

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας (I) Χημικών Επιστημών

Εργαστήριο Οργανικής Χημείας



**«Σύνθεση νέων αναλόγων κουμαρινών και
αξιολόγηση της βιοδραστικότητάς τους»**

Διπλωματική εργασία

Φιλίππα-Μαρία Μαρίνου

Επιβλέπουσα

Αναστασία Δέτση

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Αθήνα 2020

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, υπό την επίβλεψη της Δρ. Αναστασίας Δέτση, Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ε.Μ.Π., κατά το διάστημα 10/2018 – 10/2019.

Το εκπαιδευτικό αυτό έτος με βοήθησε να αναπτύξω νέες ικανότητες και να αποκτήσω αξιόλογες γνώσεις στον κλάδο της Οργανικής Συνθετικής Χημείας. Καθοριστικό ρόλο στην πραγματοποίηση και στην ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας είχαν ορισμένα άτομα, τα οποία οφείλω να ευχαριστήσω.

Πρωτίστως, ευχαριστώ θερμά την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π. κ. Αναστασία Δέτση για τη δυνατότητα που μου προσέφερε να ασχοληθώ με τη σύνθεση νέων κουμαρινικών αναλόγων, καθώς και την αξιολόγηση της βιοδραστικότητάς τους. Η καθοδήγησή της σε όλη αυτήν την πορεία, οι ανεκτίμητες συμβουλές της και η παρότρυνση που μου έδωσε, έδρασαν καταλυτικά στην εκπόνηση της εργασίας.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π. Αννίτα Κατωπόδη, για την αδιάκοπη στήριξή της τόσο σε επιστημονικό όσο και σε ανθρώπινο επίπεδο, την άψογη συνεργασία μας, αλλά και την υπομονή και επιμονή της προκειμένου να προσπεραστούν όλα τα εμπόδια και να επιτευχθεί το βέλτιστο αποτέλεσμα.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω τις ευχαριστίες στην τριμελή εξεταστική επιτροπή για τη συμμετοχή τους, αλλά και τον χρόνο που διέθεσαν για την ανάγνωση της εργασίας μου.

Ευχαριστώ, επίσης, την Καθηγήτρια Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα, στον Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτέλειου Πανεπιστήμιου Θεσσαλονίκης, για την διεξαγωγή των *in vitro* δοκιμών για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης των νέων κουμαρινικών παραγώγων, καθώς και για τη μελέτη φαρμακομοιότητάς τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη, όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π. για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που υπήρχε καθημερινά.

Τέλος, ευχαριστώ βαθύτατα την οικογένειά μου για την αγάπη και τη στήριξη σε όλη μου την πορεία μέχρι τώρα, καθώς και τα άτομα που απαρτίζουν το κοντινό μου περιβάλλον, τα οποία ήταν πάντα δίπλα μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κουμαρίνες είναι ετεροκυκλικές οργανικές ενώσεις, οι οποίες συναντώνται ευρέως στο φυτικό βασίλειο και ανήκουν στην οικογένεια των βενζοπυρονών. Τόσο τα φυτικά όσο και τα συνθετικά κουμαρινικά παράγωγα, εμφανίζουν αξιοσημείωτη ποικιλία βιολογικών-φαρμακευτικών ιδιοτήτων, όπως είναι η αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντική, αντιπηκτική, αλλά και η αντιφλεγμονώδης δράση.

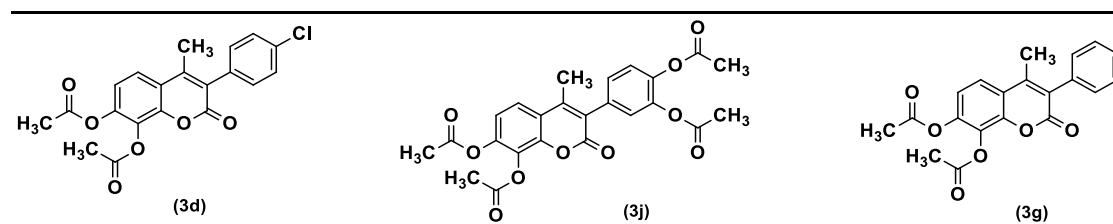
Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ο σχεδιασμός, η σύνθεση κι ο χαρακτηρισμός νέων ακετυλοξυ- και υδροξυ-κουμαρινικών αναλόγων, με στόχο την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης τους σε ειδικές *in vitro* βιοδοκιμές, αλλά και την αξιολόγησή τους ως προς τη φαρμακο-ομοιότητα.

Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας αυτής, συντέθηκαν 22 νέα κουμαρινικά ανάλογα και ταυτοποιήθηκαν όλα μέσω φασματοσκοπίας $^1\text{H NMR}$.

Η 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνη αποτέλεσε αντιδρών στην τροποποιημένη αντίδραση Perkin που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των 11 ακετυλοξυ-κουμαρινικών παραγώγων. Οι αποδόσεις ήταν ικανοποιητικές και ο καθαρισμός των ενώσεων αυτών έγινε με ανακρυστάλλωση. Τέλος, οι 11 ακετυλοξυ-κουμαρίνες οδήγησαν μέσω απακετυλίωσης στα 11 υδροξυ-κουμαρινικά ανάλογα, τα οποία συντέθηκαν με υψηλές αποδόσεις και δεν χρειάστηκαν καθαρισμό.

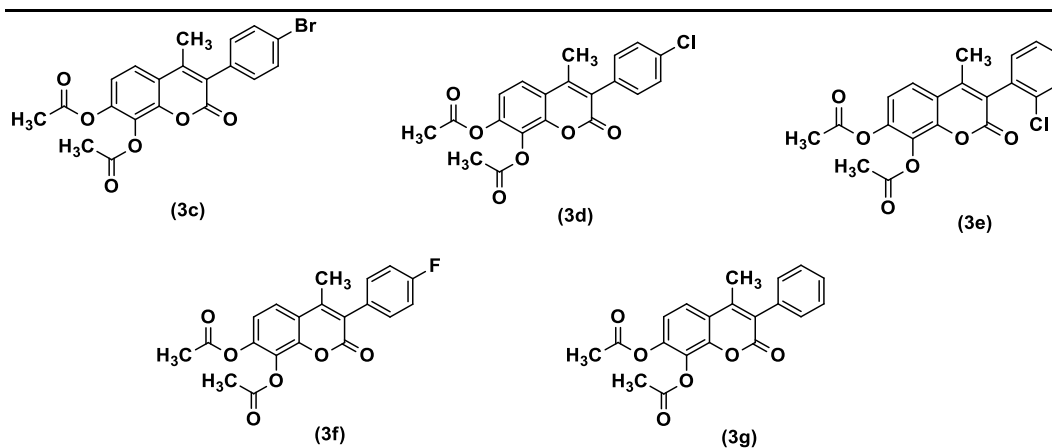
Τα νέα κουμαρινικά ανάλογα αξιολογήθηκαν για την αντιοξειδωτική τους δράση, μέσω των μεθόδων DPPH και AAPH, αλλά και για την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση της λιποξυγονάσης από σόγια (LOX). Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής αποτελούν ένδειξη αντιφλεγμονώδους δράσης. Επίσης, μελετήθηκαν ως προς την φαρμακο-ομοιότητα.

Υστερα από μελέτη των αποτελεσμάτων, παρατηρήθηκε ότι τα ακετυλοξυ-κουμαρινικά παράγωγα δεν παρουσίασαν ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, ωστόσο εμφάνισαν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση μέσω της μεθόδου AAPH. Υψηλότερη δράση παρουσίασαν τα παράγωγα **3d** (95.3% στα 100 μM) και **3j** (95.1% στα 100 μM). Επιπλέον, ισχυρότερη αντιφλεγμονώδη δράση εμφάνισε η **3g** ($\text{IC}_{50}=19 \mu\text{M}$).



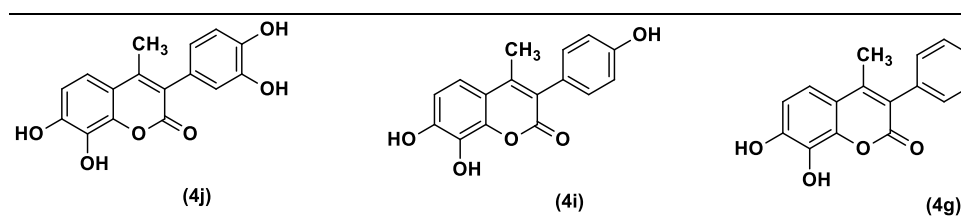
Σχήμα 1. Ακετυλοξυ-κουμαρίνες που εμφάνισαν την υψηλότερη βιοδραστικότητα

Παρατηρήθηκε επίσης, πως όλες οι ακετυλοξυ-κουμαρίνες υπακούουν στον κανόνα των 5 του Lipinski και είναι *per os* ενεργές, ενώ οι ενώσεις **3c**, **3d**, **3e**, **3f** και **3g** εμφάνισαν το καλύτερο προφίλ φαρμακο-ομοιότητας.



Σχήμα 2. Ακετυλοξυ-κουμαρίνες που εμφάνισαν το καλύτερο προφίλ φαρμακο-ομοιότητας

Τα υδροξυ-κουμαρινικά παράγωγα στην πλειονότητά τους εμφάνισαν εξαιρετική ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH, εξαιτίας του κατεχολικού συστήματος που διαθέτουν, καθώς και σημαντική ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH). Επομένως, εμφανώς μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση εμφάνισαν μέσω DPPH η **4j** ($IC_{50}=5.3 \mu M$) και η **4i** ($IC_{50}=8.7 \mu M$), ενώ μέσω AAPH η **4g** (78%) και η **4i** (78%). Τέλος, τη μεγαλύτερη ικανότητα αναστολής της δράσης της λιποξυγονάσης εμφάνισαν η **4i** ($IC_{50}=52 \mu M$) και η **4j** ($IC_{50}=52.5 \mu M$).



Σχήμα 3. Υδροξυ-κουμαρίνες που εμφάνισαν την υψηλότερη βιοδραστικότητα

Καταλήγοντας, παρατηρήθηκε πως τόσο οι διαφορετικές υποκαταστάσεις στον φαινολικό δακτύλιο της θέσης 3- του κουμαρινικού σκελετού, όσο και οι διαφορετικές θέσεις υποκατάστασης στο φαινύλιο, επηρέασαν τη βιολογική δράση των κουμαρινών.

Επιστημονική περιοχή:

Οργανική σύνθεση και αξιολόγηση βιοδραστικότητας.

Λέξεις κλειδιά:

κουμαρίνες, ακετυλοξυ-κουμαρινικά παράγωγα, υδροξυ-κουμαρινικά παράγωγα, βιοδραστικότητα, αντιοξειδωτική δράση, αντιφλεγμονώδης δράση, φαρμακο-ομοιότητα

ABSTRACT

Coumarins are heterocyclic organic compounds, widely found in the plant kingdom and they belong to the benzopyrone family. Both plant-derived and synthetic coumarin derivatives exhibit a remarkable variety of biological properties, such as antioxidant, anti-cancer, antiviral, anticoagulant and anti-inflammatory.

The purpose of this thesis was to design, synthesize and characterize novel acetyloxy- and hydroxy-coumarin analogues, as well as to evaluate their antioxidant and anti-inflammatory activity in specific *in vitro* bioassays.

Specifically, during this work, a total of 22 novel coumarin analogues were synthesized and their structure was identified by ^1H NMR spectroscopy.

The 2,3,4-trihydroxyacetophenone constituted the starting material in the modified Perkin reaction used to synthesize the 11 acetyloxy coumarin derivatives. The yields were satisfactory and these compounds were purified by recrystallization. Finally, the 11 acetyloxy coumarins were deacetylated, leading to the 11 hydroxy coumarin analogues, which were synthesized in high yields and did not require purification.

The novel acetyloxy coumarin analogues were evaluated for their antioxidant activity through the DPPH and AAPH assays, but also for their ability to inhibit soybean lipoxygenase activity (LOX). The results of this study are indicative of their anti-inflammatory activity.

After studying the results, it was observed that the acetyloxy-coumarin derivatives didn't exhibit free DPPH radical scavenging capacity, however, they exhibited significant antioxidant activity through the AAPH method. The highest activity was observed for the derivatives **3d** (95.3% 100 μM) and **3j** (95.1% 100 μM). In addition, **3g** (IC_{50} =19 μM) had the strongest anti-inflammatory activity.

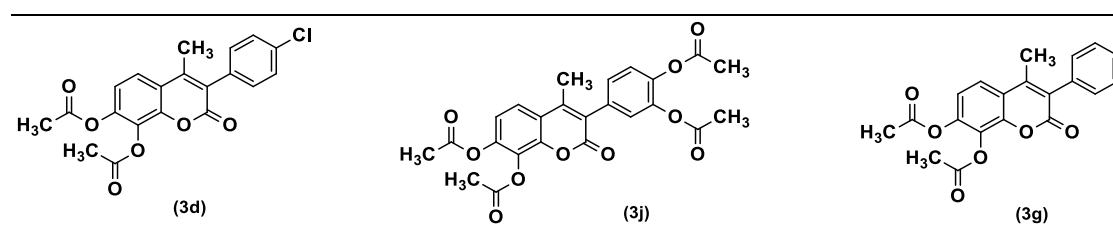


Figure 1. Acetyloxy coumarins which exhibited the highest bioactivity

It was also observed that all the acetyloxy coumarins obey Lipinski's rule of 5 and are *per os* active, while compounds **3c**, **3d**, **3e**, **3f** and **3g** exhibited the best drug-likeness profile.

