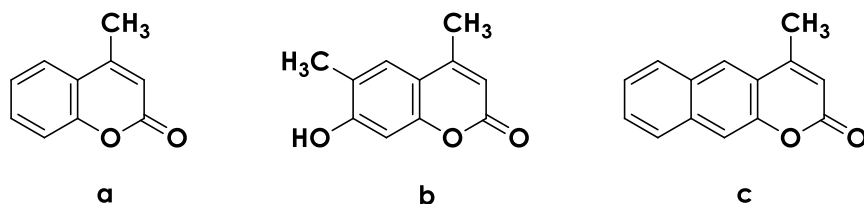
Με βάση τα ανωτέρω, γίνεται κατανοητό ότι οι κουμαρίνες και τα παράγωγά τους είναι βιολογικά και φαρμακευτικά ενεργές ενώσεις με ένα ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων συμπεριλαμβανομένων της αντιοξειδωτικής, της αντιφλεγμονώδους, της αναλγητικής, της αντιμικροβιακής, της αντιμυκητιακής, της αντικαρκινικής, της αντι-υπερτασικής, της αντιπηκτικής, της καρδιοαγγειακής και της αντικαρκινικής.^{[13],[21],[22]}

Αναλυτικότερα, παρουσιάζονται μερικά παραδείγματα ενώσεων που σχετίζονται με τις παραπάνω βιολογικές δράσεις:

1.5.1. Αντιοξειδωτική δράση

Στις μέρες μας, συναντάται ολοένα και αυξανόμενο ενδιαφέρον για την εύρεση αντιοξειδωτικών ουσιών, αποσκοπώντας είτε στην αποτροπή πιθανών τοξικών επιδράσεων των ελευθέρων ριζών (ο ρόλος τους θα αναλυθεί σε μετέπειτα κεφάλαιο) στο ανθρώπινο σώμα είτε στην αποφυγή της οξείδωσης των λιπαρών και άλλων συστατικών των τροφίμων. Έρευνες έχουν επίσης δείξει ότι τα αντιοξειδωτικά συμβάλλουν στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης χρόνιων ασθενειών όπως τα καρδιακά νοσήματα και ο καρκίνος, ενώ στην πλειονότητα προτιμώνται αντιοξειδωτικά που προέρχονται από φυσικές πηγές όπως φρούτα, λαχανικά και δημητριακά ολικής άλεσης. Οι κουμαρίνες, όπως προαναφέρθηκε, αποτελούν χημικές ενώσεις που προέρχονται από τα φυτά και διαθέτουν ποικίλες φαρμακευτικές δράσεις, μεταξύ των οποίων και αντιοξειδωτική.

Παραδείγματα κουμαρινών με αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση αποτελούν τα παρακάτω παράγωγα της 4-μεθυλο-ουμπελιφερόνης (η οποία μαζί με την απλή ουμπελιφερόνη αναφέρθηκαν παραπάνω ως αντιοξειδωτικές ενώσεις), που συντέθηκαν από τον S. Raní και τους συνεργάτες του.^[23]



Σχήμα 7 Χημική δομή **a**: 4-μεθυλο-κουμαρίνης, **b**: 4,6-διμεθυλο7-υδροξυ-κουμαρίνης και **c**: 4-μεθυλο-βενζο-γ-κουμαρίνης.

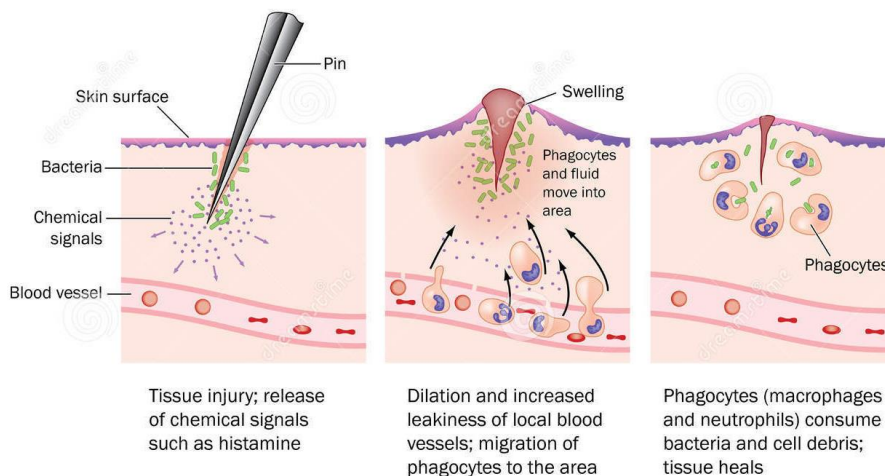
Η αντιοξειδωτική δράση των παραπάνω αναλόγων μπορεί να αποδοθεί στην πυρηνόφιλη φύση των υποκαταστατών $-OH$, $-C_6H_5$ στον κουμαρινικό σκελετό, γεγονός που μειώνει τον αριθμό των ελεύθερων ριζών και κατά συνέπεια τις επιπτώσεις τους στα κύτταρα, ενώ όσο περισσότεροι οι δότες ηλεκτρονίων, τόσο ισχυρότερη η αντιοξειδωτική δράση.

Επιπλέον, σύμφωνα με την έρευνα των Witaičenis et al. η κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε κουμαρίνες όπως η δαφνετίνη, η εσκουλετίνη και η σκοπαρόνη (οι οποίες παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση) θα μπορούσε να αποτρέψει ασθένειες σχετιζόμενες με την εντερική φλεγμονή.^[24]

Επίσης, 3-αρυλο-κουμαρινικά παράγωγα αξιολογήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση (Roussaki et al.^[25]) και τα παράγωγα με δομή κατεχόλης σημείωσαν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, υποδεικνύοντας ότι η ύπαρξη του κατεχολικού συστήματος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δράση αυτή.

1.5.2. Αντιφλεγμονώδης δράση

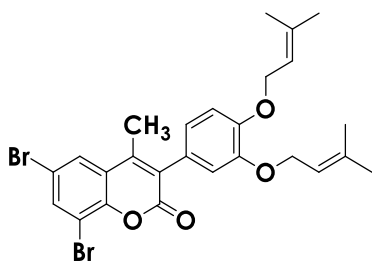
Σύμφωνα με τον ορισμό, η φλεγμονή αποτελεί ανοσολογική άμυνα, απόκριση των ιστών σε κάθε είδους τραυματισμό, λοίμωξη ή αλλεργία, που χαρακτηρίζεται από αύξηση της τοπικής αιματικής ροής, μετανάστευση λευκών αιμοσφαιρίων και απελευθέρωση κυτταροκινών στο σημείο της βλάβης. Χαρακτηρίζεται από άλγος, ερυθρότητα, θερμότητα και οίδημα, τα οποία αντανακλούν τις επιπτώσεις των κυτταροκινών στους ιστούς και στα αιμοφόρα αγγεία. Η διαστολή και η αυξημένη διαπερατότητα των αιμοφόρων αγγείων και κυρίως των τριχοειδών, οδηγεί σε αύξηση της τοπικής αιματικής ροής (υπεραιμία) και σε διαφυγή συστατικών του πλάσματος και εξαγγείωση υγρού στο μεσοκυττάριο χώρο, που συμβάλλουν στη θερμότητα, την ερυθρότητα και το οίδημα. Συστηματικά, η φλεγμονή μπορεί να συνοδεύεται από πυρετό, αρθραλγίες, μυαλγίες και καταβολή δυνάμεων.



Εικόνα 3 Μέρος της διαδικασίας της φλεγμονής.

Κατά τη φλεγμονώδη διαδικασία, οι τοπικές φλεγμονώδεις αποκρίσεις ξεκινούν όταν ο τραυματισμένος ή μολυσμένος ιστός ενεργοποιεί την χυμική και κυτταρική ανοσία. Ενεργοποιούνται πρωτεΐνες του συμπληρώματος, μέσω ενεργοποίησης του καταρράκτη του συστήματος του συμπληρώματος και κυτταροκίνες. Τα λευκά αιμοσφαίρια με την σειρά τους προσελκύνονται στο σημείο της βλάβης (χημειοταξία), καταναλώνουν ξένα ή τραυματισμένα κύτταρα και απελευθερώνουν μεταβολίτες του αραχιδονικού οξέος (λευκοτριένια), κινίνες και ισταμίνη και με τον τρόπο αυτό ενισχύεται και παρατείνεται η ανοσολογική απάντηση. Τα λευκά αιμοσφαίρια απελευθερώνουν επίσης τοξικές ρίζες οξυγόνου, μονοξειδίου του αζώτου και ανοσορρυθμιστικούς παράγοντες, σε μία απόπειρα να φονευθούν οι εισβάλλοντες μικροοργανισμοί και ταυτόχρονα προκαλούν ενεργοποίηση του ενδοθηλίου που με τη σειρά του συμμετέχει στη διαδικασία της φλεγμονής. Σε υγιή άτομα, η διαδικασία συνεχίζεται μέχρι να απομακρυνθούν όλοι οι κατεστραμμένοι ιστοί ή οι εισβάλλοντες παθογόνοι οργανισμοί (συνήθως γύρω στις 5 ημέρες). Ακολουθεί η προσπάθεια επιδιόρθωσης της βλάβης με τη συρροή ινοβλαστών και τη δημιουργία ουλής επούλωσης.

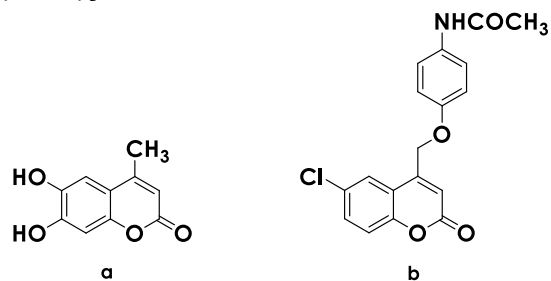
Οι κουμαρίνες έχουν επιδείξει αντιφλεγμονώδη δράση και χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του οιδήματος. Πιο συγκεκριμένα, απομακρύνουν τις πρωτεΐνες και το υγρό του οιδήματος από τον τραυματισμένο ιστό ενισχύοντας τη φαγοκυττάρωση, την παραγωγή ενζύμων και συνεπώς την πρωτεόλυση.^[26] Επίσης, σύμφωνα με την ερευνητική εργασία των Roussaki et al. 3-φαινυλο-υποκατεστημένα κουμαρινικά παράγωγα παρουσιάστηκαν ως σημαντικοί αντιοξειδωτικοί παράγοντες με αντιφλεγμονώδη δράση έναντι του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια (LOX).^[25]



Σχήμα 8 3-φαινυλο-κουμαρινικό παράγωγο με αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.

Σύμφωνα με άλλη έρευνα (Gauran Kayal et al.^[27]), οι υποκατεστημένες στις θέσεις C-3, C-4, C-6 και C-7 κουμαρίνες παρουσίασαν αυξημένη αντιφλεγμονώδη δράση. Είναι χαρακτηριστικό, μάλιστα, ότι η απουσία υποκαταστάτη στη θέση C-6 καθώς και η ύπαρξη οποιασδήποτε ομάδας υποκαταστατών πέρα από H ή F στη θέση C-5, οδηγεί σε μείωση ή και απώλεια της δράσης αυτής. Άλλη μελέτη ^[28] έδειξε ότι το συνθετικό ανάλογο 4-μεθυλο-εσκουλετίνη (Σχήμα 9 α) παρουσίασε αντιφλεγμονώδη δράση έναντι εντερικής φλεγμονής σε ποντίκια, ενώ σύμφωνα με τον Kirsch et al., κουμαρινικό ανάλογο της παρακεταμόλης (Σχήμα 9 β)

παρουσίασε *in vivo* αντιφλεγμονώδη δράση, σε φλεγμονή που επάγεται ύστερα από χορήγηση καραγενίνης.^[29]

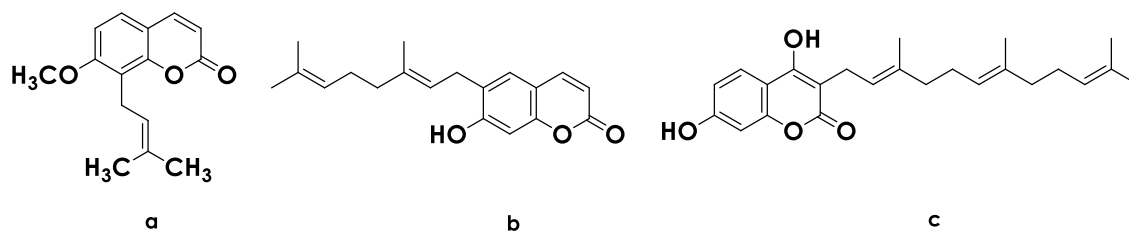


Σχήμα 9 Κουμαρινικά ανάλογα με αντιφλεγμονώδη δράση, **a**: 4-μεθυλο-εσκουλετίνη και **b**: ανάλογο της παρακεταμόλης.

1.5.3. Αντιμυκητιακή δράση

Δεδομένης της παρατηρούμενης ανθεκτικότητας των μυκήτων στα υπάρχοντα φάρμακα, αρκετά νέα φυσικά προϊόντα, όπως και ανάλογα κουμαρινών, προσελκύουν το ενδιαφέρον. Σε έρευνα των R. de Araujo et al.^[30] μελετήθηκε η σχέση δομής της 6- και της 7- υδροξυ-κουμαρίνης, καθώς και των αντίστοιχων υποκατεστημένων κουμαρινών με πρενυλο-, γερανυλο- και αλλυλο- ομάδες, με στόχο τη δράση τους κατά των μυκήτων *Aspergillus fumigatus* και *Aspergillus flavus*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ενώ στην περίπτωση υποκατάστασης της 6-υδροξυ-κουμαρίνης με μία από τις παραπάνω ομάδες δεν υπήρξε ενίσχυση της αντιμυκητιακής δράσης, στην περίπτωση της 7-υδροξυ-κουμαρίνης, η μείωση του μεγέθους της πλευρικής αλυσίδας οδηγεί σε βελτιωμένη δράση.

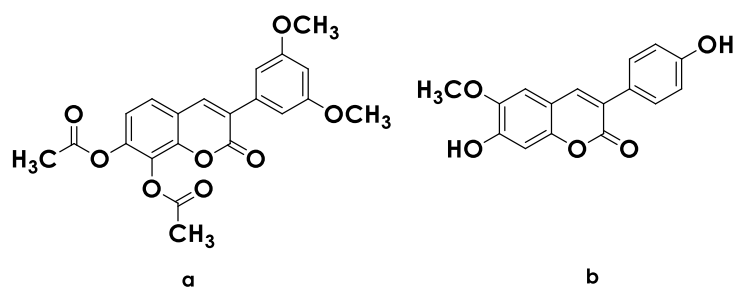
Παρόμοιο ανάλογο με δράση έναντι των μυκήτων είναι η οσθόλη (Σχήμα 10 a), η οποία χρησιμοποιείται πολλά χρόνια στην Κίνα ως παραδοσιακό βότανο, για την καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μυκήτων, όπως ο *Rhizoctonia solani*.^[31] Επίσης, η οστρουθίνη (Σχήμα 10 b) και η αμμορεζινόλη (Σχήμα 10 c) έχουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση απέναντι σε πληθώρα θετικών κατά Gram βακτηρίων, μεταξύ των οποίων ανήκουν οι *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Bacillus megaterium*.^[13]



Σχήμα 10 Κουμαρινικά ανάλογα με αντιμυκητιακή δράση, **a**: οσθόλη, **b**: οστρουθίνη και **c**: αμμορεζινόλη

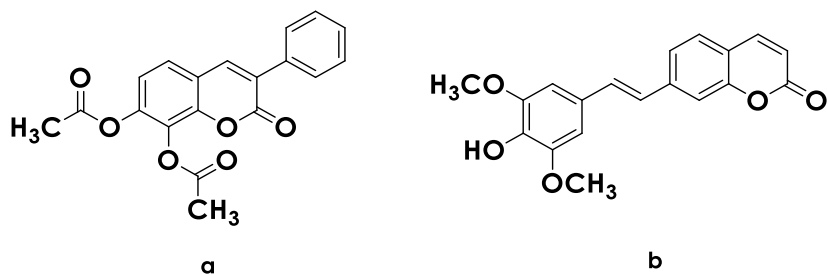
1.5.4. Αντικαρκινική δράση

Όσον αφορά την αντιμετώπιση του καρκίνου, κουμαρινικά ανάλογα έχουν συντεθεί και παρουσιάσει αξιόλογη αντικαρκινική δράση. Παράγωγα με φαινυλο-υποκαταστάτη στη θέση 3 του κουμαρινικού σκελετού έχουν αξιολογηθεί για την αντικαρκινική τους δράση. Οι Saeed Emami και Sakineh Dadashpour παρουσίασαν τη 7,8-διακετυλοξυ-3-(3,5-διμεθοξυφαινυλο)-κουμαρίνη (Σχήμα 11 α) ως κυτταροτοξική έναντι της κυτταρικής σειράς KB (υποκατηγορία της κυτταρικής σειράς ανθρώπινου καρκίνου του τραχήλου της μήτρας HeLa), ενώ η 6-μεθοξυ-7-υδροξυ-3-(υδροξυφαινυλο)-κουμαρίνη (Σχήμα 11 β) παρουσίασε κυτταροτοξική δράση έναντι των κυτταρικών σειρών καρκίνου ανθρώπινου πνεύμονα (A549) και λευχαιμίας (HL-60).^[32]



Σχήμα 11 Κουμαρινικά ανάλογα με αντικαρκινική δράση

Ο Musa et al. παρουσίασαν το 2017 τα 3-αρυλο-κουμαρινικά παράγωγα (Σχήμα 12 α) με αξιόλογη κυτταροτοξική δράση έναντι των κυτταρικών σειρών καρκίνου ανθρώπινου πνεύμονα (A549), προστάτη (PC-3) και μαστού (MDA-MB-231),^[33] ενώ το 2018 η Herrera – R και η ερευνητική της ομάδα παρουσίασαν τη σύνθεση 7-στυρυλο- ή/και 3 υποκατεστημένων κουμαρινών (Σχήμα 12 β) με αξιόλογη κυτταροτοξικότητα έναντι κυτταρικών σειρών ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου (SW480) και μη κακοήθων κυττάρων ανθρώπινων ωοθηκών (CHO-K1).^[34]

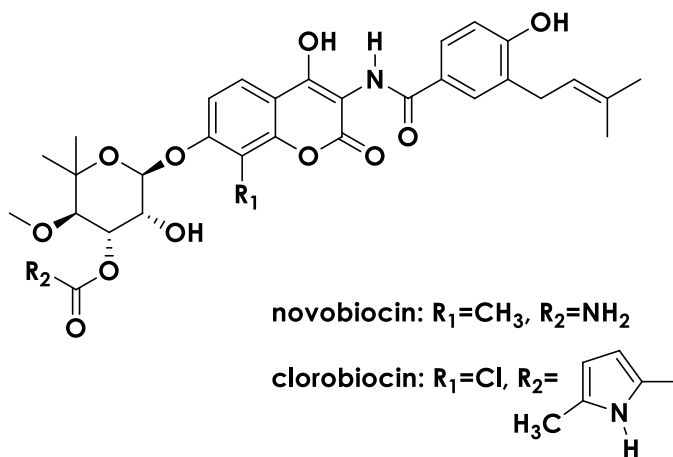


Σχήμα 12 Κουμαρινικά ανάλογα με αντικαρκινική δράση που ανακαλύφθηκαν πρόσφατα.

1.5.5. Αντιμικροβιακή δράση

Η συνεχής ανάπτυξη στελεχών βακτηρίων ανθεκτικών στα κλασσικά αντιβιοτικά οδήγησε στην ανακάλυψη και ανάπτυξη νέων υβριδικών ενώσεων που δρουν με διαφορετικούς μηχανισμούς.^[35]

Η απλή κουμαρίνη έχει χαμηλή αντιμικροβιακή δράση. Όμως, ορισμένα φυσικά παράγωγά της εμφανίζουν ισχυρότερη δράση. Το νονοβιοσίνη, που απομονώθηκε ως μεταβολίτης από τους μύκητες *Streptomyces niveus* και *Streptomyces spheroides* και το κλοροβιοσίνη αποτελούν κουμαρινικά αντιβιοτικά τα οποία δρουν ως αναστολείς της DNA γυράσης (βακτηριακή τοποϊσομεράση) κι έτσι δρουν εναντίον θετικών κατά gram βακτηρίων, όπως ο *Staphylococcus aureus*, ακόμη και εναντίον ανθεκτικών σε μεθυκυλλίνη, στελεχών του βακτηρίου αυτού.



Σχήμα 13 Χημική δομή *novobiocin* και *clorobiocin*.

Ωστόσο, η ανάπτυξη προβλημάτων κυρίως διαλυτότητας, τοξικότητας, αλλά και εμφάνισης ανθεκτικότητας των βακτηρίων, οδήγησε στη σύνθεση νέων κουμαρινικών αναλόγων. Με στόχο, κατά κύριο λόγο, την αναστολή της δράσης της βακτηριακής DNA γυράσης, συντέθηκαν νέα κουμαρινικά ανάλογα που «μιμούνται» τη δομή και τη δράση του νονοβιοσίνης εμφανίζοντας όμως ένα καλύτερο φαρμακευτικό προφίλ.

Μελετήθηκαν με την πάροδο του χρόνου λοιπόν, διάφορα παράγωγα της οικογένειας των κουμαρινών σε μία προσπάθεια συσχέτισης της δομής τους με πιθανή αντιμικροβιακή δράση. Χαρακτηριστικά, έχει βρεθεί ότι 4-υποκατεστημένες κουμαρίνες, όπως η 4-χλωρο-κουμαρίνη, έχουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση.^[36]

Ακόμη, κάποια γενικά συμπεράσματα που έχουν διατυπωθεί αποτελούν τα εξής: ένας υποκαταστάτης καρβοξυλικού οξέος ή εστέρα στον κουμαρινικό δακτύλιο είναι σημαντικός για την αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε θετικά και αρνητικά κατά gram βακτήρια, ενώ η παρουσία υδροξυλίου ή φαινολικού

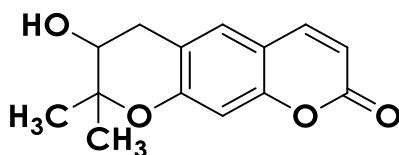
υποκαταστάτη ή/ και καρβοξυλικού οξέος στο δακτύλιο ενισχύει τη δράση εναντίον του ελικοβακτηριδίου του πυλωρού.^[37]

Επιπροσθέτως, σε έρευνα που έγινε από τον Liang Yang και τους συνεργάτες του^[38] για τη δράση των υδροξυ-κουμαρινών κατά του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum*, το οποίο μολύνει φυτά, βρέθηκε άμεση συσχέτιση της δομής τους με την αντιβακτηριακή τους δράση. Πιο συγκεκριμένα, η ουμπελιφερόνη (7-υδροξυ-κουμαρίνη) έχει ισχυρή αντιβακτηριακή δράση, ενώ ένα επιπλέον υδροξύλιο στη θέση 6 του δακτυλίου (esculetin) ενισχύει ακόμη περισσότερο τη δράση αυτή. Τέλος, η δαφνετίνη (7,8-διυδροξυ-κουμαρίνη) βρέθηκε ότι έχει τη μέγιστη αντιβακτηριακή δράση. Μάλιστα, ο μηχανισμός της δράσης εσκουλετίνης και δαφνετίνης έγκειται στην καταστροφή της μεμβράνης του βακτηρίου.

1.5.6. Λοιπές βιολογικές δράσεις κουμαρινών

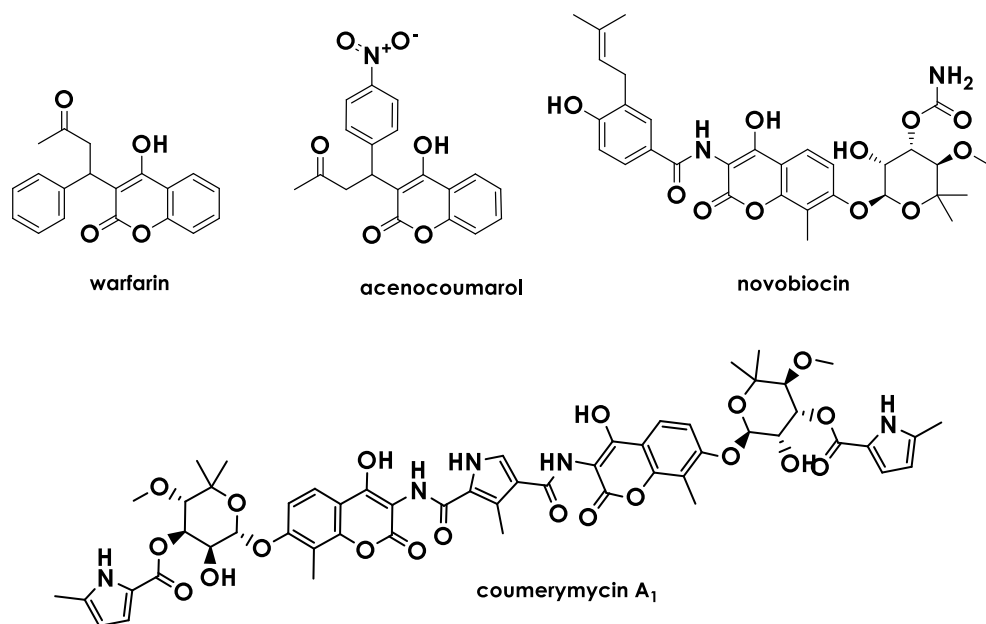
Σε πρόσφατες μελέτες (2018) οι φυσικές υδροξυ-κουμαρίνες ουμπελιφερόνη, εσκουλετίνη και δαφνετίνη αποδείχθηκε ότι μειώνουν σημαντικά τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου *Ralstonia solanacearum*, ένα από τα πιο σημαντικά φυτικά παθογόνα στον κόσμο που είναι υπεύθυνο για τη θανατηφόρο συστηματική αγγειακή νόσο Bacterial wilt.^[39]

Ο Anad et al. παρουσίασαν φυσικά και συνθετικά παράγωγα κουμαρινών με ισχυρή ικανότητα να αναστέλλουν τη δράση της ακετυλοχολινεστεράσης (acetylcholinesterase, AChE), ένζυμο το οποίο σχετίζεται με την ασθένεια του Alzheimer. Ειδικότερα, η φυσική κουμαρίνη decursinol (Σχήμα 14) παρουσίασε αξιοσημείωτη ικανότητα αναστολής με τιμή IC₅₀ 0.28μΜ.^[40]



Σχήμα 14 Χημική δομή ντεσουρκινόλης.

Σημειώνεται ότι κουμαρινικά παράγωγα αποτελούν τη δραστική φαρμακευτική ουσία (Active Pharmaceutical Ingredient, API) σε εμπορικά σκευάσματα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η βαρφαρίνη (warfarin), μια αντιπηκτική ουσία που χρησιμοποιείται ευρέως και λειτουργεί ως ανταγωνιστής της βιταμίνης K, όπως και η ακενοκουμαρόλη (acenocoumarol).^[41] Επίσης, αμινοκουμαρινικά παράγωγα αποτελούν τη δραστική φαρμακευτική ουσία στα αντιβιοτικά φαρμακευτικά σκευάσματα πονοβικίνη και coumerymycin (Σχήμα 15).^[42]



Σχήμα 15 Κουμαρίνες ως δραστικές φαρμακευτικές ουσίες σε φαρμακευτικά σκευάσματα.

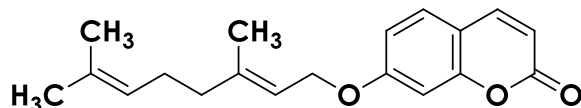
1.6. Προφίλ πρενυλοξυ-κουμαρινών

Η πρενυλίωση είναι μία χημική ή ενζυμική προσθήκη μίας υδρόφοβης, ισοπρενοειδούς (ισοπρένιο: 2-μεθυλο-1,3-βουταδιένιο κατά IUPAC) πλευρικής αλυσίδας σ' ένα μόριο, όπως ένα άλλο τερπενειδές μόριο, μία αρωματική ένωση ή μια πρωτεΐνη. Η πρενυλίωση ενός αρωματικού δευτερογενούς μεταβολίτη έχει σημαντικό ρόλο κατά τη βιοσύνθεση πληθώρας μορίων με φαρμακολογικές ιδιότητες σε ζώα και φυτά.

Συνήθως, η προσθήκη μιας ισοπρενοειδούς πλευρικής αλυσίδας καθιστά το μόριο φαρμακολογικά πιο δραστικό σε σχέση με το αρχικό μόριο. Τα υβριδικά φυσικά προϊόντα που συντίθενται αποτελούν, στις μέρες μας, ένα νέο σύνορο για την ανάπτυξη καινοτόμων φαρμακευτικών παραγόντων με αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση.^[43]

Τα ο-πρενυλιωμένα προϊόντα, όπως τα ισοπεντυλοξυ-, τα γερανυλοξυ- και, τα λιγότερο συναντώμενα, φαρνεζυλοξυ-παράγωγα αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι για χρόνια αντιμετωπίζονταν ως ενδιάμεσα της βιοσύνθεσης των C-πρενυλιωμένων παραγώγων. Μόλις τον τελευταίο καιρό τα φυσικά αυτά προϊόντα έχουν αναγνωρισθεί ως βιοδραστικά παράγωγα και έχουν κεντρίσει το επιστημονικό ενδιαφέρον για τη σύνθεση νέων παραγώγων. Δομικές τροποποιήσεις όπως η πρενυλίωση, αυξάνουν τους πιθανούς δομικούς σκελετούς των κουμαρινών, προσδίδοντάς τους πολλές βιολογικές δράσεις.^{[44],[45]}

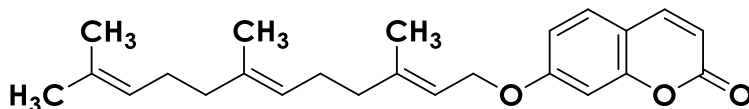
Πρενυλοξυ-κουμαρίνες έχουν απομονωθεί από τις οικογένειες Rutaceae και Umbelliferae και παρουσιάζουν ιδιαίτερες φαρμακολογικές ιδιότητες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα κουμαρίνης με πρενυλοξυ-υποκατάσταση αποτελεί η 7-γερανυλοξυ-κουμαρίνη, γνωστή ως ωραπτίνη (auraptene, Σχήμα 16), η οποία απαντάται εκτεταμένα στη φύση και απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1930 από τις φλούδες εσπεριδοειδών φρούτων (*Citrus natsudaidai* Hayata) παρουσιάζοντας χημειοπροληπτική δράση στη χημικώς προκαλούμενη καρκινογένεση.^[46]



Σχήμα 16 Χημική δομή ωραπτίνης.

Ειδικότερα, η ωραπτίνη αποτελεί αξιόλογο *in vivo* χημειοπροληπτικό παράγοντα έναντι του καρκίνου του δέρματος, της γλώσσας, του οισοφάγου και του παχέος εντέρου.^{[47],[48]} Επιπλέον, αποτελεί αναστολέα του παράγοντα νέκρωσης όγκου α (TNF-α)^[49] ενώ διαθέτει *in vitro* και *in vivo* αντιφλεγμονώδη^{[50],[51]} και νευροπροστατευτική δράση.^[52] Οι La et. al. μελέτησαν το 2013 τη δράση της ωραπτίνης κατά την αντιμετώπιση βακτηριακών περιοδοντικών λοιμώξεων, οι οποίες χαρακτηρίζονται από ελλιπή φλεγμονώδη απόκριση, οδηγώντας σε εκτεταμένες βλάβες στους ιστούς των ούλων γύρω από τα δόντια.^[53] Επίσης, έχει αναφερθεί πως η ωραπτίνη αποτρέπει το ντοπαμινεργικό νευρωνικό κυτταρικό θάνατο στο κεντρικό νευρικό σύστημα, με χρήση ενδορινικής LPS-επαγόμενης νόσου του Parkinson σε ποντικούς.^[54]

Η ουμπελιπρενίνη (umbelliprenin) ή 7-φαρνεζυλοξυ-κουμαρίνη αποτελεί μια ακόμα φυσική πρενυλοξυ-κουμαρίνη που συναντάται σε φυτά της οικογένειας Ferula, Peucedanum, Seseli, Magydaris, και Ammi και έχει παρουσιάσει αντικαρκινική δράση έναντι διαφόρων κυτταρικών σειρών (Σχήμα 17).^{[55],[56]}

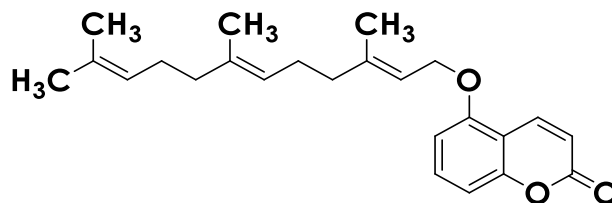


Σχήμα 17 Χημική δομή ουμπελιπρενίνης.

Η ουμπελιπρενίνη έχει, επίσης, αποδειχθεί ότι αναστέλλει τη δράση των μεταλλοπρωτεϊνών θεμέλιας ουσίας, οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση, τη μετανάστευση και την διεισδυτικότητα του καρκίνου.^[57] Επιπλέον, διάφορες μελέτες (*in vitro* και *in vivo*) έχουν παρουσιάσει την ουμπελιπρενίνη ως αντιοξειδωτικό, αντιφλεγμονώδη^[58] και χημειοπροληπτικό

παράγοντα^[59] και ως αναστολέα της ακετυλοχολινεστεράσης, επάγοντας την απόπτωση στα γαστρικά καρκινικά κύτταρα.^[56] Ο Eρίφανο και οι συνεργάτες του το 2018 ανέφεραν ότι η ωραππένη και η ουμπελιπρενίνη παρουσίασαν δράση κατά της μελανογένεσης.^[60]

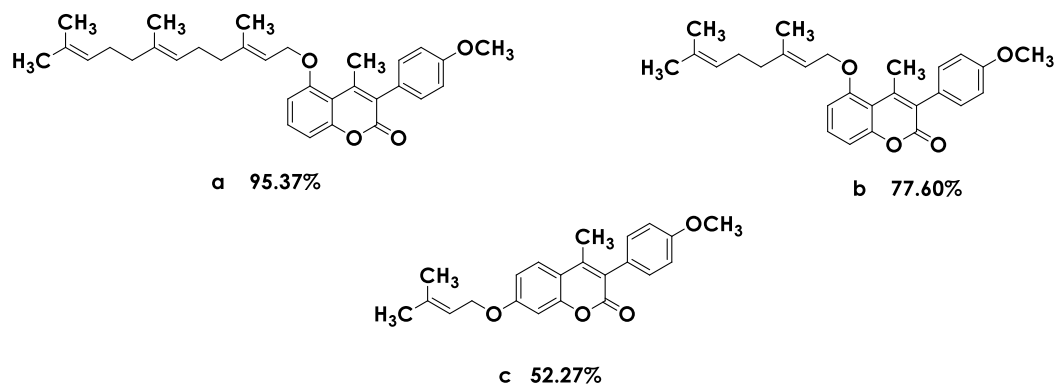
Οι φυσικές πρενυλοξυ-κουμαρίνες έχουν αποτελέσει το σύνορο για το σχεδιασμό νέων κουμαρινικών παραγώγων με αξιόλογη βιολογική δράση. Χαρακτηριστικά αναφέρεται η αντιφλεγμονώδης δράση της 5-φαρνεζυλοξυ-κουμαρίνης καθώς και της 3-φαρνεζυλοξυ-κουμαρίνης, η οποία εκφράζεται μέσω της ικανότητάς τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια (15-LOX), (Σχήμα 18).^[61]



Σχήμα 18 Χημική δομή 5-φαρνεζυλοξυ-κουμαρίνης με αντιφλεγμονώδη δράση (15-LOX IC₅₀ 0.8 μM).

Επιπροσθέτως, σε προηγούμενη μελέτη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. ^[62] εξετάστηκε η ικανότητα αναστολής του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB από πρενυλοξυ-κουμαρινικά παράγωγα. Ο φυσιολογικός ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB είναι να ρυθμίζει τα γονίδια που κωδικοποιούν τα αντι-αποπτωτικά μόρια, να ελέγχει την έκφραση διαφόρων μορίων προσκόλλησης κ.ά. Η συστηματική ωστόσο δραστηριότητα του NF-kB φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στις χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους. Η ενεργοποίηση του NF-kB στη χρόνια φλεγμονή ενδέχεται να συμμετέχει στην ογκογένεση, εφόσον τα αντι-αποπτωτικά γονίδια που ενεργοποιούνται συνεισφέρουν στην επιβίωση κυττάρων που θα έπρεπε κανονικά να ακολουθήσουν το αποπτωτικό μονοπάτι. Ο NF-kB αναστέλλει την απόπτωση είτε μέσω της επαγωγής των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών είτε με την καταστολή των προ-αποπτωτικών γονιδίων.^{[63].^[64]}

Συνεπώς, λόγω της πιθανής συσχέτισης του παράγοντα NF-kB με τις χρόνιες φλεγμονές και τον καρκίνο, εξετάστηκε η ικανότητα αναστολής του από τα ακόλουθα πρενυλοξυ-παράγωγα: 5-φαρνεσυλοξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (Σχήμα 19 α), 5-γερανυλοξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (Σχήμα 19 β) και 7-πρενυλοξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (Σχήμα 19 γ).



Σχήμα 19 Χημική δομή και ανασταλτική ικανότητα του παράγοντα NF-kB, σε συγκέντρωση 50μM, πρενυλοξυ-παραγώγων.

Παρατηρείται ότι η ένωση **a** που περιέχει φαρσενυλοξυ-υποκαταστάτη είναι πολύ πιο αποδοτική σε σχέση με την **b** που διαθέτει γερανυλοξυ-υποκαταστάτη. Η διαφορά αυτή πιθανώς έγκειται στο μεγαλύτερο μήκος της πρενυλο-αλυσίδας, το οποίο καθιστά την ένωση περισσότερο λιπόφιλη. Τέλος, η ένωση **c** επέδειξε χαμηλότερη αναστολή του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB, γεγονός που υποδεικνύει το ρόλο που παίζει το μήκος της πρενυλο-αλυσίδας, αλλά κι η θέση του υποκατάστατη στην εξεταζόμενη δράση.

2. ΧΑΛΚΟΝΕΣ

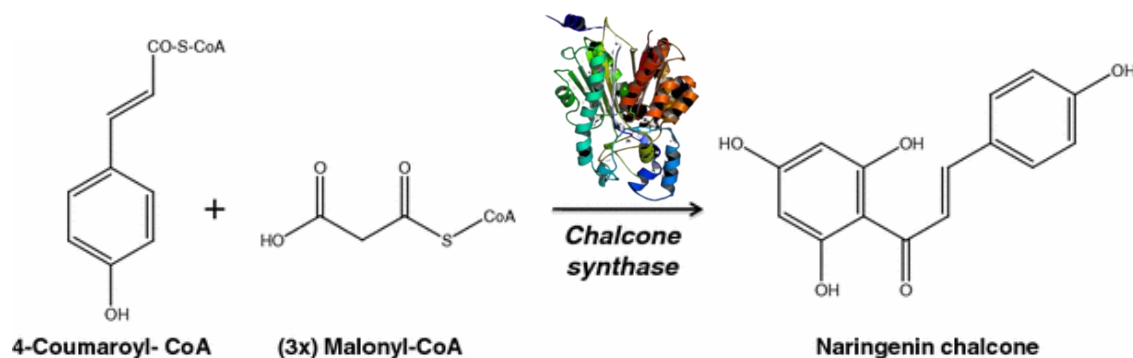
2.1. Προέλευση και δομή χαλκονών

Οι χαλκόνες είναι οργανικές ενώσεις που απαντώνται σε πληθώρα φυτικών ειδών όπως *Angelica*, *Glycyrrhiza*, *Humulus* και *Scutellaria*. Αποτελούν ενδιάμεσα της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών (Διάγραμμα 2) και εντάσσονται στην ευρύτερη κατηγορία των φαινολικών ενώσεων.



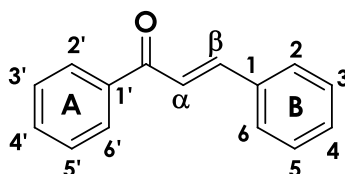
Διάγραμμα 2 Ταξινόμηση χαλκονών.

Συγκαταλέγονται στους φυτοχημικούς παράγοντες και η βιοσύνθεσή τους στα φυτά (Σχήμα 20) πραγματοποιείται προκειμένου να προστατευτούν από το φωτοσυνθετικό στρες, τις δραστικές μορφές οξυγόνου, παράσιτα ή ακόμα και στρες προκαλούμενο από μηχανικούς τραυματισμούς. Η πλειονότητα της περιεκτικότητας των χαλκονών σε εσπεριδοειδή και διάφορα φυτά διαμεσολαβείται μέσω του σχηματισμού της 4,2',4',6'-τετραϋδροξυχαλκόνης (γνωστής ως ναρινγενίνης) με τη βοήθεια του ενζύμου συνθάση χαλκόνης (CHS, η τρισδιάστατη δομή της φαίνεται στο Σχήμα 20). Η ναρινγενίνη κατέχει ουσιαστικό ρόλο κατά τη βιοσύνθεση των φλαβονοειδών και συμβάλλει σημαντικά στη συνολική ποσότητα φλαβονοειδών που περιέχονται στα φυτά.



Σχήμα 20 Βιοσύνθεση της ναρινγενίνης σε φυτά και εσπεριδοειδή μέσω συμπύκνωσης τριών μορίων μαλονυλ-CoA και ενός μορίου 4-κουμαροϋλ-CoA με καταλύτη συνθάση χαλκόνης. [65]

Η γενικός όρος «χαλκόνη» διατυπώθηκε από τους Kostanecki και Tambor [65] ενώ διάφορες ονομασίες για την ένωση αυτή είναι οι: 1,3-διφαινυλο-2-προπεν-1-όνη (κατά IUPAC), βενζαλακετοφαινόνη, βενζυλιδενό-ακετοφαινόνη κ.ά. Ο δομικός σκελετός των χαλκονών αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους (A και B) που συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός α,β-ακόρεστου καρβονυλικού συστήματος. Οι φυσικές χαλκόνες περιέχουν κυρίως υδροξυ-, μεθοξυ-, πρενυλο- και μεθυλο- ομάδες ως υποκαταστάτες στους δακτυλίους A και B (Σχήμα 21).



Σχήμα 21 Γενική χημική δομή χαλκονών.

2.2. Φαρμακευτικό προφίλ και βιολογική δράση χαλκονών

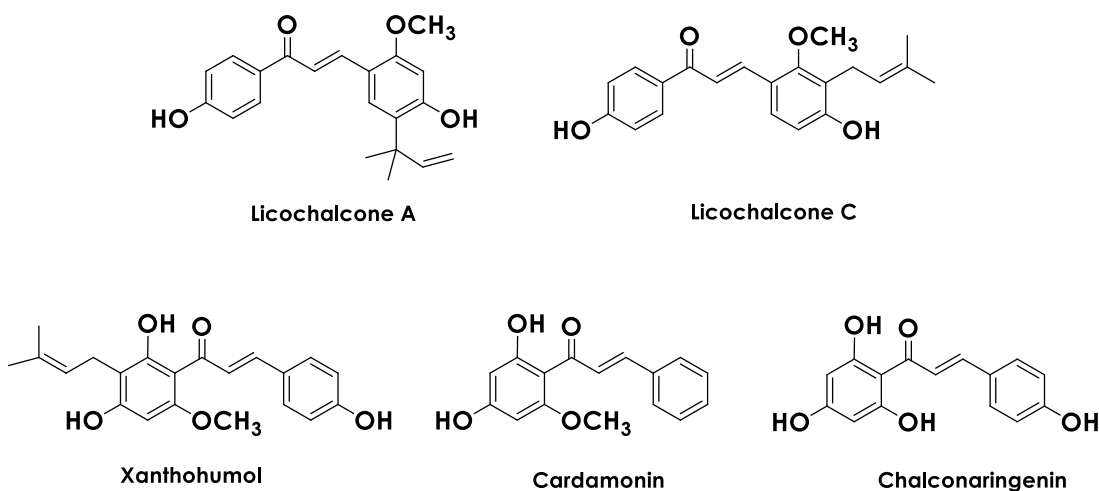
Οι χαλκόνες αφθονούν ιδιαίτερα σε φρούτα (όπως εσπεριδοειδή και μήλα), λαχανικά (όπως ντομάτες, πατάτες και βλαστούς φασολιών) καθώς και σε μπαχαρικά (όπως η γλυκόριζα), αρκετά από τα οποία χρησιμοποιούνται εδώ και πολλά χρόνια ως παραδοσιακές φαρμακευτικές θεραπείες.^[67] Συναντώνται επίσης στη μπύρα και το κρασί και επιδεικνύουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων, συμπεριλαμβανομένης της αντιοξειδωτικής, αντιφλεγμονώδους, αντικαρκινικής, αντιμικροβιακής, αντιπαρασιτικής και αντιαγγειογενετικής δράσης.^[68]

Στην παραδοσιακή ιατρική πολλών χωρών περιλαμβάνονται εκχυλίσματα και φυτικά σκευάσματα που περιέχουν ως κύριο βιοδραστικό συστατικό φυσικές χαλκόνες. Παράδειγμα αποτελούν τα εκχυλίσματα της καλλιέργειας Κανα (*Piper methysticum*), που χρησιμοποιούνται παραδοσιακά από τους κατοίκους των νησιών του Ειρηνικού ωκεανού, εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική και αγχολυτική δράση.



Εικόνα 4 Το φυτό Κανα.

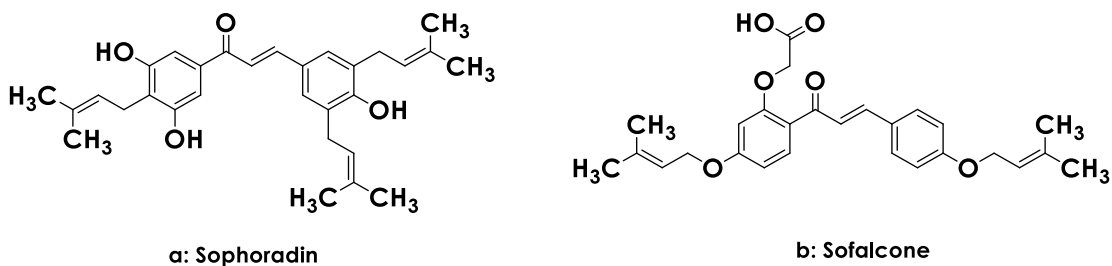
Επίσης, τα εκχυλίσματα από τις ρίζες της γλυκόριζας (*Glycyrrhiza glabra*), που χρησιμοποιούνται από την παραδοσιακή Κινεζική ιατρική για τη θεραπεία του βρογχικού άσθματος, δερματικών παθήσεων και δηλητηριάσεων, βρίσκουν σήμερα εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων, καθώς περιέχουν ως κύρια συστατικά χαλκόνες, όπως οι licochalcones A και C που εμφανίζουν αξιόλογη αντιβακτηριακή και αντιπαρασιτική δράση (Σχήμα 22).^{[71],[72]}



Σχήμα 22 Χημική δομή φυσικών βιοδραστικών χαλκονών.

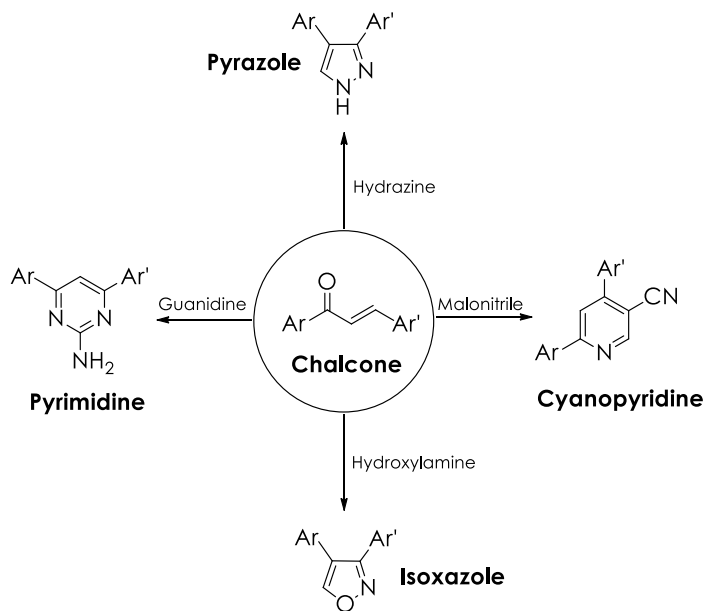
Άλλα χαρακτηριστικά παραδείγματα φυσικών βιοδραστικών χαλκονών αποτελούν η ξανθοχουμόλη (xanthohumol), ένα πρενυλιωμένο φλαβονοειδές που αποτελεί το κύριο συστατικό του λυκίσκου και διαθέτει δράσεις όπως

χημειοπροληπτική, αντιοξειδωτική και αντι-αγγειογόνο,^{[73],[74]} η καρδαμονίνη (cardamonin) που απομονώνεται από φυτά του είδους *Zingiber officinale* (όπως η πιπερόριζα/τζίντζερ) και εμφανίζει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες καθώς και ιδιότητες έναντι της μίτωσης,^{[75],[76]} και πολυ-υδροξυλιωμένες χαλκόνες, όπως η χαλκοναρινγκενίνη (chalconarigenin), η οποία είναι το κύριο φλαβονοειδές της ντομάτας και διαθέτει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Σχήμα 22).^[77] Το Ο-πρενυλιωμένο ανάλογο (Sofalcone) της φυσικής χαλκόνης Sophoradin (Σχήμα 23), η οποία δρα για την επούλωση του έλκους (μεταξύ άλλων),^[78] έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον λόγω της δράσης του (προστατευτικό του γαστρικού βλεννογόνου και επουλωτικό του έλκους)^[79], ενώ ήδη αποτελεί φαρμακευτικό προϊόν στην Ιαπωνία.^[80]



Σχήμα 23 Χημική δομή των χαλκονών **a:** σοφοραδίνη και **b:** σοφαλκόνη.

Οι χαλκόνες έχουν επιδείξει σημαντική αντιμυκητιακή, αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση, καθώς και δράση εναντίον της φυματίωσης, της ελονοσίας και της λέϊσμανίασης.^[70] Επιπλέον, αποτελούν πολύ χρήσιμα μόρια καθώς χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση ετεροκυκλικών συστημάτων με έντονο φαρμακολογικό ενδιαφέρον, όπως κυανοπυριδίνες, πυραζολίνες, ισοξαζόλια και πυριμιδίνες.^[64]

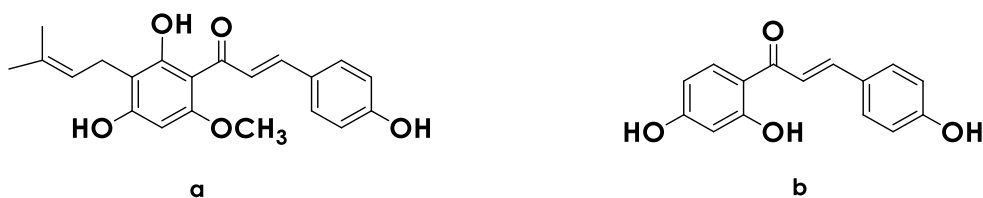


Σχήμα 24 Σύνθεση ενώσεων μέσω χαλκονών.^[70]

Οι χαλκόνες ανήκουν στην κατηγορία των «προνομιούχων δομών», ενώσεων, δηλαδή, που μπορούν να τροποποιηθούν δομικά με μεγάλη ποικιλία υποκαταστατών ούτως ώστε να διαφοροποιείται η βιολογική δράση τους και να μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για τη σχέση δομής – βιολογικής δράσης. 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.^{[68],[81]}

2.2.1. Αντικαρκινική δράση χαλκονών

Ιδιαίτερη αναφορά γίνεται στη δράση των χαλκονών έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου. Μερικά μόρια δρουν μέσω ενός μόνο μηχανισμού και έτσι στοχεύουν μια συγκεκριμένη κυτταρική διαδικασία, ενώ πολλές χαλκόνες δρουν ως πολυλειτουργικές ενώσεις. Η ξανθομουμόλη (Σχήμα 25 α) και η ισολικριπιγενίνη (Σχήμα 25 β) αντιπροσωπεύουν τη δεύτερη κατηγορία, καθώς εμπλέκονται σε διάφορα στάδια της καρκινογένεσης, από τη δημιουργία του όγκου μέχρι το σχηματισμό των μεταστάσεων και φαίνεται να είναι ειδικά στοχευμένες.^[65]



Σχήμα 25 Χημική δομή χαλκονών με αντικαρκινική δράση, **a:** ξανθομουμόλη και **b:** ισολικριπιγενίνη.



Επιπροσθέτως, το α,β-ακόρεστο καρβονυλικό σύστημα των χαλκονών τις καθιστά δέκτες ηλεκτρονίων σε αντιδράσεις Michael, με αποτέλεσμα να αντιδρούν εκλεκτικά με ασθενώς πυρηνόφιλες ομάδες όπως οι σουλφυδρυλομάδες που περιέχονται στα ενεργά κέντρα ενζύμων, όπως η τοποϊσομεράση II που περιέχει ασυνήθιστα μεγάλο αριθμό σουλφυδρυλομάδων. Οι τοποϊσομεράσες συμμετέχουν στην αντιγραφή του DNA διευκολύνοντας τη διάσπαση του ενός ή και των δύο κλώνων του DNA, συνεπώς η διακοπή αυτής της διαδικασίας και η αναστολή της δράσης κυρίως της τοποϊσομεράσης II οδηγεί σε επαγωγή της απόπτωσης (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος). Οι αλκυλιωτικοί αντικαρκινικοί παράγοντες, όπως οι α,β-ακόρεστες κετόνες, αντιδρούν με τις σουλφυδρυλομάδες των ενζύμων και αναστέλλουν την ανάπτυξη των καρκινικών όγκων. Η εκλεκτικότητα των χαλκονών να αντιδρούν κατά προτίμηση με σουλφυδρυλομάδες και όχι με άλλες, πιο ισχυρά πυρηνόφιλες ομάδες όπως η αμινο- ή υδροξυ-ομάδες, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς μπορεί να

οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών ενώσεων που στερούνται παρενεργειών όπως οι μεταλλάξεις που προκαλούνται από τις παράπλευρες αντιδράσεις άλλων αλκυλιωτικών αντικαρκινικών μορίων με τις αμινο- ή/και υδροξυ-ομάδες των νουκλεϊκών οξέων.^{[82],[83]} Επίσης, είναι αποδεδειγμένο ότι οι χαλκόνες, φυσικές και συνθετικές, εμφανίζουν αντικαρκινική δράση^{[84]-[87]} συνδυασμένη με αντιοξειδωτική,^[88] αντιφλεγμονώδη,^[89] και αποπτωτική^[90] δράση, με αποτέλεσμα να θεωρούνται ιδιαίτερα ελκυστικά μόρια για την ανάπτυξη νέων παραγόντων στη χημειοθεραπεία και τη χημειοπρόληψη του καρκίνου. Ως εκ τούτου, η αναγνώριση και ο ακριβής χαρακτηρισμός των χαλκονών που απαντώνται στη φύση, είτε ως στεροειδή, είτε ως νέοι θεραπευτικοί παράγοντες, είναι μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση στην καταπολέμηση ασθενειών όπως ο καρκίνος. Αν και τα παράγωγα της χαλκόνης είναι κοινά στη φύση, η γρήγορη και απλή σύνθεση ή η χημική τροποποίηση των χαλκονών επιτρέπει την ταχεία παραγωγή μεγάλου αριθμού νέων ενώσεων που μπορεί να είναι χρήσιμες τόσο για την χημειοπρόληψη όσο και για την αναστολή της καρκινογένεσης.

3. ΥΒΡΙΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ ΚΟΥΜΑΡΙΝΩΝ – ΧΑΛΚΟΝΩΝ

Ο συνδυασμός δυο φαρμακοφόρων δομών σε ένα μόριο αποτελεί συνήθη τεχνική στη φαρμακευτική χημεία καθώς οδηγεί σε μόρια με βελτιωμένες βιολογικές ιδιότητες. Συνήθως στις διάφορες θεραπείες χρησιμοποιούνται δραστικές ενώσεις (φάρμακα) που έχουν αναπτυχθεί με βάση την προσέγγιση «ενός στόχου», ενώ η επιλογή των δραστικών ενώσεων για την παραγωγή υβριδικών δομών με φαρμακευτικές ιδιότητες γενικά διευκολύνεται από τις παρατηρούμενες και / ή αναμενόμενες συνεργιστικές φαρμακολογικές δράσεις των μεμονωμένων μορίων. Ως εκ τούτου, σήμερα υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τη χρήση υβριδικών φαρμάκων πολλαπλής στόχευσης. Οι υβριδικές δραστικές ουσίες συνδυάζουν δύο φαρμακοφόρες δομές σε ένα μόριο, οδηγώντας σε μια νέα χημική δομή η οποία είναι πιο δραστική από τα μεμονωμένα συστατικά της και ικανή να αλληλεπιδρά ταυτόχρονα με πολλαπλούς στόχους, άμεσα ή έμμεσα μέσω του μεταβολισμού.^{[91]-[93]}

Τα υβριδικά μόρια ταξινομούνται, γενικότερα, σε τρεις τύπους, ανάλογα με τον τρόπο σύνδεσης των δύο δομών: ^[94]

- Συγχωνευμένα: περιέχουν και τις δύο φαρμακοφόρες δομές 
- Συντηγμένα: οι δύο δομές υπάρχουν ως μοναδικά μέρη, χωρίς υπέρθεση 

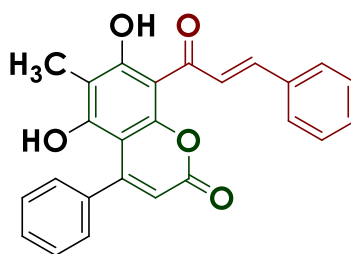
- Συζευγμένα: οι δύο δομές συνδέονται με μια διακριτή ομάδα, η οποία δεν αποτελεί τμήμα οποιασδήποτε από τις δύο φαρμακοφόρες υπομονάδες



Ο σκελετός της κουμαρίνης έχει μελετηθεί για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων, ενώ έχουν αναφερθεί υβριδικά μόρια που συνδυάζουν τη φαρμακοφόρο δομή των κουμαρινών με άλλες φαρμακοφόρες δομές, παρουσιάζοντας ένα ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων, συμπεριλαμβανομένων της αντικαρκινικής, της αντιμικροβιακής, της ανθελονοσιακής, της αντιοξειδωτικής και της αντιβιοτικής.

Κατά το σχεδιασμό των υβριδικών μορίων, ακολουθώντας διάφορες στρατηγικές υβριδοποίησης, δύναται να δημιουργηθεί μια σκελετική διάταξη ειδικά προσαρμοσμένη στο στόχο. Οι στρατηγικές υβριδοποίησης αφορούν την υποκατάσταση του ετεροκυκλικού δακτυλίου της α-πυρόνης στην 3- και 4- θέση και την υποκατάσταση του αρωματικού δακτυλίου της κουμαρίνης (θέσεις 5, 6, 7 και 8). Επιπροσθέτως, ο σχεδιασμός και η σύνθεση υβριδικών μορίων κουμαρινών μπορεί να στοχεύει στην αναστολή διαφόρων ενζύμων, με σκοπό την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση πολυάριθμων διαταραχών.^{[95],[96]}

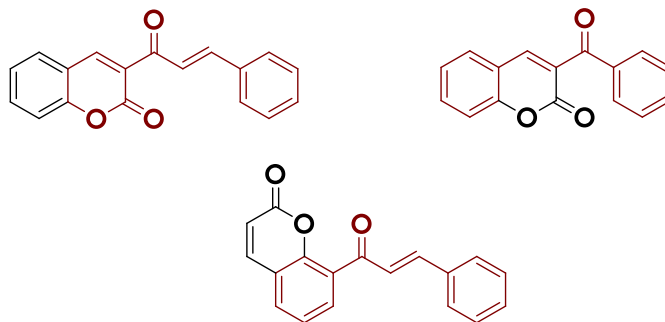
Στη φύση συναντώνται αρκετά υβριδικά μόρια κουμαρινών – χαλκονών, παρουσιάζοντας αξιόλογες βιολογικές δράσεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα φυσικού υβριδικού μορίου κουμαρίνης – χαλκόνης αποτελεί η ιντεραπτίνη Β (interruption B) (Σχήμα 26), η οποία απομονώνεται από τα φυτά *C. Interruption*^[97] και *C. Parasiticus*.^{[95],[98]} Οι αναφορές για την βιολογική της δράση είναι περιορισμένες, ενώ σύμφωνα με μελέτη του 2016, η ιντεραπτίνη Β προκαλεί διαφοροποίηση των φαιών (καφέ) λιποκυττάρων και κατανάλωση γλυκόζης σε βλαστοκύτταρα που προέρχονται από λιπώδη ιστό.^[97]



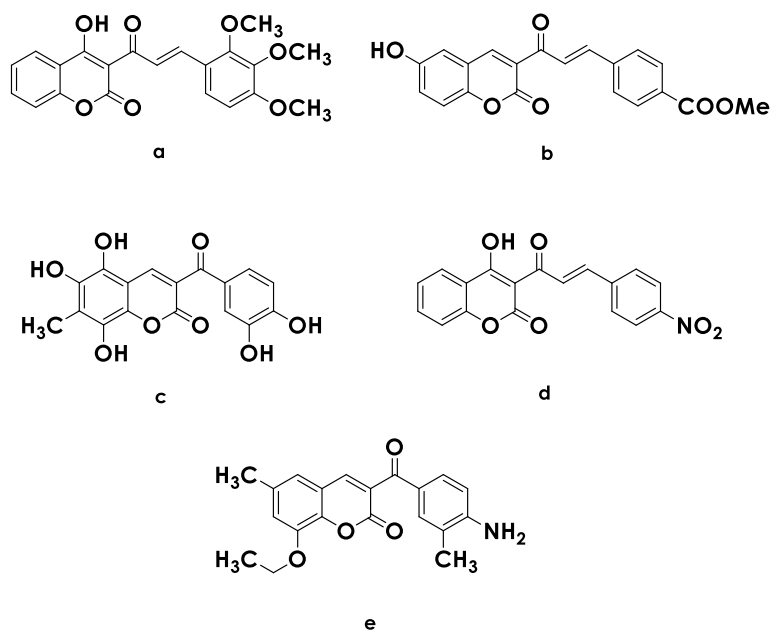
Σχήμα 26 Χημική δομή υβριδικού μορίου κουμαρίνης – χαλκόνης, ιντεραπτίνη Β.

Επιπροσθέτως, οι τρεις γενικές δομές υβριδικών μορίων κουμαρινών – χαλκονών, που φαίνονται στο Σχήμα 27, διαθέτουν διαφορετικούς υποκαταστάτες στο δακτύλιο Β της χαλκόνης και στη δομική διάταξη της κουμαρίνης και προσδίδουν πληθώρα βιολογικών δράσεων.^{[87],[95], [99]-[101]} Επίσης, στο Σχήμα 28

παρουσιάζονται υβριδικές διατάξεις κουμαρινών – χαλκονών με αξιόλογη βιολογική δράση.



Σχήμα 27 Τρεις βασικές δομές υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών.



Σχήμα 28 Χημική δομή υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών με αντικαρκινική (a, b), αντιοξειδωτική (c), ανθελονοσιακή (d) και αντιμικροβιακή (e) δράση.^[95]

1. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NMR)

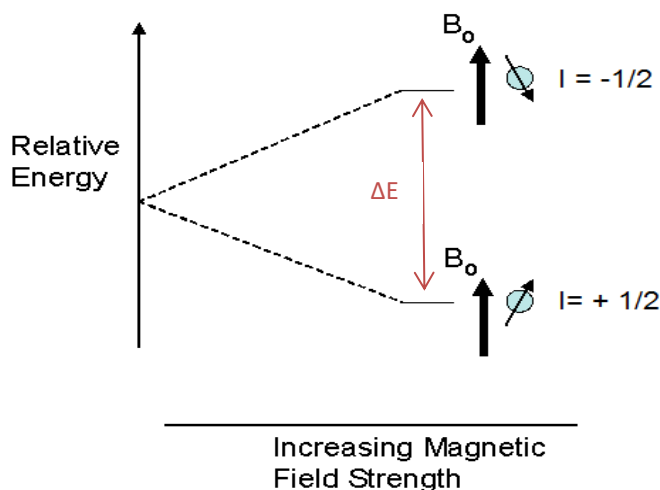
Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, κοινώς φασματοσκοπία NMR (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy), είναι μια φασματοσκοπική τεχνική για την παρατήρηση ισχυρών τοπικών μαγνητικών ομογενών πεδίων γύρω από τους ατομικούς πυρήνες. Η συχνότητα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που προκαλεί αυτές τις διεγέρσεις, βρίσκεται στην περιοχή των ραδιοκυμάτων (4 έως 900 MHz) και οι προσανατολισμένοι πυρήνες των ατόμων μεταβαίνουν από την κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας στην κατάσταση υψηλότερης ενέργειας με αναστροφή της αυτοπεριστροφής (spin) τους. Με την πραγματοποίηση αυτής της αναστροφής, οι πυρήνες συντονίζονται (εξού και ο όρος «συντονισμός») με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία.

Η συχνότητα απορρόφησης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που παρατηρείται από την αλληλεπίδρασή της με τους πυρήνες του αναλύτη είναι χαρακτηριστική για κάθε πυρήνα, με αποτέλεσμα η μέθοδος NMR να αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο για την ταυτοποίηση της δομής οργανικών ενώσεων, για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους (κυρίως για τον προσδιορισμό της καθαρότητας της ένωσης) και για το χημικό «περιβάλλον» των πυρήνων των ατόμων στα μόρια των χημικών ενώσεων. Η φασματοσκοπία NMR είναι συμπληρωματική των άλλων φασματομετρικών μεθόδων, όπως η φασματομετρία μάζας (MS) και συμβάλλει στην ταυτοποίηση ακόμη και εξαιρετικά πολύπλοκων μορίων και στη στερεοχημική διάταξη των οργανικών ενώσεων, παρέχοντας τη συγκεκριμένη στερεοχημική διάταξη του ανθρακικού σκελετού με τα υδρογόνα σ' ένα οργανικό μόριο, δεδομένου ότι οι πυρήνες που εξετάζονται στο NMR ως επί το πλείστον για την οργανική ανάλυση είναι το υδρογόνο (^1H) και ο άνθρακας-13 (^{13}C).^[103]

Λόγω της αυτοπεριστροφής των ατομικών πυρήνων γύρω από τον πυρηνικό άξονά τους, δημιουργείται ένα μαγνητικό δίπολο, μαγνητικής ροπής μ , κατά μήκος αυτού του άξονα. Η γωνιακή στροφορμή του αυτοπεριστρεφόμενου πυρήνα (I) χαρακτηρίζεται από έναν κβαντικό αριθμό spin (αυτοστροφής), που δέχεται τιμές 0, 1/2, 2/2, 3/2 κ.ο.κ. σε μονάδες $h/2\pi$, ανάλογα με το είδος του πυρήνα. Οι πυρήνες με περιττό αριθμό πρωτονίων και όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό νετρονίων εκδηλώνουν το φαινόμενο του συντονισμού, ενώ πυρήνες με άρτιο ατομικό και μαζικό αριθμό δεν παρουσιάζουν γωνιακή στροφορμή ($I = 0$) και συνεπώς δεν παρατηρούνται στο NMR. Πυρήνες με $I > 0$, όταν βρεθούν σε

εξωτερικό, ομογενές και στατικό μαγνητικό πεδίο, B_0 , συμπεριφέρονται όπως μία μαγνητική ράβδος και το άνυσμα της στροφικής ορμής τους παίρνει $2I+1$ προσανατολισμούς ως προς τη διεύθυνση του πεδίου. Σε κάθε προσανατολισμό αντιστοιχεί μία ορισμένη τιμή ενέργειας E . Για πυρήνες με κβαντικό αριθμό spin $I = \frac{1}{2}$ (όπως οι πυρήνες του ^1H και του ^{13}C) είναι πιθανοί μόνο δύο προσανατολισμοί με διαφορετική ενέργεια:

- Παράλληλος προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0 (μικρότερη ενέργεια) με $I = +\frac{1}{2}$.
- Αντιπαράλληλος προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο B_0 (μεγαλύτερη ενέργεια) με $I = -\frac{1}{2}$.



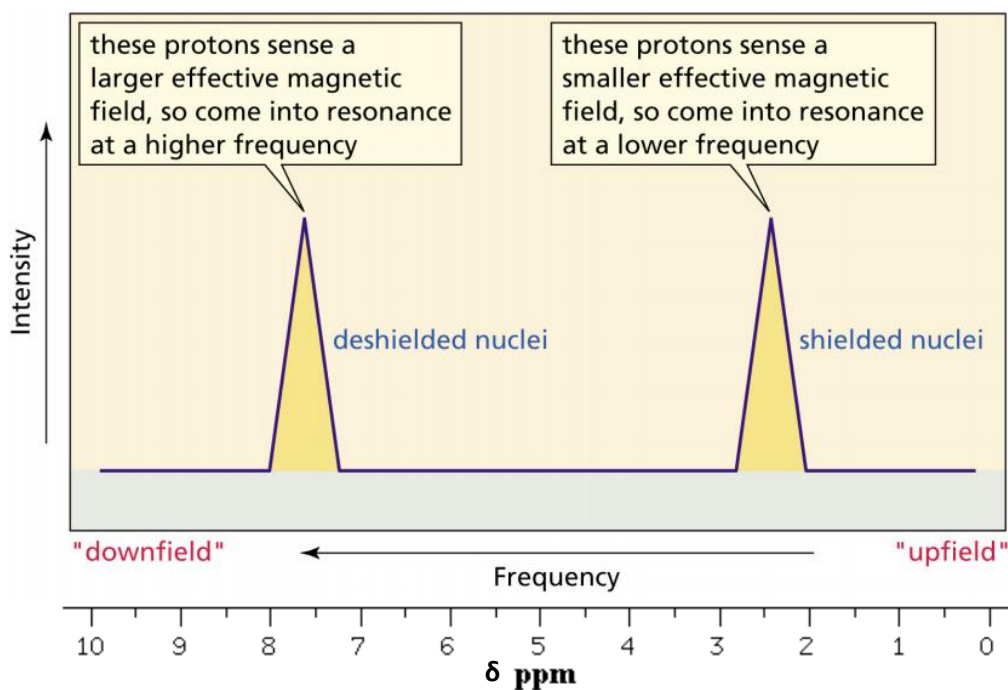
Εικόνα 5: Ενεργειακή Διαφορά ΔE μεταξύ πυρήνων με παράλληλο και αντιπαράλληλο spin σε σχέση με το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο (B_0).

Τα φάσματα NMR βασίζονται στην ύπαρξη χημικής μετατόπισης (chemical shift), που συνίσταται στην εξάρτηση της συχνότητας συντονισμού των μαγνητικών πυρήνων από το χημικό τους περιβάλλον, δηλαδή, χημικά μη ισοδύναμοι πυρήνες προστατεύονται σε διαφορετικό ποσοστό από τα ηλεκτρόνιά τους και επομένως συντονίζονται σε διαφορετικές συχνότητες δίνοντας διαφορετικά σήματα (κορυφές). Χαρακτηριστικό, επίσης, φασμάτων NMR οργανικών ενώσεων αποτελεί ο διαχωρισμός μίας κορυφής συντονισμού σε ομάδα πολλαπλών συμμετρικών κορυφών, που οφείλεται στην αλληλεπίδραση των spin των γειτονικών πυρήνων, δηλαδή στο φαινόμενο της spin/spin συζεύξεως (spin/spin coupling).

Τα πρωτόνια συντονίζονται σε διαφορετικές συχνότητες, ανάλογα με το είδος του δεσμού H-X και την ύπαρξη στο μόριο ομάδων, που επηρεάζουν τη

συμπεριφορά των πρωτονίων. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στο ότι τα ηλεκτρόνια «προστατεύουν» ή «θωρακίζουν» τον πυρήνα (διαμαγνητική θωράκιση), δημιουργώντας με την επίδραση του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου ένα μικρό τοπικό μαγνητικό πεδίο αντίθετης κατεύθυνσεως από το εφαρμοζόμενο. Σε δεσμούς $H \rightarrow X$, όπου X δέκτης ηλεκτρονίων, η ηλεκτρονιακή πυκνότητα στον πυρήνα υδρογόνου είναι ελαττωμένη, με επακόλουθο τη μειωμένη ηλεκτρονική προστασία και τη μετατόπιση του σήματος συντονισμού σε μεγαλύτερες τιμές συχνοτήτων (αριστερό τμήμα του φάσματος). Αντίθετα, σε δεσμούς $H \leftarrow Y$, όπου Y δότης ηλεκτρονίων, η ηλεκτρονική πυκνότητα στον πυρήνα υδρογόνου θα είναι αυξημένη και η συχνότητα συντονισμού μετατοπισμένη σε μικρότερες τιμές συχνοτήτων (δεξιό τμήμα του φάσματος).

Η θέση συντονισμού ενός πρωτονίου εκφράζεται σε σχέση με μία πρότυπη ένωση. Εάν ν_δ και ν_σ είναι οι συχνότητες συντονισμού του εξεταζόμενου πρωτονίου (ή ομάδας πρωτονίων) του δείγματος και της ουσίας αναφοράς, αντίστοιχα, και ν_0 η βασική συχνότητα λειτουργίας του φασματομέτρου (σε Hz), τότε η χημική μετατόπιση εκφράζεται με την κλίμακα δ , όπου $\delta = \frac{\nu_\delta - \nu_\sigma}{\nu_0} \cdot 10^6$ ppm.

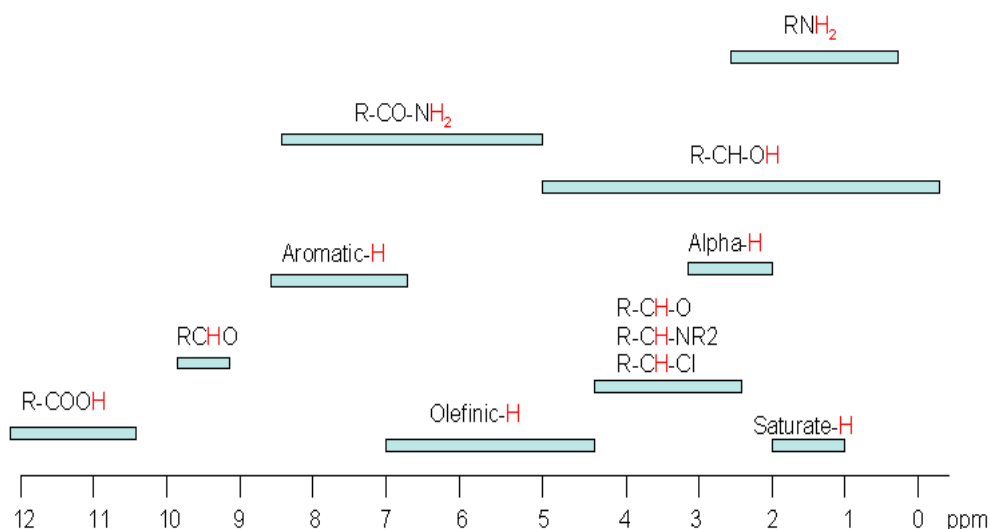


Εικόνα 6: Άξονας φάσματος NMR.