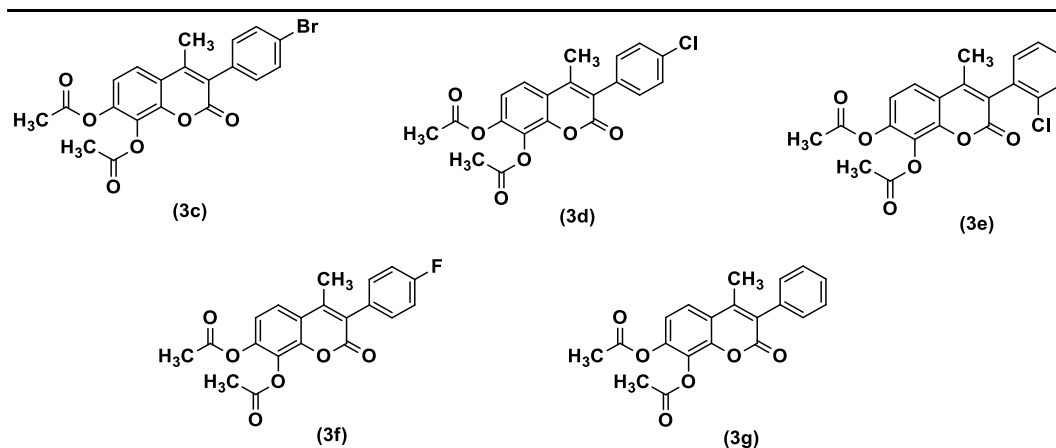


Figure 2. Acetyloxy coumarins which exhibited the best drug-likeness profile

The majority of the hydroxy coumarin derivatives exhibited excellent DPPH scavenging activity due to their catecholic system, as well as significant AAPH inhibition activity. Therefore, **4j** ($IC_{50}=5.3 \mu M$) and **4i** ($IC_{50}=8.7 \mu M$) exhibited obviously the highest free DPPH radical scavenging capacity. The highest antioxidant activity through AAPH was observed for the derivatives **4g** (78%) and **4i** (78%). Finally, **4i** ($IC_{50}=52 \mu M$) and **4j** ($IC_{50}=52.5 \mu M$) had the highest anti-inflammatory activity.

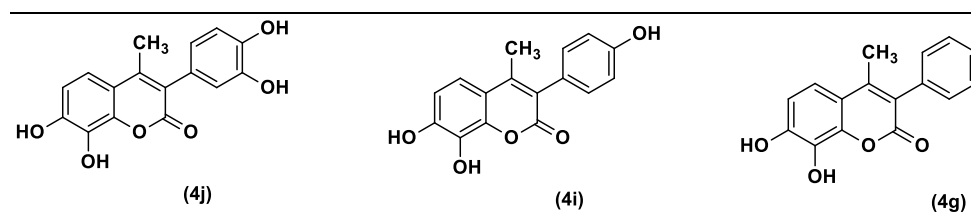


Figure 3. Hydroxy coumarins which exhibited the highest bioactivity

In conclusion, it was observed that the different substitutions on the phenolic ring at the 3-position of the coumarin skeleton, as well as the different positions of substitution on the phenyl group, affected the biological activity of the coumarins.

Scientific area: Organic synthesis and bioactivity evaluation.

Keywords: coumarins, acetyloxy-coumarin derivatives, hydroxy-coumarin derivatives, bioactivity, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, drug-likeness

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
ABSTRACT	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1. Κουμαρίνες	8
1.1. Προέλευση κουμαρινών.....	8
1.2. Χημική δομή κουμαρινών.....	8
1.3. Φαρμακευτικές δράσεις κουμαρινών.....	10
1.1.1. Αντικαρκινική δράση.....	10
1.1.2. Αντιική δράση.....	12
1.1.3. Αντιπηκτική δράση	13
1.1.4. Αντιοξειδωτική δράση	15
1.1.5. Αντιφλεγμονώδης δράση	19
2. Φαρμακο-ομοιότητα.....	21
3. Μέθοδοι σύνθεσης.....	23
3.1. Αντίδραση Pechmann.....	23
3.2. Αντίδραση Perkin.....	24
3.3. Αντίδραση Knoevenagel.....	25
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	26
ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΝΕΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ.....	27
1. Σχεδιασμός νέων κουμαρινικών αναλόγων.....	27
3.4. Σύνθεση της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (1).....	27
3.5. Σύνθεση των 7,8-διακετυλοξυ-3-αρυλοκουμαρινών (3a-3k).....	28
3.6. Σύνθεση των 7,8-διυδροξυ-3-αρυλοκουμαρινών (4a-4k).....	28
4. Μηχανισμοί αντιδράσεων	29
4.1. Μηχανισμός σύνθεσης της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (1).....	29
4.2. Μηχανισμός σύνθεσης 7,8-διακετυλοξυ-3-αρυλοκουμαρινών (3a-3k).....	31
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	32
5. Σύνθεση κουμαρινικών αναλόγων	32
5.1. Όργανα και συσκευές.....	32
5.2. Συνθετική πορεία κουμαρινών.....	33
6. Αξιολόγηση της βιοδραστικότητας των νέων κουμαρινικών παραγώγων	42
6.1. Προσδιορισμός της αναγωγής της σταθερής ρίζας DPPH	42
6.1.1. Υλικά & Συσκευές.....	42

6.1.2. Πειραματική διαδικασία	42
6.2. Προσδιορισμός AAPH	43
6.3. Προσδιορισμός της αναστολής της φυτικής λιποξυγονάσης από σόγια (LOX) 43	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	44
1. Αποτελέσματα σύνθεσης και φασματοσκοπική μελέτη (NMR)	44
2. Αξιολόγηση της βιοδραστικότητας	48
2.1. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης (DPPH).....	50
2.2. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης (AAPH)	52
2.3. Αξιολόγηση της ικανότητας αναστολής της λιποξυγονάσης (LOX).....	53
2.4. Σύγκριση βιοδραστικότητας ακετυλοξυ- και υδροξυ-κουμαρινών	54
2.5. Συνδυασμένη βιοδραστικότητα κουμαρινών.....	55
3. Φαρμακο-ομοιότητα.....	56
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	58
ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	62
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ	66
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	77
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	79
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ	80

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Κουμαρίνες

1.1. Προέλευση κουμαρινών

Οι κουμαρίνες είναι ετεροκυκλικές οργανικές ενώσεις, οι οποίες συναντώνται ευρέως στο φυτικό βασίλειο ως δευτερογενείς μεταβολίτες. Το απλούστερο μέλος αυτής της χημικής οικογένειας, δηλαδή η ίδια η κουμαρίνη, ανακαλύφθηκε πριν από 200 περίπου χρόνια στους καρπούς (tonka beans) του φυτικού είδους *Coumarouna odorata* Aube (φυτό: *Dipteryx odorata*), απ' όπου προέρχεται και το όνομά της.

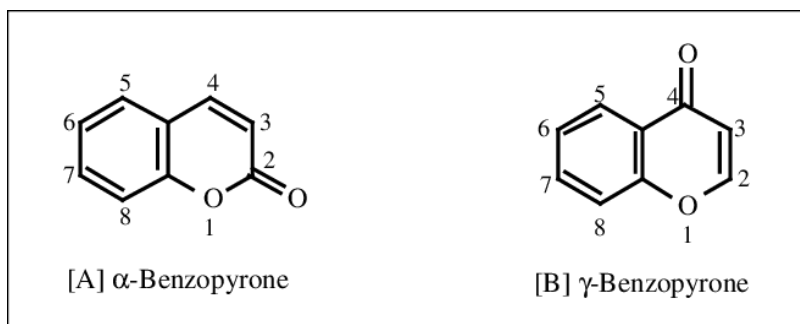


Εικόνα 1. Φυτικά είδη πλούσια σε κουμαρινικά παράγωγα

Οι κουμαρίνες υπάρχουν σε αξιοσημείωτες ποσότητες στα φυτά, αν και έχουν επίσης ανιχνευθεί σε έλαια, μικροοργανισμούς και ζωικές πηγές. Εντοπίζονται σε υψηλά επίπεδα στο έλαιο φλοιού κανέλλας, έλαιο φύλλων κασίας και στο λάδι λεβάντας, βρίσκονται όμως και σε φρούτα όπως η φράουλα και το μύρτιλλο, σε πράσινο τσάι και άλλα τρόφιμα όπως το κιχώριο. Κατανέμονται σε όλα τα μέρη του φυτού, γεγονός που επηρεάζεται από τις περιβαλλοντικές ή τις εποχιακές μεταβολές. Γενικότερα όμως, εμφανίζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στους καρπούς, έπειτα στις ρίζες, τα στελέχη και τα φύλλα.

1.2. Χημική δομή κουμαρινών

Οι κουμαρίνες ανήκουν στις βενζοπυρόνες, οι οποίες προκύπτουν από τη σύντηξη ενός δακτυλίου πυρόνης με έναν πυρήνα βενζολίου. Οι βενζοπυρόνες διακρίνονται στις βενζο-α-πυρόνες και στις βενζο-γ-πυρόνες και διαφέρουν μεταξύ τους μόνο στη θέση της ομάδας καρβonyλίου στον ετεροκυκλικό δακτύλιο.

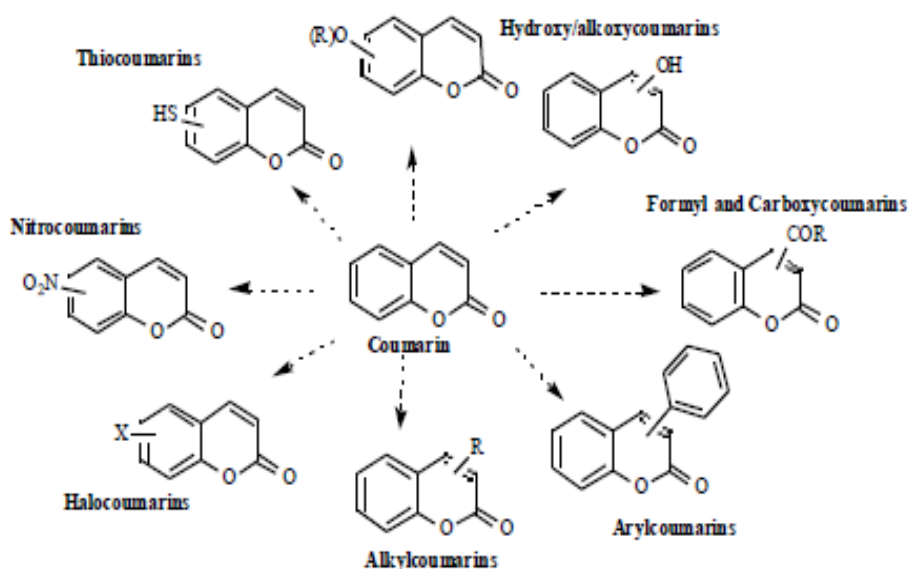


Εικόνα 2. Διάκριση βενζοπυρονών

Ο πυρήνας της κουμαρίνης αντιστοιχεί σε βενζο-α-πυρόνη, της οποίας η συστηματική ονοματολογία **-2H-chromen-2-one-** καθιερώθηκε από την IUPAC. Εκτός των φυσικών κουμαρινών υπάρχουν και συνθετικά παράγωγα, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται δομική ποικιλομορφία.[1] [2] [3]

Πίνακας 1. Κατηγορίες κουμαρινικών αναλόγων και χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών

Απλές κουμαρίνες (ουμπελιφερόνη)	
Φουρανοκουμαρίνες (ψωραλένιο)	
Πυρανοκουμαρίνες (ξανθυλετίνη)	
Κουμαρίνες υποκατεστημένες στον πυρονικό δακτύλιο (βαρφαρίνη)	



Σχήμα 4. Η κουμαρίνη ως βασικός πυρήνας για τη σύνθεση νέων κουμαρινικών αναλόγων

1.3. Φαρμακευτικές δράσεις κουμαρινών

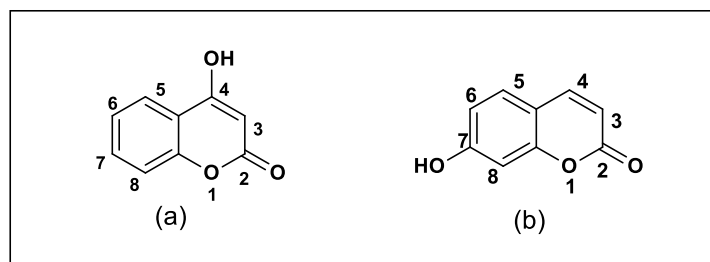
Οι κουμαρίνες έχουν χρησιμοποιηθεί ως προσθετικές αρωματικές ενώσεις σε τρόφιμα και καλλυντικά προϊόντα, όμως η μελέτη αυτών έχει επικεντρωθεί εξ αρχής στην αξιοσημείωτη ποικιλία των βιολογικών-φαρμακευτικών ιδιοτήτων τους, όπως είναι οι αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντικές, αντιπηκτικές, αλλά και οι αντιφλεγμονώδεις δράσεις τους.

1.1.1. Αντικαρκινική δράση

Καθώς ο καρκίνος στις μέρες μας είναι η δεύτερη κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως, πραγματοποιούνται πειράματα ώστε να αναπτυχθούν αντικαρκινικά μόρια με ελάχιστες ή μηδενικές παρενέργειες. Τα τελευταία χρόνια έχει ανακαλυφθεί ότι οι κουμαρίνες κατέχουν ανυπολόγιστο αντικαρκινικό δυναμικό με αμελητέες ή ήπιες παρενέργειες, ανάλογα με τις υποκαταστάσεις του κουμαρινικού σκελετού.

Πλέον η χημειοθεραπεία, η ακτινοβολία και η χειρουργική, σε συνδυασμό, προσφέρουν τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα στους καρκινοπαθείς ασθενείς, ενώ έχουν εφαρμοστεί επιτυχώς σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως λέμφωμα Hodgkin, καρκίνο των όρχεων και τη λευχαιμία. Οι κουμαρίνες μπορούν να αξιοποιηθούν όχι μόνο για τη θεραπεία του καρκινώματος, αλλά και να θεραπεύσουν τις παρενέργειες που προκαλούν οι ακτινοβολίες.

Τόσο οι κουμαρίνες όσο και τα παράγωγά τους αποτελούν πιθανούς αναστολείς του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ποικίλων καρκινικών κυτταρικών σειρών. Ενδεικτικά, έχει αποδειχθεί ότι 4-υδροξυκουμαρίνες και 7-υδροξυκουμαρίνες παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε ένα γαστρικά καρκινικά κύτταρα, ενώ 7-υδροξυκουμαρίνες έχουν επιτύχει ως αντικαρκινικοί παράγοντες σε ασθενείς με προχωρημένες κακοήθειες.

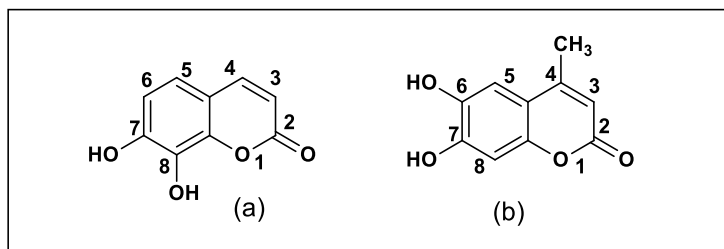


Σχήμα 5. (a) 4-υδροξυκουμαρίνες, (b) 7-υδροξυκουμαρίνες

Επιπλέον, η φυσικά εξαγόμενη 7,8-διυδροξυκουμαρίνη, γνωστή και ως δαφνετίνη, αναστέλλει την εξάπλωση του αδενοκαρκινώματος του ανθρώπινου πνεύμονα, καταστέλλοντας τα σηματοδοτικά μονοπάτια Akt/NF-κB.

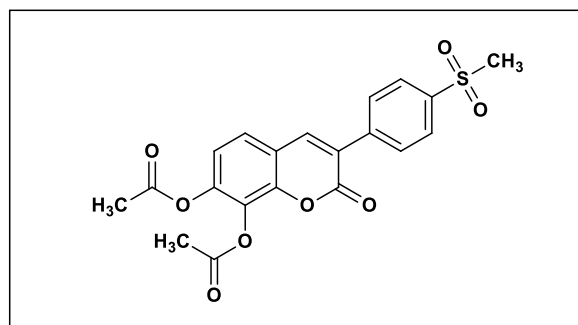
Υστερα από διαγονιδιακούς ελέγχους, ανάλυση του κυτταρικού κύκλου και μελέτη των αποπτωτικών δεικτών, προέκυψε ότι η δαφνετίνη όπως και η 6,7-διυδροξυ-4-μεθυλοκουμαρίνη, προκάλεσαν μείωση του αριθμού των κυττάρων στην G0/G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, καθώς και περιορισμό της πολλαπλασιαστικής τους ικανότητας.

Αποδείχθηκε επίσης, ότι η ορθο-διυδροξυ-υποκατάσταση των ενώσεων αυτών, δηλαδή η υποκατάσταση υδροξυ-ομάδων στις θέσεις 6 & 7 ή 7 & 8, εμφάνισαν υψηλότερη δραστηριότητα συγκριτικά με ενώσεις με μετα-διυδροξυ-υποκατάσταση, δηλαδή με υποκατεστημένες υδροξυ-ομάδες στις θέσεις 5 & 8 του κουμαρινικού σκελετού.



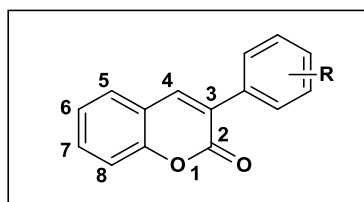
Σχήμα 6. (a) Δαφνετίνη, (b) 6,7-διυδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη

Σε κυτταρικές γραμμές A549 (καρκίνος του πνεύμονα) ερευνήθηκε, επίσης, η αντικαρκινική δραστηριότητα 3-αρυλοκουμαρινικών παραγώγων. Αποδείχθηκε ότι το πιο ενεργό μόριο ήταν η 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-μεθυλοσουλφοφαινυλο)-κουμαρίνη, η οποία παρουσίασε επιλεκτική κυτταροτοξικότητα, προκαλώντας προσβολή των κυττάρων στην S φάση του κυτταρικού κύκλου που είναι η ένδειξη της αναστολής της σύνθεσης του DNA στα κύτταρα, απώλεια μεταλλοπρωτεΐνάσης (MMP) και αύξηση της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) σε A549 καρκινικές κυτταρικές γραμμές.



Σχήμα 7. 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-μεθυλοσουλφοφαινυλο)-κουμαρίνη

Εκτός αυτού, από την αξιολόγηση 3-αρυλο-κουμαρινικών παραγώγων για την αντιπολλαπλασιαστική τους δραστηριότητα σε διάφορες κυτταρικές σειρές, προέκυψε ότι η υποκατάσταση του φαινολικού δακτυλίου στη θέση 3- του κουμαρινικού σκελετού με ηλεκτρονικά ελλειπείς ομάδες προκάλεσε αύξηση της βιοδραστικότητας, σε σύγκριση με την υποκατάσταση φαινυλίου με ηλεκτρονικά πλούσιες ομάδες.



Σχήμα 8. 3-αρυλο-κουμαρινικά παράγωγα

Αξίζει να σημειωθεί επίσης, ότι αυξημένη δραστηριότητα εμφάνισαν ενώσεις που διέθεταν υποκατάσταση σε θέση παρα- του φαινολικού δακτυλίου, σε αντίθεση με τη μειωμένη δραστηριότητα που παρουσίασαν οι υποκαταστάσεις σε μετα- ή ορθο- θέση. [3][4][5]

1.1.2. Αντιική δράση

Οι ιοί είναι αιτιολογικοί παράγοντες για αρκετές επιδημικές μοιραίες νόσους, όπως ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), οι ιοί ηπατίτιδας Β και C (HBV και HCV, αντίστοιχα), οι κοροναϊοί (αναπνευστικό σύνδρομο Μέσης Ανατολής (MERS), οξύ αναπνευστικό σύνδρομο (SARS)), γρίπη (εποχιακή, πανδημία), ευλογιά, ιογενής αιμορραγικός πυρετός (Ebola), δάγκειος πυρετός, ιός τσικουνγκούνια κλπ.

Κάθε μια από αυτές τις ασθένειες έχει παγκόσμιες κοινωνικές και οικονομικές επιπτώσεις που σχετίζονται με απροσδόκητες ασθένειες και θανάτους, καθώς επίσης δημιουργούν προβλήματα στις καθημερινές δραστηριότητες μιας φυσιολογικής ζωής. Η πρόσφατη εμφάνιση νεώτερων πανδημιών, όπως η γρίπη H1N1, ο ιός Ebola ή ο ιός Zika αποτελούν ήδη σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία.

Το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS) προκαλείται από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) και αποτελεί απειλή για την ανθρώπινη ζωή. Ο HIV οδηγεί στην καταστροφή και τη λειτουργική βλάβη του ανοσοποιητικού συστήματος, καταστρέφοντας την ικανότητα του σώματος να καταπολεμά τις λοιμώξεις. Από την πρώτη αναφορά του το 1981, εξαπλώθηκε ταχέως μέσω του ανθρώπινου πληθυσμού, ενώ σύμφωνα με στοιχεία περίπου σαράντα εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως ζούσαν με HIV ή AIDS στα τέλη του 2001. Τρία εκατομμύρια άνθρωποι αναμένεται να πεθάνουν από το AIDS αυτό το έτος και πέντε εκατομμύρια να προσβληθούν σύντομα από τον ιό HIV, μεταξύ αυτών, 1.8 εκατομμύρια γυναίκες και 0.8 εκατομμύρια παιδιά κάτω των 15 ετών.

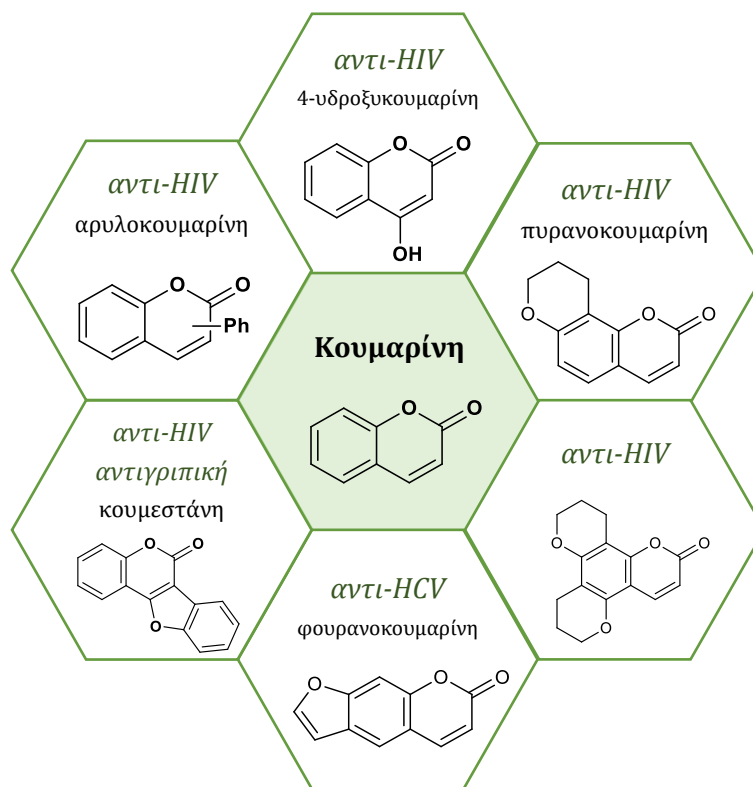
Τις τελευταίες δεκαετίες οι κουμαρίνες έχουν τραβήξει το επιστημονικό ενδιαφέρον, λόγω του ότι αποτελούν κυρίαρχες δομές στην ανακάλυψη αντιικών παραγόντων. Πολλά δομικά τροποποιημένα κουμαρινικά ανάλογα παρουσίασαν αξιοσημείωτη συσχέτιση με τους διαφορετικούς μοριακούς στόχους, ενώ παρατηρήθηκε ότι μικρές τροποποιήσεις γύρω από το κεντρικό μοτίβο οδήγησαν σε σημαντικές αλλαγές στα αντίστοιχα αντιικά φάσματα.

Επομένως, η έρευνα έχει επικεντρωθεί στην ανάπτυξη αντι-HIV παραγόντων με νέες δομές, αλλά και νέους μηχανισμούς δράσης. Κουμαρινικά ανάλογα προερχόμενα από φυτά, έχουν αξιολογηθεί για ανασταλτικές επιδράσεις στην αναπαραγωγή του ιού *in vitro*. Συγκεκριμένα, έχουν ταυτοποιηθεί κουμαρίνες που παρεμποδίζουν την προσρόφηση του ιού (γλυκοκουμαρίνη, λικοπυρανοκουμαρίνη), την αντίστροφη μεταγραφή (καλανολίδη και ανάλογα), την αναστολή της πρωτεάσης (3-υποκατεστημένες 4-υδροξυκουμαρίνες) και την ενσωμάτωση (τετραμερικές κουμαρίνες) στον κύκλο αντιγραφής του HIV.

Οι φυτικές κουμαρίνες δεν έχουν ακόμη κλινική χρήση ως αντιικοί παράγοντες. Ωστόσο, έχουν αποδειχθεί εξαιρετικά αποτελεσματικές σε προκλινικές μελέτες και σε πρώιμες κλινικές δοκιμές. Συνεπώς, οι κουμαρινικές ενώσεις που εμφανίζουν σημαντική

δραστικότητα και διαθέτουν μοναδικούς μηχανισμούς αναστολής του HIV θα μπορούσαν να έχουν δυνατότητα μελλοντικής ανάπτυξης φαρμάκων και θεραπείας.

Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται οι διαφορετικές κατηγορίες κουμαρινικών αναλόγων, τα οποία αποδείχθηκαν αποτελεσματικοί αντικοί παράγοντες για διάφορους ιούς. [6][7][8]



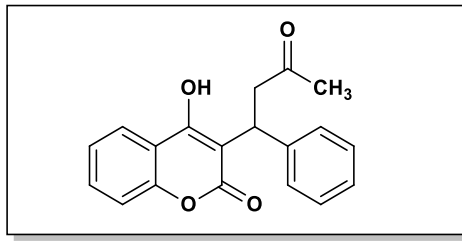
Σχήμα 9. Διαφορετικές κατηγορίες κουμαρινών, αποτελεσματικές έναντι διαφόρων ιογενών ασθενειών

1.1.3. Αντιπηκτική δράση

Η μεγάλη ζήτηση των αντιπηκτικών φαρμάκων στην αγορά οφείλεται στον αυξημένο ηλικιωμένο πληθυσμό, την αυξημένη συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων, αλλά και τα νέα φάρμακα που έχουν βελτιωθεί σημαντικά σε σύγκριση με τα ήδη υπάρχοντα.

Τη δεκαετία του 1930 εισήχθη η πρώτη αντιπηκτική ηπαρίνη και έκτοτε ακολούθησε η ανάπτυξη νέων και βελτιωμένων αντιπηκτικών φαρμάκων. Τα παραδοσιακά αντιπηκτικά περιλαμβάνουν ηπαρίνη (UFH), ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους (LMWH) και βαρφαρίνη. Τα αποτελέσματά τους για την πρόληψη και τη θεραπεία της θρομβοεμβολικής νόσου έχουν επιβεβαιωθεί από πολυάριθμες κλινικές δοκιμές και έτσι τα αντιπηκτικά αυτά φάρμακα έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην ιατρική.

Οι κουμαρίνες έχουν εμφανίσει, εκτός των άλλων, σημαντική αντιπηκτική δράση. Συγκεκριμένα, 4-υδροξυ-κουμαρινικά παράγωγα έχουν παρουσιάσει μεγάλο ενδιαφέρον λόγω των αντιπηκτικών τους επιδράσεων, με πιο διαδεδομένη και ευρέως χρησιμοποιούμενη την βαρφαρίνη.