Σε πολλά φάσματα 1H NMR οι κορυφές συντονισμού διαχωρίζονται σε συμμετρικές πολλαπλές ομάδες κορυφών (διπλές, τριπλές, κλπ.) λόγω της αλληλεπίδρασεως των spin γειτονικών πρωτονίων. Η πολλαπλότητα αυτή καλείται

spin/spin σύζευξη και οφείλεται στην αλληλεπίδραση των spin γειτονικών μαγνητικών πυρήνων, η οποία διαδίδεται όχι μέσω του χώρου, αλλά μέσω δεσμών του μορίου. Η σύζευξη μεταξύ δύο πυρήνων (ή δύο ομάδων ισότιμων πυρήνων) χαρακτηρίζεται από τη σταθερά συζεύξεως J , που είναι η απόσταση σε Hz των επιμέρους κορυφών και είναι ανεξάρτητη από την ένταση του μαγνητικού πεδίου (εξαρτάται από τη γεωμετρία του μορίου, π.χ. όρθο, πάρα, μέτα θέσεις υποκαταστατών). Όταν μία ομάδα μαγνητικά ισοδύναμων ^1H , δηλαδή πρωτονίων με ίδιο J , έχει η ισότιμα γειτονικά ^1H , τα ^1H της ομάδας δίνουν μία σύνθετη κορυφή στο φάσμα NMR με πολλαπλότητα $(n+1)$.

Πρωτόνια που έχουν το ίδιο χημικό περιβάλλον και είναι χημικώς ισότιμα (ισοδύναμα), είναι συνήθως και μαγνητικώς ισότιμα. Επομένως, τα πρωτόνια αυτά δίνουν μία μόνο κορυφή. Όταν τα πρωτόνια είναι μεν χημικώς ισοδύναμα, αλλά όχι μαγνητικώς, παρατηρούνται διαφορετικά σήματα συντονισμού. Παραδείγματος χάριν, τα πρωτόνια μίας μεθοξυ-ομάδας υφίστανται μεγαλύτερη αποθωράκιση λόγω του ηλεκτρονιόφιλου οξυγόνου σε σχέση με τα μεθυλικά.



Εικόνα 7: Χημικές μετατοπίσεις των κυριότερων χαρακτηριστικών ομάδων στο φάσμα ^1H NMR.

2. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (MS)

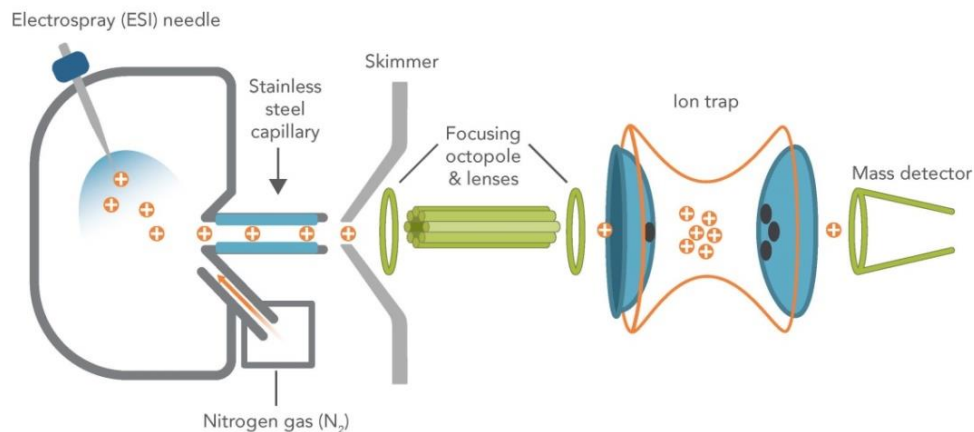
Η μοριακή φασματομετρία μάζας, ή εν συντομία φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) αποτελεί ένα αναλυτικό εργαλείο απαραίτητο για τη διερεύνηση της δομής των οργανικών και ανόργανων ενώσεων. Οι ποιοτικές εφαρμογές συμπεριλαμβάνουν ταυτοποίηση δομής αγνώστων συστατικών, όπως φυσικών προϊόντων, μεταβολιτών φαρμάκων, συνθετικών ουσιών, η οποία επιτυγχάνεται με τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους, του μοριακού τύπου ή της στοιχειακής σύστασης. Μπορεί να προσδιορίσει μοριακά βάρη ενώσεων έως και 4000, ενώ χρησιμοποιείται για την ποιοτική ανάλυση αερίων, υγρών και – υπό ειδικές συνθήκες – στερεών δειγμάτων. Στην ποσοτική ανάλυση, η MS εφαρμόζεται για την ανάπτυξη προτύπων μεθόδων αναφοράς και για τον ποσοτικό προσδιορισμό πολύπλοκων οργανικών ενώσεων, όπως διοξινών, ναρκωτικών ουσιών, ενώ τελευταία εφαρμόζεται για το χαρακτηρισμό βιομακρομορίων.^[103]

Βασίζεται στην παραγωγή ιόντων κατά τον ιονισμό του μορίου και τον διαχωρισμό τους βάσει του λόγου μάζας/φορτίου (m/z) του ιόντος. Τα ιόντα περιέχουν περίσσεια ενέργειας και θραύονται στη συνέχεια σε ιόντα μικρότερου μεγέθους. Η θραυσματοποίηση πραγματοποιείται μέσω σχάσης ή αντιδράσεων ανασύνταξης, παρέχοντας πληροφορίες για την δομή του αρχικού μορίου, ενώ μετά την επιτάχυνσή τους από ένα ηλεκτρικό πεδίο, τα ιόντα εισέρχονται στον αναλυτή μαζών, όπου διαχωρίζονται με βάση το λόγο m/z . Εν συνεχεία, τα ιόντα διαφορετικών μαζών καταγράφονται με κατάλληλο ανιχνευτή, ενώ το σύστημα βρίσκεται υπό υψηλό κενό για την αποφυγή διαμοριακών συγκρούσεων.^[105]

Η επιλογή της τεχνικής ιονισμού που θα εφαρμοστεί είναι μεγάλης σημασίας για την ανάλυση που θα ακολουθήσει. Για την ίδια ένωση, το λαμβανόμενο φάσμα μπορεί να είναι εντελώς διαφορετικό με εφαρμογή διαφορετικών τεχνικών και συνθηκών ιονισμού. Ένας διαχωρισμός των τεχνικών ιονισμού μπορεί να γίνει σε "μαλακές" και "σκληρές" τεχνικές. Στις σκληρές τεχνικές ιονισμού χρησιμοποιείται υψηλή ενέργεια που προκαλεί διάσπασή της σε θυγατρικά ιόντα (θραύση). Μαλακές καλούνται οι τεχνικές που επιτυγχάνουν τον ιονισμό σε ηπιότερες συνθήκες με μικρή ή μηδαμινή θραύση. Όσον αφορά μη πτητικές ενώσεις, ο ιονισμός πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρική πίεση, με απευθείας μετατροπή του δείγματος σε αερώδη ιόντα. Οι τεχνικές ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης περιλαμβάνουν τον Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray, ESI), το Χημικό Ιονισμό σε ατμοσφαιρική Πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation, APCI) και το Φωτοϊονισμό σε Ατμοσφαιρική Πίεση (Atmospheric Pressure Photo Ionisation, APPI). Η επιλογή της τεχνικής ή των διάφορων μορφών αυτής εξαρτάται από την απόδοση ιονισμού ανά περίπτωση.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας για την ταυτοποίηση των συντιθέμενων μορίων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική φασματομετρίας μάζας υψηλής

διακριτικής ικανότητας (High Resolution MS) με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού (ESI-HRMS). Η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού (ESI) αποτελεί την κυριότερη μέθοδο σύζευξης υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών. Το έκλουσμα της στήλης εισέρχεται μέσω τριχοειδούς σωλήνα μέσα σε πεδίο 3-5 kV. Παράλληλα με τον τριχοειδή, διαβιβάζεται αέριο για δημιουργία εκνεφώματος. Το υγρό διασπείρεται σε νέφος από μικρές φορτισμένες σταγόνες και ο διαλύτης εξατμίζεται ταχύτατα ιονίζοντας τις αναλυόμενες ενώσεις. Το φαινόμενο ονομάζεται εξάτμιση με ιονισμό (ion evaporation) και εντάσσεται στις μαλακές/ήπιες τεχνικές ιονισμού. Ανάλογα με τις συνθήκες θερμοκρασίας και το δυναμικό μπορεί να λαμβάνει ή να μη λαμβάνει χώρα θραύση των μορίων, οπότε το φάσμα μπορεί να διαφέρει πολύ. Η διάταξη επιτρέπει την ανάλυση μεγαλομορίων (πρωτεΐνες, νουκλεοτίδια κλπ.), ενώ καλύπτει το μεγαλύτερο πεδίο εφαρμογής για την ανάλυση βιομορίων καθώς επιτυγχάνει τον ιονισμό πολλών κατηγοριών βιομορίων, όπως πεπτίδια, πρωτεΐνες, αμινοξέα, οργανικά οξέα, νουκλεοτίδια, σάκχαρα, βιταμίνες, και σχεδόν όλες τις κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών (αλκαλοειδή, φαινόλες, τερπενοειδή, γλυκοζίτες κλπ.). Επίσης στη βιοφαρμακευτική ανάλυση, η χρήση του ESI επικρατεί, γιατί τα περισσότερα φάρμακα εμπίπτουν στις κατηγορίες μορίων τα οποία ιονίζονται αποδοτικότερα με ESI (βιομόρια, πεπτίδια ή και αντισώματα).^[106]



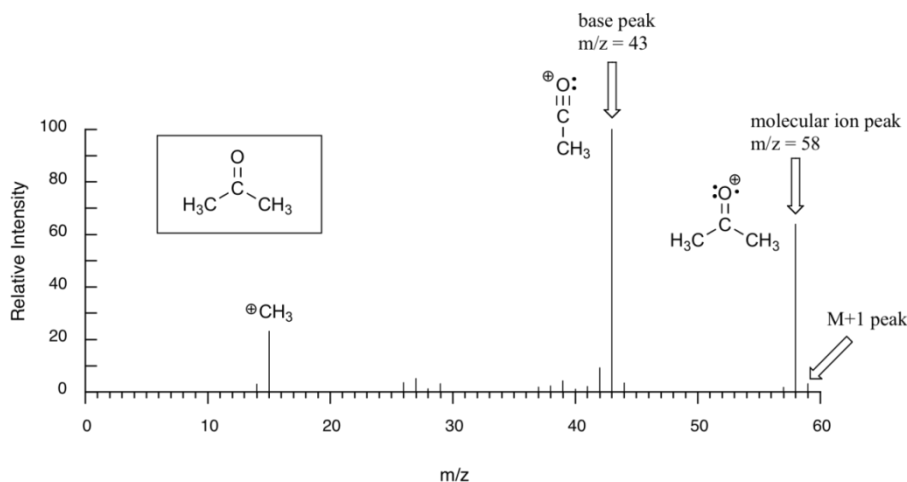
Εικόνα 8: Διάγραμμα ροής φασματομετρίας ESI-MS.^[107]

Το φάσμα μάζας εκφράζει τη στατιστική αφθονία ή ένταση κάθε είδους ιόντων που σχηματίζεται ως συνάρτηση της αναλογίας μάζας/φορτίου (m/z). Ένα φάσμα μάζας έχει ως τεταγμένη την ένταση των κορυφών (σε ποσοστό επί τοις εκατό) και ως τετμημένη το λόγο m/z , εκφρασμένη σε amu (atomic mass units) ή

Da (Dalton). Η αφθονία των μαζών μπορεί να καταγραφεί με δύο διαφορετικούς τρόπους: ως συνεχές φάσμα μια μάζας ή περιοχής μαζών, όπου το σήμα του ιόντος εμφανίζει κορυφή και ως φάσμα ιόντων υπό τη μορφή ραβδογράμματος (bar spectrum).

Το κύριο ιόν που παράγεται από την απώλεια ενός ηλεκτρονίου του μορίου μιας ένωσης είναι το μοριακό ιόν, συμβολίζεται με M^+ και δίνει ένα πολύ απλό φάσμα μάζας που αποτελείται μόνο από τη μητρική κορυφή, η οποία δίνει το ακριβές μοριακό βάρος της ένωσης. Ως μοριακό ιόν M^+ ορίζεται αυτό που αποτελείται από τα πιο διαδεδομένα ισότοπα των στοιχείων που απαρτίζουν την ένωση, συνεπώς τα άλλα μοριακά είδη, που αποτελούνται από πιο βαριά ισότοπα συμβολίζονται ως $(M+1)^+$, $(M+2)^+$ κ.λ.π. Στην περίπτωση που το αρχικό μόριο διασπάται σε πολλά θραύσματα και η μητρική κορυφή εμφανίζεται πολύ ασθενής ή καθόλου, η μεγαλύτερη κορυφή που παρατηρείται ονομάζεται βασική κορυφή και αντιστοιχεί στο βασικό ιόν. Στο βασικό ιόν αποδίδεται αυθαίρετα η τιμή 100 και οι άλλες κορυφές εκφράζονται ως ποσοστά επί τοις % της βασικής αυτής κορυφής (κανονικοποιημένο φάσμα).

Τέλος, ευρύτερες είναι οι εφαρμογές της φασματομετρίας μάζας, η δύναμη της οποίας έγκειται στη δυνατότητα ανίχνευσης ουσιών σε πολύ μικρά επίπεδα συγκεντρώσεων (ppb, ppt σε ορισμένες περιπτώσεις). Ορισμένες χαρακτηριστικές εφαρμογές της μεθόδου αποτελούν: ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους, η ταυτοποίηση ανγώστου ενώσεως, η ανίχνευση προσμίξεων, ο χαρακτηρισμός πολυμερών και ο προσδιορισμός στοιχείων (μέσω Ατομικής Φασματομετρίας Μάζας), ενώ χρησιμοποιείται επίσης ως συνδυασμένη τεχνική με φασματομετρία συζευγμένου πλάσματος (ICP) και τον αέριο ή υγρό χρωματογράφο (GC-MS, LC-MS).



Εικόνα 9: Χαρακτηριστικό φάσμα MS για την ακετόνη $((\text{CH}_3)_2\text{CO})$.

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

1. ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις στα τρόφιμα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως παράγοντες προστασίας του οργανισμού, καθώς σύμφωνα με επιστημονικά δεδομένα μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης χρόνιων ασθενειών όπως ο καρκίνος και οι καρδιακές παθήσεις. Βασικές πηγές αντιοξειδωτικών που απαντώνται στη φύση αποτελούν τα φρούτα, τα λαχανικά και τα δημητριακά ολικής άλεσης. Αντιοξειδωτικά προερχόμενα από φυτά, όπως η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, τα καροτενοειδή και τα φαινολικά οξέα (στα οποία υπάγονται τα κουμαρινικά ανάλογα) έχουν τη δυνατότητα μείωσης του κινδύνου εμφάνισης ασθενειών. Είναι σε θέση να μειώσουν ή να αποτρέψουν την οξείδωση άλλων ευαίσθητων μορίων μέσω διαφορετικών μηχανισμών, όπως η συμπλοκοποίηση μεταλλικών ιόντων, η δέσμευση ελευθέρων ριζών ή η αναστολή των προ-οξειδωτικών ή προ-φλεγμονωδών ενζύμων.^{[109]-[111]}

Οι ελεύθερες ρίζες και οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS) είναι άτομα, μόρια ή ιόντα που διαθέτουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια, τα οποία είναι ιδιαίτερα δραστικά. Οι ROS είναι εξαιρετικά δραστικές (λόγω του μονήρους ηλεκτρονίου που διαθέτουν) και ικανές να εκκινήσουν ταχείες αντιδράσεις αποσταθεροποίησης άλλων μορίων, ενώ παράγουν πληθώρα άλλων ελευθέρων ριζών. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου σχηματίζονται ως ένα φυσικό παραπροϊόν του φυσιολογικού μεταβολισμού του οξυγόνου, ενώ είναι υπεύθυνες για τις τοξικές επιδράσεις στο σώμα, προκαλώντας σημαντικές βλάβες στις κυτταρικές δομές. Αθροιστικά, τα παραπάνω είναι γνωστά ως «οξειδωτικό στρες», μια ειδική κατάσταση στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα ενός ιστού όταν ανατρέπεται η ισορροπία μεταξύ αντιοξειδωτικών και οξειδωτικών παραγόντων προς όφελος των τελευταίων. Στις δραστικές μορφές οξυγόνου ανήκουν οι ρίζες υδροξυλίου ($\text{HO}\cdot$), οι ρίζες οξυ- ή υπεροξυ-λιπιδίων, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το μονοατομικό οξυγόνο, το υπεροξυνιτρικό ανιόν (ONOO^-) που σχηματίζεται από το μονοξείδιο του αζώτου.^[112]

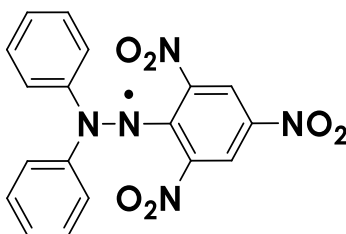
Τα αντιοξειδωτικά στον οργανισμό παράγονται συνεχώς και απομακρύνονται από το βιολογικό σύστημα μέσω μεταβολικών διεργασιών, ενώ διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πληθώρα φυσιολογικών βιοχημικών λειτουργιών. Χαρακτηριστικά, συμμετέχουν κατά τη σήμανση της κυτταρικής απόπτωσης, στη γονιδιακή έκφραση, στη μεταφορά ιόντων και στις μη φυσιολογικές παθολογικές διεργασίες. Η υπερπαραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου δύναται να επιφέρει επιβλαβείς συνέπειες. Χαρακτηριστικά, οι παραγόμενες κατά το οξειδωτικό στρες ROS, μπορεί να συμβάλλουν στην πρόοδο της νόσου του Chagas^[113] και

σε ασθένειες όπως ο διαβήτης, ο καρκίνος, η αρθρίτιδα και η αρτηριοσκλήρυνση.^[114]

Η αντιοξειδωτική δράση φυσικών και συνθετικών ενώσεων μπορεί να προσδιοριστεί μέσω διαφόρων δοκιμών που έχουν αναπτυχθεί. Αναφέρονται, χαρακτηριστικά, η μέθοδος DPPH και η μέθοδος AAPH, οι οποίες εκφράζουν την αναγωγική ικανότητα των ενώσεων να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH και την ικανότητά τους να αναστέλλουν την υπεροξειδωση του λιπελαϊκού οξέος, αντίστοιχα.

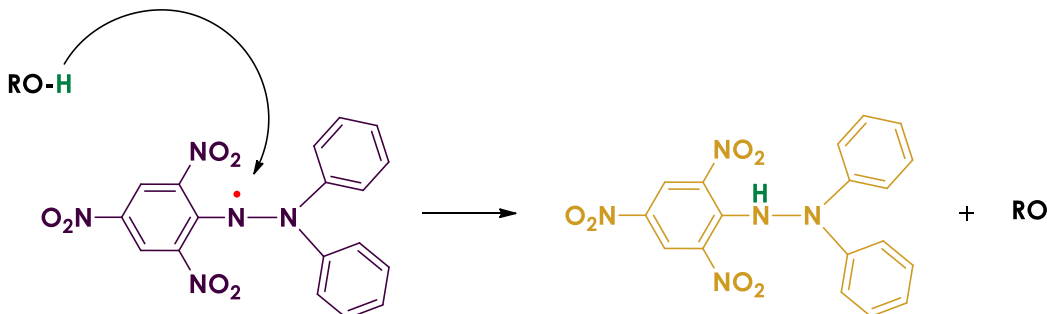
1.1. Μέθοδος DPPH

Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε από τους Brand – Williams et al.^[115] για πρώτη φορά και χρησιμοποιείται εκτεταμένα για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων οργανικών ενώσεων, καθώς επίσης και για την αναστολή αντιδράσεων πολυμερισμού. Η ρίζα DPPH (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζίλη) είναι μια από τις λίγες σταθερές και εμπορικά διαθέσιμες οργανικές ρίζες αζώτου. Ειδικότερα, η ρίζα DPPH (Σχήμα 29) δεν αποσυντίθεται, ενώ δεν αντιδρά με το οξυγόνο και χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης φυσικών μορίων όπως βιταμίνες και εκχυλίσματα φυτών καθώς και συνθετικών μορίων.^[116]



Σχήμα 29 Χημική δομή της ρίζας DPPH.

Η ελεύθερη ρίζα DPPH διαθέτει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο και κατά τη διάλυσή της εμφανίζει ένα έντονο πορφυρό χρώμα, το οποίο μπορεί να μετρηθεί φωτομετρικά στα 517 nm. Παρουσία ενώσεων οι οποίες δύνανται να δώσουν ή να μεταφέρουν ένα μόριο υδρογόνου, η ρίζα αποχρωματίζεται, δίνοντας ένα υποκίτρινο χρώμα.^{[117],[118]} Ειδικότερα, η σύζευξη του μονήρους ηλεκτρονίου οδηγεί σε στοιχειομετρική ελάττωση της απορρόφησης σε σχέση με τον αριθμό των ηλεκτρονίων που προσλαμβάνονται, οδηγώντας στην εξασθένηση του πορφυρού χρώματος του διαλύματος στα 517 nm. Η μεταβολή της έντασης απορρόφησης που παρατηρείται κατά την αντίδραση, χρησιμοποιείται ως ένδειξη της ικανότητας των ενώσεων να δρουν ως σαρωτές/δεσμευτές ελευθέρων ριζών και κατ' επέκταση της αντιοξειδωτικής τους δράσης (Σχήμα 30).^[119]



Σχήμα 30 Αντίδραση της ρίζας DPPH με δεσμευτές ελευθέρων ριζών.

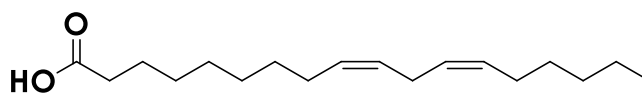
Παρότι η μέθοδος DPPH χρησιμοποιείται ευρέως, διότι είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική και πραγματοποιείται σε μικρό χρονικό διάστημα, υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί. Συγκεκριμένα, η ελεύθερη ρίζα (που εντοπίζεται στο κέντρο της δομής) είναι προσβάσιμη κυρίως από μικρά μόρια, ενώ τα μεγαλύτερα μόρια παρουσιάζουν περιορισμένη πρόσβαση (λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης).^[120] Επίσης, ορισμένες ενώσεις όπως τα καροτενοειδή απορροφούν ισχυρά στο ίδιο μήκος κύματος με την ρίζα DPPH^[121], ενώ για τις ενώσεις οι οποίες δεν αποτελούν δότες υδρογόνου, η αντιοξειδωτική τους δράση δεν μπορεί να προσδιοριστεί με τη μέθοδο αυτή.

Αναφορικά με τις φαινολικές ενώσεις, η αντιοξειδωτική δράση, εκφρασμένη μέσω της ικανότητας δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, επηρεάζεται από: ^[118]

- τη σταθερότητα της φαινολικής ρίζας που δημιουργείται μετά τη μεταφορά ατόμων H (υδρογόνου) από τη φαινολική ένωση στο DPPH
- τον αριθμό ατόμων υδρογόνου που παρέχουν οι φαινολικές ενώσεις
- την ταχύτητα με την οποία οι φαινολικές ενώσεις παρέχουν τα άτομα H
- την ευκολία με την οποία οι ρίζες των φαινολικών ενώσεων μπορούν να συνδυαστούν με πιο δραστικές ελεύθερες ρίζες και
- τη δυνατότητα σχηματισμού ή μη ενός νέου αντιοξειδωτικού μετά τη μεταφορά ατόμων υδρογόνου από τη φαινολική ένωση.

1.2. Μέθοδος AAPH

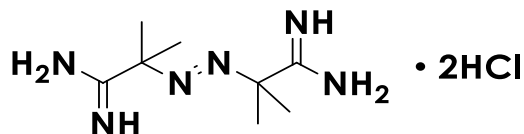
Η μέθοδος AAPH εκφράζει την ικανότητα των ενώσεων να αναστέλλουν την υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος (linoleic acid, LA), το οποίο είναι ένα πολυακόρεστο ωμέγα-6 λιπαρό οξύ και ένα από τα απαραίτητα λιπαρά οξέα για τον ανθρώπινο οργανισμό.^[122]



Σχήμα 31 Χημική δομή του λινελαϊκού οξέος.

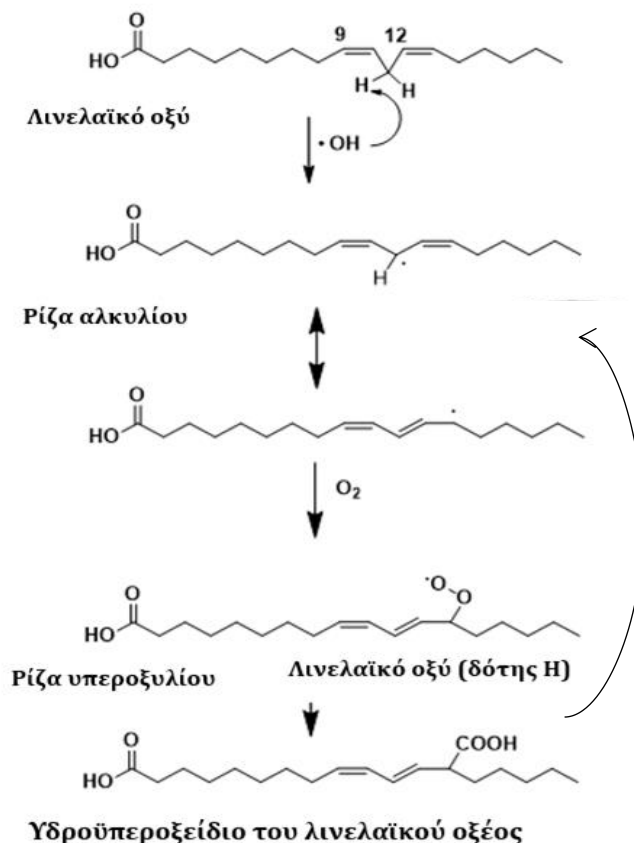
Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) προσβάλλουν τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, πυροδοτώντας αλυσιδωτές αντιδράσεις λιπιδικής υπεροξειδωσης. Η λιπιδική υπεροξειδωση και η προκαλούμενη βλάβη του DNA σχετίζονται με πληθώρα χρόνιων προβλημάτων υγείας, όπως ο καρκίνος, η γήρανση και η αθηροσκλήρυνση.^{[123]-[125]} Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις (ή ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση) μπορούν να σαρώσουν τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και τις ρίζες υπεροξειδίου, τερματίζοντας την αλυσιδωτή αντίδραση της υπεροξειδωσης και με τον τρόπο αυτό να αποτρέψουν ή να αντιμετωπίσουν ορισμένες παθολογικές καταστάσεις. Η λιπιδική υπεροξειδωση αποτελείται από τρία κύρια στάδια: έναρξη, διάδοση και τερματισμό.

Στην περίπτωση του λινελαικού οξέος, η *in vitro* έναρξη της λιπιδικής υπεροξειδωσης μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε μέσω μεταλλικών ιόντων Fe^{2+} ή Cu^{+} με H_2O_2 (αντίδραση Fenton), είτε θερμικά με τη χρήση του υδατοδιαλυτού αζω-εκκινητή 2,2'-αζοδις-(2-αμιδινοπροπανο)διϋδροχλώριο (AAPH) (Σχήμα 32).



Σχήμα 32 Χημική δομή του εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH.

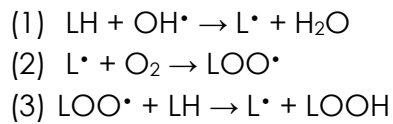
- Εκκίνηση με μεταλλικά ιόντα: τα ιόντα σιδήρου (Fe^{2+}) ή χαλκού (Cu^{+}) αντιδρούν με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και παράγουν την εξαιρετικά δραστική ρίζα $\cdot OH$. Αυτές οι ρίζες ($\cdot OH$, $R\cdot$ και $ROO\cdot$) προσβάλλουν ένα υδρογόνο του μεθυλενίου του λινελαικού οξέος για να σχηματίσουν λιπιδική ρίζα και λιπιδικό υπεροξείδιο παρουσία O_2 , πυροδοτώντας την αλυσιδωτή αντίδραση. Το υπόστρωμα του λινολεϊκού οξέος (ή τα ανάλογά του) μπορεί να επωαστεί με τον εκκινητή (είτε AAPH είτε Fe^{2+} / H_2O_2) απουσία ή παρουσία αντιοξειδωτικών σε ομοιογενές διάλυμα.
- Θερμική εκκίνηση: ο εκκινητής AAPH αποσυντίθεται σε θερμοκρασία $37\text{ }^\circ C$ σε υδατικά διαλύματα και σχηματίζει ρίζα αλκυλίου ($R\cdot$), η οποία παρουσία οξυγόνου μετατρέπεται στις αντίστοιχες ρίζες υπεροξειδίου ($ROO\cdot$), καθιστώντας εύκολο τον έλεγχο και τη μέτρηση του ρυθμού δημιουργίας ελευθέρων ριζών. Η μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης πολλών ενώσεων, βοτάνων, της μπύρας και του κρασιού με τη χρήση του AAPH ως εκκινητή ελευθέρων ριζών (Μέθοδος AAPH) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως, καθώς αποτελεί μια γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδο. Επιπλέον, η μέθοδος χρησιμοποιείται και στην περίπτωση της αιμόλυσης που εγείρεται από το AAPH παρέχοντας μια καλή προσέγγιση για τη μελέτη της βλάβης των κυτταρικών μεμβρανών που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες.^[126]



Σχήμα 33 Μηχανισμός υπεροξειδωσης του λινελαϊκού οξέος.^[102]

Ο μηχανισμός της λιπιδικής υπεροξειδωσης περιλαμβάνει τα στάδια που εμφανίζονται στο παραπάνω Σχήμα 33. Σημειωτέον ότι ο ίδιος μηχανισμός ακολουθείται κατά την λιπιδική υπεροξειδωση του συνόλου των λιπαρών οξέων, όπως των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, των φωσφολιπιδίων, των γλυκολιπιδίων και της χοληστερόλης.^{[127],[128]} Η αλυσιδωτή αντίδραση εκκινεί με τη δράση των ριζών υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$), οι οποίες προσβάλλουν τη μεθυλενική ομάδα του λινελαϊκού οξέος που βρίσκεται μεταξύ των δυο διπλών δεσμών (C-9 και C-12). Οι διπλοί δεσμοί δρουν ως δότες ηλεκτρονίων, ελκύοντας τη ρίζα $\text{OH}\cdot$ στο σημείο της αλυσίδας με το $-\text{CH}_2-$, αποσπώντας ένα υδρογόνο και σχηματίζοντας την ελεύθερη ρίζα $-\text{CH}_2\cdot$. Στο σημείο αυτό της αλυσίδας του λινελαϊκού οξέος πραγματοποιείται μετάθεση του διπλού δεσμού, οδηγώντας στο σχηματισμό ενός συζυγιακού διενίου χαμηλότερης εντροπίας από την αρχική ελεύθερη ρίζα του λινελαϊκού οξέος. Στη συνέχεια, ένα μόριο οξυγόνου αντιδρά προς το σχηματισμό της ρίζας του λινελαϊκού υπεροξειδίου ($\text{LOO}\cdot$). Οι αντιδράσεις της λιπιδικής υπεροξειδωσης συνεχίζονται με την αλυσιδωτή αντίδραση των δραστικών υπεροξειδίων του λινελαϊκού οξέος τα οποία αποσπών ένα υδρογόνο από νέα μόρια λινελαϊκού οξέος με το σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων (LOOH).

Κατά την αντίδραση λιπιδικής υπεροξειδωσης, οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι οι εξής (όπου LH το λινελαϊκό οξύ):



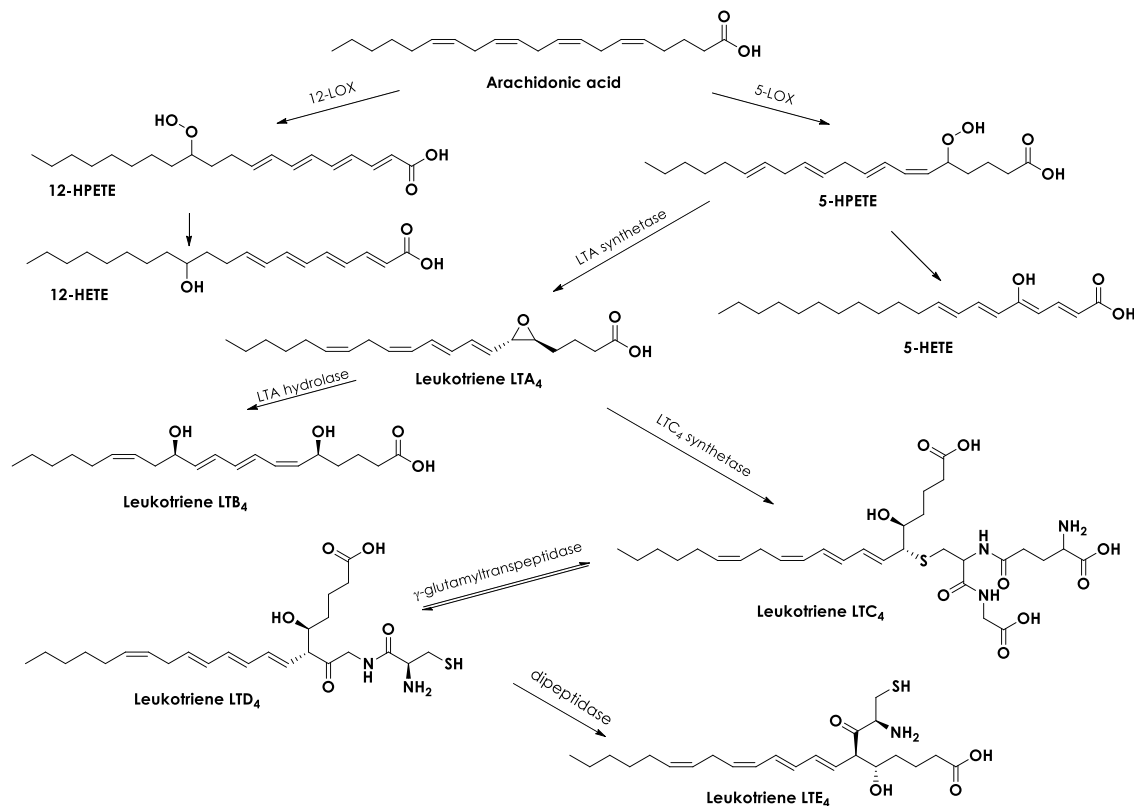
2. ΑΝΤΙΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΔΡΑΣΗ

Η αντιφλεγμονώδης δράση των νέων κουμαρινικών αναλόγων εκφράζεται μέσω της ικανότητάς τους να αναστέλλουν τη δράση της φυτικής λιποξυγονάσης (LOX). Οι λιποξυγονάσες αποτελούν μία οικογένεια πρωτεϊνών, ευρέως διαδεδομένων στη φύση, οι οποίες περιέχουν ένα «μη τύπου αίμης» άτομο σιδήρου στο ενεργό τους κέντρο, ενωμένο με πέντε μόρια ιστιδίνης. Οι LOX είναι ένζυμα που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος, οι μεταβολίτες του οποίου, όπως τα λευκοτριένια (LTs) και οι λιποξίνες, αποτελούν τους κυριότερους προ-φλεγμονώδεις μεσολαβητές που απελευθερώνονται κυρίως από τα λευκά αιμοσφαίρια στον ανθρώπινο οργανισμό.^[129]

Οι κυριότερες λιποξυγονάσες που συναντώνται στα ζωικά κύτταρα είναι οι 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX (εκφράζεται κυρίως στα αιμοπετάλια και στο δέρμα) και 15-LOX (εκφράζεται κυρίως στον προστάτη και στον κερατοειδή)^[130], η ονομασία των οποίων προέρχεται από το άτομο του άνθρακα, στο μόριο του αραχιδονικού οξέος, στο οποίο εισάγεται το οξυγόνο και πραγματοποιείται η υπεροξειδωση (οξειδωση ατόμων άνθρακα 5-, 8-, 12- και 15- του αραχιδονικού οξέος στα θηλαστικά). Οι παραπάνω λιποξυγονάσες καταλύουν την οξειδωση ελεύθερων και εστεροποιημένων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που περιέχουν ομάδα 1,4-cis-πενταδιενίου, παράγοντας υδροϋπεροξυ-παράγωγα (όπως το υδροϋπεροξυεικοσιτετρανοϊκό οξύ, HPETE).^[129]

Η ανθρώπινη λιποξυγονάση 5-LOX καταλύει τον σχηματισμό των λευκοτριενίων ή του εικοσατετραενοϊκού οξέος από το αραχιδονικό οξύ. Αναλυτικότερα, ο μηχανισμός έχει ως εξής: σε πρώτο στάδιο, η μετατροπή του αραχιδονικού οξέος σε λευκοτριένια καταλύεται από την 5-LOX κατά την μετατροπή του στο υδροϋπεροξείδιο 5-HPETE, εισάγοντας μοριακό οξυγόνο στη θέση 5, με τη βοήθεια της πρωτεΐνης που ενεργοποιεί την 5-LOX (FLAP). Αυτό το ενδιάμεσο (5-υδροϋπεροξυεικοσατετραενοϊκό οξύ, 5-HPETE) ανάγεται αμέσως στο 5-υδροξυεικοσατετραενοϊκό οξύ, 5-HETE). Το 5-HPETE, με την απομάκρυνση ενός μορίου νερού, μπορεί να μετατραπεί σε ένα ασταθές 5,6-εποξείδιο με ένα συζευγμένο τριένιο (LTA₄), το οποίο έπειτα είτε μετατρέπεται στο LTB₄, μέσω της υδρολάσης του LTA₄, με εισαγωγή ενός υδροξυλίου στον C-12 ^{[131],[132]}, είτε στο

LTC₄ με σύζευξη με γλουταθειόνη (GSH), από την γλουταθεινυλο-S-τρανσφεράση.^[133]



Σχήμα 34 Βιοσυνθετική πορεία λευκοτριενίων, μέσω επίδρασης της LOX στο μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος.^[134]

Προϊόντα μεταβολισμού λιποξυγονασών

➤ Λευκοτριένια A₄, B₄, C₄, D₄, E₄: Προκαλούν βρογχόσπασμο (άσθμα), αύξηση της διαπερατότητας αγγείων^[135]. Παθολογικά, συνεισφέρουν σε πληθώρα φλεγμονωδών και αλλεργικών παθήσεων, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, η ψωρίαση, η αλλεργική ρινίτιδα, το βρογχικό άσθμα, ο καρκίνος, η αθηροσκλήρωση και η οστεοαρθρίτιδα.^[136]

- B₄: προκαλεί την προσκόλληση των ουδετερόφιλων στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων και αυξάνει το ρυθμό της μετανάστευσής τους στους εξωαγγειακούς ιστούς. Πυροδοτεί αρκετές αντιδράσεις για την λειτουργία των ενζύμων, την ενεργοποίηση της οξειδάσης NADPH και τη φαγοκυττάρωση. Μελέτες έχουν δείξει ότι το LTB₄ ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την εμφάνιση ελκωδών καταστάσεων επί του γαστρεντερικού συστήματος, πιθανότατα λειτουργώντας ως μεσολαβητής της φλεγμονής.