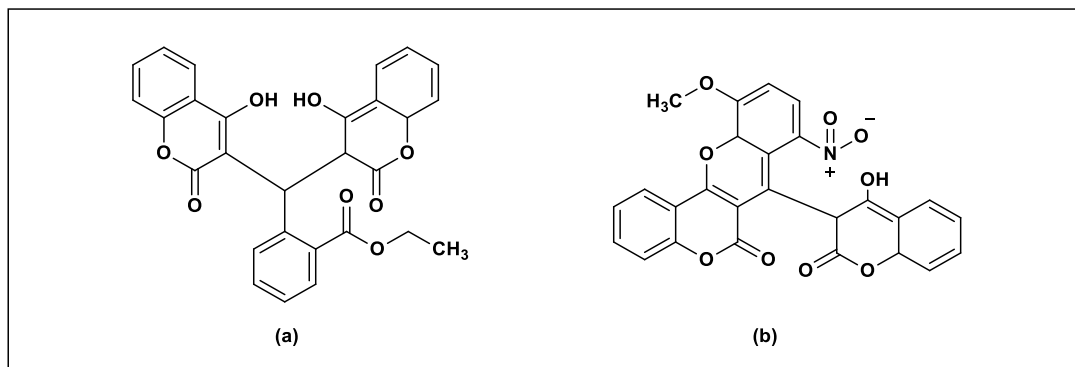


Σχήμα 10. Χημική δομή βαρφαρίνης

Ο ενζυμικός στόχος των κουμαρινών είναι η αναγωγή του 2,3-εποξειδίου της βιταμίνης K στα μικροσώματα του ήπατος. Πρόσφατα, έχει ταυτοποιηθεί μια πρωτεΐνη 18 kDa στο ενδοπλασματικό δίκτυο, η ποσότητα της οποίας αυξάνεται παρουσία αντιπηκτικών κουμαρίνης. Αυτή η πρωτεΐνη αναστέλλει τη δραστηριότητα της αναγωγής 2,3-εποξειδίου, κατά τρόπο εξαρτώμενο από τη δόση. Ωστόσο, τα φάρμακα αυτής της ομάδας παρουσιάζουν ορισμένες παρενέργειες, όπως το σύνδρομο πορφυρών ποδιών, που σχετίζονται με τη βαρφαρίνη.

Αν και η αντιθρομβωτική δράση της βαρφαρίνης είναι σαφής, ο μεταβολισμός της είναι ευαίσθητος σε τρόφιμα, φάρμακα και άλλους παράγοντες. Το εύρος θεραπείας είναι περιορισμένο και απαιτεί συχνή παρακολούθηση για την τιτλοποίηση της δόσης, ώστε να μεγιστοποιηθεί η ισορροπία του αντιπηκτικού αποτελέσματος και της πιθανής αιμορραγίας.

Ωστόσο, με σύνθεση διαφορετικά υποκατεστημένων 4-υδροξυ-κουμαρινών και βενζοπυρανοβενζοπυρανίων, είναι δυνατόν να ληφθούν ενώσεις με βιολογική δραστηριότητα συγκρίσιμη με αυτή της βαρφαρίνης, αλλά με χαμηλότερη τοξικότητα και λιγότερες παρενέργειες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν η 4-hydroxy-3-[(2-oxo-2H-chromen-3-yl)-(4-carboxyphenyl)methyl]-coumarin και η 3-[6-oxo-(6H,7H)-benzopyrano[4,3-b]benzopyran-8-nitro-11-methoxy-7-yl]-4-hydroxy-coumarin.



Σχήμα 11. (a) 4-hydroxy-3-[(2-oxo-2H-chromen-3-yl)-(4-carboxyphenyl)methyl]-coumarin (b) 3-[6-oxo-(6H,7H)-benzopyrano[4,3-b]benzopyran-8-nitro-11-methoxy-7-yl]-4-hydroxy-coumarin

Επίσης, ύστερα από μελέτη 17 διαφορετικά υποκατεστημένων 4-υδροξυκουμαρινών με αντιπηκτική δράση προέκυψε ότι χαμηλή τοξικότητα θα μπορούσε να επιτευχθεί για μια μη διακλαδισμένη ένωση με μεγάλη επιφάνεια, με ηλεκτροαρνητικά γειτονικούς υποκαταστάτες και έλλειψη p-υδροξυλομάδας στο κομμάτι αλδεϋδης του μορίου.

Πιστεύεται, λοιπόν, ότι η βαρφαρίνη τελικά θα καταργηθεί σταδιακά καθώς εισάγονται νέα *per os* (χορήγηση από το στόμα) αντιπηκτικά. Δύο από τα πιο ελπιδοφόρα φάρμακα στα αντιπηκτικά είναι αναστολείς του άμεσου παράγοντα πήξης Χα (αντίστοιχα φάρμακα: rivaroxaban, apixaban, etaneraban), καθώς και του άμεσου παράγοντα πήξης Ια (αντίστοιχο φάρμακο: dabigatran etexilate). Τα δύο νέα αυτά *per os* αντιπηκτικά θεωρούνται σημαντική πρόοδος στον τομέα της αντιπηκτικής θεραπείας και της θρομβοπροφύλαξης. [9][10][11]

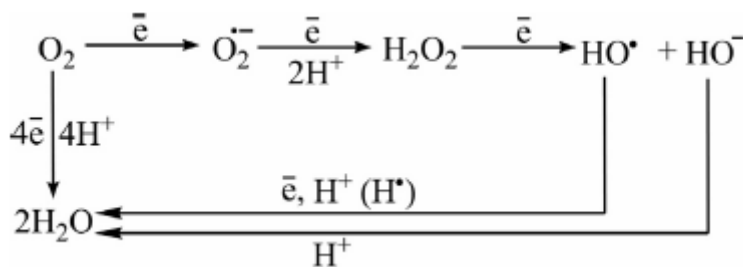
1.1.4. Αντιοξειδωτική δράση

Ελεύθερες ρίζες & Οξειδωτικό στρες

Στα βιολογικά συστήματα παράγονται δραστικές μορφές ουσιών φυσιολογικά σε χαμηλά ή μέτρια επίπεδα, ωστόσο μπορεί να οφείλονται και σε παθολογικά αίτια, όπως για παράδειγμα να είναι αποτέλεσμα φλεγμονής.

Οι πιο κοινές δραστικές μορφές που παράγονται στους οργανισμούς είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), Αζώτου (RNS) και θείου (RSS). Οι ουσίες αυτές περιέχουν ένα ή περισσότερα μη δεσμευμένα ηλεκτρόνια, γνωστά και ως ελεύθερες ρίζες και είναι πολύ ασταθή μόρια, καθώς είναι αρκετά ενεργά σε χημικές αντιδράσεις με άλλα μόρια.

Δραστικές μορφές οξυγόνου αποτελούν οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , RO^{\cdot} κ.α., αλλά και παράγωγα του οξυγόνου που προκύπτουν στο κυτταρικό περιβάλλον και δεν είναι ελεύθερες ρίζες όπως H_2O_2 , $ROOH$, $HOCl$, O_3 . [12]



Σχήμα 12. Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Σε ένα βιολογικό σύστημα όταν διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου και της ικανότητας του συστήματος να αμύνεται από αυτά τα τοξικά μόρια, προκύπτει το οξειδωτικό στρες. Ο αυξημένος αριθμός ελεύθερων ριζών βλάπτει όλα τα συστατικά του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και του DNA, τα οποία σχετίζονται με αρκετές παθήσεις όπως φλεγμονή, καρκινογένεση, αρτηριοσκλήρυνση, καρδιαγγειακά νοσήματα, καρκίνο, διαβήτη, νόσο του Alzheimer, καταρράκτη, αυτισμό και τη γήρανση.

Οι οργανισμοί όπως το ανθρώπινο σώμα, έχουν αναπτύξει ένα αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα που εξαφανίζει τις ελεύθερες αυτές ρίζες, μετά τη διαμόρφωσή τους. Εξαιτίας της οξειδωτικής καταστροφής που προκαλούν οι δραστικές μορφές οξυγόνου στους οργανισμούς, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει στραφεί στη σύνθεση νέων αντιοξειδωτικών μορίων, με σκοπό να επιτευχθεί η θεραπεία του οξειδωτικού στρες. Πρόκειται για μόρια τα οποία μπορούν άμεσα να αντιδράσουν με τα μη

δεσμευμένα ηλεκτρόνια και να τα εξαλείψουν με αποδοχή ή προσφορά ηλεκτρονίου/-ων, ενώ μπορούν επίσης να μετατραπούν σε νέες ελεύθερες ρίζες λιγότερο ενεργές και άρα λιγότερο επικίνδυνες από εκείνες που εξουδετέρωσαν.

Οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες είναι ενζυματικοί ή μη ενζυματικοί. Οι ενζυμικοί μπορεί να είναι το ένζυμο της σουπεροξειδικής δισμοτάσης (Cu, Zn-SOD, Mn-SOD), της καταλάσης (ένζυμο haelm) ή της υπεροξειδάσης γλουταθειόνης.

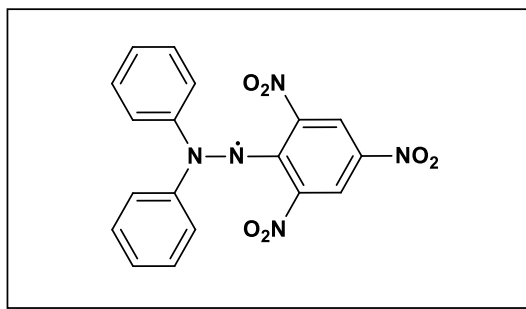
Οι μη ενζυμικοί περιλαμβάνουν συνήθως θρεπτικά μικροσυστατικά, όπως η βιταμίνη E και η βιταμίνη C. Επιπλέον, τα καροτενοειδή, τα φλαβονοειδή, αλλά και το λιποϊκό οξύ αποτελούν μη ενζυματικούς παράγοντες κατά των ελεύθερων ριζών. Στη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιούνται ευρέως συνθετικά αντιοξειδωτικά, με στόχο την επιβράδυνση της οξείδωσης των λιπιδίων. Ωστόσο, ορισμένα από αυτά δεν ενδείκνυνται για φαρμακολογική χρήση λόγω τοξικολογικών ανησυχιών, με αποτέλεσμα τα φυτικά προϊόντα και τα συνθετικά τους ανάλογα να ερευνώνται περισσότερο ως αντιοξειδωτικά συμπληρώματα.

Τα φυτικά αντιοξειδωτικά προέρχονται επί το πλείστον από φρούτα, λαχανικά, μπαχαρικά, δημητριακά και βότανα που περιέχουν μια μεγάλη ποικιλία αντιοξειδωτικών ενώσεων, τα οποία βοηθούν στην προστασία των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες και στη μείωση του κινδύνου χρόνιων ασθενειών. Ελπιδοφόρες ενώσεις ως πιθανές πηγές αντιοξειδωτικών αποτελούν οι φυσικά ή χημικά τροποποιημένες κουμαρίνες, καθώς και τα φλαβονοειδή. Επιπλέον, η ανάπτυξη νέων κουμαρινικών αναλόγων με αντιοξειδωτική δράση έχει προσελκύσει μεγάλη προσοχή τα τελευταία χρόνια, λόγω του γεγονότος ότι οι κουμαρίνες έχουν την ικανότητα να δρουν με ποικίλους και καινοτόμους μηχανισμούς. [13][14][15]

Προσδιορισμός της αναγωγής της ελεύθερης ρίζας DPPH

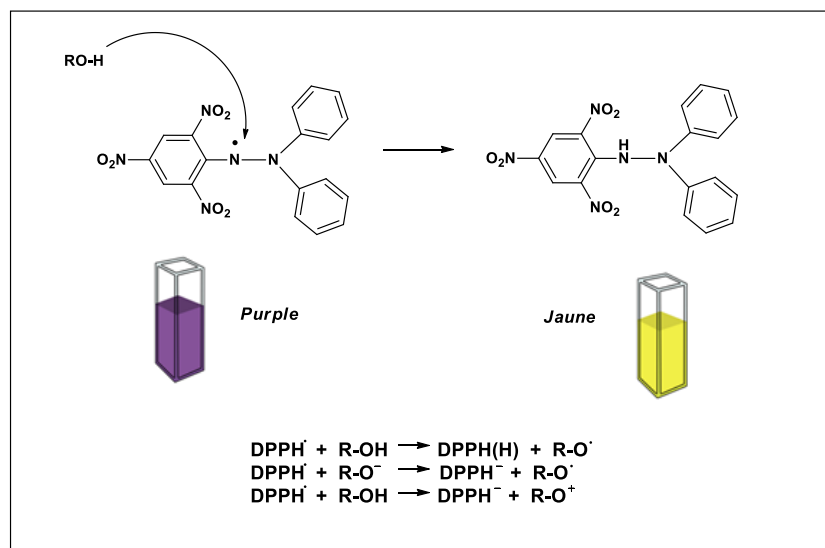
Το μοντέλο δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH αποτελεί μία από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες και αποτελεσματικές μεθόδους για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης οργανικών μορίων.

Η ρίζα DPPH είναι η ελεύθερη ρίζα της 2,2- διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλης και διαθέτει σκούρο μωβ χρώμα. Μπορεί να δεχθεί ένα ηλεκτρόνιο ή μια ρίζα υδρογόνου και να μετατραπεί με τον τρόπο αυτό σε σταθερό, διαμαγνητικό μόριο.



Σχήμα 13. Χημική δομή σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH

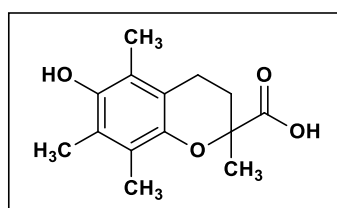
Η ρίζα DPPH λόγω του μονήρες ηλεκτρονίου που διαθέτει, εμφανίζει ισχυρή απορρόφηση στα 515 nm. Ωστόσο, όταν το ηλεκτρόνιο συζευχθεί, η απορρόφηση ελαττώνεται στοιχειομετρικά σε σχέση με τον αριθμό των ηλεκτρονίων που προσλαμβάνονται, με αποτέλεσμα να αποχρωματίζεται. Η μεταβολή της έντασης απορρόφησης που παρατηρείται κατά την αντίδραση, χρησιμοποιείται για τη μελέτη της ικανότητας των μορίων να δρουν ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών σε συστήματα που δεν περιέχουν σίδηρο.