Τέλος, εμπλέκεται σε χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις που σχετίζονται με την παθοφυσιολογία της αθηροσκλήρωσης.

- D₄, E₄: σχετίζονται με τη στένωση των αεροφόρων οδών και σύσπαση των λείων μυϊκών ινών των αγγείων, όπως και με την ανάπτυξη του οιδήματος και αύξηση των βλεννωδών εκκρίσεων που είναι δυνατόν να εμφανίζονται σε φλεγμονώδεις καταστάσεις. Είναι σημαντικοί μεσολαβητές στο άσθμα αλλά και σε πολλές άλλες ασθένειες όπου εμπλέκεται η φλεγμονή.
 - C₄: συμμετέχει στο σχηματισμό γαστρικού ερεθισμού, επιπλέον των προηγούμενων ιδιοτήτων.^{[136]-[138]}
- Λιποξίνες: έχουν ανοσολογικές ιδιότητες, συμμετέχουν στην αγγειοδιαστολή και συναντώνται σε υψηλά επίπεδα στη φλεγμονώδη αρθρίτιδα και στη σπειραματονεφρίτιδα.^[135]

Αναστολείς των λιποξυγονασών

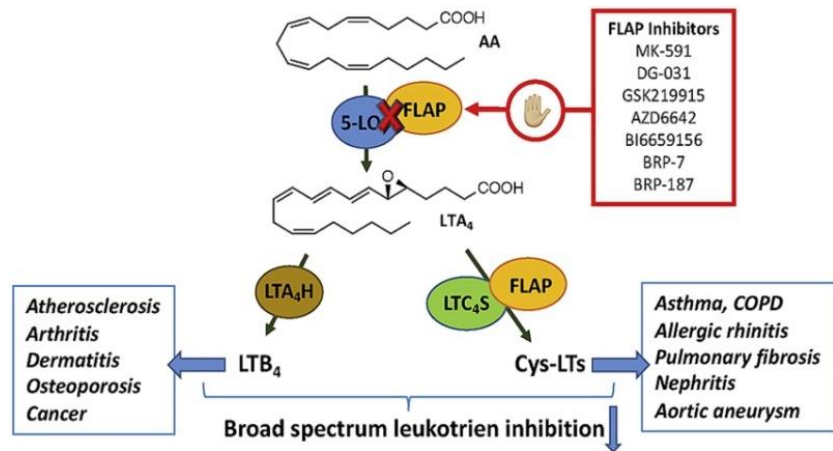
Οι αναστολείς της δράσης των λιποξυγονασών είναι στην πλειοψηφία αντιοξειδωτικά ή σαρωτές ελευθέρων ριζών και κεντρίζουν το ενδιαφέρον ως δυνητικοί παράγοντες για τη θεραπεία φλεγμονωδών και αλλεργικών ασθενειών. Το θεραπευτικό τους δυναμικό έχει πλέον επεκταθεί και σε ορισμένους τύπους καρκίνου και καρδιαγγειακές παθήσεις αλλά και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις, όπως η οστεοπόρωση και ο διαβήτης. Οι αναστολείς της λιποξυγονάσης μπορούν να ταξινομηθούν στις παρακάτω κατηγορίες:

- I. Αναστολείς που επιδρούν στη διαθεσιμότητα του υποστρώματος.^{[139],[140]}
- II. Άμεσοι αναστολείς της 5-LO. Με βάση τα χαρακτηριστικά και το μηχανισμό δράσης τους, οι άμεσοι αναστολείς του ενζύμου LOX διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες:
 - α. Οξειδοαναγωγικοί παράγοντες: αποτελούν ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση και σαρωτές ελευθέρων ριζών, καθώς η δράση του ενζύμου περιλαμβάνει τη δημιουργία ελεύθερης ανθρακικής ρίζας σε ένα λιπιδικό υπόστρωμα, αναστέλλοντας τον σχηματισμό της ή παγιδεύοντάς την όταν σχηματιστεί. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται οι φαινολικές ενώσεις όπως το νορδιϋδρογουαρετικό οξύ (NDGA), το καφεϊκό οξύ, τα φλαβονοειδή, οι κουμαρίνες και άλλες πολυφαινολικές ενώσεις οι οποίες καθίστανται αποτελεσματικοί αναστολείς της 5-LO τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.^{[141],[142]} Ωστόσο, ορισμένες από αυτές τις ενώσεις παρουσιάζουν το μειονεκτήματα της μικρής εκλεκτικότητας στην 5-LO, της περιορισμένης από του στόματος

βιοδιαθεσιμότητά τους, ενώ εμφανίζουν ορισμένες παρενέργειες λόγω της εμπλοκής τους με άλλες οξειδοαναγωγικές διαδικασίες ή με την παραγωγή διαφόρων δραστικών ριζών.^[143]

- β. Παράγοντες που συμπλοκοποιούν το σίδηρο: αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου καθώς αποτελούν εξαιρετικούς δεσμευτές του σιδήρου που βρίσκεται στην ενεργή θέση του ενζύμου. Παραδείγματα τέτοιων ενώσεων αποτελούν το αραχιδονουδροξαμικό οξύ και η τεποξαλίνη.
- γ. Μη οξειδοαναγωγικοί αναστολείς: ανταγωνίζονται το αραχιδονικό οξύ για να δεσμεύσουν το ενεργό κέντρο του ενζύμου και αναλόγων προϊόντων.^[144]
- δ. Ορισμένοι αναστολείς της LO συνδυάζουν τις ιδιότητες τόσο των οξειδοαναγωγικών όσο και των μη οξειδοαναγωγικών ενώσεων.

III. Αναστολείς της πρωτεΐνης FLAP. Από την άλλη πλευρά, οι έμμεσοι αναστολείς, δηλαδή οι αναστολείς της FLAP μπορούν να εμποδίσουν την αλληλεπίδραση της 5-LO με την πρωτεΐνη ενεργοποίησής της, FLAP (Five Lipoxygenase Activating Protein) και, κατά συνέπεια, να αναστείλουν τη βιοσύνθεση των λευκοτριενίων (LTs). Ο ρόλος της FLAP οδήγησε σε μια εναλλακτική μέθοδο αναστολής της σύνθεσης των λευκοτριενίων, καθώς διαπιστώθηκε ότι είναι απαραίτητη για την *in vivo* βιοσύνθεσή τους.^{[143],[145]}



Εικόνα 10 Αναστολείς FLAP κατά τη βιοσύνθεση των λευκοτριενίων

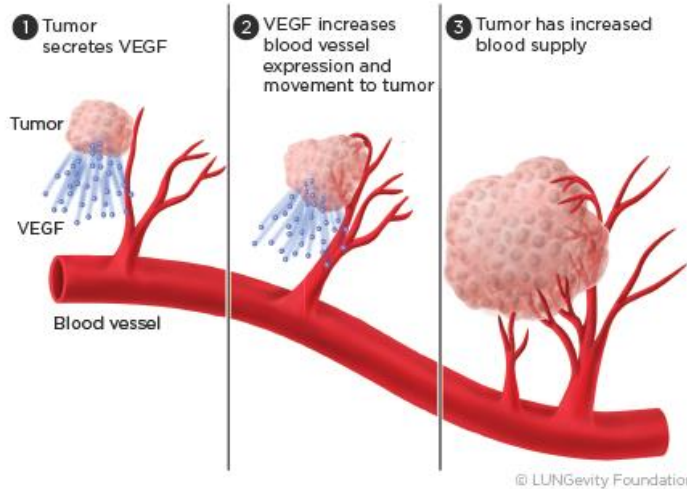
3. ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Η φλεγμονή θεωρείται ένας από τους παράγοντες που επιτρέπουν την ανάπτυξη του καρκίνου. Η χρόνια φλεγμονώδης νόσος μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη ορισμένων μορφών καρκίνου, ενώ υπάρχουν ισχυρές επιδημιολογικές ενδείξεις ότι τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (NSAIDs) και ιδιαίτερα η ασπιρίνη, είναι ισχυροί χημειοπροληπτικοί παράγοντες. Τα φλεγμονώδη κύτταρα είναι ένα βασικό συστατικό του στρώματος των καρκινικών κυττάρων (μικροπεριβάλλον του όγκου) και εκκρίνουν πολλούς μεσολαβητές (όπως κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες, χημειοκίνες, δραστικά είδη οξυγόνου) που μπορούν να δράσουν είτε με αυτοκρινή τρόπο (δρουν στα κύτταρα που τους παράγουν) ή/και με παρακρινή τρόπο (διαμορφώνουν τις αποκρίσεις άλλων κυττάρων, τόσο στα κακοήθη όσο και στα μη κακοήθη κύτταρα). Η σύνθεση του φλεγμονώδους μικροπεριβάλλοντος του όγκου έχει καθοριστική επίδραση στην έκβαση της νόσου. Το ανοσολογικό σύστημα μπορεί να έχει δύο ρόλους: την αντικαρκινική δράση και την προ-καρκινική (κακοήθεια που προάγει τη φλεγμονή), ενώ είναι επίσης σημαντικό να αξιολογείται η θεραπευτική αποτελεσματικότητα φαρμάκων που παρεμβάλλονται στην ενεργοποίηση προ-καρκινικών μονοπατιών σε συνδυασμό με φάρμακα ή θεραπείες που ενισχύουν την αντικαρκινική ανοσία.^[147]

Το αραχιδονικό οξύ ανήκει στην οικογένεια των ω-6 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (polyunsaturated fatty acids, PUFA) και υφίσταται βιομετατροπή προς προσταγλαδίνες και λευκοτριένια, αφενός μέσω του μονοπατιού της κυκλοοξυγενάσης (COX) για την παραγωγή προσταγλανδινών (*prostaglandins*: PG) και αφετέρου μέσω του μονοπατιού της λιποξυγονάσης (LOX) για την παραγωγή υδροξυεικοσατετρανοϊκών οξέων (*hydroxyeicosatetraenoic acids*, HETEs). Υπάρχουν ενδείξεις ότι μεταβολίτες της LOX επιδρούν στους παράγοντες πολλαπλασιασμού, στη δράση των ογκογονιδίων, στους μηχανισμούς προσκόλλησης των κυττάρων και στην απόπτωση και συμμετέχουν στην προαγωγή της ανάπτυξης του καρκίνου με μοριακούς μηχανισμούς που δεν έχουν προσδιοριστεί πλήρως.^[148] Στοιχεία από μελέτες σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα δείχνουν ότι οι οδοί LOX εμπλέκονται στην καρκινογένεση. Πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν τη συμμετοχή αυξητικών παραγόντων, όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (*epidermal growth factor*: EGF) στην πρόοδο του όγκου που προκαλείται από την 5-LOX στον καρκίνο του προστάτη. Ο παράγοντας αυτός ασκεί έντονη μιτογόνο δράση μόνο σε επιθηλιακά προστατικά κύτταρα. Επιπλέον, μελέτες με siRNA της 5-LOX και συγκεκριμένο αναστολέα της 5-LOX κατέδειξαν τη σχέση αυτού του γονιδίου με τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Το πιο σημαντικό είναι ότι μερικές μελέτες σε μοντέλα καρκινογένεσης ζώων, καταδεικνύουν ότι η αναστολή των οδών LOX μπορεί επίσης να εμποδίσει την καρκινογένεση.^[149]

Η αγγειογένεση (angiogenesis) είναι μία πολύπλοκη διαδικασία κατά την οποία νέα αιμοφόρα αγγεία σχηματίζονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα προϋπαρχόντων αγγείων, τα οποία με τη σειρά τους προήλθαν από διαφοροποίηση πρόδρομων μεσεγχυματικών κυττάρων κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης του οργανισμού (vasculogenesis). Εκτός από την εμβρυογένεση, η αγγειογένεση εμφανίζεται σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις και περιλαμβάνει δυναμικές αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων καθώς και αλλαγές στον πολλαπλασιασμό και στη μετανάστευση των κυττάρων, στη στρατολόγηση των περιαγγειακών κυττάρων και στη διαδικασία ωρίμανσης. Αυτές οι διαδικασίες ρυθμίζονται από διάφορους αγγειογενετικούς παράγοντες μέσω ταυτόχρονης μετάδοσης σήματος μέσω διαφορετικών μονοπατιών. Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), είναι ένας από τους πιο ισχυρούς αγγειογενετικούς παράγοντες. Η επαγωγή της αγγειογένεσης συνδέεται, επίσης, με την ανάπτυξη των όγκων και αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την μετάσταση των κακοήθων όγκων. Ένας όγκος πρέπει διαρκώς να διεγείρει την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων προκειμένου να αναπτυχθεί, ενώ παράλληλα τα νέα αιμοφόρα αγγεία μέσα στην καρκινική μάζα διευκολύνουν την διήθηση των παρακείμενων ιστών, την είσοδο των καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία και την μετάστασή τους σε απομακρυσμένα όργανα. Πρόσφατα, ο μεταβολίτης 5-HETE της 5-LOX, βρέθηκε ότι διεγείρει την αγγειογένεση, προκαλώντας την έκφραση του VEGF στην περίπτωση του καρκίνου του παχέος εντέρου. Η αναστολή της αγγειογένεσης με φάρμακα που μπλοκάρουν τον υποδοχέα του VEGF αποτελούν πεδίο εντατικής επιστημονικής έρευνας στη θεραπεία του καρκίνου.^{[150]-[152]}

Blood Vessel Overgrowth on Cell



Εικόνα 11: Η έκφραση του VEGF είναι υπεύθυνη για την επαγωγή της αγγειογένεσης, η οποία σχετίζεται με την προαγωγή ανάπτυξης του όγκου.^[153]

Η αναστολή της δράσης της LOX έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί απόπτωση σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων όπως του μαστού,^[153] του νευροβλαστώματος, του παγκρέατος^[155] κ.ά. Ειδικότερα, έχει αποδειχθεί ότι η αναστολή της λιποξυγονάσης επάγει απόπτωση των ανθεκτικών καρκινικών κυττάρων ανθρώπινου προστάτη.^[156] Πολλές είναι, επίσης, οι φυσικές ενώσεις που αναστέλλουν τη δράση της LOX, όπως το φλαβονοειδές Baicalein, το οποίο προκαλεί απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα ανθρώπινου στομάχου μέσω της αναστολής του μονοπατιού της LOX.^[157]

Η αουρανοφίνη (auranofin) (θειομαλικός χρυσός), που αποτελεί γνωστό αντιφλεγμονώδες, αντιαρθρικό και ανοσορρυθμιστικό φάρμακο, έχει αναφερθεί ότι αποκλείει πλήρως όλα τα προϊόντα της LOX μέσω παρεμπόδισης της 5-LOX.^{[158]-[160]} Επίσης, προκαλεί απόπτωση στα ανθεκτικά κύτταρα καρκίνου ανθρώπινων ωοθηκών.^[161]

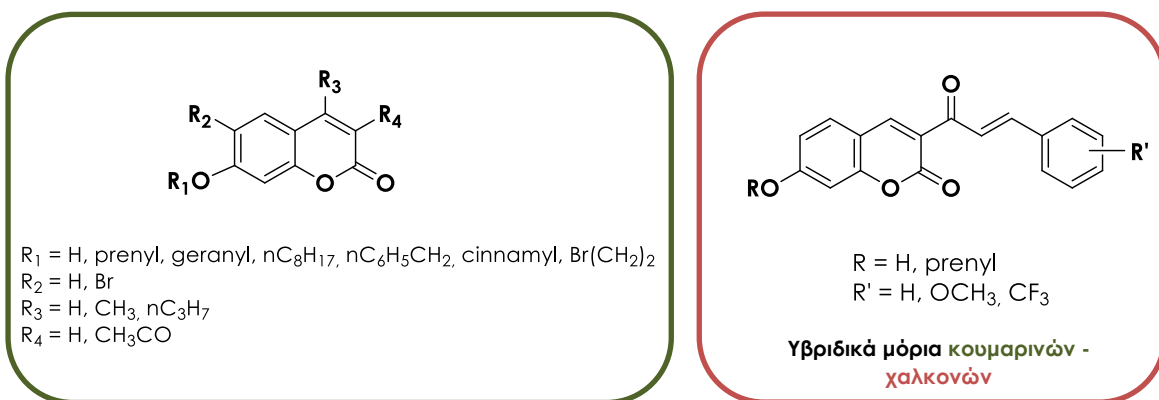
Σύμφωνα με μελέτες, η βενζοκινόνη AA-861 μπορεί να αναστείλει τη δράση της 5-LOX σε περιτοναϊκά πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα ινδικού χοιριδίου^[162] και επίσης μπορεί να δράσει ανασταλτικά κατά τον σχηματισμό του 5-HETE και του LTD₄.^[163] Οι Ζου et al. ανέφεραν ότι η ένωση AA-861 ελάττωσε την έκταση μετάστασης του καρκίνου του στομάχου και προκάλεσε απόπτωση, συνεπώς δύναται να δράσει ως ένας ισχυρός, επιλεκτικός και από του στόματος δραστικός αναστολέας της 5-LOX.^[164] Συνεπώς, η στόχευση της LOX αποτελεί στρατηγική με προοπτική για την ανάπτυξη νέων βιοδραστικών ενώσεων προκειμένου να αποτραπεί η πρόοδος και η μετάσταση του καρκίνου.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, στόχο αποτέλεσε ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η ταυτοποίηση της δομής νέων κουμαρινικών αναλόγων με σκοπό τη μελέτη της σχέσης δομής – βιολογικής δράσης. Ο σχεδιασμός και η σύνθεση των νέων αναλόγων στηρίχθηκε σε ενώσεις με αξιόλογη βιολογική δράση που αποτελούν φυσικά προϊόντα, όπως η ουμπελιφερόνη και η υμεχρωμόνη (hymecromone) (Σχήμα 35), καθώς και σε μόρια – οδηγούς που έχουν προκύψει από προηγούμενες εργασίες της ερευνητικής ομάδας του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ.



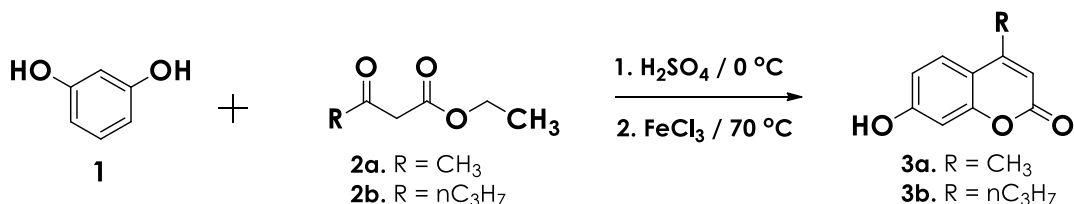
Σχήμα 35 Φυσικές κουμαρίνες με αξιόλογη βιολογική δράση.

Βάσει των ανωτέρω, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν δομικά τροποποιημένα υδροξυ-, αλκοξυ- κουμαρινικά παράγωγα καθώς και υβριδικά ανάλογα κουμαρινών-χαλκονών (Σχήμα 36), μελετώντας την επίδραση της θέσης και του είδους του υποκαταστάτη στη βιολογική τους δράση.

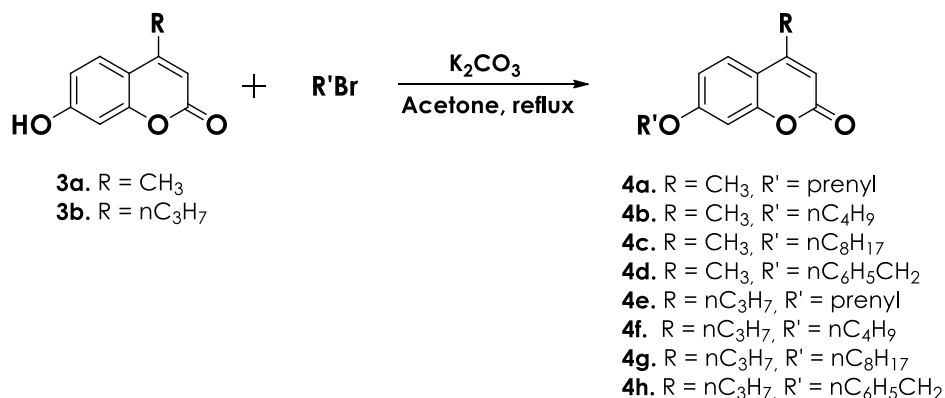


Σχήμα 36 Γενική δομή των συντιθέμενων μορίων.

Αρχικά, συντέθηκαν δύο 7-υδροξυ-4-υποκατεστημένα παράγωγα (**3a**, **3b**) της ουμπελιφερόνης μέσω αντίδρασης Pechmann μεταξύ της ρεσορκινόλης και του κατάλληλου β-κετο-εστέρα (Σχήμα 37). Τα μόρια αυτά αντέδρασαν, στη συνέχεια, μέσω σύνθεσης αιθέρων κατά Williamson, μεταξύ της κατάλληλα 4-υποκατεστημένης-7-υδροξυ-κουμαρίνης και των κατάλληλων αλκυλο-βρωμιδίων, παρουσία διαλύτη ακετόνης και βάσης ανθρακικού καλίου (K₂CO₃), οδηγώντας στα οκτώ νέα (**4a** – **4h**) 7-αλκοξυ-4-υποκατεστημένα παράγωγα (Σχήμα 38).

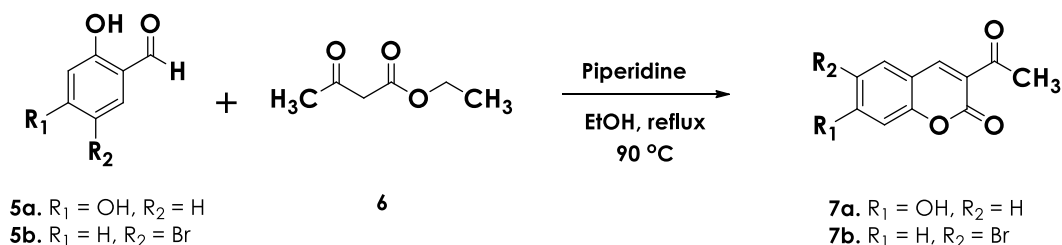


Σχήμα 37 Σύνθεση αναλόγων ουμπελιφερόνης με τη μέθοδο Pechmann.



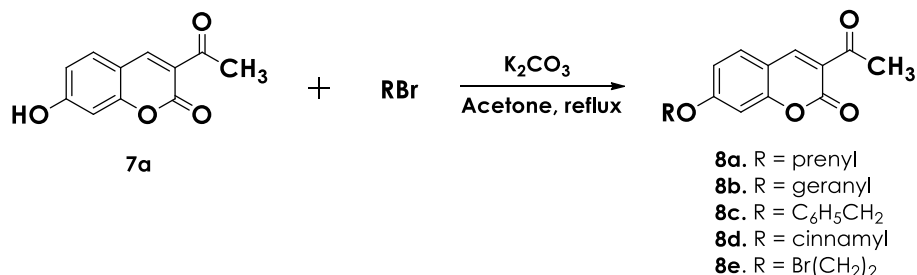
Σχήμα 38 Σύνθεση κουμαρινών κατά Williamson.

Έπειτα, σχεδιάστηκαν δύο 3-ακετυλο-7-ή 6-υποκατεστημένα ανάλογα (**7a**, **7b**) μέσω αντίδρασης συμπύκνωσης Knoevenagel, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για τη σύνθεση κουμαρινικών παραγώγων μεταξύ κατάλληλα υποκατεστημένων 2-υδροξυ-βενζαλδεϋδών και ενώσεων ενεργού μεθυλενίου (εν προκειμένω ακετοξικού αιθυλεστέρα) σε διαλύτη αιθανόλη, παρουσία πιπεριδίνης (Σχήμα 39).



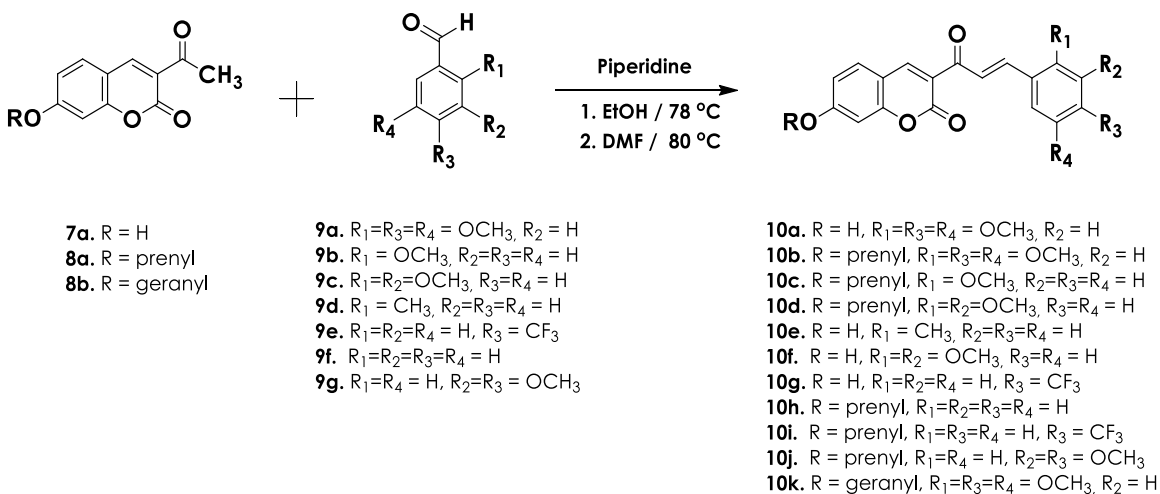
Σχήμα 39 Σύνθεση κουμαρινών κατά Knoevenagel.

Τα 7-αλκοξυ-3-ακετυλο-κουμαρινικά ανάλογα (**8a** – **8e**) συντίθενται μέσω αντίδρασης αλκυλίωσης μεταξύ της 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης (**7a**) και του κατάλληλου αλκυλο-βρωμιδίου σε βασικό περιβάλλον (K_2CO_3) στο παρακάτω Σχήμα 40.



Σχήμα 40 Σύνθεση αλκοξυ-παραγώγων της 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης.

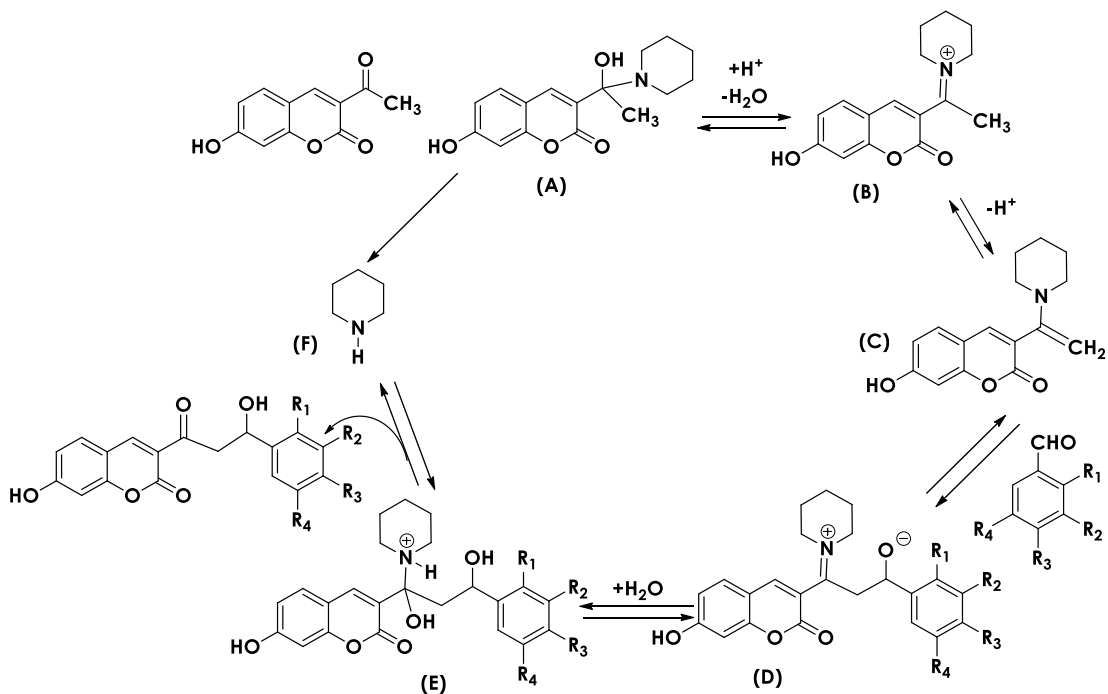
Τέλος, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν έντεκα νέα υβριδικά μόρια κουμαρινών – χαλκονών (**10a** – **10k**), τα οποία χαρακτηρίζονται από καινοτόμο σχεδιασμό, λόγω των τριών φαρμακοφόρων δομών που φέρουν στο ίδιο μόριο. Τα μόρια αυτά προκύπτουν από αντίδραση αλδολικής συμπύκνωσης μεταξύ της 3-ακετυλο-7-υποκατεστημένης κουμαρίνης και της κατάλληλα υποκατεστημένης βενζαλδεΐδης με διαλύτη αιθανόλη ή διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και βάση πιπεριδίνη (Σχήμα 41).



Σχήμα 41 Σύνθεση υβριδικών μορίων κουμαρινών – χαλκονών.

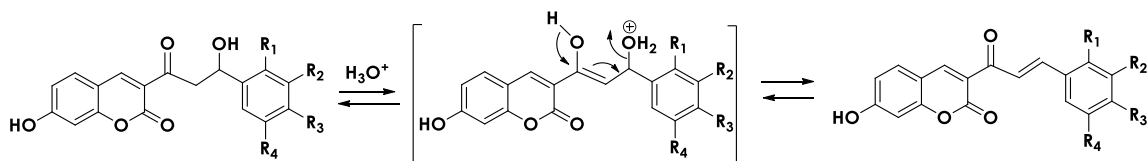
Μηχανισμός σύνθεσης κουμαρινών – χαλκονών

Η σύνθεση των υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών πραγματοποιείται μέσω αλδολικής συμπύκνωσης και στη συγκεκριμένη περίπτωση επιλέχθηκε ως καταλύτης η πιπεριδίνη. Ο καταλυτικός κύκλος περιλαμβάνει τον ενδιάμεσο σχηματισμό καρβινολαμίνης (A), ιόντος ιμινίου (B) και εναμίνης (C). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται πυρηνόφιλη προσθήκη στην αλδεΐδη οπότε σχηματίζεται ο νέος δεσμός C – C (D). Ο κύκλος ολοκληρώνεται με την προσθήκη H₂O προς το σχηματισμό μιας νέας καρβινολαμίνης (E) και διάσπασή της προς το προϊόν αλδολικής συμπύκνωσης και απελευθέρωση της αμίνης (F) (Σχήμα 42).



Σχήμα 42 Μηχανισμός καταλυόμενης από πιπεριδίνη αλδολικής συμπύκνωσης.

Το προϊόν της αλδολικής συμπύκνωσης δεν απομονώνεται και η όξινη κατεργασία του μίγματος της αντίδρασης οδηγεί στην αφυδάτωση του προϊόντος και τελικά στο σχηματισμό της επιθυμητής χαλκόνης, όπως φαίνεται στο Σχήμα 43.



Σχήμα 43 Μηχανισμός αφυδάτωσης του προϊόντος αλδολικής συμπύκνωσης

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

1.1. Οργανολογία – Υλικά

Η πορεία των αντιδράσεων καθώς και ο έλεγχος της καθαρότητας των ενώσεων πραγματοποιήθηκε μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) σε πλάκες αλουμινίου, επιστρωμένες με Silica Gel F254 της εταιρίας Merck. Οι κηλίδες των χρωματογραφημάτων TLC εμφανίστηκαν σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) στα 254 nm και εν συνεχεία με εμποτισμό των πλακών σε διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος (PMA) σε αναλογία (αιθανολικό διάλυμα PMA 7% / EtOH 1:2).

Η παραλαβή των τελικών καθαρών προϊόντων πραγματοποιήθηκε μέσω ανακρυστάλλωσης είτε χρωματογραφίας στήλης. Η χρωματογραφία στήλης ταχείας ανάπτυξης (Flash Column Chromatography, FCC) πραγματοποιήθηκε με χρήση Silica Gel (γέλης πυριτίου) 60 (40-63 microns) της εταιρίας Merck. Τα συστήματα έκλουσης για τον καθαρισμό των ενδιαμέσων και τελικών προϊόντων είναι ίδια με αυτά που δίνονται για τον παράγοντα συγκράτησης (Rf).

Η εξάτμιση των οργανικών διαλυτών πραγματοποιήθηκε υπό ελαττωμένη πίεση σε θερμοκρασίες 40-60 °C σε περιστροφικό εξατμιστήρα Büchi Rotavapor® R-210, ενώ η ξήρανση των στερεών ενώσεων πραγματοποιήθηκε σε αντλία υψηλού κενού Edwards (RV-5).

Εν συνεχεία, η δομική ταυτοποίηση καθώς και ο έλεγχος της καθαρότητας των νέων προϊόντων πραγματοποιήθηκε μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), πρωτονίου (^1H NMR) και άνθρακα (^{13}C NMR). Τα φάσματα NMR καταγράφηκαν μέσω των οργάνων Varian 300MHz και Varian 600MHz του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας, του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) και το δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο ($\text{DMSO} - d_6$). Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων, δίνονται σε ppm ως προς τη συχνότητα συντονισμού της ένωσης αναφοράς TMS (τετραμεθυλοσιλάνιο) και η πολλαπλότητα των σημάτων στα φάσματα ^1H NMR αναφέρεται ως εξής: (singlet, απλό), d (doublet, διπλό), t (triplet, τριπλό), m (multiplet, πολλαπλό), dd (doublet of doublets, διπλή διπλών), br (broad, ευρύ). Οι σταθερές σύζευξης, J , δίνονται σε Hz.



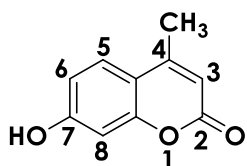
Εικόνα 12: Όργανο NMR Varian 600 MHz.

Τα φάσματα ESI – HRMS καταγράφηκαν με το όργανο UHPLC – MSn Orbitrap Velos-Thermo του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας, του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για τη διάλυση όλων των υπό εξέταση ενώσεων ήταν η μεθανόλη (MeOH).

Τέλος, τα σημεία τήξεως (Σ.Τ.) των ενώσεων προσδιορίστηκαν σε ανοικτούς τριχοδιαμετρικούς σωλήνες με χρήση συσκευής Gallenkamp, ενώ το σύνολο των αντιδραστηρίων και των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα στάδια ήταν υψηλής καθαρότητας και προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες Sigma – Aldrich, Alfa – Aesar, Fluka και Acros.

1.2. Παρασκευή αναλόγων της συμπελιφερόνης με τη μέθοδο Pechmann

7-υδροξυ-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (3a)



Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 100 mL πυκνού θειικού οξέος (H₂SO₄) υπό ψύξη στους 0 °C. Παρασκευάζεται διάλυμα 90.82 mmol (10 g) ρεσορκινόλης σε 92.1 mmol (12 mL) 3-οξοβουτανοϊκού αιθυλεστέρα, το οποίο προστίθεται στάγδην και υπό ανάδευση στη σφαιρική φιάλη σε θερμοκρασία κάτω των 10 °C. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται για 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα προστίθεται σε πάγο υπό έντονη ανάδευση και το στερεό που καταβυθίζεται διηθείται υπό κενό με ποσότητα παγωμένου νερού. Το τελικό καθαρό προϊόν παραλαμβάνεται ύστερα από ανακρυστάλλωση από διαλύτη μεθανόλη σε μορφή υποκίτρινου στερεού. Η δομή του προϊόντος ταυτοποιείται με φασματοσκοπία ¹H και ¹³C NMR.

Απόδοση: 90 %

Σημείο τήξεως: 186 – 187 °C, (Σ.Τ. βιβλιογραφίας^[165]: 185 – 187 °C)

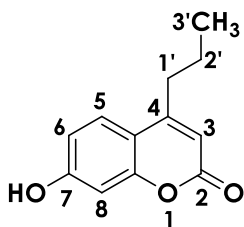
¹H NMR (600MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 10.47 (s, 1H, 7-OH), 7.55 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-5), 6.76 (dd, *J* = 8.4 & *J* = 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.66 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-8), 6.08 (s, 1H, H-3), 2.32 (s, 3H, 4-CH₃)

¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 161.1, 160.3, 154.8, 153.5, 126.6, 112.8, 112.0, 110.2, 102.2, 18.1

FT-IR (KBr): (cm⁻¹) 3155 ν(O-H), 1680 ν(C=O), 1601 ν(C=C aromatic), 1390 δ(O-H), 1067 ν(C-O)

UV-vis (EtOH): λ_{\max} = 323 nm

7-υδροξυ-4-προπυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (3b)



Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 4.54 mmol (500 mg) ρεσορκινόλης, 4.54 mmol (73.64 mg) άνυδρου τριχλωριούχου σιδήρου (FeCl_3) και 9.08 mmol (1461.2 μL) 3-οξοεξανοϊκού αιθυλεστέρα και αφήνονται στους 70 °C για 12 ώρες υπό συνεχή ανάδευση και αδρανείς συνθήκες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί προσθήκη 5 mL αιθανόλης και κατόπιν 15 mL νερού στάγδην υπό ψύξη (παγόλουτρο). Μετά την εμφάνιση στερεού στην σφαιρική, πραγματοποιείται διήθηση του προϊόντος και ξέπλυμα αυτού με μικρή ποσότητα αιθανόλης. Παραλαμβάνεται σκούρο καφέ στερεό.

Απόδοση: 80 %

Σημείο τήξεως: 135 – 136 °C, (Σ.Τ. βιβλιογραφίας^[166]: 129 – 131 °C

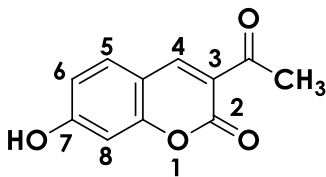
$^1\text{H NMR}$ (600MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ (ppm) 7.64 (d, J = 9 Hz, 1H, H-5), 6.79 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-6), 6.71 (s, 1H, H-8), 6.08 (s, 1H, H-3), 2.70 (t, J = 7.5 Hz, 2H, H-1'), 1.62 (m, 2H, H-2'), 0.96 (t, J = 7.2 Hz, 3H, 3'- CH_3)

1.3. Γενική μέθοδος σύνθεσης κουμαρινικών αναλόγων με τη μέθοδο Knoevenagel (**Μέθοδος A**)

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται ποσότητα κατάλληλα υποκατεστημένης 2-υδροξυ-βενζαλδεΐδης (1 eq) ισομοριακή ποσότητα αιθανικού αιθυλεστέρα (1 eq) παρουσία πιπεριδίνης και διαλυτή αιθανόλη. Το μίγμα αφήνεται για 24 ώρες υπό συνεχή ανάδευση στους 90 °C παρουσία καθέτου ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες.

Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Μετά το τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται εξάτμιση σε περιστροφικό εξάτμιστήρα έως ότου εναποτεθεί στερεό στα τοιχώματα της σφαιρικής φιάλης. Τέλος, το προϊόν ανακρυσταλλώνεται με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου και η καθαρότητά του ελέγχεται μέσω φασματοσκοπίας $^1\text{H NMR}$.

3-ακετυλο-7-υδροξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (7a)



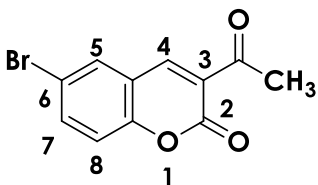
Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Α**, 10.86 mmol (1.5 g) 2,4-διυδροξυ-βενζαλδεΐδης και 10.86 mmol (1.37 mL) αιθανικού αιθυλεστέρα διαλύονται σε 30 mL αιθανόλη και 160.8 mL πιπεριδίνης. Παραλαμβάνεται ανοιχτό πράσινο στερεό.

Απόδοση: 63 %

Σημείο τήξεως: 235 – 236 °C, (Σ.Τ. βιβλιογραφίας^[167]: 238 °C)

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.37 (s, 1H, H-4), 7.37 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, H-5), 6.75 (dd, *J* = 4.2 Hz, *J* = 0.9 Hz, 1H, H-6), 6.72 (s, 1H, H-8), 2.57 (s, 3H, CH₃)

3-ακετυλο-6-βρωμο-2H-χρωμεν-2-όνη (7b)



Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Α**, 4.98 mmol (1 g) 5-βρωμο-2-υδροξυ-βενζαλδεΐδης και 4.98 mmol (629.2 μL) αιθανικού αιθυλεστέρα διαλύονται σε 13.8 mL αιθανόλη και 75 mL πιπεριδίνης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 98 %

Σημείο τήξεως: 221 – 222 °C, (Σ.Τ. βιβλιογραφίας^[168]: 221 – 223 °C)

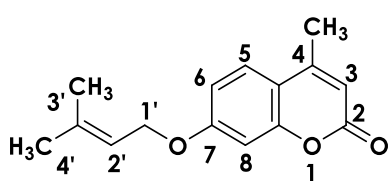
¹H NMR (600MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.40 (s, 1H, H-4), 7.78 (s, 1H, H-5), 7.73 (d, *J* = 12 Hz, 1H, H-7), 7.27 (s, 1H, H-8), 2.72 (s, 3H, CH₃)

1.4. Γενική μέθοδος σύνθεσης αλκοξυ-παραγώγων (Μέθοδος Β)

Σε σφαιρική φιάλη προστίθεται ποσότητα της κατάλληλα υποκατεστημένης 7-υδροξυ-κουμαρίνης (1 eq) καθώς και το κατάλληλο αλκυλο-βρωμίδιο (1.2 eq) παρουσία ξηρής βάσης ανθρακικού καλίου (K₂CO₃) σε διαλύτη ακετόνη και αφήνονται για 24 ώρες υπό συνεχή ανάδευση στους 56 °C παρουσία καθέτου ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες.

Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 80% (PE) : 20% (EtOAc). Μετά το τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό και εκπλύσεις με ακετόνη ώστε να παραληφθεί το οργανικό διήθημα, το οποίο, εν συνεχεία, εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα. Τέλος, το προϊόν υφίσταται διεργασίες καθαρισμού (ανακρυστάλλωση, χρωματογραφία στήλης) και η καθαρότητά του ελέγχεται μέσω φασματοσκοπίας ¹H NMR και φασματομετρίας Μάζας Υψηλής Ανάλυσης (HR-MS).

7-πρενυλοξυ-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (4a)



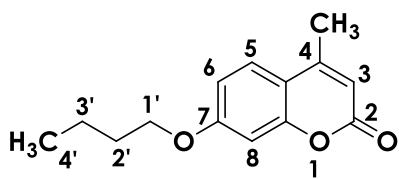
Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Β**, 0.36 mmol (70 mg) 4-μεθυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης, 0.43 mmol (0.05 mL) πρενυλο-βρωμιδίου και 0.36 mmol (49.8 mg) K₂CO₃ προστίθενται σε 5.0 mL ακετόνης. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και εξανίου. Παραλαμβάνεται στερεό λευκού χρώματος.

Απόδοση: 70 %

Σημείο τήξεως: 84 – 86 °C, (Σ.Τ. βιβλιογραφίας^[169]: 84 – 86 °C)

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.48 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-5), 6.86 (dd, *J* = 8.7 Hz & *J* = 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.82 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-8), 5.48 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-2'), 4.59 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-1'), 2.42 (s, 3H, 4-CH₃) 1.83 (s, 3H, 3'-CH₃), 1.79 (s, 3H, 4'-CH₃)

4-μεθυλο-7-(βουτυλοξυ)-2H-χρωμεν-2-όνη (4b)



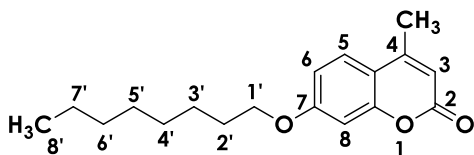
Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Β**, 1.13 mmol (200 mg) 4-μεθυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης, 1.35 mmol (0.2 mL) βουτυλο-βρωμιδίου προστίθενται και 1.13 mmol (156.2 mg) K₂CO₃ προστίθενται σε 15.8 mL ακετόνης. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου. Παραλαμβάνεται στερεό λευκού χρώματος.

Απόδοση: 65 %

Σημείο τήξεως: 49 – 50 °C, (Σ.Τ. βιβλιογραφίας^[169]: 47 – 48 °C)

¹H NMR (600MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 6.88 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-8), 6.82 (dd, *J* = 9 Hz & *J* = 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.15 (s, 1H, H-3), 4.02 (t, *J* = 6 Hz, 2H, H-1'), 2.4 (s, 3H, 4-CH₃), 1.82-1.78 (m, 2H, H-2'), 1.26-1.24 (m, 2H, H-3'), 0.99 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, 4'-CH₃)

4-μεθυλο-7-(οκτυλοξυ)-2H-χρωμεν-2-όνη (4c)



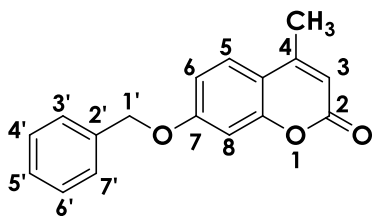
Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Β**, 1.13 mmol (200 mg) 4-μεθυλο-ουμπελιφερόνης προστίθενται σε 15.8 mL ακετόνης. Στη συνέχεια, προστίθενται 1.13 mmol (156.2 mg) K₂CO₃ και 1.35 mmol (351.2 μL) οκτυλο-βρωμιδίου. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί ανακρουστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου. Παραλαμβάνεται πράσινο στερεό.

Απόδοση: 55 %

Σημείο τήξεως: 51 – 52 °C, (Σ.Τ. βιβλιογραφίας^[171]: 48 – 50 °C)

¹H NMR (600MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 8.58 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 6.78 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.68 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-8), 6.15 (s, 1H, H-3), 4.06 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, H-1'), 2.39 (s, 3H, 4-CH₃), 1.72 (m, 2H, H-2'), 1.40 (m, 2H, H-7'), 1.29 (m, 8H, H-3' & H-5' & H-4' & H-6'), 0.86 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, 8'-CH₃)

7-(βενζυλοξυ)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (4d)



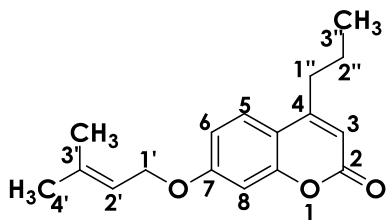
Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Β**, προστίθενται 1.7 mmol (300 mg) 4-μεθυλο-ουμπελιφερόνης σε 23.8 mL ακετόνης. Στη συνέχεια προστίθενται 235 mg K₂CO₃ και τέλος 2.04 mmol (242.6 μL) βενζυλο-βρωμιδίου. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί ανακρουστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 62 %

Σημείο τήξεως: 117 – 118 °C, (Σ.Τ. βιβλιογραφίας^[172]: 115 °C)

¹H NMR (600MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.50 (d, *J* = 12 Hz, 1H, H-5), 7.41 (m, 4H, H-6' & H-4' & H-3' & H-7'), 7.35 (m, 1H, H-5'), 6.935 (dd, *J* = 2.4 Hz, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-6), 6.89 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-8), 6.14 (s, 1H, H-3), 5.13 (s, 2H, H-1'), 2.39 (s, 3H, 4-CH₃)

7-((3-μεθυλβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-4-προπυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (4e)



Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Β**, 0.83 mmol (168.9 mg) 7-υδροξυ-4-προπυλο-κουμαρίνης διαλύονται σε 11.6 mL ακετόνης. Στη συνέχεια, προστίθενται 0.83 mmol (114.79 mg) K_2CO_3 και 0.996 mmol (115.6 μ L) πρενυλο-βρωμιδίου. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου. Παραλαμβάνεται πράσινο στερεό.

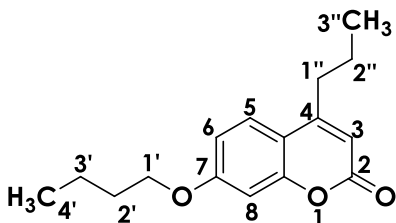
Απόδοση: 60 %

Σημείο τήξεως: 88 – 89 °C

1H NMR (600MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.51 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-5), 6.85 (dd, $J = 9$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-6), 6.82 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-8), 6.11 (s, 1H, H-3), 5.47 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H, H-2'), 4.57 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-1'), 2.69 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-1''), 1.80 (s, 3H, 3'- CH_3), 1.76 (s, 3H, 4'- CH_3), 1.72 (m, 2H, H-2''), 1.04 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, 3''- CH_3)

HRMS calcd for $C_{17}H_{21}O_3$ ($M+H$)⁺: m/z: 273.1485, found: 273.1485

7-βουτυλοξυ-4-προπυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (4f)



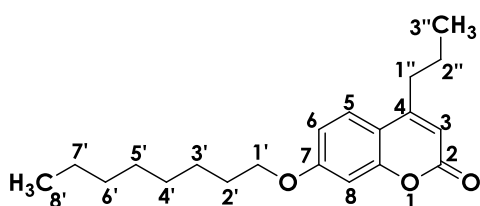
Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Β**, 1.49 mmol (305 mg) 4-προπυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης, 1.79 mmol (0.3 mL) βουτυλο-βρωμιδίου και 1.49 mmol (205.9 mg) K_2CO_3 προστίθενται σε 20.8 mL ακετόνης. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου. Παραλαμβάνεται στερεό πράσινου χρώματος.

Απόδοση: 68 %

Σημείο τήξεως: 70 – 72 °C

1H NMR (600MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.48 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-5), 6.87 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-8), 6.83 (dd, $J = 9.0$ Hz & $J = 2.4$ Hz, 1H, H-6), 6.13 (s, 1H, H-3), 4.03 (t, $J = 6$ Hz, 2H, H-1' $CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2.73 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-1''), 1.83-1.77 (m, 2H, H-2'), 1.73-1.69 (m, 2H, H-2''), 1.25-1.22 (m, 2H, H-3'), 1.03 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, 3''- CH_3), 0.94 (t, $J = 7.2$ Hz, 4'- CH_3)

7-οκτυλοξυ-4-προπυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (4g)



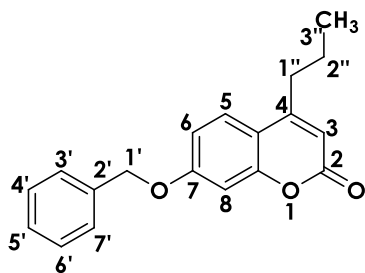
Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Β**, 1.49 mmol (305 mg) 7-υδροξυ-4-προπυλο-κουμαρίνης διαλύονται σε 20.8 mL ακετόνης. Στη συνέχεια, προστίθενται 1.49 mmol (205.9 mg) K_2CO_3 και 1.79 mmol (309.2 μ L) οκτυλο-βρωμιδίου. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί ανακρουσάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 74 %

Σημείο τήξεως: 47 – 48 °C

1H NMR (600MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.51 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-5), 6.84 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-6), 6.81 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-8), 6.12 (s, 1H, H-3), 4.01 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, H-1'), 2.71 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-1'), 1.80 (m, 2H, H-2'), 1.73 (m, 2H, H-2''), 1.45 (m, 2H, H-7'), 1.31 (m, 8H, H-3' & H-5' & H-4' & H-6'), 1.04 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, 3''- CH_3), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, 8'- CH_3)

7-βενζυλοξυ-4-προπυλο-2H-χρωμεν-2-όνη (4h)



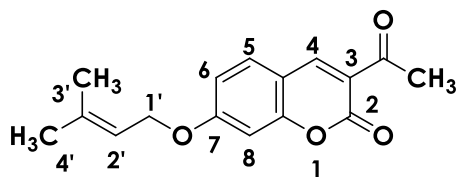
Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Β**, 1.22 mmol (250 mg) 7-υδροξυ-4-προπυλο-κουμαρίνης διαλύονται σε 17.1 mL ακετόνης. Στη συνέχεια, προστίθενται 1.22 mmol (168.6 mg) K_2CO_3 και 1.46 mmol (173.6 μ L) βενζυλοβρωμιδίου. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί καθαρισμός του προϊόντος με τη μέθοδο χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 90% (PE) : 10% (EtOAc). Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 60 %

Σημείο τήξεως: 72 – 73 °C

1H NMR (600MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7.53 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-5), 7.41 (m, 4H, H-6' & H-4' & H-3' & H-7'), 7.35 (m, 1H, H-5'), 6.92 (dd, $J = 9$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-6), 6.89 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-8), 6.12 (s, 1H, H-3), 5.13 (s, 2H, H-1'), 2.69 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H-1''), 1.72 (sext, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-2''), 1.04 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, 3''- CH_3)

3-ακετυλο-7-πρενυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (8a)



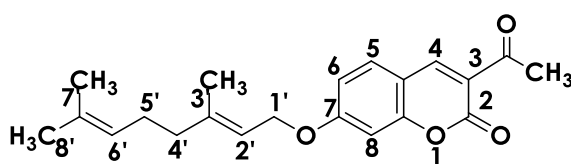
Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Β**, 1.96 mmol (400 mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης προστίθενται σε 27.4 mL ακετόνης. Στη συνέχεια, προστίθενται 1.96 mmol (271 mg) K_2CO_3 και 2.35 mmol (272.6 μ L) 3,3-διμεθυλο-αλλυλοβρωμιδίου (πρενυλο-βρωμιδίου). Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου. Παραλαμβάνεται υπόλευκο στερεό.

Απόδοση: 75 %

Σημείο τήξεως: 147 – 148 °C, (Σ.Τ. βιβλιογραφίας^[173]:108 – 110 °C)

1H NMR (600MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.48 (s, 1H, H-4), 7.52 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-5), 6.89 (dd, $J = 9$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-6), 6.81 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-8), 5.46 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H, H-2'), 4.61 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H, H-1'), 2.69 (s, 3H, 3- CH_3), 1.81 (s, 3H, 3'- CH_3), 1.77 (s, 3H, 4'- CH_3)

3-ακετυλο-7-γερανυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (8b)



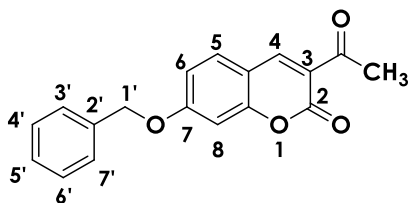
Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Β**, 1.47 mmol (300 mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης προστίθενται σε 20.6 mL ακετόνης. Στη συνέχεια, προστίθενται 1.47 mmol (203.2 mg) K_2CO_3 και 1.76 mmol (350 μ L) γερανυλο-βρωμιδίου. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου. Παραλαμβάνεται πράσινο στερεό.

Απόδοση: 97 %

Σημείο τήξεως: 99 - 101 °C, (Σ.Τ. βιβλιογραφίας^[174]:122 – 124 °C)

1H NMR (600MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.49 (s, 1H, H-4), 7.53 (d, $J = 9$ Hz, 1H, H-5), 6.97 (dd, $J = 9$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-6), 6.82 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-8), 5.46 (t, $J = 6$ Hz, 1H, H-2') , 5.07 (t, $J = 6$ Hz, 1H, H-6'), 4.64 (d, $J = 6$ Hz, 2H, H-1'), 2.70 (s, 3H, 3- CH_3), 2.13 (m, 4H, H-5' & H-4'), 1.76 (s, 3H, 3'- CH_3), 1.66 (s, 3H, 7'- CH_3), 1.60 (s, 3H, 8'- CH_3)

3-ακετυλο-7-βενζυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (8c)



Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Β**, 1.96 mmol (400 mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης προστίθενται σε 27.4 mL ακετόνης. Στη συνέχεια, προστίθενται 1.96 mmol (271 mg) K_2CO_3 και 2.35 mmol (272.6 μ L) βενζυλο-βρωμιδίου. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου. Παραλαμβάνεται υπόλευκο στερεό.

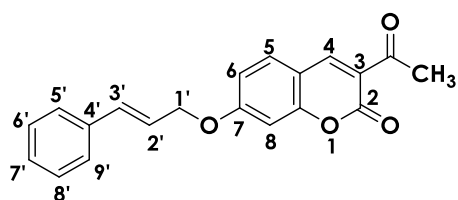
Απόδοση: 60 %

Σημείο τήξεως: 180 – 181 °C

1H NMR (600MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.49 (s, 1H, H-4), 7.55 (d, $J = 12$ Hz, 1H, H-5), 7.42 (m, 4H, H-4' & H-6' & H-3' & H-7'), 7.37 (m, 1H, H-5'), 6.97 (dd, $J = 9$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-6), 6.89 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-8), 5.16 (s, 2H, H-1'), 2.70 (s, 3H, 3- CH_3)

HRMS calcd for $C_{18}H_{15}O_4$ (M+H)⁺: m/z: 295.0965, found: 295.0960

3-ακετυλο-7-κινναμυλοξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (8d)



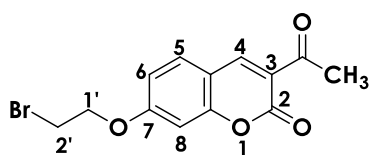
Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Β**, 0.83 mmol (170 mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης προστίθενται σε 11.7 mL ακετόνης. Στη συνέχεια, προστίθενται 0.83 mmol (115 mg) K_2CO_3 και 0.99 mmol (195.1 mg) κινναμυλο-βρωμιδίου. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου. Παραλαμβάνεται κίτρινο στερεό.

Απόδοση: 28 %

Σημείο τήξεως: 176 – 177 °C

1H NMR (600MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.49 (s, 1H, H-4), 7.55 (d, $J = 12$ Hz, 1H, H-5), 7.42 (s, 1H, H-5'), 7.41 (s, 1H, H-9'), 7.34 (t, $J = 9$ Hz, 2H, H-6' & H-8'), 7.28 (m, 1H, H-7'), 6.96 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-6), 6.89 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-8) 6.76 (d, $J = 18$ Hz, 1H, H-3'), 6.38 (m, 1H, H-2'), 4.80 (d, $J = 6$ Hz, 2H, H-1'), 2.71 (s, 3H, 3- CH_3)

3-ακετυλο-7-(2-βρωμοεθοξυ)-2H-χρωμεν-2-όνη (8e)



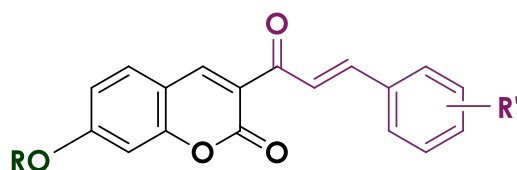
Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Β**, 1.45 mmol (300 mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης προστίθενται σε 20.6 mL ακετόνης. Στη συνέχεια, προστίθενται 1.45 mmol (203 mg) K_2CO_3 και 1.76 mmol (260 μ L) 1,2-διβρωμοεθανίου. Μετά το τέλος της αντίδρασης, ακολουθεί ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου. Παραλαμβάνεται πορτοκαλί στερεό.

Απόδοση: 20 %

Σημείο τήξεως: 163 – 164 °C

1H NMR (600MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 8.49 (s, 1H, H-4), 7.56 (d, $J = 12$ Hz, 1H, H-5), 6.93 (dd, $J = 12$ Hz, $J = 6$ Hz, 1H, H-6), 6.76 (d, $J = 18$ Hz, 1H, H-3'), 6.83 (d, $J = 6$ Hz, 1H, H-8), 4.39 (t, $J = 6$ Hz, 2H, H-1'), 3.68 (t, $J = 6$ Hz, 2H, H-2'), 2.71 (s, 3H, 3- CH_3)

1.5. Συνθετική πορεία υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών (Μέθοδος Γ)



R = H, prenyl, geranyl

R' = H, OCH_3 , CF_3

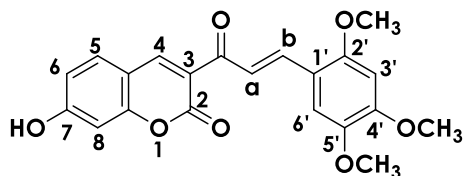
Σχήμα 44 Γενική δομή υβριδικών μορίων κουμαρινών – χαλκονών.

Κατάλληλη ποσότητα 3-ακετυλο-7-υποκατεστημένης-κουμαρίνης (1 eq) και ισομοριακή ποσότητα βενζαλδεΐδης (1 eq) αντιδρούν παρουσία πιπεριδίνης και διαλύτη αιθανόλη. Το μίγμα αναδεύεται συνεχώς στους 78 °C για 24 ώρες, παρουσία καθέτου ψυκτήρα.

Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 80% (PE) : 20% (EtOAc). Μετά το τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται οξίνιση με προσθήκη διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (HCl 10%) υπό ψύξη και μετά την καταβύθιση στερεού, πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό. Το διήθημα υφίσταται διεργασίες καθαρισμού

(ανακρυστάλλωση, χρωματογραφία στήλης) και η καθαρότητά του ελέγχεται μέσω φασματοσκοπίας ^1H NMR, ^{13}C NMR και φασματομετρίας Μάζας Υψηλής Ανάλυσης (HR-MS).

7-υδροξυ-3-(3-(2,4,5,-τριμεθοξυφαινυλ)ακρυλοϋλ)-2H-χρωμεν-2-όνη (10a)



Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Γ**, 0.73 mmol (149.4 mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης και 0.73 mmol (143.6 mg) 2,4,5-τριμεθοξυβενζαλδεϋδης προστίθενται σε 2.9 mL αιθανόλης και 6 σταγόνες πιπεριδίνης. Μετά το τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται εκχύλιση της υδατικής σπιβάδας και το προϊόν που λαμβάνεται ανακρυσταλλώνεται με κατάλληλη ποσότητα διχλωρομεθανίου και μεθανόλης. Παραλαμβάνεται κόκκινο στερεό.

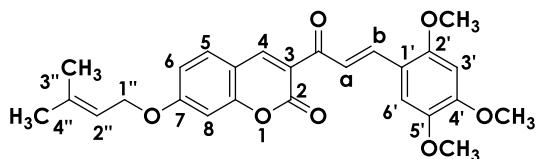
Απόδοση: 30 %

Σημείο τήξεως: 247 °C (decomp.)

^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 11.07 (br, 1H, OH), 8.59 (s, 1H, H-4), 7.94 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, H-b), 7.78 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-5), 7.67 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, H-a), 7.24 (s, 1H, H-2'), 6.86 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-6), 6.77 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-8), 6.75 (s, 1H, H-5'), 6.77 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-8), 6.75 (s, 1H, H-5'), 3.89 (s, 3H, 3'-OCH₃), 3.87 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3.77 (s, 3H, 6'-OCH₃)

^{13}C NMR (150MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 186.4, 159.0, 157.0, 154.5, 152.9, 147.6, 143.0, 138.0, 132.2, 122.0, 114.2, 111.3, 111.1, 97.7, 97.6, 56.4, 56.4, 56.2, 56.2, 55.9, 55.9

7-((3-μεθυλβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-3-(3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)ακρυλοϋλ)-2H-χρωμεν-2-όνη (10b)



Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Γ**, 0.44 mmol (120 mg) 3-ακετυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνης και 0.44 mmol (86.33 mg) 2,4,5-τριμεθοξυβενζαλδεϋδης προστίθενται σε 1.8 mL αιθανόλης και 4 σταγόνες πιπεριδίνης. Μετά το τέλος της αντίδρασης και την οξίνιση, παρατηρείται δημιουργία γαλακτώματος και εν συνεχεία ψύξη αυτού. Τέλος, πραγματοποιείται καθαρισμός του προϊόντος με τη μέθοδο χρωματογραφίας στήλης σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Παραλαμβάνεται πορτοκαλί στερεό.

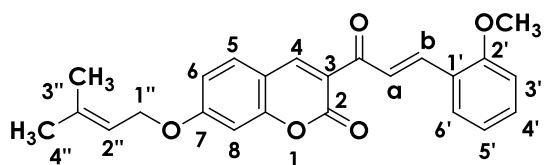
Απόδοση: 30 %

Σημείο τήξεως: 144 – 145 °C

¹H NMR (600MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.55 (s, 1H, H-4), 8.21 (d, *J* = 16.2Hz, 1H, H-b), 7.90 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, H-a), 7.54 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-5), 7.19 (s, 1H, H-6'), 6.89 (dd, *J* = 2.4 Hz, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-6), 6.84 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-8), 6.50 (s, 1H, H-3'), 5.48 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-2''), 4.62 (d, *J* = 6.6Hz, 2H, H-1''), 3.94 (s, 3H, 2'-OCH₃), 3.91 (s, 3H, 4'-OCH₃), 3.90 (s, 3H, 5'-OCH₃), 1.82 (s, 3H, 4''-CH₃), 1.78 (s, 3H, 3''-CH₃)

HRMS calcd for C₂₆H₂₇O₇ (M+H)⁺: m/z: 451.4883, found: 451.1751

3-(3-(2-μεθοξυφαινυλ)ακρυλοϋλ)-7-((3-μεθυλοβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2H-χρωμεν-2-όνη (10c)



Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Γ**, 0.59 mmol (159.9 mg) 3-ακετυλο-7-πρενυλοξυκουμαρίνης και 0.59 mmol (79.9 mg) 2-μεθοξυ-βενζαλδεΐδης προστίθενται σε 2.4 mL αιθανόλης και 4 σταγόνες

πιπεριδίνης. Μετά το τέλος της αντίδρασης και την οξίνιση, παρατηρείται καταβύθιση στερεού κι έτσι πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό. Τέλος, πραγματοποιείται ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου. Παραλαμβάνεται κίτρινο στερεό.

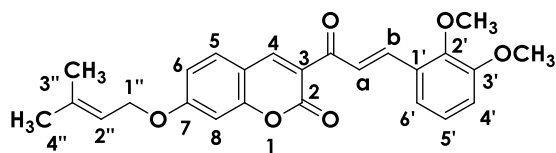
Απόδοση: 33 %

Σημείο τήξεως: 130 – 132 °C

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.56 (s, 1H, H-4), 8.21 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, H-b), 8.05 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H, H-a), 7.71 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H, H-2'), 7.54 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-5), 6.91 (m, 4H, H-6 & H-8 & H-3' & H-5'), 7.37 (pseudotriplet, 1H, H-4'), 5.48 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-2''), 4.61 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-1'') 3.91 (s, 3H, -OCH₃), 1.80 (d, *J* = 12 Hz, 6H, 3''-CH₃ & 4''-CH₃)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 186.96, 164.48, 159.96, 159.10, 157.70, 148.35, 139.93, 132.04, 131.30, 129.43, 124.76, 124.21, 121.75, 120.86, 118.43, 114.42, 112.46, 111.30, 101.15, 66.87, 55.68, 55.67, 25.95, 18.46

3-(3-(2,3-διμεθοξυφαινυλ)ακρυλοϋλ)-7-((3-μεθυλβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2H-χρωμεν-2-όνη (10d)



Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Γ**, 0.55 mmol (150 mg) 3-ακετυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνης προστίθενται σε 2.24 mL αιθανόλης. Κατόπιν, προστίθενται 0.55 mmol (91.4 mg) 2,3-διμεθοξυ-βενζαλδεΐδης καθώς και 5 σταγόνες πιπεριδίνης. Τέλος, με τη μέθοδο χρωματογραφίας στήλης πραγματοποιείται καθαρισμός του προϊόντος σε σύστημα διαλυτών 70% (PE) : 30% (EtOAc). Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

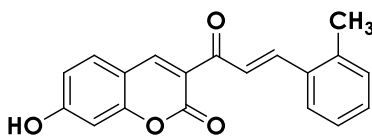
Απόδοση: 32 %

Σημείο τήξεως: 136 – 137 °C

¹H NMR (600MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.57 (s, 1H, H-4), 8.18 (d, *J* = 18 Hz, 1H, H-b), 8.03 (d, *J* = 18 Hz, 1H, H-a), 7.55 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 7.36 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-6'), 7.08 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-5'), 6.96 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-4'), 6.90 (dd, *J* = 1.8 Hz, *J* = 9 Hz, 1H, H-6), 6.85 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-8), 5.48 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, H-2''), 4.62 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, H-1''), 3.90 (s, 3H, 3'-OCH₃), 3.89 (s, 3H, 2'-OCH₃), 1.82 (s, 3H, 4''-CH₃), 1.78 (s, 3H, 3''-CH₃)

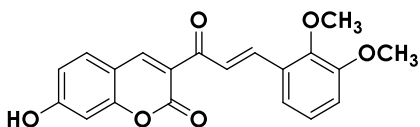
HRMS calcd for C₂₅H₂₅O₆ (M+H)⁺: m/z: 421.4624, found: 421.1624

7-υδροξυ-3-(3-(ο-τολυλ)ακρυλοϋλ)-2H-χρωμεν-2-όνη (10e)



Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Γ**, 1.23 mmol (251.6 mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης και 1.23 mmol (140 μL) 2-μεθυλο-βενζαλδεΐδης προστίθενται σε 5 mL αιθανόλης και 10 σταγόνες πιπεριδίνης. Μετά το τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου. Όπως διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία NMR, για την παραλαβή καθαρού προϊόντος απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός.

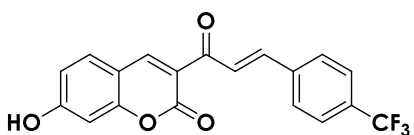
3-(3-(2,3-διμεθοξυφαινυλ)ακρυλοϋλ)-7-υδροξυ-2H-χρωμεν-2-όνη (10f)



Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Γ**, 0.74 mmol (150 mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης και 0.74 mmol (122.1 mg) 2,3-διμεθοξυ-βενζαλδεΐδης

προστίθενται σε 3 mL αιθανόλης και 6 σταγόνες πιπεριδίνης. Μετά το τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται καθαρισμός του προϊόντος με τη μέθοδο χρωματογραφίας στήλης σε σύστημα διαλυτών 95% (PE) : 5% (EtOAc). Όπως διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία NMR, για την παραλαβή καθαρού προϊόντος απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός.

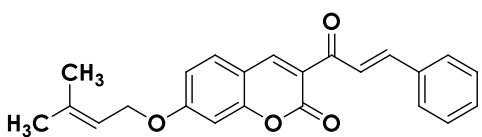
7-υδροξυ-3-(3-(4-(τριφθορομεθυλ)φαινυλ)ακρυλοϋλ)-2H-χρωμεν-2-όνη (10g)



Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Γ**, 0.74 mmol (150 mg) 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης και 0.74 mmol (150 μ L) 4-τριφθορομεθυλο-βενζαλδεΐδης προστίθενται σε 3 mL αιθανόλης και 6 σταγόνες πιπεριδίνης.

Μετά το τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου. Όπως διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία NMR, για την παραλαβή καθαρού προϊόντος απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός.

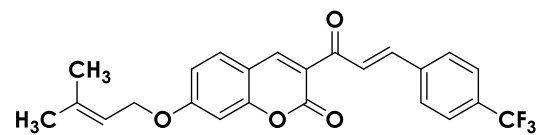
3-κινναμούλο-7-((3-μεθυλβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2H-χρωμεν-2-όνη (10h)



Σε σχέση με τη **Μέθοδο Γ**, προτιμήθηκε μεγαλύτερη αναλογία βενζαλδεΐδης (1 εα κουμαρίνης προς 1.5 εα βενζαλδεΐδης) προκειμένου να είναι δυνατός ο διαχωρισμός.

Συγκεκριμένα 0.44 mmol (120 mg) 3-ακετυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνης και 0.66 mmol (67.13 μ L) 4-τριφθορομεθυλο-βενζαλδεΐδης προστίθενται σε 3 mL αιθανόλης και 4 σταγόνες πιπεριδίνης. Μετά το τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου. Όπως διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία NMR, για την παραλαβή καθαρού προϊόντος απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός.

7-((3-μεθυλβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-3-(3-(4-(τριφθορομεθυλ)φαινυλ)ακρυλοϋλ)-2H-χρωμεν-2-όνη (10i)

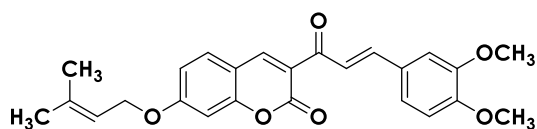


Σε σχέση με τη **Μέθοδο Γ**, προτιμήθηκε μεγαλύτερη αναλογία βενζαλδεΐδης (1 εα κουμαρίνης προς 1.5 εα βενζαλδεΐδης) καθώς και διαλύτης ξηρό

διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) προκειμένου να είναι δυνατός ο διαχωρισμός. Συγκεκριμένα, 0.29 mmol (80.40 mg) 3-ακετυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνης και 0.44 mmol (60 μ L) 4-τριφθορομεθυλο-βενζαλδεΐδης προστίθενται σε 1.3 mL DMF και

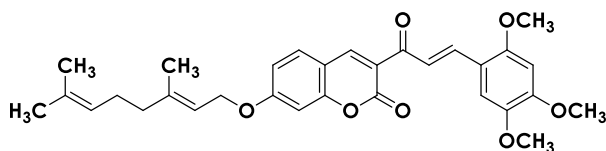
3σταγόνες πιπεριδίνης. Μετά το τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου. Όπως διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία NMR, για την παραλαβή καθαρού προϊόντος απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός.

3-(3-(3,4-διμεθοξυφαινυλ)ακρυλοϋλ)-7-((3-μεθυλβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2Η-χρωμεν-2-όνη (10j)



Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Γ**, 0.44 mmol (120 mg) 3-ακετυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνης και 0.44 mmol (73.1 mg) 3,4-διμεθοξυ-βενζαλδεΰδης προστίθενται σε 2 mL αιθανόλης και 4 σταγόνες πιπεριδίνης. Μετά το τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου. Όπως διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία NMR, για την παραλαβή καθαρού προϊόντος απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός.

7-((3,7-διμεθυλοκτα-2,6-διεν-1-υλ)οξυ)-3-(3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)ακρυλοϋλ)-2Η-χρωμεν-2-όνη (10k)



Σύμφωνα με τη **Μέθοδο Γ**, 0.59 mmol (200 mg) 3-ακετυλο-7-γερανυλοξυ-κουμαρίνης και 0.59 mmol (115.3 mg) 2,4,5-τριμεθοξυ-βενζαλδεΰδης προστίθενται σε 2.4 mL αιθανόλης και 5 σταγόνες πιπεριδίνης. Μετά το τέλος της αντίδρασης, πραγματοποιείται εκχύλιση της υδατικής στιβάδας και το προϊόν που λαμβάνεται ανακρυσταλλώνεται με κατάλληλη ποσότητα διχλωρομεθανίου και μεθανόλης. Όπως διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία NMR, για την παραλαβή καθαρού προϊόντος απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός.

2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

2.1. Οργανολογία – Υλικά

Για την αξιολόγηση της ικανότητας των ενώσεων να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση και τη δράση της φυτικής λιποξυγονάσης χρησιμοποιήθηκαν: ο διαλύτης διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), η ρίζα 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζίλη (DPPH), το νορδιυδρογουαϊαρετικό οξύ (NDGA), το άλας λινελαϊκού οξέος με νάτριο, το 2,2-αζοδισ-(2-αμιδινοπροπανο)διυδροχλωρίδιο (AAPH) και η λιποξυγονάση φυτικής προέλευσης (σόγια), τα οποία προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma – Aldrich (St. Louis, MO, USA). Η απορρόφηση των διαλυμάτων μετρήθηκε με το φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer Lambda 20.

Για την αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας επιλεγμένων μορίων χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά LNCap. Τα θρεπτικά μέσα καλλιέργειών Minimal Essential Medium και Dulbecco's Modified Eagle's που χρησιμοποιήθηκαν προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich. Το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) που χρησιμοποιήθηκε ήταν ειδικό για κυτταροκαλλιέργειες και αγοράστηκε από τη Sigma-Aldrich. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε επωαστήριο κυττάρων ατμόσφαιρας 5% (v/v) CO₂ σε αέρα και θερμοκρασία 37 °C της εταιρίας Thermo Scientific και απαγωγό κάθετης νηματικής ροής. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν υδατόλουτρο (στους 37 °C), επιτραπέζια φυγόκεντρος και οπτικό μικροσκόπιο.