Σχήμα 14. Η αντίδραση της ρίζας DPPH με δεσμευτές ελευθέρων ριζών

Κατά τη μέθοδο DPPH το διάλυμα πυκνού διαλύματος DPPH αραιώνεται σε μεθανόλη σε απορρόφηση ~ 1 στα 515 nm, μετράται η απορρόφηση έναρξης (A_0) και προστίθεται το αντιοξειδωτικό για να ξεκινήσει η αντίδραση. Έπειτα μετρείται η τελική απορρόφηση (A_f) στα 515 nm μετά τους χρόνους αντίδρασης που κυμαίνονται από 4 λεπτά έως πολλές ώρες ή ακόμη και ημέρες. Η τιμή ($A_0 - A_f$) χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση δοκιμασμένων υλικών, π.χ. EC_{50} (συγκέντρωση αντιοξειδωτικού που απαιτείται για τη μείωση DPPH 50%), % απώλεια DPPH, % DPPH που απομένει ή τέλος αντιριζική αποτελεσματικότητα ($[1 / [EC_{50}(\text{Sample}) \times EC_{50}(\text{Trolox})]]$).

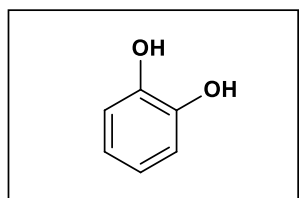
Το Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), το οποίο συχνά χρησιμοποιείται ως ένωση αναφοράς, αποτελεί ανάλογο της βιταμίνης E και παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. [16][17][18]



Σχήμα 15. Χημική δομή Trolox

Κατεχολικό σύστημα

Η παρουσία ενός κατεχολικού συστήματος είναι γνωστό ότι ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση μιας ένωσης, ενώ έχει αναγνωριστεί ως δομική απαίτηση για αποτελεσματική δέσμευση ριζών DPPH και ικανότητα αναστολής της υπεροξειδωσης λιπιδίων. Ειδικότερα, έχει αποδειχθεί ότι στα φλαβονοειδή και στα κουμαρινικά παράγωγα το ορθο-διυδροξυ σύστημα σχηματίζει σταθεροποιημένη ελεύθερη ρίζα, η οποία ενισχύει την ικανότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών. [19]

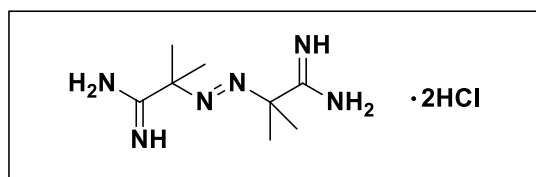


Σχήμα 16. Κατεχολικό σύστημα

Αναστολή λιπιδικής υπεροξειδωσης - Μέθοδος AAPH

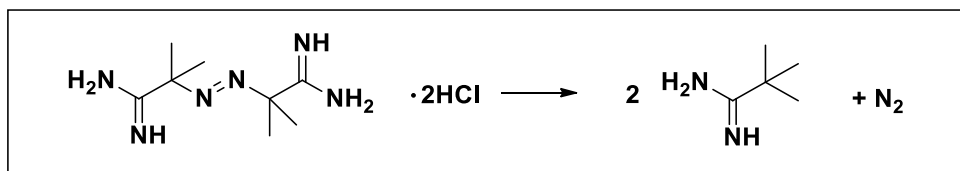
Η μέθοδος AAPH αποτελεί μία γρήγορη, αξιόπιστη και εξίσου διαδεδομένη μέθοδο αξιολόγησης αντιοξειδωτικής δράσης. Το 2,2 αζοδισ-(2-αμιδινοπροπανο)-υδροχλωρίδιο (AAPH) είναι ένας εκκινητής ελευθέρων ριζών που δημιουργεί ελεύθερες ρίζες στο διάλυμα οι οποίες προκαλούν την οξείδωση του λινελαϊκού οξέος.

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



Σχήμα 17. Χημική δομή 2,2 αζοδισ-(2-αμιδινοπροπανο)-υδροχλωριδίου (AAPH)

Το AAPH είναι ένα υδατοδιαλυτό αζω-παράγωγο, το οποίο χρησιμοποιείται εκτενώς για την παραγωγή ελευθέρων ριζών, κυρίως κατά τη μελέτη της λιπιδικής υπεροξειδωσης αλλά και για το χαρακτηρισμό μορίων με αντιοξειδωτική δράση. Η διάσπαση του μορίου του AAPH, οδηγεί στο σχηματισμό αζώτου και άνθρακα.



Σχήμα 18. Διάσπαση μορίου AAPH

Οι ρίζες άνθρακα είτε αντιδρούν μεταξύ τους προς σχηματισμό σταθερών προϊόντων, είτε αντιδρούν με μοριακό οξυγόνο προς σχηματισμό ριζών υπεροξειδίου, με δραστηρότερες τις ρίζες HO[·] και ROO[·], οι οποίες έχουν την ικανότητα να προκαλούν λιπιδική υπεροξειδωση. [17][20][21]

1.1.5. Αντιφλεγμονώδης δράση

Η φλεγμονή είναι μία αντίδραση αυτό-προστασίας του οργανισμού που περιλαμβάνει φυσικές αναπροσαρμογές με στόχο τη μείωση της βλάβης του ιστού και τον περιορισμό του φλεγμονώδους ερεθίσματος. Μπορεί να προκληθεί από μια ποικιλία ερεθισμάτων, όπως ο τραυματισμός, η μικροβιακή εισβολή, εξαιτίας της υπεριώδους ακτινοβολίας και των ανοσολογικών αντιδράσεων. Η ερυθρότητα, η ζέστη, το πρήξιμο και ο πόνος είναι κλασικά συμπτώματα φλεγμονής. Η ερυθρότητα και η θερμότητα προκαλούνται από την αυξημένη ροή αίματος, ενώ η διόγκωση οφείλεται στην αυξημένη κίνηση υγρών και λευκών αιμοσφαιρίων στην περιοχή της φλεγμονής. Η απελευθέρωση των χημικών μεσολαβητών και η συμπίεση των νεύρων κοντά στην φλεγμονώδη διαδικασία προκαλεί πόνο.

Η ικανότητα δημιουργίας φλεγμονώδους αντίδρασης είναι απαραίτητη για την αντιμετώπιση παθογόνων μικροοργανισμών και τραυματισμών. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις και ασθένειες η αντίδραση αυτή μπορεί να είναι συνεχής και σε υπερβολικό βαθμό χωρίς εμφανές όφελος, αλλά ακόμη και με σοβαρές δυσμενείς επιπτώσεις. Εάν δεν ελέγχεται η φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη ασθενειών όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, το χρόνια άσθμα, η πολλαπλή σκλήρυνση, η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου και η ψωρίαση. Πολλές από αυτές τις ασθένειες είναι εξουθενωτικές και γίνονται όλο και πιο συνηθισμένες στις μεγαλύτερες ηλικίες.

Λιποξυγονάσεις

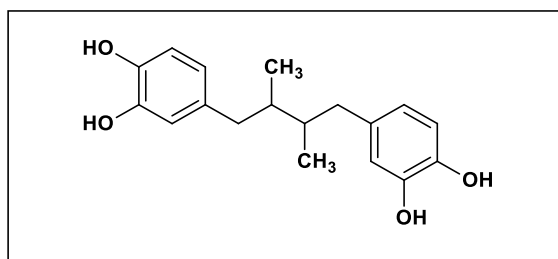
Οι λιποξυγονάσεις είναι μια οικογένεια σιδηρούχων ενζύμων, ευρέως διαδεδομένων στη φύση, τα οποία καταλύουν την οξυγόνωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε λιπίδια που περιέχουν μια δομή cis, cis-1,4-πενταδιενίου. Μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ, ένα συστατικό των μεμβρανικών φωσφολιπιδίων, σε προ-φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές που ονομάζονται λευκοτριένια (φλεγμονώδεις πρόδρομες ενώσεις που ελευθερώνονται από κύτταρα μυελού των οστών), τα οποία αποτελούν μια ομάδα πολύ ισχυρών μορίων που έχουν ποικίλες βιολογικές δράσεις και εμπλέκονται όλο και περισσότερο σε ποικίλες καταστάσεις ασθένειας, όπως άσθμα, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD), τον καρκίνο, την οστεοπόρωση και την αθηροσκλήρωση.

Αν και τα αντιφλεγμονώδη φάρμακα χρησιμοποιούνται ευρέως, η παρατεταμένη κατανάλωση αυτών των φαρμάκων συσχετίζεται συνήθως με πολλές παρενέργειες. Συνεπώς, υπάρχει ανάγκη να διερευνηθούν εναλλακτικές στρατηγικές για τη μείωση του σχηματισμού φλεγμονωδών μεσολαβητών με τη βοήθεια φυσικών προϊόντων. Μια ομάδα αυτών των φυσικών προϊόντα είναι οι κουμαρίνες. Μέχρι σήμερα, διάφορα φυσικά παράγωγα κουμαρίνης όπως η εσκουλετίνη, η δαφνετίνη και η φραξετίνη έχουν αναγνωρισθεί ως αντιφλεγμονώδεις παράγοντες.

Η ουμπελιφερόνη έχει αξιολογηθεί ως προς την αναστολή της λιποξυγονάσης από σόγια με τη δοκιμασία ενζύμου βασισμένη στην υπεριώδη ακτινοβολία. Η ουμπελιφερόνη έδειξε αξιοσημείωτη ανασταλτική δραστηριότητα έναντι της λιποξυγονάσης ($IC_{50} = 0.0725 \mu M$) σε σύγκριση με το πρότυπο αναφοράς, δηλαδή το καφεϊκό οξύ ($IC_{50} = 600 \mu M$).

Η ικανότητα ενώσεων να αναστέλλουν τη δράση της λιποξυγονάσης από σόγια, αποτελούν ένδειξη αντιφλεγμονώδους δράσης, αφού οι λιποξυγονάσες σχετίζονται με την παραγωγή πρόδρομων ενώσεων φλεγμονής.

Σε μετρήσεις που γίνονται για τον προσδιορισμό της αναστολής της φυτικής λιποξυγονάσης από σόγια (LOX), χρησιμοποιείται συχνά ως ένωση αναφοράς το NDGA (Nordihydroguaiaretic acid). [22] [23]



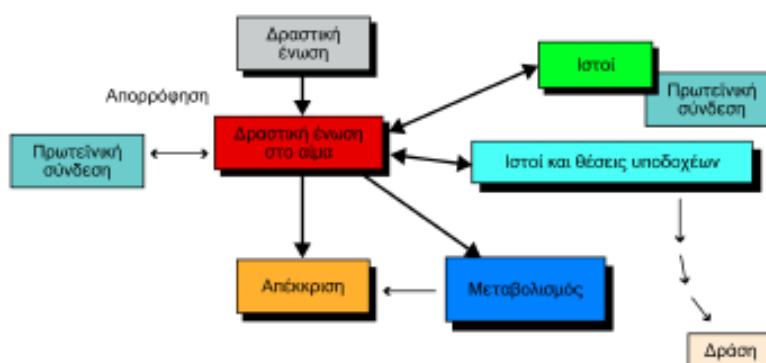
Σχήμα 19. Χημική δομή NDGA

2. Φαρμακο-ομοιότητα

Η «Φαρμακο-ομοιότητα» τα τελευταία χρόνια γίνεται όλο και πιο διαδεδομένη και αφορά τα μόρια που περιέχουν λειτουργικές ομάδες ή/και έχουν φυσικοχημικές ιδιότητες συμβατές με την πλειονότητα των γνωστών φαρμάκων. Έχουν καταβληθεί πολλές προσπάθειες για την κωδικοποίηση ομάδων «κανόνων» ή «φίλτρων», που θα βοηθήσουν στον εντοπισμό μορίων τα οποία θα μπορούν να ενσωματωθούν αποτελεσματικά σε ένα φάρμακο.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες per os φαρμάκων περιορίζονται σε στενό εύρος τιμών που αποκαλείται φυσικοχημικός χώρος φαρμακο-ομοιότητας. Οι κυριότερες φυσικοχημικές ιδιότητες που σχετίζονται άμεσα με τη φαρμακοκινητική/φαρμακοδυναμική συμπεριφορά των ενώσεων είναι το μοριακό μέγεθος, η λιποφιλία, το σχήμα στο χώρο, η δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου και η πολικότητα.

Η πορεία ενός φαρμάκου στον οργανισμό καθορίζεται από τη φαρμακοκινητική και τη φαρμακοδυναμική φάση. Η φαρμακοκινητική φάση περιλαμβάνει απορρόφηση, πρωτεϊνική σύνδεση, κατανομή, αποθήκευση σε ουδέτερα λίπη, μεταβολισμό και απέκκριση. Η φαρμακοδυναμική φάση αφορά στη σύνδεση με τον υποδοχέα-στόχο. Τα στάδια αυτά βρίσκονται σε ισορροπία μεταξύ τους όπως φαίνεται παρακάτω. Η κατανομή στα όργανα και στους ιστούς εμπλέκει τις διαδικασίες της απορρόφησης (διαπερατότητα μεμβρανών) και της πρωτεϊνικής σύνδεσης.