2.2. Προσδιορισμός *in vitro* αντιοξειδωτικής δράσης των νέων κουμαρινικών αναλόγων

Για τα βιολογικά πειράματα, προετοιμάστηκαν stock διαλύματα ενώσεων σε DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο) συγκέντρωσης 10 mM. Οι δοκιμασίες πραγματοποιούνται τρεις φορές και τα αποτελέσματα αποδίδονται ως ο μέσος όρος των τριών τιμών.

Ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH (Μέθοδος DPPH)

Η ικανότητα των νέων κουμαρινικών αναλόγων να αλληλεπιδρούν με την ελεύθερη ρίζα DPPH αξιολογήθηκε σε χρόνους 20 και 60 λεπτών με βάση την ακόλουθη διαδικασία:

Αρχικά, παρασκευάζεται αιθανολικό διάλυμα DPPH (0.1 mM), στο οποίο προστίθενται οι υπό μελέτη ενώσεις σε τελική συγκέντρωση 0.1 mM. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται σε ηρεμία για 20 και 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος στα 517 nm – που

αποτελεί το μήκος κύματος απορρόφησης του DPPH – και τέλος, υπολογίζεται το ποσοστό της αντιοξειδωτικής δράσης. Ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το NDGA.^[175]

Ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Μέθοδος AAPH)

Η ικανότητα των νέων κουμαρινικών αναλόγων να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση υπολογίζεται μέσω του υπολογισμού της απορρόφησης υδατικού διαλύματος άλατος νατρίου του λινελαϊκού οξέος στα 234 nm.

Αρχικά, παρασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων συγκέντρωσης 0.05 M με pH 7.4 και σε θερμοκρασία 37 °C. Ακολουθώντας, 0.93 mL του ρυθμιστικού διαλύματος προστίθενται σε κυψελίδα χαλαζία UV μαζί με 10 µL από το αιώρημα των 16 mM του διαλύματος άλατος νατρίου του λινελαϊκού οξέος. Στη συνέχεια, προστίθενται 50 µL από το διάλυμα AAPH συγκέντρωσης 40 mM και εκκινεί η αντίδραση οξειδωσης στον αέρα και σε θερμοκρασία 37 °C. Για την μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας της ένωσης προστίθενται 10 µL διαλύματος της ένωσης σε DMSO, ενώ στην περίπτωση που δεν υπάρχει αντιοξειδωτικό, προστίθεται ίδια ποσότητα διαλύτη DMSO. Η παρακολούθηση του ρυθμού οξειδωσης στα 234 nm και στους 37 °C, πραγματοποιείται με καταγραφή της μείωσης απορρόφησης που εμφανίζεται λόγω των συζευγμένων διενικών υδροϋπεροξειδίων. Ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το Trolox.^[175]

2.3. Προσδιορισμός *in vitro* αντιφλεγμονώδους δράσης των νέων κουμαρινικών αναλόγων

Η αντιφλεγμονώδης δράση των νέων κουμαρινικών αναλόγων εκφράζεται μέσω της ικανότητας αναστολής της φυτικής λιποξυγονάσης (LOX). Οι υπό εξέταση ενώσεις διαλύονται σε DMSO 10 mM, ενώ σε κυψελίδα χαλαζία προστέθηκαν 0.1 mL λινελαϊκού νατρίου και 0.2 mL ενζυμικού διαλύματος (1/9 x 10⁻⁴ w/v σε φυσιολογικό ορό) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris με pH 9.0. Στη συνέχεια, καταγράφεται η μετατροπή του λινελαϊκού νατρίου σε 13-υδροϋπεροξυλινελαϊκό οξύ στα 234 nm με την παρουσία του διαλύματος της ένωσης και συγκρίνεται με την προκαλούμενη μετατροπή από την κατάλληλη ένωση αναφοράς (NDGA).^{[175],[176]}

Στην περίπτωση των ενώσεων για τις οποίες η προκαλούμενη αναστολή ήταν $\geq 50\%$ στα 100 µM προσδιορίστηκε η τιμή IC₅₀ σε µM (χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα 5-100 µM).

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με το Εργαστήριο Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτελείου

Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, από την Καθηγήτρια Δήμητρα Χατζηπαύλου – Λίτινα και τους συνεργάτες της.

2.4. Προσδιορισμός *in vitro* κυτταροτοξικότητας των νέων κουμαρινικών αναλόγων

Κυτταρική καλλιέργεια

Τα καρκινικά κύτταρα του ανθρώπινου προστάτη (LNCap) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI Medium 1640 (4.5 g/L D-γλυκόζης), εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός (FBS) και αντιβιοτικά (antibiotic – antimycotic), αγορασμένα από την εταιρεία gibco®.

Η κυτταρική σειρά διατηρήθηκε σε τυπικές συνθήκες καλλιέργειας (37 °C και 5% CO₂).

Τα πειράματα όσον αφορά την κυτταρική σειρά ανθρώπινου καρκίνου προστάτη (LNCap) πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με το Εργαστήριο Βιοϊατρικής Οπτικής και Εφαρμοσμένης Βιοφυσικής της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών του Ε.Μ.Π. από τη Δρ. Ελένη Αλεξανδράτου και τους συνεργάτες της.

Δοκιμασία βιωσιμότητας κυτάρων (Δοκιμασία MTT)

Η βιωσιμότητα των κυτάρων προσδιορίστηκε μέσω της δοκιμασίας MTT (3-(4,5-διμεθυλοθιαζολ-2-υλ)-2,5-διφαινυλτετραζόλιο βρωμίδιο, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) το οποίο προμηθεύτηκε από την εταιρεία Sigma – Aldrich (St. Louis, MO, USA).^[177] Τα ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου προστάτη (LNCap) επιστρώθηκαν σε πλακίδιο 96 πηγαδίων σε πλήρες μέσο καλλιέργειας και στην κατάλληλη πυκνότητα κυτάρων και επώαστηκαν. Είκοσι τέσσερις ώρες μετά την επίστρωση και έχοντας τα πηγάδια πληρωθεί περίπου στο 90%, πραγματοποιείται αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και προσθήκη των υπό εξέταση ενώσεων σε διαφορετικές αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0 μΜ, 5 μΜ, 10 μΜ, 50 μΜ, 100 μΜ και 200 μΜ), σε μέσο χωρίς ορό για 48 ώρες στους 37 °C. Τα κουμαρινικά παράγωγα διαλύονται σε DMSO και αραιώνονται στην κατάλληλη συγκέντρωση σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας χωρίς ορό ώστε η τελική συγκέντρωση DMSO σε κάθε πηγάδι να είναι 0.5% (v/v). Μετά από 48 ώρες επώασης, το θρεπτικό μέσο απομακρύνεται και τα κύτταρα επώάζονται περαιτέρω για 3 ώρες στους 37 °C σε θρεπτικό μέσο χωρίς ορό το οποίο περιείχε 0.65 mg / mL MTT.

Τέλος, το θρεπτικό μέσο απομακρύνεται και κάθε πηγάδι εκπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS). Οι κρύσταλλοι φορμαζάνης με

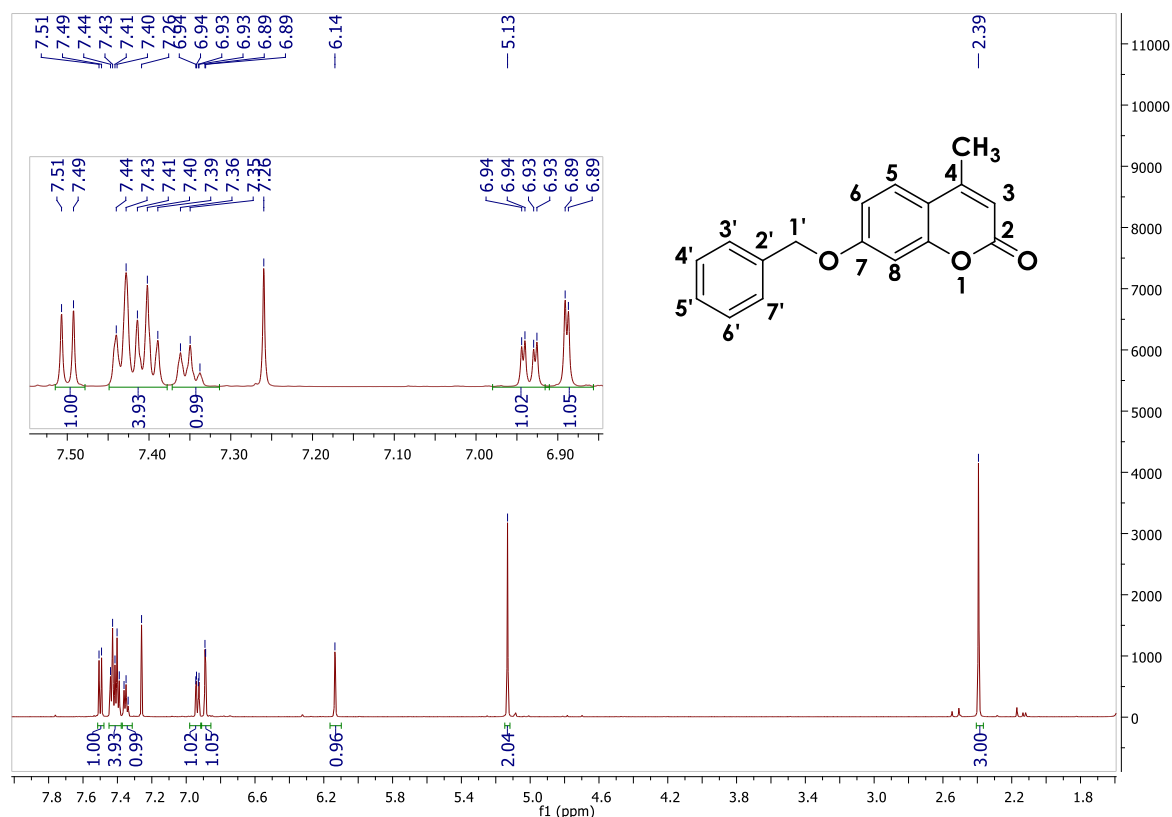
σκούρο μωβ χρώμα, που σχηματίστηκαν από τα μιτοχόνδρια των μεταβολικώς ενεργών κυττάρων, διαλύονται σε DMSO και μετράται η απορρόφηση τους στα 550 nm με μετρητή πλακιδίων Spectramax 250 (Molecular Devices®) του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν για κάθε ένωση και οι τιμές IC₅₀ υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).



Σχήμα 45 Μετατροπή του βρωμιδίου MTT σε φορμαζάνη.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

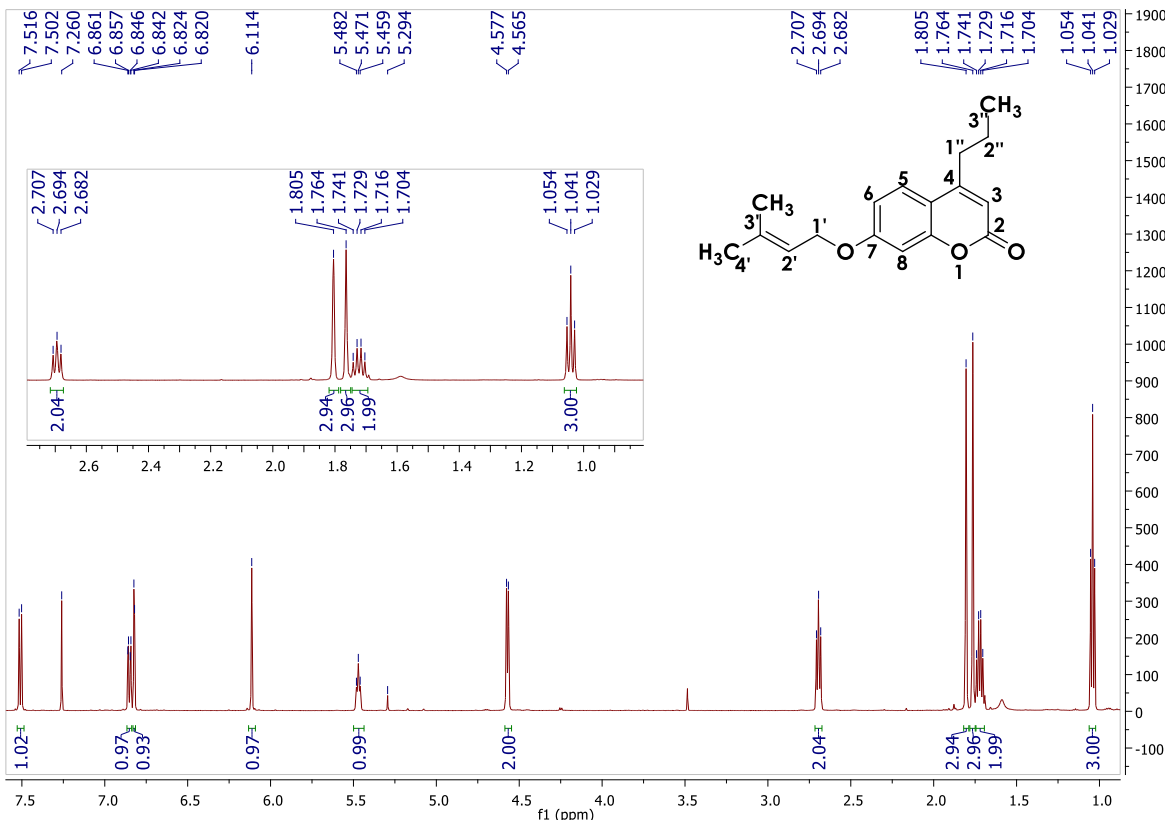


Εικόνα 13: Φάσμα ¹H NMR της 7-(βενζυλοξυ)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (**4d**) (CDCl₃).

Το παραπάνω φάσμα χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας απλής κορυφής στα 2.39 ppm που ολοκληρώνεται για 3 πρωτόνια και αποδίδεται στα πρωτόνια της μεθυλο-ομάδας της θέσης 4. Εν συνεχεία, εμφανίζεται στα 5.13 ppm επίσης μια απλή κορυφή που αποδίδεται στα 2 πρωτόνια του μεθυλενίου της θέσης 1', ενώ στα 6.14 ppm η απλή κορυφή ολοκληρώνεται για 1 πρωτόνιο, αυτό της θέσης 3.

Έπειτα, στα 6.89 ppm παρατηρείται μια διπλή κορυφή με $J = 2.4$ Hz που αποδίδεται στο H-8, ως αποτέλεσμα της σύζευξης του με το αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 6. Στα 6.94 ppm εμφανίζεται μια διπλή διπλών κορυφή που αποδίδεται στο H-6 με $J = 8.4$ Hz και $J = 2.4$ Hz, λόγω της σύζευξης του με τα H-5 και H-8, αντίστοιχα.

Ακολουθως, στα 7.35 ppm η πολλαπλή κορυφή ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο, της θέσης 5', ενώ η επίσης πολλαπλή στα 7.41 ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια H-6', H-4', H-3' και H-7'. Τέλος, η διπλή κορυφή στα 7.50 ppm αποδίδεται στο H-5 καθώς διαθέτει ένα μη ισοδύναμο γειτονικό πρωτόνιο.



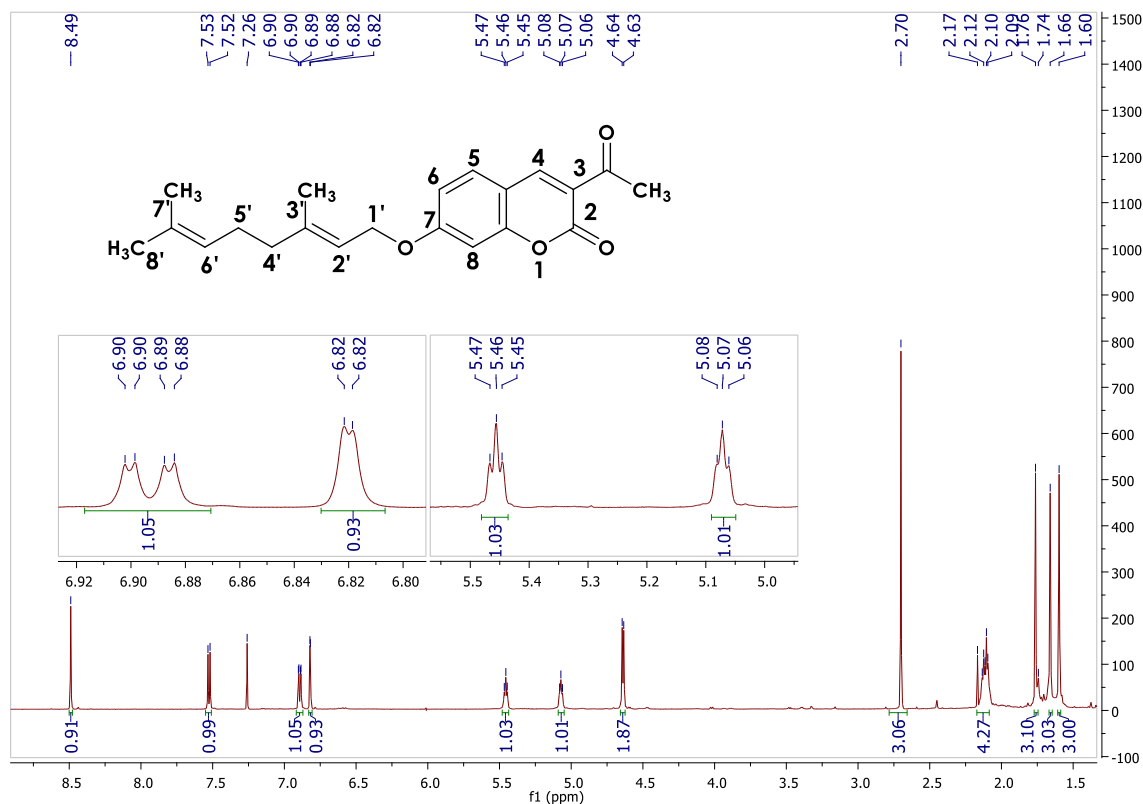
Εικόνα 14: Φάσμα ¹H NMR της 7-((3-μεθυλβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-4-προπυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (**4e**) (CDCl₃).

Το παραπάνω φάσμα χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας τριπλής κορυφής στα 1.04 ppm που ολοκληρώνεται για 3 πρωτόνια και αποδίδεται στα πρωτόνια της μεθυλο-ομάδας της θέσης 3''. Στα 1.72 ppm η πολλαπλή κορυφή αποδίδεται στα 2 πρωτόνια της θέσης 2'', ενώ στα 1.76 ppm η απλή κορυφή ολοκληρώνεται για τα 3 πρωτόνια της μεθυλο-ομάδας της θέσης 4' και στα 1.80 ppm η επίσης απλή κορυφή αποδίδεται στα 3 πρωτόνια της μεθυλο-ομάδας της θέσης 3'.

Εν συνεχεία, στα 2.69 ppm παρατηρείται μια τριπλή κορυφή που ολοκληρώνεται για τα 2 πρωτόνια της θέσης 1'' λόγω αλληλεπίδρασης με τα πρωτόνια της θέσης 2'' καθώς και του μεθυλίου της θέσης 3''. Στα 4.57 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή που αποδίδεται στα 2 πρωτόνια H-1', ενώ η τριπλή κορυφή στα 5.47 ppm ολοκληρώνεται για 2 πρωτόνια, της θέσης 2'.

Έπειτα, στα 6.11 ppm η απλή κορυφή αποδίδεται στο H-3, ενώ στα 6.82 ppm η διπλή κορυφή αντιστοιχεί στο H-8, ως αποτέλεσμα της σύζευξης του με το αρωματικό πρωτόνιο της θέσης 6. Η διπλή διπλών κορυφή στα 6.85 ppm

αποδίδεται στο H-6, με $J = 9$ Hz και $J = 2.4$ Hz, λόγω της σύζευξης του με τα H-5 και H-8, αντίστοιχα. Τέλος, η διπλή κορυφή στα 7.51 ppm αποδίδεται στο H-5 καθώς διαθέτει ένα μη ισοδύναμο γειτονικό πρωτόνιο.



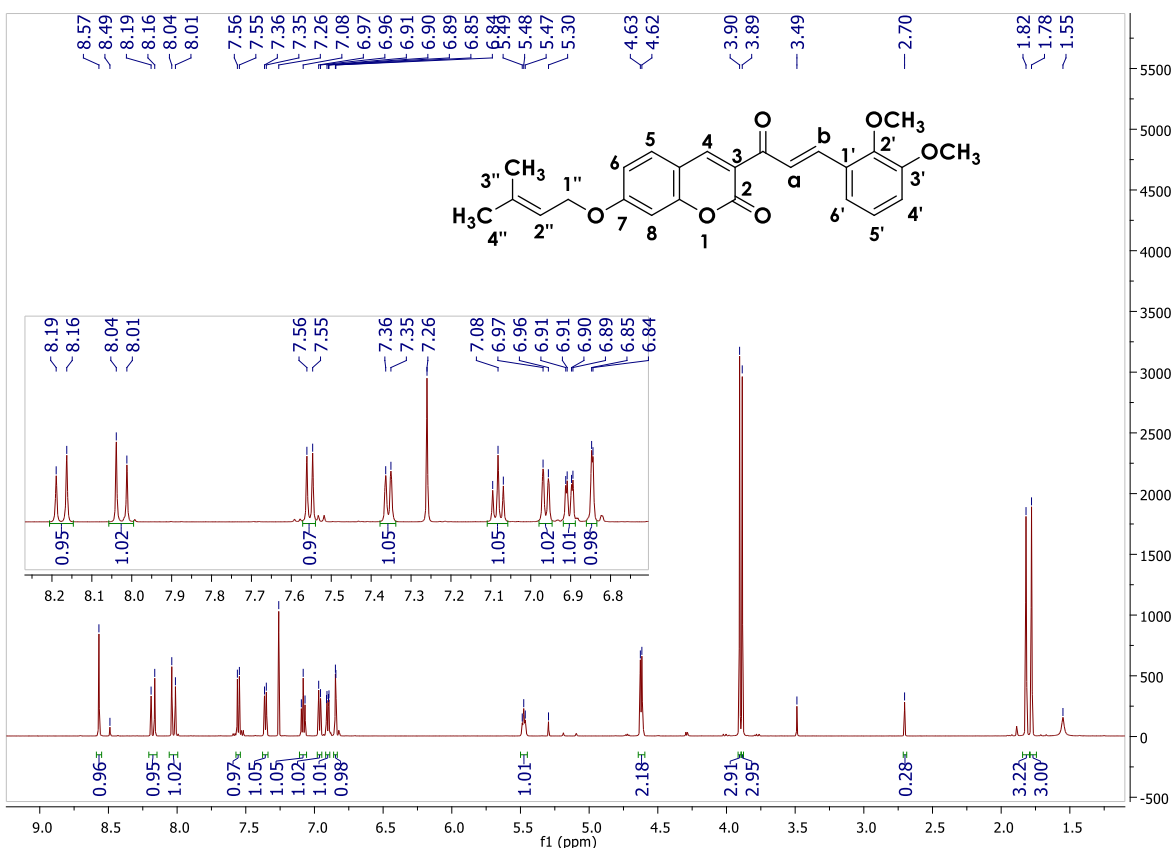
Εικόνα 15: Φάσμα ^1H NMR της 3-ακετυλο-7-γερανυλοξυ-κουμαρίνης (**8b**) (CDCl_3).

Το φάσμα αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας απλής κορυφής στα 1.60 ppm, μιας απλής στα 1.66 ppm και ακόμα μιας απλής στα 1.76 ppm, που ολοκληρώνονται για 3 πρωτόνια η κάθε μία η κάθε μία και οφείλονται στις μεθυλο-ομάδες των θέσεων 8', 7' και 3', αντίστοιχα, της γερανυλ-αλυσίδας. Στα 2.13 ppm η πολλαπλή κορυφή ολοκληρώνεται για 4 πρωτόνια και αποδίδεται στα H-4' και H-5', ενώ στα 2.70 ppm η απλή κορυφή ολοκληρώνεται για τα 3 πρωτόνια της ακετυλο-ομάδας της θέσης 3.

Επιπλέον, στα 4.64 ppm παρατηρείται μια διπλή κορυφή που αντιστοιχεί στο H-1'. Στα 5.07 ppm η τριπλή κορυφή αποδίδεται στο H-6', λόγω της σύζευξης του με δύο μη ισοδύναμα γειτονικά πρωτόνια, ενώ η επίσης τριπλή κορυφή στα 5.46 ppm αποδίδεται στο H-2' για τον ίδιο λόγο (δύο μη ισοδύναμα γειτονικά πρωτόνια).

Περνώντας στα αρωματικά πρωτόνια του κουμαρινικού δακτυλίου, στα 6.82 ppm η διπλή κορυφή αντιστοιχεί στο H-8, λόγω της μετα-σύζευξης του με το H-6. Η διπλή διπλών κορυφή στα 6.97 ppm αποδίδεται στο H-6, με $J = 9$ Hz και $J = 2.4$ Hz, λόγω της σύζευξης του με τα H-5 και H-8, αντίστοιχα. Η διπλή κορυφή στα 7.53

ppm αποδίδεται στο H-5 λόγω της σύζευξης του με το H-6. Τέλος, στα 8.49 ppm η απλή κορυφή αποδίδεται στο H-4, καθώς δεν αλληλεπιδρά με γειτονικό πρωτόνιο.



Εικόνα 16: Φάσμα ¹H NMR της 3-(3-(2,3-διμεθοξυφαινυλ)ακρυλοϋλ)-7-((3-μεθυλβουτ-2-εν-1-υλ)οξυ)-2H-χρωμεν-2-όνης (**10d**) (CDCl₃).

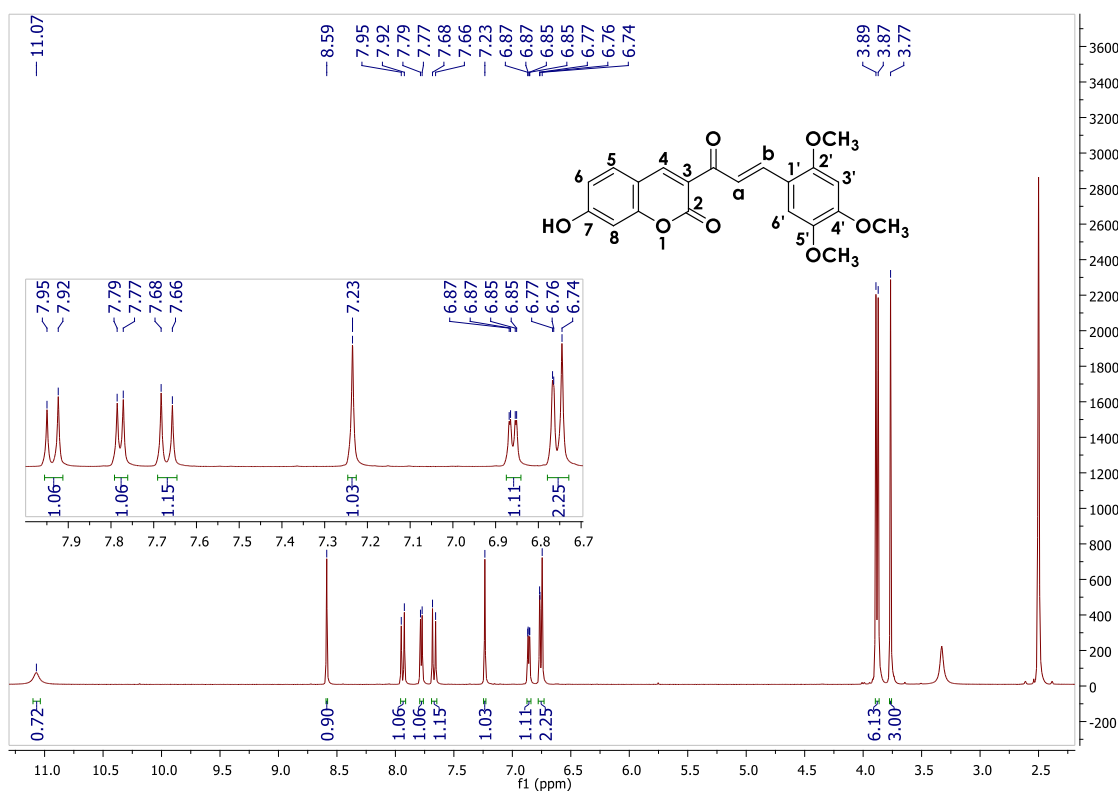
Το παραπάνω φάσμα χαρακτηρίζεται από την παρουσία των δυο απλών κορυφών στα 1.78 και 1.82 ppm, καθεμία από τις οποίες ολοκληρώνεται για 3 πρωτόνια και αντιστοιχεί στις θέσεις 3' και 4', αντίστοιχα, δηλαδή τις μεθυλο-ομάδες της πρενυλο-αλυσίδας. Οι κορυφές στα 3.89 και 3.90 ppm αντιστοιχούν – η καθεμία – στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια των μεθοξυ-ομάδων των θέσεων 2' και 3', αντίστοιχα.

Έπειτα, στα 4.62 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή που αποδίδεται στα δύο πρωτόνια H-1'', ενώ στα 5.48 ppm η τριπλή κορυφή οφείλεται στο H-2'', κορυφές που ανήκουν σε πρωτόνια της πρενυλο-αλυσίδας. Στα 6.85 η διπλή κορυφή αποδίδεται στο H-8, λόγω της μετα-σύζευξης του με το H-6, ενώ η διπλή διπλών κορυφή στα 6.96 ppm αποδίδεται στο H-6, με $J = 9$ Hz και $J = 1.8$ Hz, λόγω της σύζευξης του με τα H-5 και H-8, αντίστοιχα.

Ακολούθως, η ύπαρξη της τριπλής κορυφής στα 7.08 ppm αποδίδεται στο πρωτόνιο της θέσης 5' και η διπλή κορυφή στα 7.36 ppm στο H-6' του

αρωματικού δακτυλίου της βενζυλο-ομάδας. Στα 7.55 ppm η διπλή κορυφή αποδίδεται στο H-5 λόγω της σύζευξης του με το H-6, ενώ η αποδιδόμενη στο H-4 (που δεν αλληλεπιδρά με γειτονικό πρωτόνιο) απλή κορυφή εντοπίζεται στα 8.57 ppm.

Τέλος, ιδιαίτερης σημασίας είναι η εμφανιζόμενη διπλή κορυφή στα 8.03 ppm με $J = 18$ Hz, η οποία αποδίδεται στο H-a, αφού η σταθερά σύζευξης των βινυλικών πρωτονίων κυμαίνεται συνήθως κοντά στην τιμή αυτή, ενώ παρατηρούμε την ίδια τιμή ($J = 18$ Hz) στα 8.18 ppm, όπου εμφανίζεται άλλη μία διπλή κορυφή που αποδίδεται στο H-b. Η τιμή των σταθερών σύζευξης των βινυλικών πρωτονίων, αποδεικνύει την *trans* διευθέτησή τους και επομένως τη στερεοεκλεκτικότητα της αντίδρασης.



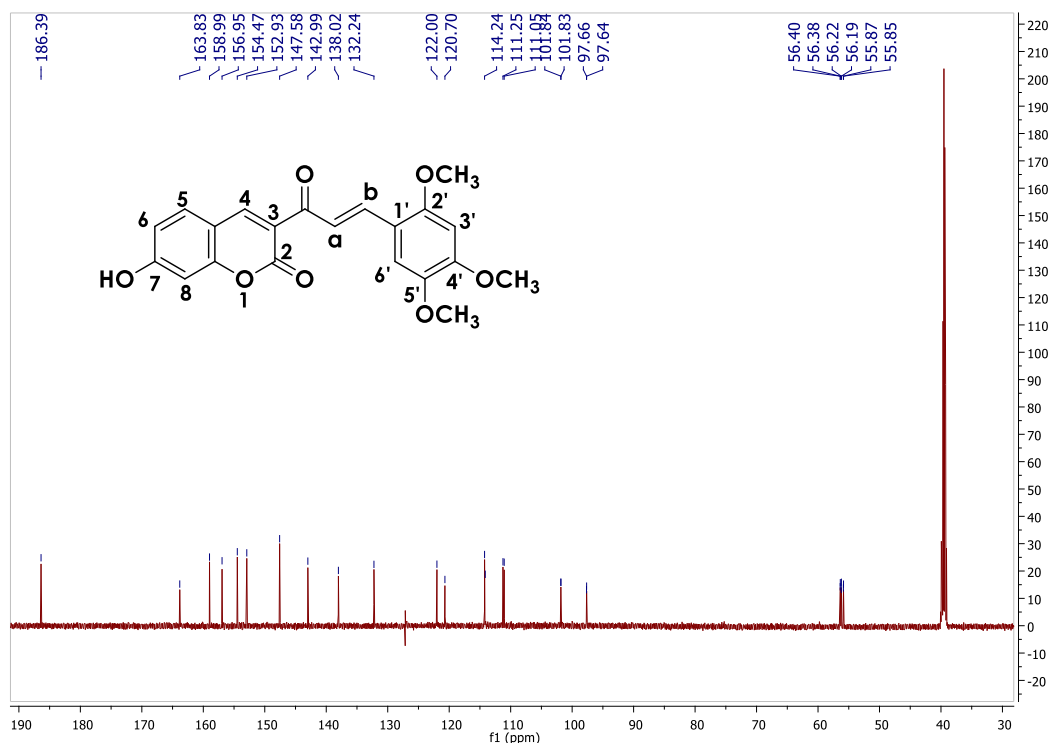
Εικόνα 17: Φάσμα ¹H NMR της 7-υδροξυ-3-(3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)ακρυλοϋλ)-2H-χρωμεν-2-όνης (**10a**) (DMSO-d₆).

Το φάσμα αυτό χαρακτηρίζεται από μία απλή κορυφή στα 3.77 ppm που οφείλεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της μεθοξυ-ομάδας της θέσης 4'. Στα 3.89 ppm και στα 3.87 ppm εμφανίζονται επίσης δύο απλές κορυφές που ολοκληρώνονται για 3 πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια των μεθοξυ-ομάδων των θέσεων 2' και 5', αντίστοιχα.

Έπειτα, η απλή κορυφή στα 6.75 ppm αποδίδεται στο πρωτόνιο H-3'. Στα 6.77 ppm η διπλή κορυφή με $J = 1.8$ Hz αποδίδεται στο H-8, λόγω της σύζευξης του με

το H-6. Ακολούθως, στα 6.86 ppm η διπλή διπλών κορυφή οφείλεται στο H-6, ενώ στα 7.24 ppm εμφανίζεται μία απλή κορυφή που αποδίδεται στο H-6'.

Επιπλέον, στα 7.67 ppm εμφανίζεται μία διπλή κορυφή που οφείλεται στο βινυλικό πρωτόνιο H-a με $J = 15.6$ Hz. Στα 7.78 ppm, η διπλή κορυφή αποδίδεται στο H-5, καθώς διαθέτει ένα μη ισοδύναμο γειτονικό πρωτόνιο. Στα 7.94 ppm εμφανίζεται μία διπλή κορυφή με $J = 15.6$ Hz, επίσης, η οποία οφείλεται στο H-b. Η τιμή των σταθερών σύζευξης των βινυλικών πρωτονίων, αποδεικνύει την *trans* διευθέτησή τους και επομένως τη στερεοεκλεκτικότητα της αντίδρασης. Τέλος, στα 8.59 ppm εμφανίζεται μία απλή κορυφή που αποδίδεται στο H-4, ενώ η ευρεία κορυφή στα 11.07 ppm αντιστοιχεί στο αποπροστατευμένο πρωτόνιο του υδροξυλίου (-OH).

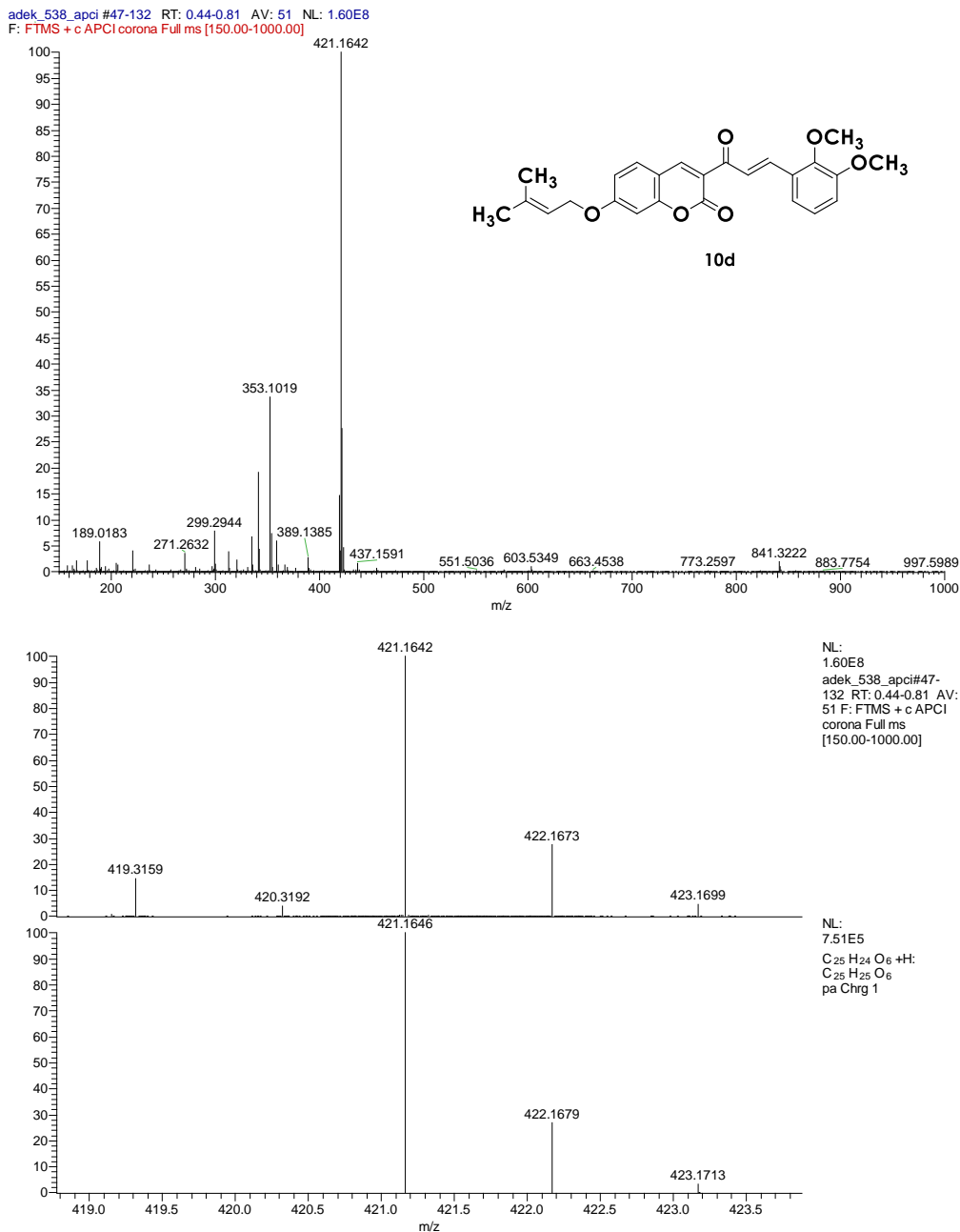


Εικόνα 18: Φάσμα ^{13}C NMR της 7-υδροξυ-3-(3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)ακρυλοϋλ)-2H-χρωμεν-2-όνης (**10a**) ($\text{DMSO-}d_6$).

Στο ανωτέρω φάσμα άνθρακα του υβριδικού μορίου **10a** χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας κορυφής στα χαμηλά πεδία, στα 186.3 ppm, η οποία αποδίδεται στον καρβονυλικό άνθρακα του α, β-ακόρεστου καρβονυλικού συστήματος της χαλκόνης. Στα 159.0 ppm εμφανίζεται ο αποπροστατευμένος καρβονυλικός άνθρακας της θέσης 2 της κουμαρίνης και στα 156.95 ppm ο άνθρακας της θέσης 7 που είναι συνδεδεμένος με την ομάδα OH. Οι άνθρακες του διπλού δεσμού του α, β-ακόρεστου καρβονυλικού συστήματος εντοπίζονται στα 141.1 ppm και στα 122.0 ppm. Προκειμένου να αποδοθούν τα σήματα στους άνθρακες Ca και Cb απαιτούνται πειράματα 2-D NMR (δύο διαστάσεων). Τέλος, οι

άνθρακες των μεθοξυ-ομάδων του μορίου εντοπίζονται στα 56.39, 56.21 και 55.86 ppm.

➤ Στη συνέχεια, παρουσιάζεται ενδεικτικά τα φάσματα ESI-HRMS του μορίου **10d**:

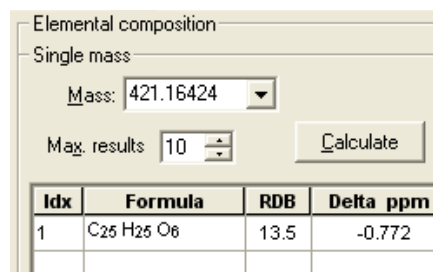


Εικόνα 19: Φάσμα HRMS (ESI) του μορίου **10d**.

Στο παραπάνω φάσμα παρατηρείται μία κορυφή σε m/z 421.16 (100%), η οποία – είναι η βασική κορυφή και – αντιστοιχεί στο ιόν (M+1)⁺ της ένωσης. Το μοριακό ιόν σε προσθήκη δύο ιόντων υδρογόνου (M+2)⁺ εμφανίζεται σε m/z

422.16, ενώ σε προσθήκη τριών ιόντων υδρογόνου (M+3)⁺ εμφανίζεται σε m/z 423.17.

Η επιβεβαίωση της καθαρότητας του μορίου προκύπτει από το γεγονός ότι η αναμενόμενη τιμή του μοριακού βάρους M+1, υπολογισμένη με ακρίβεια (Εικόνα 20) είναι 421.16424 και στο φάσμα HRMS η τιμή είναι 421.1642.



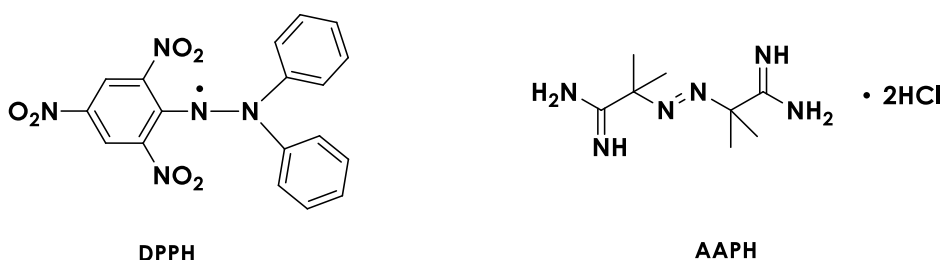
Idx	Formula	RDB	Delta ppm
1	C ₂₅ H ₂₅ O ₆	13.5	-0.772

Εικόνα 20: Υπολογισμός μοριακού βάρους της ένωσης **10d** με μεγάλη ακρίβεια.

2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΚΟΥΜΑΡΙΝΙΚΩΝ ΑΝΑΛΟΓΩΝ

2.1. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης

Τα κουμαρινικά ανάλογα εξετάστηκαν ως προς την αναγωγική τους ικανότητα (εκφράζεται επί τοις εκατό) στην αλληλεπίδρασή τους με την ελεύθερη ρίζα DPPH (Μέθοδος DPPH) και την ικανότητα (εκφράζεται επί τοις εκατό) αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης που επάγεται από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών 2,2'-αζωδις(2-αμιδινοπροπανίου)διϋδροχλωρίδιο, AAPH (Μέθοδος AAPH). Ως ενώσεις αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν, για τη μέθοδο του DPPH το νορ-διυδρογουαϊαρετικό οξύ (Nordihydroguaiaretic acid, NDGA) και για τη μέθοδο του AAPH το Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό ανάλογο της βιταμίνης E.



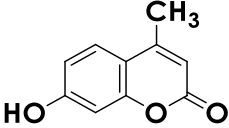
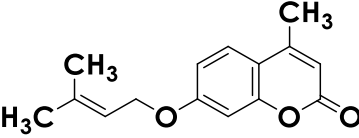
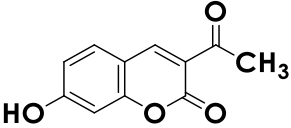
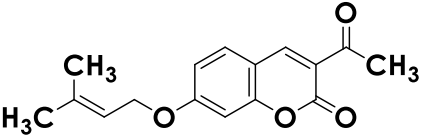
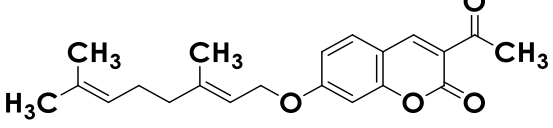
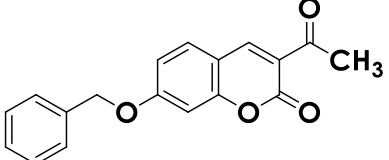
Σχήμα 46 Χημική δομή της ελεύθερης ρίζας DPPH και του εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH.

Αναφορικά με την αξιολόγηση της πιθανούς αντιφλεγμονώδους δράσης των κουμαρινικών αναλόγων, αυτή αξιολογήθηκε *in vitro* μέσω της ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια (LOX) και εκφράζεται μέσω της τιμής IC₅₀ (δηλαδή της συγκέντρωσης της ουσίας η οποία

μειώνει τη δράση στο 50%). Ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το νορ-διυδρογουαϊαρετικό οξύ (Nordihydroguaiaretic acid, NDGA).

Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση των παραπάνω δράσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1 Αξιολόγηση της % αλληλεπίδρασης των νέων μορίων με την ελεύθερη ρίζα DPPH, της % αναστολής της υπεροξειδωσης του λινελαϊκού οξέος (LP), σε συγκέντρωση ουσίας και ένωση αναφοράς 0.1mM AAPH και της ικανότητας αναστολής της δράσης της φυτικής λιποξυγονάσης LOX [IC_{50} (μ M)].

Παράγωγο	Δομή	% DPPH (0.1 mM)		% LP (0.1 mM)	LOX $IC_{50}^{(1)}$ (μ M)
		20 min	60 min		
3a		No ⁽²⁾	No	93.0	No
4a		1.0	2.0	57.3	(4% @100 μ M) ⁽⁴⁾
7a		4.9	1.8	94.1	56.0
8a		No	No	No	39.0
8b		n.t. ⁽³⁾	n.t.	n.t.	n.t.
8c		n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

Παράγωγο	Δομή	% DPPH (0.1 mM)		% LP (0.1 mM)	LOX IC ₅₀ ⁽¹⁾ (μM)
		20 min	60 min		
10a		No ⁽²⁾	No	15.8	No
10b		No	No	76.0	36.0
10c		7.8	No	66.7	32.5
10d		No	2.0	21.0	100.0
Trolox		n.t. ⁽³⁾	n.t.	88.0	n.t.
NDGA		84.0	96.0	n.t.	0.45

(1) Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος 3 τιμών και η SD ≤ ± 10 %

(2) No: η ένωση δεν έδειξε δράση στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες

(3) n.t. : η ένωση δεν αξιολογήθηκε για τη συγκεκριμένη δράση (not tested)

(4) Δεν προσδιορίστηκε IC₅₀ γιατί η ικανότητα αναστολής ήταν <50%

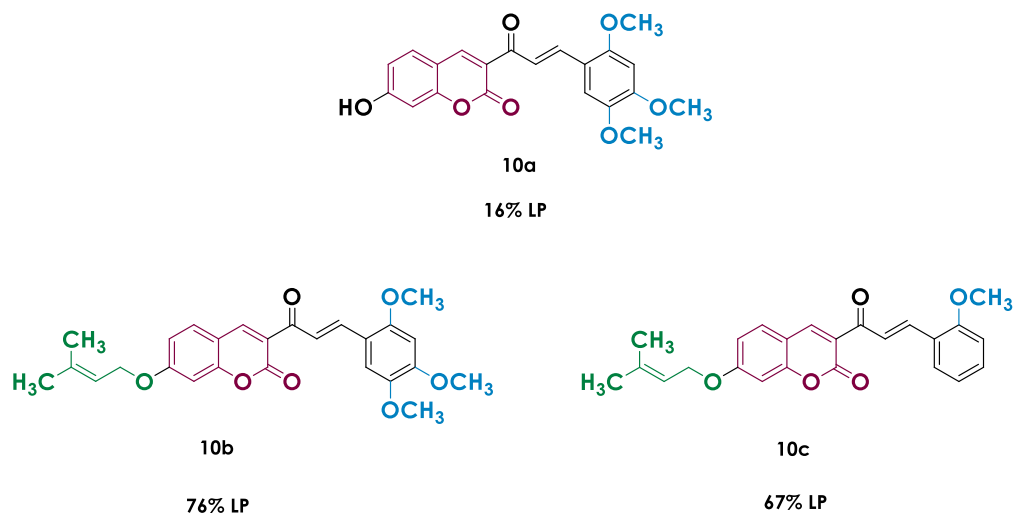
Αντιοξειδωτική δράση

Παρατηρούμε ότι η πλειονότητα των εξεταζόμενων κουμαρινικών αναλόγων δε διέθετε ικανοποιητική ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, πιθανότατα λόγω:

- Παρουσίας ογκωδών υποκαταστατών (όπως γερανυλο-ομάδα) που πιθανώς να παρεμποδίζουν στερεοχημικά την αποτελεσματική αλληλεπίδραση των ενώσεων με τη ρίζα DPPH.
- Απουσίας φαινολικών υδροξυλομάδων.

Αρκετά από τα κουμαρινικά παράγωγα εμφάνισαν αξιόλογη ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (LP). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν: η φυσική κουμαρίνη 4-μεθυλο-ουμπελιφερόνη (**3a**) και η 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνη (**7a**), με υψηλότερη ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης από την ένωση αναφοράς Trolox (88%) με 93% και 94%, αντίστοιχα.

Μεταξύ των νέων υβριδικών μορίων κουμαρινών – χαλκονών, τα μόρια **10b** και **10c** παρουσίασαν τα υψηλότερα ποσοστά αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης, τα οποία διαθέτουν μεθοξυ-υποκαταστάτες στις διάφορες θέσεις του δακτυλίου B της χαλκόνης και πρενυλοξυ-υποκαταστάτη στη θέση 7 του κουμαρινικού σκελετού. Το υδροξυ-ανάλογό τους (**10a**) δεν εμφανίζει ικανότητα αναστολής της LP (15.8%), υποδεικνύοντας τον πρενυλοξυ-υποκαταστάτη ως σημαντικό δομικό χαρακτηριστικό για αυτή τη βιολογική δράση (Σχήμα 47).



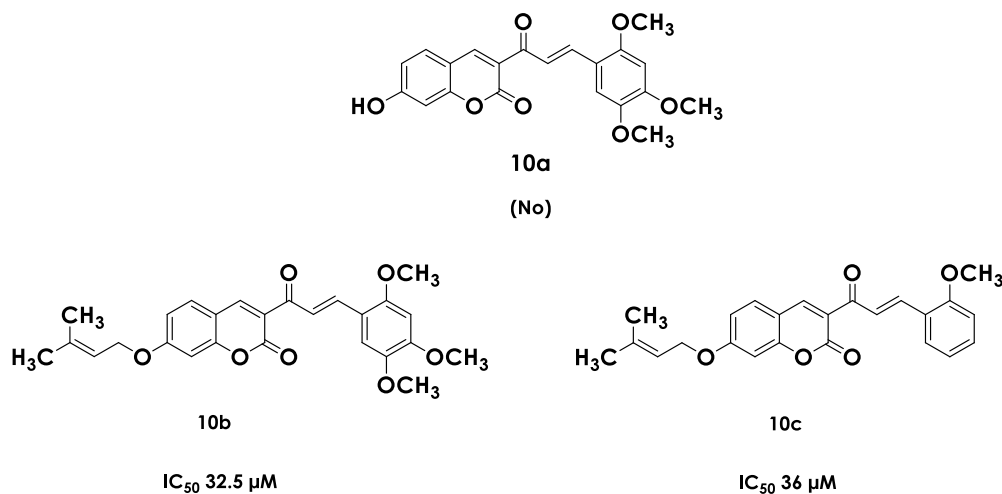
Σχήμα 47 Υβριδικά μόρια κουμαρινών – χαλκονών που εμφανίζουν τη βέλτιστη ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (LP) σε σύγκριση με το μόριο **10a** που δεν φέρει πρενυλοξυ-υποκαταστάτη.

Αντιθέτως, στην περίπτωση της φυσικής κουμαρίνης 4-μεθυλο-ουμπελιφερόνης (**3a**) και της 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνης (**7a**) η πρενυλίωση μειώνει (**4a**, 57.3 %LP) ή και οδηγεί στην πλήρη απώλεια (**8a**, No) ικανότητας αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης.

Αντιφλεγμονώδης δράση

Παρατηρείται πως η ένωση **8a** (3-ακετυλο-7-πρενυλοξυ-κουμαρίνη) εμφάνισε βελτιωμένη δράση (IC₅₀ 39 μM) σε σχέση με τη φυσική κουμαρίνη 3-ακετυλο-7-υδροξυ-κουμαρίνη **7a** (IC₅₀ 56 μM). Επίσης, τα υβριδικά μόρια κουμαρινών – χαλκονών **10b** και **10c** παρουσίασαν την ισχυρότερη ικανότητα αναστολής του ενζύμου (IC₅₀ 36 μM και IC₅₀ 32.5 μM, αντίστοιχα).

Στην περίπτωση των υβριδικών μορίων κουμαρινών-χαλκονών, η παρουσία του πρενυλοξυ-υποκαταστάτη στη θέση 7 του δομικού σκελετού της κουμαρίνης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και για την αντιφλεγμονώδη δράση, καθώς η ένωση **10a** που δεν διαθέτει πρενυλοξυ-υποκαταστάτη είναι ανενεργή στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες (Σχήμα 48).



Σχήμα 48 Αντιφλεγμονώδης δράση των υβριδικών μορίων **10b** και **10c** της Σειράς Δ που φέρουν πρενυλοξυ-υποκαταστάτη.

Στόχο της σύγχρονης φαρμακευτικής χημείας αποτελεί ο σχεδιασμός και η σύνθεση φαρμακευτικών μορίων πολλαπλής στόχευσης (όπως μόρια με συνδυασμένη βιολογική δράση). Από την παρούσα μελέτη προέκυψε ότι τα υβριδικά μόρια **10b** και **10c** παρουσίασαν συνδυασμένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση. Ο συνδυασμός ενός αντιοξειδωτικού και ενός

αντιφλεγμονώδους παράγοντα σε ένα φαρμακευτικό σκεύασμα αποτελεί αποτελεσματική στρατηγική για την ενίσχυση της θεραπευτικής δράσης, καθώς σε περιπτώσεις οξείας και χρόνιας φλεγμονής, απαιτούνται αντιοξειδωτικοί παράγοντες προκειμένου να επιφέρουν την οξειδωτική ισορροπία που επηρεάζεται από τις υψηλές συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS).

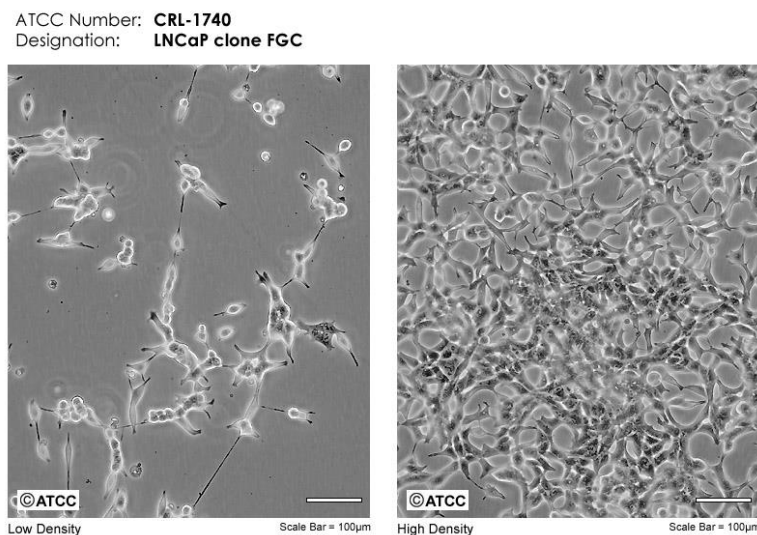
2.1.1. Αξιολόγηση της κυτταροτοξικής δράσης

Η φυσική κουμαρίνη **7a** καθώς και επιλεγμένα συνθετικά κουμαρινικά ανάλογα αξιολογήθηκαν για την πιθανή κυτταροτοξική τους δράση.

Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου MTT (3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο), χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά καρκίνου ανθρώπινου προστάτη (LNCaP).

Η κυτταρική σειρά LNCaP δημιουργήθηκε το 1977. Είναι σειρά κυτάρων αδενοκαρκινώματος που έχουν απομονωθεί από ανθρώπινο προστάτη Καυκάσιας φυλής, ηλικίας 50 ετών, γένους αρσενικού (Εικόνα 21).

Τα αποτελέσματα της *in vitro* αξιολόγησης παρουσιάζονται στον Πίνακα 2, σε τιμές IC₅₀, εκφράζοντας τη συγκέντρωση της ουσίας που απαιτείται προκειμένου να ανασταλεί ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός κατά 50%.



Εικόνα 21: Μορφολογία κυτταρικής σειράς LNCaP.
(Πηγή: www.lgcstandards-atcc.org)

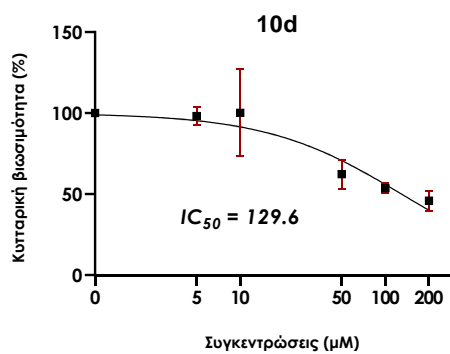
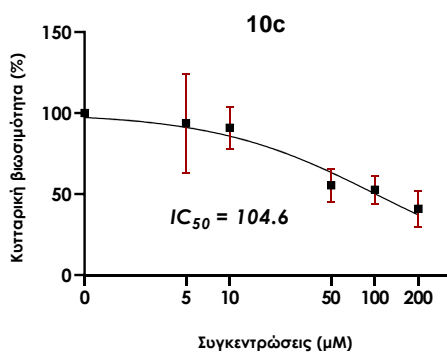
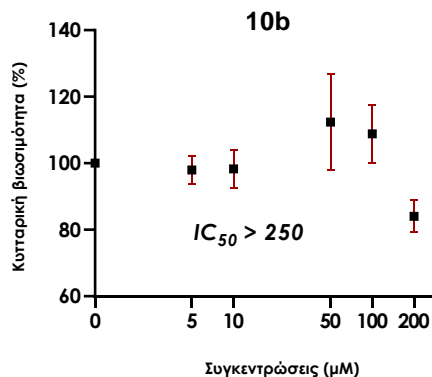
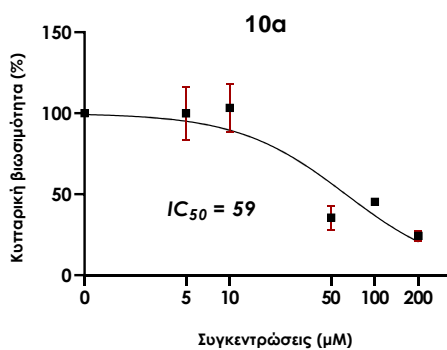
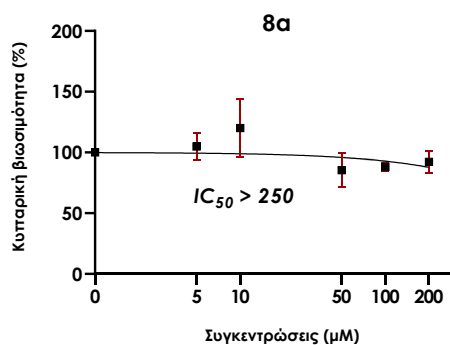
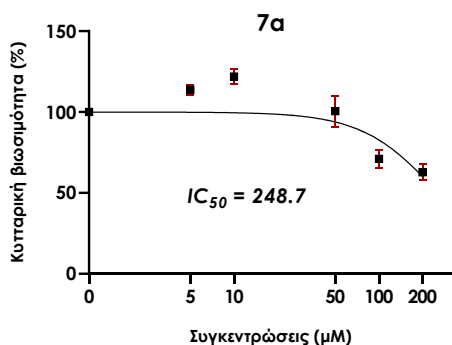
Πίνακας 2 Αποτελέσματα της *in vitro* κυτταροτοξικότητας των κουμαρινικών αναλόγων **7a**, **8a**, **10a**, **10b**, **10c** και **10d** στην κυτταρική σειρά καρκίνου ανθρώπινου προστάτη (LNCap).

Παράγωγο	Δομή	IC ₅₀ ⁽¹⁾ (μΜ)
7a		248.7
8a		> 250
10a		59.1
10b		> 250
10c		104.6
10d		129.6

(1) Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος 3 τιμών και η SD ≤ ± 10 %

- ❖ Παρατηρείται ότι το υβριδικό μόριο κουμαρινών – χαλκονών **10a** που φέρει υδοξυ-υποκαταστάτη στη θέση 7 της κουμαρίνης παρουσίασε συγκριτικά την καλύτερη κυτταροτοξική δράση μεταξύ των ενώσεων που μελετήθηκαν. Αντίθετα, το πρενυλοξυ-ανάλογό του **10b** δεν επηρέασε την βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων LNCap.
- ❖ Επίσης, στην περίπτωση των 7-πρενυλοξυ-υποκατεστημένων μορίων κουμαρινών – χαλκονών, παρατηρείται πως η παρουσία περισσότερων μεθοξυ-ομάδων στο δακτύλιο B της χαλκόνης οδηγεί σε μείωση της κυτταροτοξικότητας της ένωσης (IC₅₀ [**10b**] > IC₅₀ [**10d**] > IC₅₀ [**10a**]).

- ❖ Στο ακόλουθο Σχήμα 49 παρουσιάζονται τα διαγράμματα συγκέντρωσης – % κυτταρικής βιωσιμότητας των παραπάνω ενώσεων.



Σχήμα 49 Επίδραση των κουμαρινικών αναλόγων **7a**, **8a**, και **10a-10d** στη βιωσιμότητα των LNCap καρκινικών κυττάρων ανθρώπινου προστάτη.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν 28 νέα κουμαρινικά παράγωγα και μελετήθηκε η σχέση δομής βιολογικής δράσης.

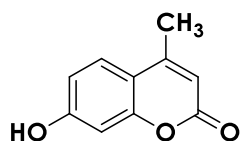
Τα νέα παράγωγα ταυτοποιήθηκαν δομικά μέσω της φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (^1H και ^{13}C NMR) και της φασματομετρίας Μάζας υψηλής ανάλυσης (HR-MS).

Αρχικά, συντέθηκαν 4-υποκατεστημένα ανάλογα της ουμπελιφερόνης μέσω αντίδρασης Pechmann, σε υψηλές αποδόσεις – της τάξης του 80-90% – και σε ήπιες συνθήκες, χρησιμοποιώντας τον τριχλωριούχο σίδηρο (FeCl_3) ως καταλύτη, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο το οργανικό φορτίο των αποβλήτων. Στη συνέχεια, μέσω αντίδρασης σύνθεσης αιθέρων Williamson προέκυψαν οκτώ νέα αλκοξυ-ανάλογά τους. Τα νέα αλκοξυ-παράγωγα λήφθηκαν σε υψηλή καθαρότητα και ικανοποιητικές αποδόσεις.

Επιπλέον, σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν έντεκα υβριδικά μόρια που συνδυάζουν το δομικό φαρμακοφόρο σκελετό της κουμαρίνης με το βιοδραστικό σύστημα της χαλκόνης. Τα μόρια αυτά συντέθηκαν ύστερα από τρία στάδια και μετά τη διερεύνηση των συνθηκών της αντίδρασης αλδολικής συμπύκνωσης.

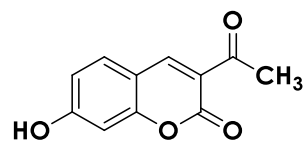
Τα μόρια που σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν αξιολογήθηκαν για την *in vitro* αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και κυτταροτοξική τους δράση. Η αντιοξειδωτική δράση των νέων παραγώγων αξιολογήθηκε μέσω της ικανότητάς τους να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH (Μέθοδος DPPH) και της ικανότητάς τους να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος που επάγεται από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH (Μέθοδος AAPH). Από την αξιολόγηση της δράσης προέκυψαν χρήσιμα συμπεράσματα για τη σχέση δομής – βιολογικής δράσης.

Βάσει των αποτελεσμάτων, το σύνολο των εξεταζόμενων παραγώγων δεν παρουσίασε αλληλεπίδραση με την ελεύθερη ρίζα DPPH, πιθανότατα λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης ή απουσίας φαινολικών υδροξυλίων. Αντιθέτως, τα νέα κουμαρινικά ανάλογα φαίνεται να είναι πιο δραστικά έναντι της λιπιδικής υπεροξειδωσης (LP), ως ένδειξη της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα με αξιοσημείωτη δράση αποτελούν τα μόρια **3a** (93% LP) και **7a** (94% LP).



3a

93% LP

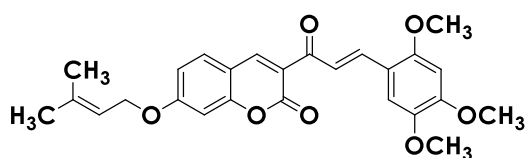


7a

94% LP

Σχήμα 50 Χημική δομή των μορίων **3a** και **7a** με τη βέλτιστη δράση έναντι της λιπιδικής υπεροξειδωσης (LP).

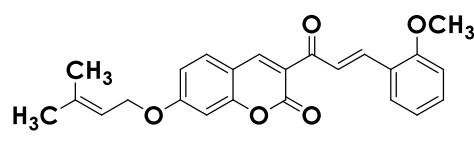
Η αντιφλεγμονώδης δράση των μορίων που συντέθηκαν αξιολογήθηκε μέσω της ικανότητάς τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου λιποξυγονάση από σόγια (LOX). Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι τα υβριδικά μόρια κουμαρινών – χαλκονών (**10b**, **10c**) που φέρουν πρενυλοξυ-υποκαταστάτη παρουσίασαν συγκριτικά την καλύτερη δράση (τιμές IC_{50} 32.5 και 36.0 μ M, αντίστοιχα), σε αντιδιαστολή με το υβριδικό μόριο **10a**, στο οποίο το υδροξύλιο της κουμαρίνης είναι ελεύθερο, που δεν εμφανίζει δράση έναντι της λιποξυγονάσης. Τα παραπάνω υποδεικνύουν πως ο συνδυασμός των φαρμακοφόρων δομών της πρενυλοξυ-ομάδας, της κουμαρίνης και του α,β -ακόρεστου καρβονυλικού συστήματος της χαλκόνης στο ίδιο μόριο, έχει ως αποτέλεσμα δομές με βελτιωμένη βιολογική δράση. Επιπλέον, από την παρούσα μελέτη προέκυψε ότι τα υβριδικά μόρια **10b** και **10c** παρουσίασαν συνδυασμένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.



10b

76% LP

IC_{50} 32.5 μ M (LOX)



10c

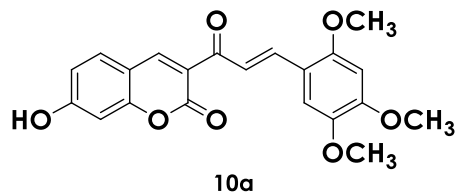
67% LP

IC_{50} 36 μ M (LOX)

Σχήμα 51 Χημική δομή των μορίων **10b** και **10c** με συνδυασμένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.

Έξι κουμαρινικά ανάλογα αξιολογήθηκαν για την *in vitro* κυτταροτοξικότητά τους μέσω της δοκιμασίας MTT, χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά καρκίνου ανθρώπινου προστάτη (LNCap). Όσον αφορά τα υβριδικά μόρια κουμαρινών-χαλκονών, η ύπαρξη της πρενυλο-ομάδας που θεωρήθηκε σημαντικό δομικό

χαρακτηριστικό για την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση των μορίων, δε φαίνεται να ευνόησε την κυτταροτοξική τους δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων ανθρώπινου προστάτη LNCap (το μόριο **10b**, που φέρει πρενυλοξυομάδα, παρουσίασε μειωμένη δράση σε σχέση με το 7-υδροξυ ανάλογό του, **10a**, το οποίο παρουσίασε συγκριτικά την καλύτερη κυτταροτοξική δράση μεταξύ των ενώσεων που μελετήθηκαν).



10a

IC₅₀ 59.1 μM

Σχήμα 52 Χημική δομή του μορίου με την καλύτερη, συγκριτικά, κυτταροτοξική δράση έναντι της καρκινικής σειράς LNCap, **10a**.

ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Από τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία προέκυψαν αξιόλογα συμπεράσματα που μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για περαιτέρω έρευνα και μελέτη στον τομέα της Φαρμακευτικής Χημείας.

Οι δομικές τροποποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν προκειμένου να μελετηθεί η σχέση δομής – βιολογικής δράσης οδήγησαν στον προσδιορισμό μορίων – οδηγών με δυνατότητα περαιτέρω αξιοποίησης και μελέτης. Τα νέα κουμαρινικά παράγωγα προτείνεται να μελετηθούν με φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων (2D NMR) με σκοπό την απόδοση των σημάτων στους άνθρακες C_a και C_b του α,β-καρβονυλικού συστήματος των υβριδικών μορίων κουμαρινών – χαλκονών.

Αντικείμενο μελλοντικής έρευνας θα μπορούσε να αποτελέσει η σύνθεση νέων κουμαρινικών αναλόγων καθώς και νέων υβριδικών μορίων κουμαρινών – χαλκονών που θα φέρουν διάφορους υποκαταστάτες τόσο στο δομικό σκελετό της κουμαρίνης, όσο και στο δακτύλιο B του συστήματος της χαλκόνης. Επιπλέον, θα μπορούσε να μελετηθεί η σύνθεση των υβριδικών με χρήση τεχνικών υψηλής ενέργειας (χρήση μικροκυμάτων και υπερήχων), με στόχο τη μείωση του χρόνου της αντίδρασης και την αύξηση της απόδοσης.

Μελλοντικό στόχο, επίσης, αποτελεί η αξιολόγηση της κυτταροτοξικής δράσης των μορίων που μελετήθηκαν σε υγιείς κυτταρικές σειρές.

Τέλος, μελλοντικό στόχο αποτελεί ο εγκλεισμός των κουμαρινικών παραγώγων που επέδειξαν αξιόλογη βιολογική δράση από τα *in vitro* πειράματα σε διάφορους φορείς προκειμένου να αυξηθεί η υδατοδιαλυτότητά τους και να εξεταστεί αν η διεργασία του εγκλεισμού συνέβαλε στη διατήρηση ή και στη βελτίωση της δράσης τους.

- [1] D. Murray, J. Mendez, S. Brown, "The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry and Biochemistry" New York: Wiley J. & Sons. **1982**.
- [2] R. O'Kennedy, R. Thornes, "Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action" Chichester: Wiley J. & Sons. **1997**.
- [3] D. Singh, D. P. Pathak, "COUMARINS: AN OVERVIEW OF MEDICINAL CHEMISTRY. POTENTIAL FOR NEW DRUG MOLECULES" *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **2016**, 7 (2), 482.
- [4] C. E. Searle (ed.), "Chemical Carcinogens" ACS Monograph 173. Washington, DC: American Chemical Society **1976**, p. 722.
- [5] G. Feuer, "The Metabolism and Biological Actions of Coumarins". *Progress in medicinal chemistry* **1974**, 10, 85-158.
- [6] F. Bourgaud, A. Hehn, R. Labat, et al., "Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes", *Phytochem Rev* **2006**, 5, 293. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9040-2>
- [7] S. Bhat, B. Nagasampagi, M. Sivakumar, "Chemistry of Natural Products" Narosa Publishing House **2005**.
- [8] M. J. Matos, L. Santana, E. Uriarte, O.A. Abreu, "Coumarins – An Important Class of Phytochemicals Coumarins" *Phytochemicals Isolation, Characterisation and Role in Human Health*, **2015**. doi:10.5772/59982.
- [9] C. V. Ribeiro, M. A. Kaplan, "Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em angiospermae" *Quim Nova* **2002**, 25 (4), 533-8.
- [10] Yarnell, Eric & Abascal, Kathy, "Plant Coumarins: Myths and Realities" *Alternative and Complementary Therapies*. **2009**, 15, 24-30. 10.1089/act.2009.15104.
- [11] O. Mazimba, "Umbelliferone: Sources, chemistry and bioactivities review" *Bull Fac Pharmacy, Cairo Univ.* **2017**, 55 (2), 223-232. doi:10.1016/j.bfopcu.2017.05.001.
- [12] G. Vialart, A. Hehn, A. Olry, et al., "A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase from *Ruta graveolens* L. exhibits p-coumaroyl CoA 2'-hydroxylase activity (C2'H): a missing step in the synthesis of umbelliferone in plants" *Plant J.* **2012**, 70, 460-470. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04879.x
- [13] K. N. Venugopala, V. Rashmi, B. Odhav, "Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity" *Biomed Res Int.* **2013**, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/963248>
- [14] M. Cheng, C. Peng, H. Huang, I. Chen "A Novel Dimeric Coumarin Analog and Antimycobacterial Constituents from *Fatoua pilosa*" **2010**, 7, 1728-1736.

- [15] R. Ramalingam, M. Vaiyapuri, "Effects of umbelliferone on lipid peroxidation and antioxidant status in diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma" *J Acute Med.* **2013**, 3 (3), 73-82. doi:10.1016/j.jacme.2013.05.001
- [16] L. Pan, X. Li, H. Jin, X. Yang, B. Qin, "Antifungal activity of umbelliferone derivatives: Synthesis and structure-activity relationships" *Microb Pathog.* **2017**, 104, 110-115. doi:10.1016/j.micpath.2017.01.024
- [17] A. Kultti, S. Pasonen-seppänen, M. Jauhiainen, et al., "4-Methylumbelliferone inhibits hyaluronan synthesis by depletion of cellular UDP-glucuronic acid and downregulation of hyaluronan synthase 2 and 3" *Exp Cell Res.* **2009**, 315 (11), 1914-1923. doi:10.1016/j.yexcr.2009.03.002
- [18] J. A. Garc, A. R. Quesada, M. A. Medina "4 - Methylumbelliferone Inhibits Angiogenesis in Vitro and in Vivo", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, 61 (17), 4063-4071. <https://doi.org/10.1021/jf303062h>
- [19] T.J. Yates, L.E. Lopez, S.D. Lokeshwar, et al., "Dietary Supplement 4-Methylumbelliferone: An Effective Chemopreventive and Therapeutic Agent for Prostate Cancer" *J Natl Cancer Inst.* **2015**, 107, 1-10. doi:10.1093/jnci/djv085
- [20] Y. Fang, H. Wang, W. Zhu, et al., "Antioxidative properties of 4-methylumbelliferone are related to antibacterial activity in the silkworm (*Bombyx mori*) digestive tract" *J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol.* **2014**, 184 (6), 699-708.
- [21] A. Detsi A, C. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina. "Coumarin derivatives: an updated patent review (2015-2016)" *Expert Opin Ther Pat.* **2017**, 27 (11), 1201-1226. doi:10.1080/13543776.2017.1360284
- [22] K.P. Barot, S.V. Jain, L. Kremer, S. Singh, M.D. Ghate, "Recent advances and therapeutic journey of coumarins: Current status and perspectives" *Med Chem Res.* **2015**, 24 (7), 2771-2798. doi:10.1007/s00044-015-1350-8
- [23] Y. Al-Majedy, A. Al-Amiery, A. A. Kadhum, A. BakarMohamad, "Antioxidant Activity of Coumarins" *Systematic Reviews in Pharmacy* **2017**, 8 (1), 24.
- [24] A. Witacenis, L. N. Seito, A. Da Silveira Chagas, et al., "Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives" *Phytomedicine* **2014**, 21(3), 240-246. doi:10.1016/j.phymed.2013.09.001
- [25] M. Roussaki, C. A. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina, S. Hamilakis, A. Detsi, "A novel synthesis of 3-aryl coumarins and evaluation of their antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity" *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2010**, 20 (13), 3889-3892. doi:10.1016/j.bmcl.2010.05.022
- [26] N. Piller, "A comparison of the effectiveness of some anti-inflammatory drugs on thermal oedema" *British journal of experimental pathology* **1975**, 56 (6), 554.