Σχήμα 20. Πορείες ισορροπίας του φαρμάκου στον οργανισμό

Γενικά, έχει παρατηρηθεί ότι οι ενώσεις που εισέρχονται στις κλινικές φάσεις είναι περισσότερο λιπόφιλες, μεγαλύτερου μοριακού βάρους και λιγότερο τριδιάστατες (φέρουν, δηλαδή, περισσότερους επίπεδους δακτύλιους) από τα φάρμακα που έχουν τελικά εγκριθεί για per os χορήγηση. Στατιστικές αναλύσεις δείχνουν ότι μεγάλοι μοριακού βάρους και λιπόφιλα μόρια έχουν αυξημένες πιθανότητες να αποτύχουν σε κάθε ένα από τα διαδοχικά στάδια κλινικής ανάπτυξης. Η προτίμηση σε αυτού του τύπου μόρια στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης ενός φαρμάκου οφείλεται στο ότι η λιποφιλία και το μέγεθος επιδρούν θετικά στην συγγένεια των προσδεμάτων με τους υποδοχείς/ένζυμα. Ένας τρόπος αποφυγής της διόγκωσης των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των προσδεμάτων για να επιτευχθεί μεγαλύτερη δραστηριότητα, είναι η χρήση και επικέντρωση στη βελτιστοποίηση συγκεκριμένων μετρικών δεικτών αποτελεσματικότητας των μορίων.

Η επίδραση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων στη διαπερατότητα συνοψίστηκε από τον Lipinski το 1997 σε ένα απλό μνημονικό κανόνα πολλαπλασίων του 5 (rule of five, Ro5).

Ο κανόνας αυτός αφορά σε μη ευνοϊκά μοριακά χαρακτηριστικά για την απορρόφηση των φαρμάκων που χορηγούνται *per os*. Σύμφωνα, λοιπόν, με αυτόν τον κανόνα, τα μοριακά χαρακτηριστικά που πιθανώς να προσδώσουν στο φαρμακομόριο προβληματική απορρόφηση ή διαπερατότητα είναι:

1. Μοριακό βάρος > 500.
2. Συντελεστής μερισμού $\log P > 5$.
3. Περισσότερες από 5 θέσεις δοτών πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου, υπολογισμένες ως το άθροισμα όλων των ομάδων OH και NH στο μόριο.
4. Περισσότερες από 10 θέσεις δεκτών πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου, υπολογισμένες ως το άθροισμα όλων των ατόμων O και N στο μόριο.

Όταν μία ένωση έχει δυο τουλάχιστον από τα παραπάνω χαρακτηριστικά αναμένεται να εμφανίζει προβλήματα στην απορρόφησης της *per os*, στη διαλυτότητά της και γενικά στη βιοδιαθεσιμότητά της. Ο Lipinski αναγνώρισε επίσης, ότι η διαλυτότητα του μορίου είναι καθοριστική φυσικοχημική παράμετρος για επιτυχή ανάπτυξη του ως φάρμακο.

Το $\log BB$, που ορίζεται ως ο λογάριθμος του λόγου της συγκέντρωσης ενός φαρμάκου στον εγκέφαλο και στο αίμα, μετρούμενο σε ισορροπία, είναι δείκτης της διαπερατότητας του BBB. Το BBB αποτελεί μια συλλογή κυττάρων και υποκυτταρικών δομών στο εγκεφαλοαγγειακό τοίχωμα που διαχωρίζει το κυκλοφορούν αίμα από τον εγκέφαλο και είναι απαραίτητη για να διατηρηθεί ο εγκεφαλικός ιστός σε υγιή κατάσταση.

Οι τιμές του λογαρίθμου BB λαμβάνονται πειραματικά είτε *in vivo*, συνήθως σε αρουραίους, είτε *in vitro*. Για *in vivo* προσδιορισμούς, ένα φάρμακο χορηγείται σε έναν αρουραίο και, μετά την επίτευξη ισορροπίας, η συγκέντρωσή του μετράται στον εγκέφαλο και στο αίμα. Για *in vitro* προσδιορισμούς, οι οποίοι έχουν χρησιμοποιηθεί ως επί το πλείστον για πτητικές ενώσεις, οι συντελεστές διαχωρισμού αερίου αίματος και αερίου/εγκεφάλου μετρώνται ξεχωριστά και διαδοχικά συνδυάζονται σε τιμή λογαρίθμου BB .

Όταν το $\log BB$ λαμβάνει τιμές μικρότερες από -1 ($\log BB < -1$) η διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού είναι περιορισμένη, ενώ για τιμές μεγαλύτερες από 0.3 ($\log BB > 0.3$) η διαπερατότητα είναι μεγάλη. Τέλος, όταν $-1 < \log BB < 0.3$ είναι δυνατή η πρόσβαση στο κεντρικό νευρικό σύστημα. [24][25][26][27][28][29]

3. Μέθοδοι σύνθεσης

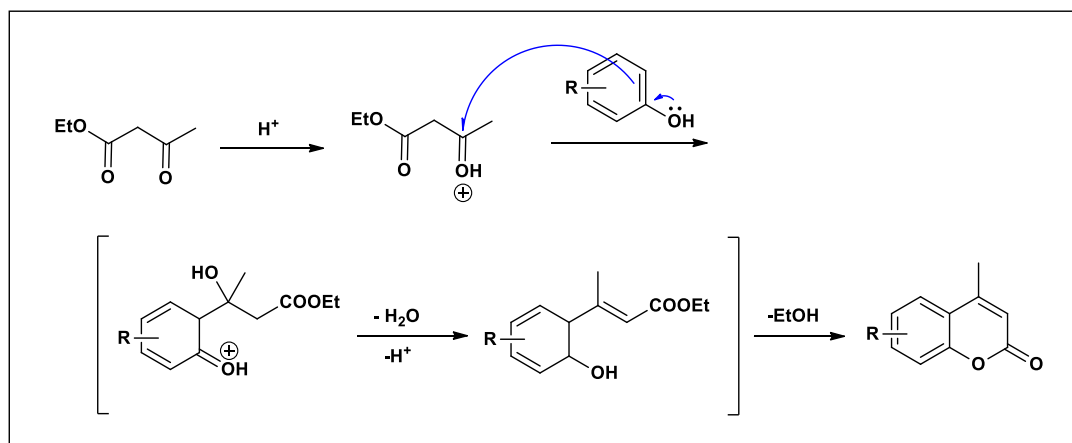
Δεδομένης της σημαντικής θέσης που κατέχουν οι κουμαρίνες στο χώρο της φυσικής και της συνθετικής χημείας, έχει υπάρξει μεγάλο ενδιαφέρον για την εύρεση και την ανάπτυξη μεθόδων με τις οποίες να επιτυγχάνεται η ακριβής και αποτελεσματική παραγωγή συνθετικών κουμαρινών. Οι τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί σε αυτό τον ενάμιση αιώνα χημικής σύνθεσης κουμαρινών είναι πολλές και περιλαμβάνουν ποικίλους μηχανισμούς. Η κάθε μία ανταποκρίνεται σε συγκεκριμένα κριτήρια και έχει συγκεκριμένα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Επίσης εφαρμόζονται συχνά πολλές τροποποιήσεις σε ήδη γνωστές μεθόδους οι οποίες στοχεύουν να τις κάνουν καταλληλότερες για τις ανάγκες της κάθε ερευνητικής προσπάθειας.

Οι κυριότερες μέθοδοι σύνθεσης κουμαρινών είναι η αντίδραση Pechmann, η αντίδραση Perkin και η αντίδραση Knoevenagel.

3.1. Αντίδραση Pechmann

Η αντίδραση Pechmann είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη μέθοδος για τη σύνθεση των κουμαρινών, καθώς διεξάγεται από πολύ απλά αρχικά υλικά και δίνει πολύ καλές αποδόσεις 4-υποκατεστημένων κουμαρινών. Πολλοί όξινοι καταλύτες έχουν χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση Pechmann συμπεριλαμβανομένου του θειικού οξέος, του χλωριούχου αργιλίου, του πεντοξειδίου του φωσφόρου, του τριφθοροξικού οξέος και άλλων. Οι καταλύτες αυτοί ωστόσο, πρέπει να χρησιμοποιούνται σε περίσσεια, για παράδειγμα, απαιτείται θειικό οξύ σε δέκα ισοδύναμα, τριφθοροξικό οξύ σε τρία έως τέσσερα ισοδύναμα και πεντοξείδιο του φωσφόρου σε πέντε ισοδύναμα.

Η αντίδραση ξεκινάει με ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση στη φαινόλη και συγκεκριμένα σε ο-θέση ως προς το υδροξύλιο, από τον άνθρακα της καρβονυλικής ομάδας του β-κετο-εστέρα, προς σχηματισμό των ενδιάμεσων. Ακολουθεί λακτονοποίηση με απόσπαση νερού και αιθανόλης, για τον σχηματισμό του κουμαρινικού συστήματος. Η πορεία της αντίδρασης εξαρτάται από το είδος του β-κετοεστέρα, την όξινη κατάλυση και τους υποκαταστάτες της φαινόλης. Φαινόλες με υποκαταστάτες δέκτες ηλεκτρονίων δεν ευνοούν γενικά τη συμπύκνωση. Υποκαταστάτες δότες ηλεκτρονίων σε μετα- θέση ως προς το -OH την ευνοούν, ενώ σε ορθο- και παρα- θέσεις δεν επηρεάζουν καθόλου τη δραστηριότητα της φαινόλης.



Σχήμα 21. Αντίδραση Pechmann

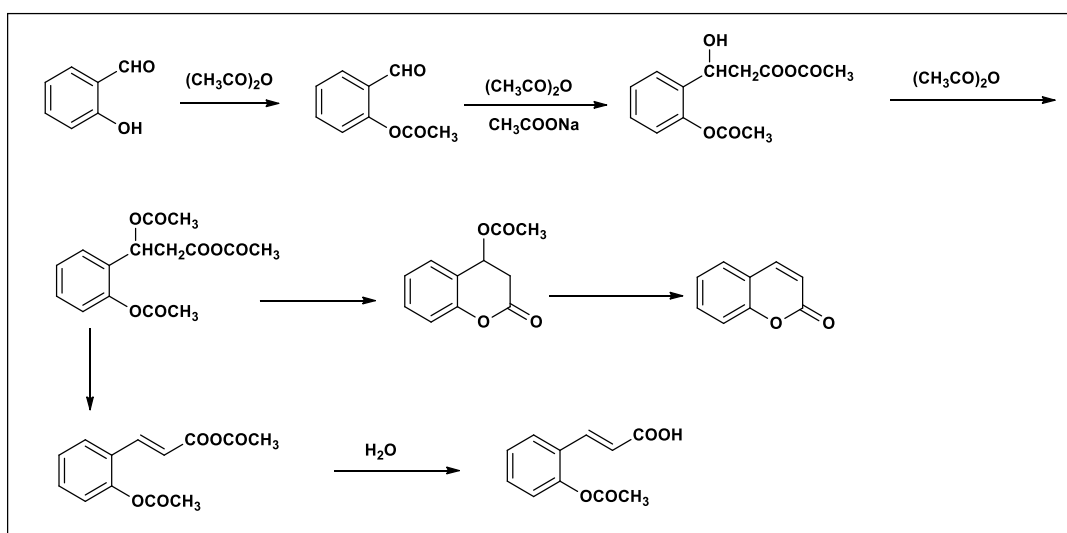
Με την ταχεία εξέλιξη στον τομέα της συνθετικής οργανικής χημείας, οι ερευνητές τόσο από τον ακαδημαϊκό χώρο όσο και από τη βιομηχανία έχουν αρχίσει να δίνουν μεγάλη σημασία στις σοβαρές επιπτώσεις των μη πράσινων διεργασιών και των χημικών ουσιών στο περιβάλλον. Έχουν αναπτύξει με επιτυχία πολλές φιλικές προς το περιβάλλον διαδικασίες για την αποφυγή ή τουλάχιστον την ελαχιστοποίηση αυτών των επιπτώσεων.

Οι συνθέσεις των κουμαρινών έχουν διεξαχθεί επιτυχώς με τη χρήση στερεών όξινων καταλυτών και με συνδυασμό στερεών όξινων καταλυτών και ακτινοβολίας μικροκυμάτων ως εναλλακτική λύση σε συμβατικές μεθόδους. Τα ιοντικά υγρά έχουν πρόσφατα αναγνωρισθεί ως πιθανοί περιβαλλοντικά καλοί εναλλακτικοί διαλύτες σε διάφορες χημικές διεργασίες. Έχουν προσελκύσει την προσοχή των χημικών λόγω των μοναδικών φυσικών και χημικών ιδιοτήτων τους. Λόγω της χαμηλής πίεσης ατμών τους, τα ιοντικά είδη δεν συμβάλλουν στην εκπομπή πτητικών οργανικών ενώσεων. [30][31][32]

3.2. Αντίδραση Perkin

Μία άλλη κλασική μέθοδος σύνθεσης κουμαρινικών αναλόγων είναι η αντίδραση Perkin η οποία πραγματοποιείται με θερμική αντίδραση σαλικυλικής αλδεΐδης με οξικό ανυδρίτη παρουσία άνυδρου οξικού νατρίου.

Από την πρώτη εφαρμογή της μεθόδου για την παραγωγή κουμαρίνης το 1868, έχουν συντεθεί χημικά πολλές από τις φυσικές κουμαρίνες. Η σύνθεση κουμαρινών με μεθοξυ- ή υδροξυ- ομάδες ακόμα συνηθίζεται να γίνεται με την αντίδραση Perkin, παρά τις χαμηλές αποδόσεις.



Σχήμα 22. Αντίδραση Perkin

Δεδομένου ότι ο σχηματισμός της πυρόνης είναι το σημαντικότερο βήμα σε πολλές από τις συνθέσεις κουμαρινών, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για την εισαγωγή

χαρακτηριστικών ομάδων σε αυτή την δομή, όπως για παράδειγμα η σύνθεση φαινόλης με τους επιθυμητούς υποκαταστάτες της κουμαρίνης. Διαφορετικά, μπορεί να προηγηθεί ο σχηματισμός του δομικού πυρήνα της κουμαρίνης και στην συνέχεια να προστεθούν οι κατάλληλοι υποκαταστάτες με αλκυλίωση άνθρακα ή οξυγόνου.

Μειονέκτημα της μεθόδου αυτής αποτελεί η δυσκολία παρασκευής των απαραίτητων πρώτων υλών (υποκατεστημένες ο-υδροξυ-βενζαλδεΐδες) και οι χαμηλές αποδόσεις, που οφείλονται στο γεγονός ότι οι δραστικές συνθήκες που απαιτούνται (παρατεταμένη θέρμανση στους 150-200oC) οδηγούν στο σχηματισμό ρητινωδών προϊόντων και το γεγονός ότι υπάρχει πιθανότητα σχηματισμού κουμαρικών οξέων αντί των κουμαρινών.

Ωστόσο, σημαντικό πλεονέκτημα είναι ότι δεν υπάρχει αμφιβολία για τη δομή του προϊόντος, αφού δεν είναι δυνατός ο σχηματισμός ισομερών προϊόντων, λόγω της παρουσίας σε συγκεκριμένες θέσεις του αρωματικού δακτυλίου των υποκαταστατών, που συμμετέχουν στο σχηματισμό του λακτονικού δακτυλίου. [33][34][35]

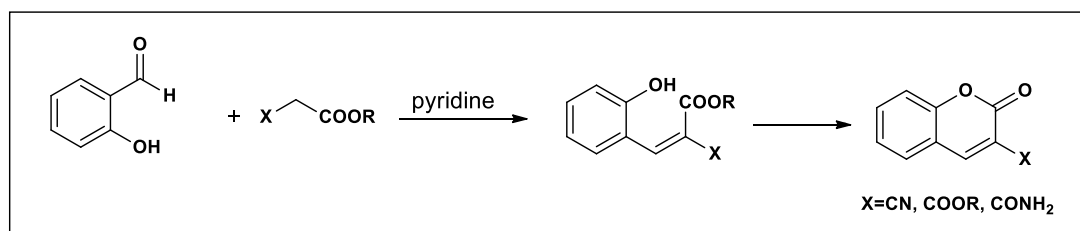
3.3. Αντίδραση Knoevenagel

Οι 2-υδροξυ-βενζαλδεΐδες δίνουν αντιδράσεις συμπύκνωσης με ενώσεις που έχουν ενεργή μεθυλενική ομάδα παρουσία πυριδίνης, πιπεριδίνης και άλλων βάσεων, όπου μετά από λακτονοποίηση λαμβάνεται σαν τελικό προϊόν κουμαρινικά-3-καρβοξυλικά οξέα.

Η αντίδραση περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

1. Ενοποίηση της προσθήκης μεθυλενικής ένωσης, πιθανώς διαχωρίζοντας ένα ιόν υδρογόνου. Η ισορροπία ενοποίησης καταλύεται τόσο από τα οξέα όσο και από τις βάσεις. Οι βάσεις παράγουν υψηλότερες συγκεντρώσεις του ενολικού ανιόντος, απομακρύνοντας το ιόν υδρογόνου.
2. Προσθήκη της ενόλης, πιθανόν μέσω των ιόντων της, στην ένωση καρβονυλίου. Οι ρυθμοί των αντιδράσεων προσθήκης εξαρτώνται από τον βαθμό στον οποίο παρεμποδίζεται η προσθήκη στην ομάδα καρβονυλίου ή από το μέγεθος των αλκυλομάδων.
3. Εξάλειψη του νερού από το ενδιάμεσο τύπου αλδολίου. Οι αντιδράσεις όπως αυτή, στις οποίες εξαλείφεται το νερό, καταλύονται τόσο από τα οξέα όσο και από τις βάσεις, αλλά γενικά ισχυρότερα από τα οξέα.

Η συνθετική αυτή μέθοδος έχει το πλεονέκτημα ότι λαμβάνει χώρα κάτω από ηπιότερες συνθήκες αντίδρασης σε σχέση με τη μέθοδο Perkin. [36]



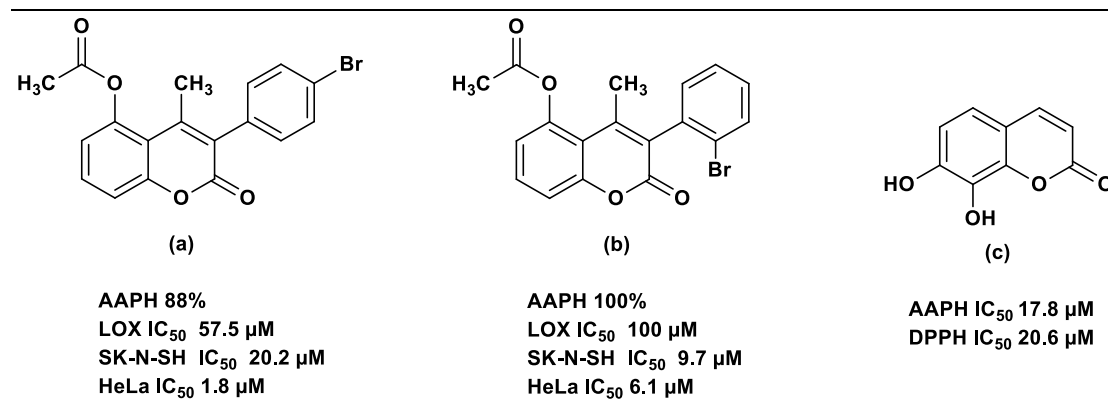
Σχήμα 23. Αντίδραση Knoevenagel

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ο σχεδιασμός, η σύνθεση κι ο χαρακτηρισμός νέων ακετυλοξυ- και υδροξυ-κουμαρινικών αναλόγων, με στόχο την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης τους σε ειδικές *in vitro* βιοδοκιμές, αλλά και την αξιολόγησή τους ως προς τη φαρμακο-ομοιότητα.

Η επιλογή των κουμαρινικών αναλόγων προέκυψε βάσει μορίων που έχουν ήδη παρασκευαστεί από την ερευνητική μας ομάδα στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π. και έχουν παρουσιάσει αξιόλογη αντιοξειδωτική, αλλά και αντιφλεγμονώδη δράση. [37][38]

Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η 5-ακετυλοξυ-3-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλοκουμαρίνη (**a**), η 5-ακετυλοξυ-3-(2-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλοκουμαρίνη (**b**), καθώς και η φυσική κουμαρίνη δαφνετίνη (**c**). Τα μόρια αυτά αποτέλεσαν οδηγούς για τη σύνθεση νέων ενώσεων, δομικά τροποποιημένων στο φαινολικό δακτύλιο της θέσης 3- του κουμαρινικού δακτυλίου, προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του υποκαταστάτη στη βιολογική δράση των νέων κουμαρινικών αναλόγων.



Σχήμα 24. Μόρια οδηγού

Επιπλέον, δεδομένου ότι η παρουσία του κατεχολικού συστήματος, δηλαδή η ορθο-διυδροξυ υποκατάσταση, ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση μιας ένωσης [19], στόχος ήταν η σύνθεση υδροξυ-κουμαρινικών αναλόγων με διαφορετικές υποκαταστάσεις.

Ως αποτέλεσμα, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση 11 νέων ακετυλοξυ- και 11 νέων υδροξυ- κουμαρινικών αναλόγων, αλλά και της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης, η οποία αποτέλεσε αντιδρών στην τροποποιημένη αντίδραση Perkin που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των ακετυλοξυ-κουμαρινικών παραγώγων. Οι 11 ακετυλοξυ-κουμαρίνες οδήγησαν μέσω απακετυλίωσης στα 11 υδροξυ-κουμαρινικά ανάλογα.

Τέλος, τα νέα κουμαρινικά ανάλογα αξιολογήθηκαν για την αντιοξειδωτική τους δράση, μέσω των μεθόδων DPPH και AAPH, αλλά και για την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση της λιποξυγονάσης από σόγια (LOX). Οι ακετυλοξυ-κουμαρίνες αξιολογήθηκαν, επίσης, για το προφίλ φαρμακο-ομοιότητάς τους.

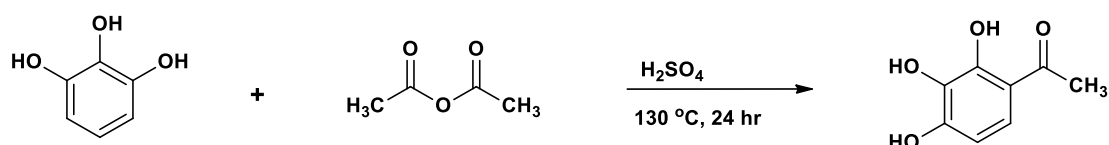
ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΝΕΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

1. Σχεδιασμός νέων κουμαρινικών αναλόγων

3.4. Σύνθεση της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (1)

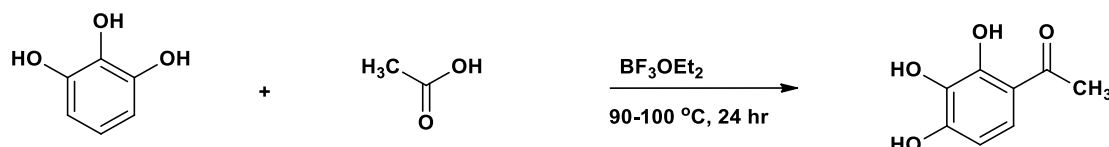
Για τη σύνθεση της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης εξετάστηκαν δύο εναλλακτικές πορείες σύνθεσης.

1^η) Η αντίδραση έγινε μεταξύ της πυρογαλλόλης και του οξικού ανυδρίτη, σε στοιχειομετρία 1:1 στους 130°C, παρουσία θειικού οξέος.



Σχήμα 25. 1^η συνθετική πορεία 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (1)

2^η) Η αντίδραση έγινε μεταξύ της πυρογαλλόλης και του οξικού οξέος, σε στοιχειομετρία 1:1.11 στους 90-100°C, παρουσία του συμπλόκου τριφθοριούχου βορίου-διαιθυλαιθέρα.



Σχήμα 26. 2^η συνθετική πορεία 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (1)

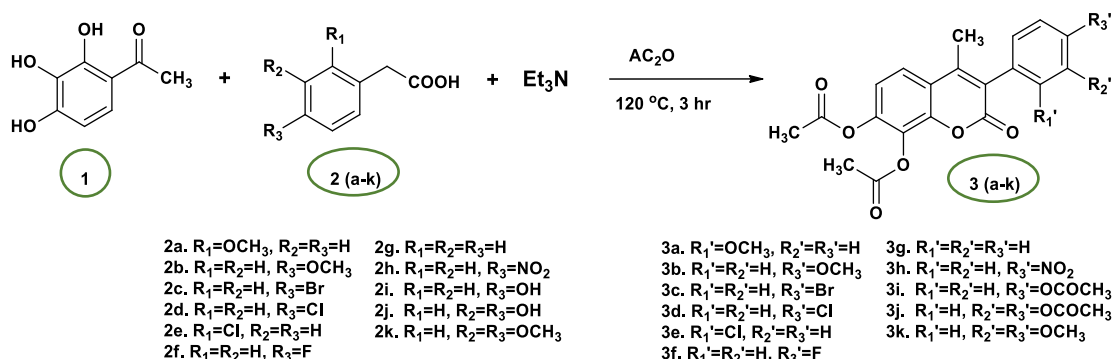
Πίνακας 2. Μελέτη εναλλακτικών συνθηκών αντίδρασης σύνθεσης της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης

	Πυρογαλλόλη	Οξικός ανυδρίτης	Συνθήκες	Απόδοση
Συνθετική πορεία 1	1 eq	1 eq	130°C, 24h	18%
	Πυρογαλλόλη	Οξικό οξύ	Συνθήκες	Απόδοση
Συνθετική πορεία 2	1 eq	1.11 eq	90-100°C, 24h	55%

Από τα παραπάνω προέκυψε ότι η βέλτιστη μέθοδος για τη σύνθεση της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης ήταν η δεύτερη, καθώς επιτεύχθηκε υψηλότερη απόδοση και συλλέχθηκε προϊόν χωρίς προσμίξεις.

3.5. Σύνθεση των 7,8-διακετυλοξυ-3-αρυλοκουμαρινών (3a-3k)

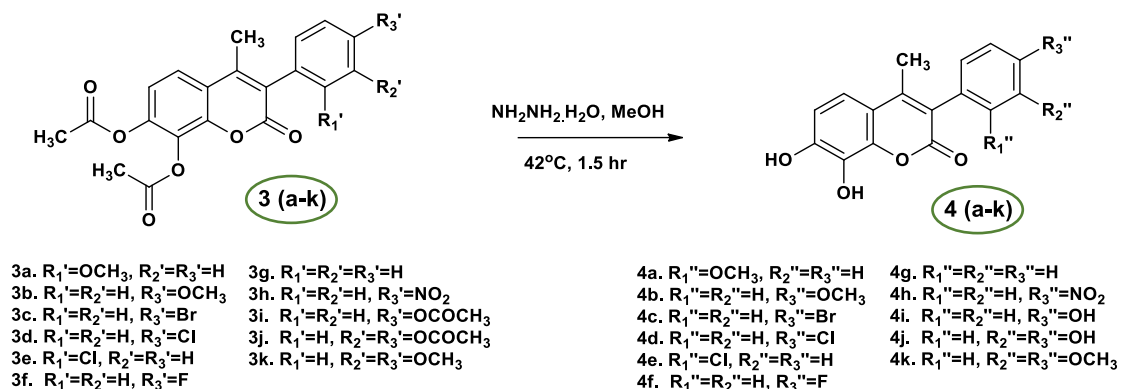
Η σύνθεση των ακετυλοξυ-κουμαρινικών αναλόγων, επιτεύχθηκε μέσω τροποποιημένης αντίδρασης Perkin-Ogliologo, κατά την οποία κατάλληλη ποσότητα υποκατεστημένου-φαινυλοξικού οξέος αντιδρά με κατάλληλη ποσότητα 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (**1**) και τριαιθυλαμίνης παρουσία οξικού ανυδρίτη, στους 130°C. Ως αποτέλεσμα, προέκυψαν 11 **νέα** ακετυλοξυ-κουμαρινικά παράγωγα, τα οποία διαθέτουν υποκαταστάτες -OCH₃, -Br, -Cl, -F, -NO₂, -OCOCH₃, σε θέσεις ορθο-, μετα- και παρα- του αρωματικού δακτυλίου της θέσης 3- του κουμαρινικού σκελετού.