- [27] G. Kayal, K. Jain, S. Malviya, A. Kharia, "Comparative SAR of synthetic coumarin derivatives for their anti-inflammatory activity" *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **2014**, 5 (9), 3577.
- [28] A. Witaicenis, E. C. S. de Oliveira, A. Tanimoto, S. F. G. Zorzella-Pezavento, S. L. de Oliveira, A. Sartori, L. C. Di Stasi "4-methylesculetin, a coumarin derivative, ameliorates dextran sulfate sodium-induced intestinal inflammation" *Chemico-Biological Interactions* **2018**, 280, 59-63. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.12.006>
- [29] G. Kirsch, A. B. Abdelwahab, P. Chaimbault, "Natural and synthetic coumarins with effects on inflammation." *Molecules* **2016**, 21 (10), 1-13. doi:10.3390/molecules21101322
- [30] R. S. De Araújo, F. Q. Guerra, E. de O Lima, C.A. De Simone, J.F. Tavares, L. Scotti, M. T. Scotti, T. M. De Aquino, R. O. De Moura, F. J. Mendonça, "Synthesis, structure-activity relationships (SAR) and in silico studies of coumarin derivatives with antifungal activity" *International journal of molecular sciences* **2013**, 14 (1), 1293-1309.
- [31] M.-Z. Zhang, Y. Zhang, J.-Q. Wang, W.-H. Zhang, "Design, Synthesis and Antifungal Activity of Coumarin Ring-Opening Derivatives" *Molecules* **2016**, 21 (10), 1387.
- [32] S. Genovese, V. A. Taddeo, S. Fiorito, F. Epifano, M. Marrelli, F. Conforti, "Inhibition of nitric oxide production by natural oxyprenylated coumarins and alkaloids in RAW 264.7 cells" *Phytochem Lett.* **2017**, 20,181-185. doi:10.1016/j.phytol.2017.04.032
- [33] M. Musa, L. M. Latinwo, M. Y. Joseph, V. Badisa, "Identification of 7,8-Diacetoxy-3-Arylcoumarin Derivative as a Selective Cytotoxic and Apoptosis-inducing Agent in a Human Prostate Cancer Cell Line" *Anticancer Res.* **2017**, 37 (11), 6005-6014. doi:10.21873/anticancer.12047
- [34] A. Herrera-R, W. Castrillón, E. Otero, et al., "Synthesis and antiproliferative activity of 3- and 7-styrylcoumarins" *Med Chem Res.* **2018**, 27 (8), 1893-1905. doi:10.1007/s00044-018-2202-0
- [35] Y. K. Al-Majedy, A. A. H. Kadhum, A. A. Al-Amiery, A. B. Mohamad, "Coumarins: The Antimicrobial agents" *Systematic Reviews in Pharmacy* **2017**, 8 (1), 62.
- [36] M. J. Matos, S. Vazquez-Rodriguez, L. Santana, E. Uriarte, C. Fuentes-Edfuf, Y. Santos, A. Muñoz-Crego, "Synthesis and structure-activity relationships of novel amino/nitro substituted 3-arylcoumarins as antibacterial agents" *Molecules* **2013**, 18 (2), 1394-1404.
- [37] F. Borges, F. Roleira, N. Milhazes, L. Santana, E. Uriarte, "Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity" *Current Medicinal Chemistry* **2005**, 12 (8), 887-916.

- [38] L. Yang, W. Ding, Y. Xu, D. Wu, S. Li, J. Chen, B. Guo, "New insights into the antibacterial activity of hydroxycoumarins against *Ralstonia solanacearum*" *Molecules* **2016**, 21 (4), 468.
- [39] L. Yang, L. Wu, X. Yao, et al., "Hydroxycoumarins: New effective plant-derived compounds reduce *Ralstonia pseudosolanacearum* populations and control tobacco bacterial wilt" *Microbiol Res.* **2018**, 215, 15-21. doi:10.1016/j.micres.2018.05.011
- [40] P. Anand, B. Singh, N. Singh, "A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease" *Bioorganic Med Chem.* **2012**, 20(3), 1175-1180. doi:10.1016/j.bmc.2011.12.042
- [41] M. Gebauer, "Synthesis and structure – activity relationships of novel warfarin derivatives" *Bioorg Med Chem.* **2007**, 15, 2414-2420. doi:10.1016/j.bmc.2007.01.014
- [42] A. Bryskier, M. Klich, "Coumarin Antibiotics: Novobiocin, Coumerymycin, and Clorobiocin" *Antimicrobial Agents : Antibacterials and Antifungals.* **2005**.
- [43] F. Epifano, S. Genovese, L. Menghini, M. Curini, "Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites" *Phytochemistry* **2007**, 68 (7), 939-953. doi:10.1016/j.phytochem.2007.01.019
- [44] M. Roussaki, K. Zelianaios, E. Kavetsou, et al., "Structural modifications of coumarin derivatives: Determination of antioxidant and lipoxygenase (LOX) inhibitory activity" *Bioorganic Med Chem.* **2014**, 22 (23), 6586-6594. doi:10.1016/j.bmc.2014.10.008
- [45] A. M. Alhassan, M. I. Abdullahi, A. Uba, A. Umar, "Prenylation of Aromatic Secondary Metabolites : A New Frontier for Development of Novel Drugs" *Trop J Pharm Res.* **2014**, 13 (2), 307-314.
- [46] S. Fiorito, F. Epifano, V. A. Taddeo, S. Genovese, "Recent acquisitions on oxyprenylated secondary metabolites as anti-inflammatory agents" *Eur J Med Chem.* **2018**, 153, 116-122. doi:10.1016/j.ejmech.2017.08.038
- [47] F. Soltan, F. Mosaffa, M. Iranshahi, et al., "Auraptene from *Ferula szowitsiana* Protects Human Peripheral Lymphocytes Against Oxidative Stress" *Phytother Res.* **2010**, 24, 85-89. doi:10.1002/ptr
- [48] L. Saldanha, G. Elias, M. Rao, "Oxygen radical scavenging activity of phenylbutenones and their correlation with antiinflammatory activity" *Arzneimittelforschung* **1990**, 40 (1), 89-91.
- [49] L. K. Banbury, Q. Shou, D. E. Renshaw, et al., "Compounds from *Geijera parviflora* with prostaglandin E2 inhibitory activity may explain its traditional use for pain relief" *J Ethnopharmacol.* **2015**, 163, 251-255. doi:10.1016/j.jep.2015.01.033
- [50] H. Yan, Z. Ma, S. Peng, X. Deng, "Anti-In fl ammatory Effect of Auraptene Extracted from Trifoliolate Orange (*Poncirus Trifoliolate*) on LPS-Stimulated RAW 264 . 7 Cells" *Inflammation* **2013**, 1-8. doi:10.1007/s10753-013-9695-y

- [51] M. Curini, F. Epifano, F. Maltese, et al., "Synthesis and anti-inflammatory activity of natural and semisynthetic geranyloxycoumarins" *Bioorganic Med Chem Lett.* **2004**, *14* (9), 2241-2243. doi:10.1016/j.bmcl.2004.02.009
- [52] S. Okuyama, S. Minami, N. Shimada, N. Makihata, M. Nakajima, Y. Furukawa, "Anti-inflammatory and neuroprotective effects of auraptene, a citrus coumarin, following cerebral global ischemia in mice" *Eur J Pharmacol.* **2013**, *699* (1-3), 118-123. doi:10.1016/j.ejphar.2012.11.043
- [53] V. D. La, L. Zhao, F. Epifano, S. Genovese, D. Grenier, "Anti-Inflammatory and Wound Healing Potential of Citrus Auraptene 1" **2013**, *16* (10), 961-964. doi:10.1089/jmf.2013.0029
- [54] S. Okuyama, T. Semba, N. Toyoda, et al., "Auraptene and Other Prenyloxyphenylpropanoids Suppress Microglial Activation and Dopaminergic Neuronal Cell Death in a Lipopolysaccharide-Induced Model of Parkinson's Disease" *Int J Mol Sci.* **2016**, (Figure 1), 1-11. doi:10.3390/ijms17101716
- [55] M. Iranshahi, M. Askari, A. Sahebkar, D. Hadjipavlou-Litina, "Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and lipoxygenase inhibitory activities of the prenylated coumarin umbelliprenin" *DARU-JOURNAL Fac Pharm.* **2009**, *17* (2), 99-103.
- [56] L. Zhang, J. Si, G. Li, et al., "Umbelliprenin and lariciresinol isolated from a long-term-used herb medicine *Ferula sinkiangensis* induce apoptosis and G0/G1 arresting in gastric cancer cells" *RSC Adv.* **2015**, *5* (110), 91006-91017. doi:10.1039/c5ra11335k
- [57] A. R. Shahverdi, F. Saadat, M. R. Khorramizadeh, M. Iranshahi, M. R. Khoshayand, "Two matrix metalloproteinases inhibitors from *Ferula persica* var. *persica*." *Phytomedicine.* **2006**, *13* (9-10), 712-717. doi:10.1016/j.phymed.2006.01.003
- [58] E. Kavetsou, L. Gkionis, G. Galani, et al., "Synthesis of prenyloxy coumarin analogues and evaluation of their antioxidant, lipoxygenase (LOX) inhibitory and cytotoxic activity" *Med Chem Res.* **2017**. doi:10.1007/s00044-017-1800-6
- [59] M. Iranshahi, F. Kalategi, R. Rezaee, et al., "Cancer Chemopreventive Activity of Terpenoid Coumarins from *Ferula* Species" *Planta Med.* **2008**, *74*, 147-150. doi:10.1055/s-2008-1034293
- [60] S. Fiorito, F. Epifano, F. Preziuso, et al., "Natural oxyprenylated coumarins are modulators of melanogenesis" *Eur J Med Chem.* **2018**, *152*, 274-282. doi:10.1016/j.ejmech.2018.04.051
- [61] M. Iranshahi, A. Jabbari, A. Orafaie, et al., "Synthesis and SAR studies of mono O-prenylated coumarins as potent 15-lipoxygenase inhibitors" *Eur J Med Chem.* **2012**, *57*, 134-142. doi:10.1016/j.ejmech.2012.09.006

- [62] E. Ιωαννίδη, "Νέες ετεροκυκλικές ενώσεις ως αναστολείς του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ", Διπλωματική εργασία, *Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο* **2017**.
- [63] Y. Ben-Neriah, M. Karin, "Inflammation meets cancer, with NF-[kappa] B as the matchmaker" *Nature immunology* **2011**,12 (8), 715-723.
- [64] B. Chavan, A. Gadekar, P. Mehta, P. Vawhal, A. Kolsure, A. Chabukswar, "Synthesis & Medicinal Significance of Chalcones-A Review" *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* **2016**, 6 (56), 01.
- [65] B. Orlikova, D. Tasdemir, F. Golais, et al., "Genes Nutr" **2011**, 6, 125. <https://doi.org/10.1007/s12263-011-0210-5>
- [66] S.V. Kostanecki, Tambor, *J. Chem. Ber.* **1899**, 32, 1921
- [67] G. Di Carlo, N. Mascolo, A. A. Izzo, F. Capasso, "Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs" *Life Sci* **1999**, 65, 337-353
- [68] C. Zhuang, W. Zhang, C. Sheng, W. Zhang, C. Xing, Z. Miao, "Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry" *Chem Rev.* **2017**, 117 (12), 7762-7810. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00020
- [69] T. T. Dao, H. J. Linthorst, R. Verpoorte, "Chalcone synthase and its functions in plant resistance." *Phytochem Rev.* **2011**, 10 (3), 397-412. doi:10.1007/s11101-011-9211-7
- [70] Gaonkar, Santosh & u n, Vignesh, "Synthesis and pharmacological properties of chalcones: a review" *Research on Chemical Intermediates* **2017**, 43, 6043. 10.1007/s11164-017-2977-5.
- [71] R. Tsukiyama, H. Katsura, N. Tokuriki, M. Kobayashi, "Antibacterial Activity of Licochalcone A against Spore-Forming Bacteria" *Antimicrob Agents Chemother.* **2002**, 46 (5), 1226-1230. doi:10.1128/AAC.46.5.1226
- [72] L. I. N. Zhai, J. Blom, M. Chen, et al., "The Antileishmanial Agent Licochalcone A Interferes with the Function of Parasite Mitochondria" *Antimicrob Agents Chemother.* **1995**, 39 (12), 2742-2748.
- [73] J. F. Stevens, J. E. Page, "Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health!" *Phytochemistry.* **2004**, 65, 1317-1330. doi:10.1016/j.phytochem.2004.04.025
- [74] C. Gallo, K. Dallaglio, B. Bassani, et al., "Hop derived flavonoid xanthohumol inhibits endothelial cell functions via AMPK activation" *Oncotarget.* **2016**, 7 (37).
- [75] L. Goncalves, I. Valente, J. Rodrigues, "An Overview on Cardamonin" *J Med Food.* **2014**, 17(6), 633-640. doi:10.1089/jmf.2013.0061
- [76] J. Lee, H. S. Jung, P. M. Giang, et al., "Blockade of Nuclear Factor- κB Signaling Pathway and Anti-Inflammatory Activity of Cardamomin , a Chalcone Analog from *Alpinia conchigera*" *J Pharmacol Exp Ther.* **2006**, 316 (1), 271-278. doi:10.1124/jpet.105.092486.addition
- [77] R. Slimstad, T. Fossen, M. Verheul, "The Flavonoids of Tomatoes. *J Agric Food Chem*" **2008**, 280 (2006), 2436-2441.

- [78] T. Brzozowski, S. Konturek, S. Kwiecien, et al., "SU-840, a novel synthetic flavonoid derivative of sophoradin, with potent gastroprotective and ulcer healing activity" *J Physiol Pharmacol.* **1998**, 49 (1), 83-98.
- [79] H. Tanaka, S. Nakamura, K. Onda, T. Tazaki, T. Hirano, "Sofalcone , an anti-ulcer chalcone derivative , suppresses inflammatory crosstalk between macrophages and adipocytes and adipocyte differentiation : Implication of heme-oxygenase-1 induction" *Biochem Biophys Res Commun.* **2009**, 381(4), 566-571. doi:10.1016/j.bbrc.2009.02.086
- [80] K. Onda, S. Tong, A. Nakahara, M. Kondo, H. Monchusho, T. Hirano, T. Kaitu'u-Lino, S. Beard, N. Binder, L. Tuohy, F. Brownfoot, N. J. Hannan, "Sofalcone Upregulates the Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like 2/Heme Oxygenase-1 Pathway, Reduces Soluble fms-Like Tyrosine Kinase-1, and Quenches Endothelial Dysfunction" *Hypertension* **2015**, 65 (4), 855-862. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04781>.
- [81] D. Ugwu, "syntheses and pharmacological applications of chalcones : a review" *Int J Chem Sci.* **2015**, 13 (1), 459-500.
- [82] A. T. Dinkova-kostova, M. A. Massiah, R. E. Bozak, R. J. Hicks, P. Talalay, "Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups" *PNAS* **2001**, 98 (6), 3404-3409.
- [83] A. Jha, C. Mukherjee, A. J. Rolle, E. De Clercq, J. Balzarini, J. P. Stables, "Cytostatic activity of novel 4-O-aminochalcone-based imides" *Bioorg Med Chem Lett.* **2007**, 17, 4545-4550. doi:10.1016/j.bmcl.2007.05.094
- [84] S. Syam, S. I. Abdelwahab, M. A. Al-mamary, S. Mohan, "Synthesis of Chalcones with Anticancer Activities" *Molecules* **2012**, 17, 6179-6195. doi:10.3390/molecules17066179
- [85] S. Ducki, "The development of chalcones as promising anticancer agents" *IDrugs Investig IDrugs: the investigational drugs journal* **2007**, 10 (1), 42-46.
- [86] C. Karthikeyan, N. S. H. Narayana, S. Ramasamy, "Advances in Chalcones with Anticancer Activities" *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* **2015**, (1), 97-115.
- [87] M. Das, K. Manna, "Chalcone Scaffold in Anticancer Armamentarium : A Molecular Insight" *J Toxicol.* **2016**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7651047>
- [88] E. Sayed, M. Aly, A. El Razek, H. Fodah, "Antiobesity, antioxidant and cytotoxicity activities of newly synthesized chalcone derivatives and their metal complexes" *Eur J Med Chem.* **2014**, 76, 517-530. doi:10.1016/j.ejmech.2014.02.021
- [89] S. Vogel, M. Barbic, G. Ju, "Synthesis , cytotoxicity , anti-oxidative and anti-inflammatory activity of chalcones and influence of A-ring modifications on

- the pharmacological effect" *Eur J Med Chem.* **2010**, *45*, 2206-2213. doi:10.1016/j.ejmech.2010.01.060
- [90] F. Navarini, L. Domeneghini, A. Mascarello, R. Jose, R. Augusto, B. Creczynski-pasa, "Hydroxychalcones induce apoptosis in B16-F10 melanoma cells via GSH and ATP depletion" *Eur J Med Chem.* **2009**, *44*, 1630-1637. doi:10.1016/j.ejmech.2008.09.009
- [91] A. Peperidou, D. Kapoukranidou, C. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina, "Multitarget molecular hybrids of cinnamic acids" *Molecules* **2014**, *19* (12), 20197-20226. doi:10.3390/molecules191220197
- [92] Shaveta, S. Mishra, P. Singh, "Hybrid molecules: The privileged scaffolds for various pharmaceuticals" *Eur J Med Chem.* **2016**, *124*, 500-536. doi:10.1016/j.ejmech.2016.08.039
- [93] M. Decker, "Design of Hybrid Molecules for Drug Development" *Elsevier* **2017**.
- [94] L. K. Luna Parada, L. Y. Vargas Mendez, V. V. Kouznetsov, "Quinoline-Substituted 1,2,3-Triazole-Based Molecules, As Promising Conjugated Hybrids in Biomedical Research" *Org Med Chem.* **2018**, *7* (2), 1-10. doi:10.19080/OMCIJ.2018.07.555708
- [95] H. Wei, J. Ruan, X. Zhang, "Coumarin-Chalcone Hybrids: Promising Agents with Diverse Pharmacological Properties" *RSC Advances* **2016**, *6* (13), 10846-10860 <https://doi.org/10.1039/C5RA26294A>
- [96] A. Ibrar, S. A. Shehzadi, F. Saeed, I. Khan, "Developing hybrid molecule therapeutics for diverse enzyme inhibitory action: Active role of coumarin-based structural leads in drug discovery" *Bioorganic Med Chem.* **2018**, *26* (13), 3731-3762. doi:10.1016/j.bmc.2018.05.042
- [97] S. Kaewsuwan, A. Plubrukarn, M. Utsintong, S. H. O. Kim, "Interruptin B induces brown adipocyte differentiation and glucose consumption in adipose-derived stem cells" **2016**, 2078-2086. doi:10.3892/mmr.2016.4758
- [98] T. Quadri-spinelli, J. Heilmann, T. Rali, O. Sticher, "Bioactive Coumarin Derivatives from the Fern *Cyclosorus interruptus*" *Planta Med.* **2000**, *66*, 728-733.
- [99] S. Vazquez-Rodriguez, R. Figueroa-Guñez, M. J. Matos, et al., "Synthesis of coumarin-chalcone hybrids and evaluation of their antioxidant and trypanocidal properties" *Medchemcomm.* **2013**, *4* (6), 993-1000. doi:10.1039/c3md00025g
- [100] R. Ashraf, M. Hasanain, P. Pandey, "Coumarin-chalcone hybrid instigates DNA damage by minor groove binding and stabilizes p53 through post translational modifications" *Sci Rep.* **2017**, (October 2016), 1-12. doi:10.1038/srep45287
- [101] F. Molaverdi, M. Khoobi, S. Emami, M. Alipour, "Polyoxygenated cinnamoylcoumarins as conformationally constrained analogs of cytotoxic

- diarylpentanoids: Synthesis and biological activity" *Eur J Med Chem.* **2013**, 68, 103-110. doi:10.1016/j.ejmech.2013.07.014
- [102] Ε. Καβέτσου, "Νέα βιοδραστικά ανάλογα φυσικών προϊόντων και μελέτη εγκλεισμού τους σε βιοδιασπώμενα πολυμερή", Διδακτορική Διατριβή, *Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο* **2019**.
- [103] Μ. Όξενκιουν – Πετροπούλου, "Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης. Φασματομετρικές Μέθοδοι", **2006**, (17-18), *Εκδόσεις Συμμετρία*, Αθήνα.
- [104] Θ. Π. Χατζηγιάννου, Μ. Α. Κούππαρη, "Ενόργανη Ανάλυση", *Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών*, **2003**.
- [105] Α. Παππά, "Φυσικές μέθοδοι ανάλυσης, Χρωματογραφικές, Θερμικές, ηλεκτρομετρικές, Φασματομετρίας μάζας", *Εκδόσεις Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου*, **2004**.
- [106] https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/3677/1/02_chapter_12.pdf
- [107] <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/esi-mass-spectrometry-why-we-use-it-for-oligonucleotide-quality-control>
- [108] Α. Κατωπόδη, "Σύνθεση νέων βιοδραστικών κουμαρινικών παραγώγων και εγκλεισμός επιλεγμένων κουμαρινών σε β-κυκλοδεξτρίνη", Διπλωματική εργασία, *Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο* **2017**.
- [109] S. Vazquez-Rodriguez, R. Figueroa-Guñez, M. J. Matos, et al., "Synthesis of coumarin-chalcone hybrids and evaluation of their antioxidant and trypanocidal properties" *Medchemcomm.* **2013**, 4 (6), 993-1000. doi:10.1039/c3md00025g
- [110] J. Nordberg, E. Arner, "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system" *Free Radic Biol Med.* **2001**, 31 (11), 1287-1312.
- [111] A. A. H. Kadhum, A. A. Al-Amiery, A. Y. Musa, A. B. Mohamad, "The Antioxidant Activity of New Coumarin Derivatives" *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12 (9), 5747–5761. <https://doi.org/10.3390/ijms12095747>
- [112] S. Casas-Grajales, P. Muriel, "The Liver, Oxidative Stress, and Antioxidants" *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants* **2017**, 583-604. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804274-8.00043-6>
- [113] T. Nishiyama, J. Ohnishi, Y. Hashiguchi, "Fused heterocyclic antioxidants: antioxidative activities of hydrocoumarins in a homogeneous solution" *Biosci Biotechnol Biochem.* **2001**, 65 (5), 1127-1133. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.1127>
- [114] S. Mandal, S. Yadav, R. Nema, "Antioxidants: a review" *J Chem Pharm Res.* **2009**, 1 (1), 102-10
- [115] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity" *LWT - Food Sci Technol.* **1995**, 28 (1), 25-30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5

- [116] R. W. Holtz, "In Vitro Methods to Screen Materials for Anti-Aging Effects" *Personal Care & Cosmetic Technology, Skin Aging Handbook*, William Andrew Publishing **2009**, 329-362. <https://doi.org/10.1016/B978-0-8155-1584-5.50017-X>
- [117] M. S. M. Alger, "Polymer science dictionary", Springer **1997**, p. 152.
- [118] X. C. Weng, Y. Huang, "Relationship structure-antioxidant activity of hindered phenolic compounds" *Grasas y Aceites*. **2014**, 65 (4), e051. doi:10.3989/gya.0225141
- [119] M. Karamac, R. Amarowicz, S. Weidner, S. Abe, F. Shahidi, "Antioxidant Activity of Rye Caryopses and Embryos Extracts" *Czech J Food Sci*. **2000**, 20 (6), 209-214.
- [120] R. L. Prior, X. Wu, K. Schaich, "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements" *J Agric Food Chem*. **2005**, 53 (10), 4290-4302. doi:10.1021/Jf0502698
- [121] T. Nomura, M. Kikuchi, A. Kubodera, Y. Kawakami, "Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)" *Biochem Mol Biol Int*. **1997**, 42 (2), 361-370.
- [122] G. O. Burr, M. M. Burr, E. Miller, "On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition" *J. Biol. Chem*. **1930**, 86 (587), 1-9.
- [123] L. Marnett, "Oxyl radicals and DNA damage" *Carcinogenesis*. **2000**, 21 (3), 361-370.
- [124] M. K. Shigenaga, T. M. Hagen, B. N. Ames, "Oxidative damage and mitochondrial decay in aging" *Proc Natl Acad Sci*. **2006**, 91 (23), 10771-10778. doi:10.1073/pnas.91.23.10771
- [125] J. s. Bland, "Oxidants and Antioxidants in Clinical Medicine: Past, Present and Future Potential" *J Nutr Environ Med*. **1995**, 5 (3), 255-280. doi:10.3109/13590849509000226
- [126] J.-G. Fang, J.-Q. Dai, L.-F. Hou, et al., "Antioxidative and free radical scavenging effects of ecdysteroids from *Serratula strangulate*" *Can J Physiol Pharmacol*. **2003**, 80 (12), 1187-1194. doi:10.1139/y02-152
- [127] J. M. Lü, P. H. Lin, Q. Yao, C. Chen, "Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems" *J Cell mol med*. **2010**, 14 (4), 840-860. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x
- [128] R. Geuther, "The Molecular Basis of Cell Structure and Function (2nd Edition)" *J Basic Microbiol*. **2007**, 17 (1), 86-87.
- [129] A. Detsi, M. Majdalani, C. A. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina, P. Kefalas, "Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity" *Bioorganic Med Chem*. **2009**, 17 (23), 8073-8085. doi:10.1016/j.bmc.2009.10.002

- [130] J. Morrow, J. II Roberts, "The Pharmacological Basis of Therapeutics" *Goodman & Gilman's*, **2001**, 10th ed McGraw-Hill Medical Publishing Division, 671.
- [131] C. D. Funk, "Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology" *Science* **2001**, 294, 1871–5, Vol. 294 no 5548 pp. 1871- 1875 (2001) 26.
- [132] M. Minami, S. Ohno, H. Kawasaki, O. Radmark, B. Samuelsson, H. Jornvall, et al., "Molecular cloning of a cDNA coding for human leukotriene A4 hydrolase. Complete primary structure of an enzyme involved in eicosanoid synthesis" *J Biol Chem.* **1987**, 262 (27), 13873–6.
- [133] S. Hammarstrom, L. Orning, K. Bernstrom, "Metabolism of leukotrienes". *Mol Cell Biochem* **1985**, 69, 7–16.
- [134] Π. Τζιώρα, "Σύνθεση και φαρμακοχημική μελέτη νέων παραγώγων ιβουπροφαίνης ως αντιφλεγμονωδών και αντιοξειδωτικών παραγώγων" Μεταπτυχιακή διατριβή, *Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης* **2012**. <http://ikee.lib.auth.gr/record/131491>
- [135] Δ. Τ. Μπούμπας, "Σημειώσεις παθοφυσιολογίας, μυοσκελετικών, ανοσολογικών και αλλεργικών νόσων, *Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης* **2003**, Κεφάλαιο 21, σελ. 94- 97,
- [136] M. L. Smith, R. C. Murphy, "The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase and epoxygenase pathways", *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* **1996**, 31 (11), 283- 308,
- [137] S. Fiore, "Leukotrienes and lipoxins" *Bioactive Lipids*. 223-243 (edited by A.Nicolaou and G. Kokotos, Oily Press, Bridgwater) (**2004**)
- [138] O. Radmark, B. Samuelsson, *J. Lipid Res*, **2009**, 50, S40-S45
- [139] E. O'Leary, A. Sapirstein, Z. Huang, et al.. "Reduced fertility and postischaemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2" *Nature*. **2002**, 390 (6660), 622-625. doi:10.1038/37635
- [140] H. Uozumi, K. Kume, T. Nagase, et al., "Role of cytosolic phospholipase A2 in allergic response and parturition" *Nature* **1997**, 390 (6660), 618-622. doi:10.1038/37622
- [141] A. Ford-Hutchinson, M. Gresser, R. N. Young, "5-Lipoxygenase" *AnnuRevBiochem.* **1994**, 63, 383-417.
- [142] D. G. Batt, "5-Lipoxygenase Inhibitors and Their Anti-Inflammatory Activities" *Prog Med Chem.* **1992**, 29, 1-63.
- [143] E. Pontiki, D. Hadjipavlou-Litina, "Lipoxygenase inhibitors: A comparative QSAR study review and evaluation of new QSARs" *Med Res Rev.* **2008**, 28 (1), 39-117. doi:10.1002/med.20099
- [144] O. Werz, "5-Lipoxygenase: Cellular Biology and Molecular Pharmacology" *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* **2002**, 1 (1), 23-44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14561204>.

- [145] M. Peters-Golden, T. G. Brock, "5-Lipoxygenase and FLAP" *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. **2003**, 69 (2-3), 99-109. doi:10.1016/S0952-3278(03)00070-X
- [146] A. Mantovani, P. Allavena, A. Sica, F. Balkwill, "Cancer-related inflammation" *Nature* **2008**, 454 (7203), 436-444. doi:10.1007/s10875-012-9847-0
- [147] S. I. Grivennikov, M. Karin, "Inflammation and oncogenesis: a vicious connection" *Curr Opin Genet Dev*. **2010**, 20 (1), 65-71. doi:10.1016/j.gde.2009.11.004
- [148] N. Rioux, A. Castonguay, "Inhibitors of lipoxygenase: A new class of cancer chemopreventive agents" *Carcinogenesis* **1998**, 19 (8), 1393-1400. doi:10.1093/carcin/19.8.1393
- [149] K. Bishayee, A. Khuda-Bukhsh, "5-Lipoxygenase Antagonist therapy: A new approach towards targeted cancer chemotherapy" *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. **2013**, 45 (9), 709-719. doi:10.1093/abbs/gmt064.5-Lipoxygenase
- [150] M. Tsujii, S. Kawano, S. Tsuji, H. Sawaoko, M. Hori, R. DuBois, "Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells" *Cell*. **1998**, 93 (2), 705-716.
- [151] M. Romano, A. Catalano, M. Nutini, et al., "5-Lipoxygenase regulates malignant mesothelial cell survival: involvement of vascular endothelial growth factor" *FASEB J*. **2002**, 15 (13), 2326-2336. doi:10.1096/fj.01-0150com
- [152] Y. N. Ye, W. K. K. Wu, V. Y. Shin, I. C. Bruce, B. C. Y. Wong, C. H. Cho, "Dual inhibition of 5-LOX and COX-2 suppresses colon cancer formation promoted by cigarette smoke" *Carcinogenesis*. **2005**, 26 (4), 827-834. doi:10.1093/carcin/bgi012
- [153] <https://lungevity.org/for-patients-caregivers/lung-cancer-101/treatment-options/angiogenesis-inhibitors>
- [154] W. G. Tong, X. Z. Ding, T. E. Adrian, "The mechanisms of lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breast cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun*. **2002**, 296 (4), 942-948. doi:10.1016/S0006-291X(02)02014-4
- [155] S.-B. WU, L.-S. QU, H.-F. ZHANG, et al., "Inhibition of 5-lipoxygenase triggers apoptosis in pancreatic cancer cells" *Oncol Rep*. **2015**, 33 (2), 661-668. doi:10.3892/or.2014.3650
- [156] S. Sarveswaran, N. R. S. Varma, S. Morisetty, J. Ghosh, "Inhibition of 5-lipoxygenase downregulates stemness and kills prostate cancer stem cells by triggering apoptosis via activation of c-Jun N-terminal kinase" *Oncotarget*. **2016**, 10 (4), 424-436. doi:10.18632/oncotarget.13422
- [157] S. Ikemoto, K. Sugimura, K. Kuratukuri, T. Nakatani, "Antitumor effects of lipoxygenase inhibitors on murine bladder cancer cell line (MBT-2)" *Anticancer Res*. **2004**, 24 (2B), 733-736.

- [158] M. P. Rigobello, G. Scutari, R. Boscolo, A. Bindoli, "Induction of mitochondrial permeability transition by auranofin, a Gold(I)-phosphine derivative" *Br J Pharmacol.* **2002**, 136 (8), 1162-1168. doi:10.1038/sj.bjp.0704823
- [159] C. Liu, Z. Liu, M. Li, et al., "Enhancement of Auranofin-Induced Apoptosis in MCF-7 Human Breast Cells by Selenocystine, a Synergistic Inhibitor of Thioredoxin Reductase" *PLoS One.* **2013**, 8(1), e53945. doi:10.1371/journal.pone.0053945
- [160] J. Elmgreen, I. Ahnfelt-Ronne, O. H. Nielsen, "Inhibition of human neutrophils by auranofin: Chemotaxis and metabolism of arachidonate via the 5-lipoxygenase pathway" *Ann Rheum Dis.* **1989**, 48 (2), 134-138. doi:10.1136/ard.48.2.134
- [161] C. Marzano, V. Gandin, G. Scutari, M. P. Rigobello, A. Folda, A. Bindoli, "Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells" *Free Radic Biol Med.* **2006**, 42 (6), 872-881. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.12.021
- [162] T. Yoshimoto, Yokoyama, K. Ochi, et al., "2,3,5-Trimethyl-6-(12-hydroxy-5,10-dodecadiynyl)-1,4-benzoquinone (AA861), a selective inhibitor of the 5-lipoxygenase reaction and the biosynthesis of slow-reacting substance of anaphylaxis" *Biochim Biophys Acta.* **1982**, 713 (2), 470-473. doi:10.1016/0005-2760(82)90267-3
- [163] Y. Ashida, T. Saijo, H. Kuriki, H. Makino, S. Terao, Y. Maki, "Pharmacological profile of AA-861, a 5-lipoxygenase inhibitor" *Prostaglandins* **1983**, 26 (6), 955-972.
- [164] L. Zou, J. Li, F. Chen, Z. Chen, X. Wang, "Tumor 5Lipoxygenase Expression Correlates with Gastric Cancer Metastasis and Its Selective Inhibitor Induces Cancer Cell Apoptosis" *J Cancer Mol.* **2006**, 2, 227-233.
- [165] B. Kiskan, Y. Yusuf, "Thermally Curable Benzoxazine Monomer with a Photodimerizable Coumarin Group" *J Polym Sci Part A Polym Chem.* **2006**. doi:10.1002/pola
- [166] K. C. Prousis, N. Avlonitis, G. A. Heropoulos, T. Calogeropoulou, "FeCl₃-catalysed ultrasonic-assisted, solvent-free synthesis of 4-substituted coumarins. A useful complement to the Pechmann reaction" *Ultrason Sonochem.* **2014**, 21 (3), 937-942. doi:10.1016/J.ultsonch.2013.10.018
- [167] T. M. Pereira, F. Vitório, R. C. Amaral, K. P. S. Zanoni, N. Y. Murakami Iha, A. E. Kümmerle, "Microwave-assisted synthesis and photophysical studies of novel fluorescent N-acylhydrazone and semicarbazone-7-OH-coumarin dyes" *New J Chem.* **2016**, 40 (10), 8846-8854. doi:10.1039/c6nJ01532h
- [168] Y. Xinwen, Y. Hua, W. Mangang, W. Jun, S. Zhicai, "A Green Method for the Synthesis of 3-Substituted Coumarins Catalyzed by L-Lysine in Water Via

- Knoevenagel Condensation" *Letters in Organic Chemistry* **2012** 9 (1), 22.
<https://doi.org/10.2174/157017812799303953>
- [169] N. Takeuchi, T. Kasama, Y. Aida, et al., "Pharmacological Activities of the Prenylcoumarins, Developed from Folk Usage as a Medicine of *Peucedanum japonicum* THUNB" *ChemiPharmBull.* **1991**, 39 (6), 1415-1421.
- [170] K. Muthuramu, N. Ramnath, V. Ramamurthy, "Photodimerization Of Coumarins In Micelles: Limitations Of Alignment Effect". *J Org Chem.* **1983**, 48 (11). doi:10.1002/chin.198345113
- [171] A. Herrera-R, W. Castrillón, E. Otero, et al., "Synthesis and antiproliferative activity of 3- and 7-styrylcoumarins" *Med Chem Res.* **2018**, 27 (8), 1893-1905. doi:10.1007/s00044-018-2202-0
- [172] T. Khomenko, A. Zakharenko, T. Odarchenko, et al., "New inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (Tdp 1) combining 7-hydroxycoumarin and monoterpenoid moieties" *Bioorganic Med Chem.* **2016**, 24 (21), 5573-5581. doi:10.1016/J.bmc.2016.09.016
- [173] J. A. Kumar, G. Saidachary, G. Mallesham, et al., "Synthesis, anticancer activity and photophysical properties of novel substituted 2-oxo-2H-chromenylpyrazolecarboxylates" *Eur J Med Chem.* **2013**, 65, 389-402. doi:10.1016/j.ejmech.2013.03.042
- [174] S. Genovese, S. Fiorito, S. Durdagi, et al., "Combined molecular modeling and cholinesterase inhibition studies on some natural and semisynthetic O-alkylcoumarin derivatives" *Bioorg Chem.* **2018**, 84 (October 2018), 355-362. doi:10.1016/j.bioorg.2018.11.044
- [175] D. Hadjipavlou-Litina, T. Garnelis, C. M. Athanassopoulos, D. Papaioannou, "Kukoamine A analogs with lipoxygenase inhibitory activity" *J Enzyme Inhib Med Chem.* **2009**, 24 (5), 1188-1193. doi:10.1080/14756360902779193
- [176] C. Kontogiorgis, D. Hadjipavlou-Litina, "Biological evaluation of several coumarin derivatives designed as possible anti-inflammatory/antioxidant agents" *J Enzyme Inhib Med Chem.* **2003**, 18 (1), 63-69. doi:10.1080/1475636031000069291
- [177] M. V. Berridge, A. S. Tan, "Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction" *Arch Biochem Biophys.* **1993**, 303 (2), 474-482.