Σχήμα 27. Συνθετική πορεία 7,8-διακετυλοξυ-3-αρυλοκουμαρινών (3a-3k)

3.6. Σύνθεση των 7,8-διυδροξυ-3-αρυλοκουμαρινών (4a-4k)

Η σύνθεση των υδροξυ-κουμαρινικών παραγώγων πραγματοποιήθηκε μέσω αντίδρασης απακετυλίωσης των αντίστοιχων ακετυλοξυ-κουμαρινών (**3a-3k**). Οι κατάλληλα υποκατεστημένες ακετυλοξυ-κουμαρίνες αντιδρούν με μονοένυδρη υδραζίνη σε διαλύτη μεθανόλη, στους 42°C. Ως αποτέλεσμα, προέκυψαν 11 **νέα** υδροξυ-κουμαρινικά παράγωγα, τα οποία διαθέτουν υποκαταστάτες -OCH₃, -Br, -Cl, -F, -NO₂, -OH, σε θέσεις ορθο-, μετα- και παρα- του αρωματικού δακτυλίου της θέσης 3- του κουμαρινικού σκελετού.



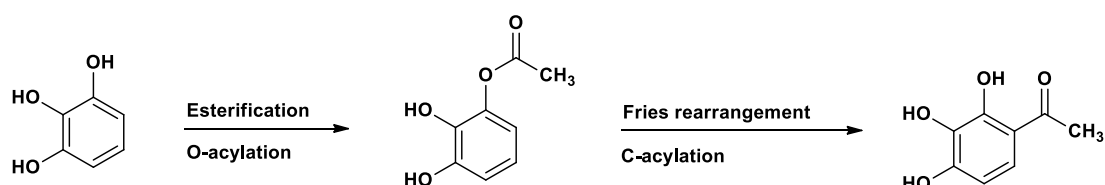
Σχήμα 28. Συνθετική πορεία 7,8-διυδροξυ-3-αρυλοκουμαρινών (4a-4k)

4. Μηχανισμοί αντιδράσεων

4.1. Μηχανισμός σύνθεσης της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (1)

Ο μηχανισμός σύνθεσης της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης περιλαμβάνει τα ακόλουθα δύο στάδια:

- i) Εστεροποίηση κατά Fischer (O-Ακυλίωση)
- ii) Αναδιάταξη Fries (C-Ακυλίωση)

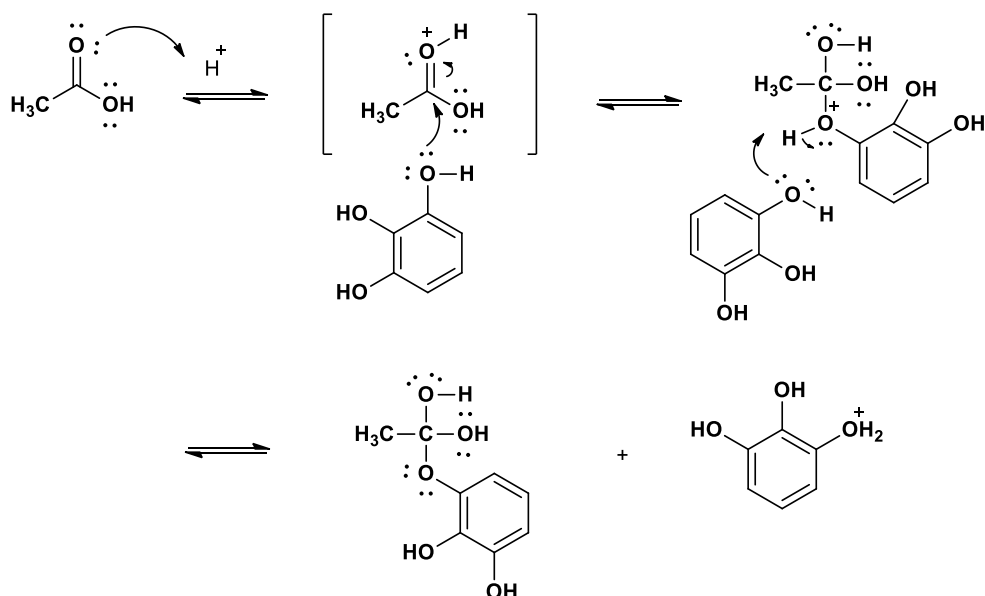


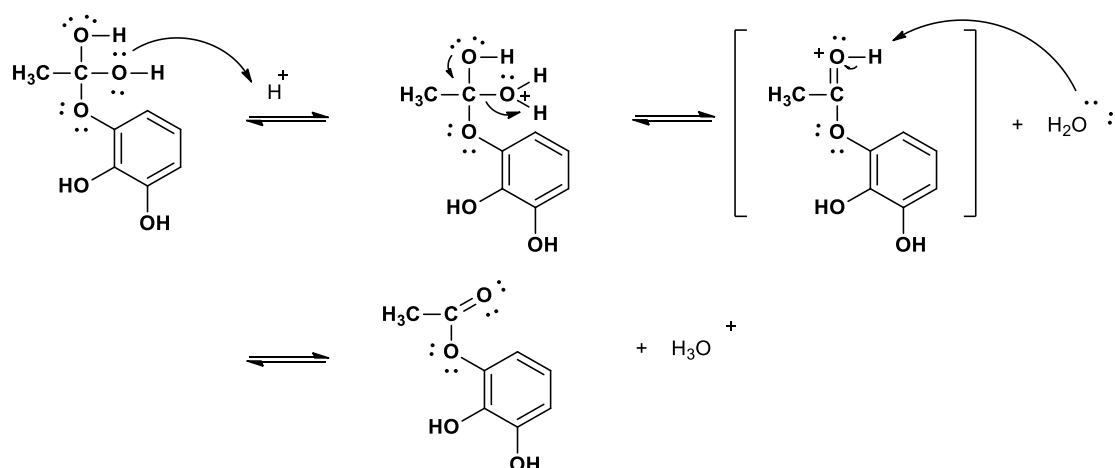
Σχήμα 29. Μηχανισμός σύνθεσης της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (1)

Εστεροποίηση κατά Fischer

Ο μηχανισμός της εστεροποίησης κατά Fischer είναι μία καταλύμενη από οξύ, πυρηνόφιλη ακυλική υποκατάσταση. Ο όξινος καταλύτης πρωτονώνει την καρβονυλική ομάδα και την ενεργοποιεί ως προς την πυρηνόφιλη προσβολή. Με προσβολή από την αλκοόλη και στη συνέχεια με απώλεια πρωτονίου, παίρνουμε τον υδρίτη ενός εστέρα.

Η πρωτονίωση οποιασδήποτε από τις υδροξυλομάδες επιτρέπει την απομάκρυνσή της υπό μορφή νερού και το σχηματισμό κατιόντος που σταθεροποιείται μέσω συντονισμού. Με απώλεια πρωτονίου από τη δεύτερη υδροξυλομάδα παίρνουμε τον εστέρα.[39]

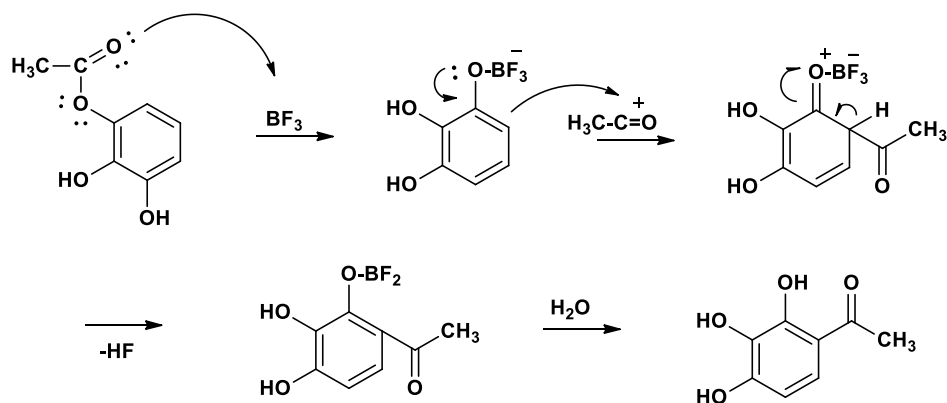




Σχήμα 30. Μηχανισμός εστεροποίησης κατά Fischer

Αναδιάταξη Fries

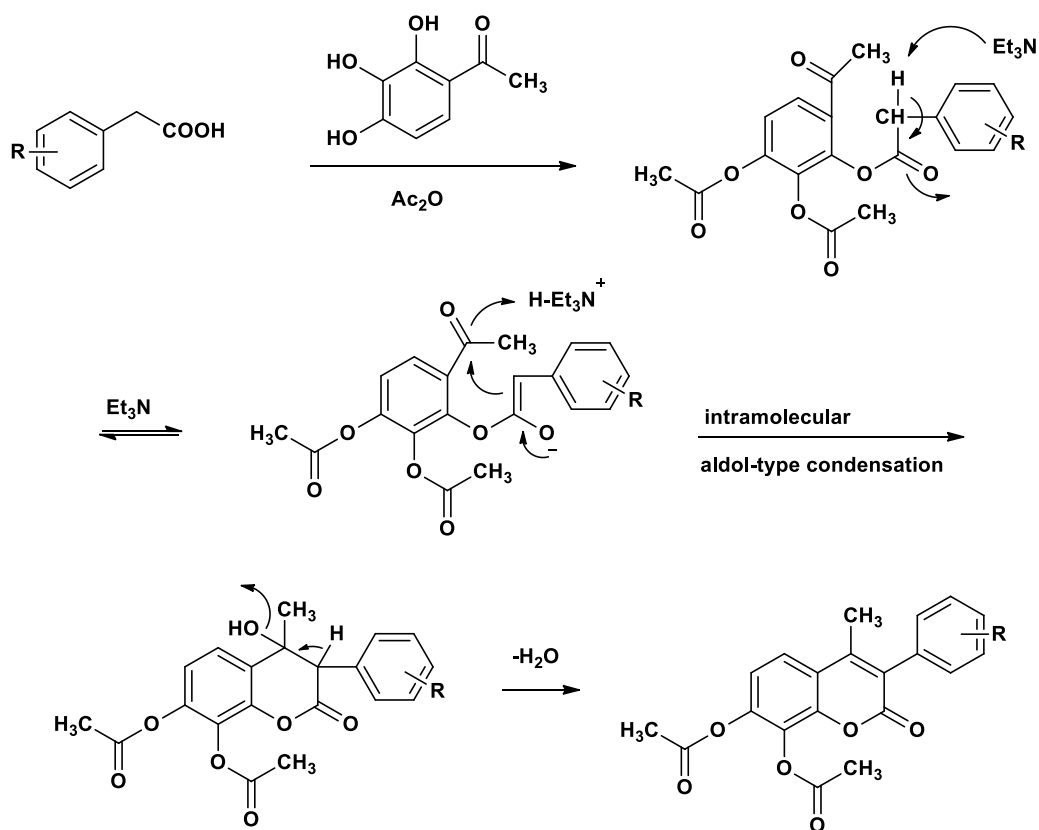
Η αναδιάταξη Fries είναι μετατροπή που λαμβάνει χώρα υπό τις συνθήκες της ακυλίωσης κατά Friedel-Crafts (ηλεκτρονιόφιλη υποκατάσταση). Το αρχικό προϊόν της ακυλίωσης (ακυλοβενζόλιο) είναι μία κετόνη. Η καρβονυλική ομάδα της κετόνης διαθέτει αδεδσμικά ηλεκτρόνια που συμπλέκονται με το οξύ Lewis (BF_3), απαιτώντας κατά την ακυλίωση ένα ολόκληρο ισοδύναμο BF_3 . Το προϊόν είναι το σύμπλοκο του ακυλοβενζολίου με τριφθοριούχο βόριο. Με προσθήκη νερού το σύμπλοκο αυτό υδρολύεται, ελευθερώνοντας κετόνη.[40]



Σχήμα 31. Αναδιάταξη Fries

4.2. Μηχανισμός σύνθεσης 7,8-διακετυλοξυ-3-αρυλοκουμαρινών (3a-3k)

Ο μηχανισμός σύνθεσης κουμαρινών από κατάλληλα υποκατεστημένες 2-υδροξυ-ακετοφαινόνες, μέσω τροποποιημένης αντίδρασης Perkin-Oglialoro, περιλαμβάνει μία ενδομοριακή αλδολικού τύπου συμπύκνωση της Ο-ακετυλο-ακετοφαινόνης ως ενδιάμεσο στάδιο. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται μέσω αφυδάτωσης. [41]



Σχήμα 32. Τροποποιημένη αντίδραση Perkin-Oglialoro

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5. Σύνθεση κουμαρινικών αναλόγων

5.1. Όργανα και συσκευές

Παρακάτω αναφέρονται τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την επίβλεψη της πορείας των αντιδράσεων, τον χαρακτηρισμό των νέων ενώσεων αλλά και τον προσδιορισμό ορισμένων ιδιοτήτων τους. Όλα τα αντιδραστήρια αγοράστηκαν από τις εταιρίες Sigma-Aldrich, Fluka, Alfa Aesar και Acros και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Για τη συμπύκνωση των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε περιστροφικός εξατμιστήρας (Buchi Rotavapor® R-210).

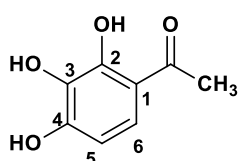
Η παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν, όπως και ο αρχικός έλεγχος της καθαρότητάς τους έγινε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, TLC, (Thin Liquid Chromatography) σε πλάκες αλουμινίου, επιστρωμένες με Silica gel F254 της εταιρίας Merck. Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες αναλογίες συστήματος διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα (PE) / οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc), ανάλογα με το εκάστοτε μόριο. Οι κηλίδες των χρωματογραφημάτων TLC εμφανίστηκαν με λάμπα υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας στα 254 nm, έπειτα με εμπλοτισμό σε διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος (αιθανολικό διάλυμα PMA 7%) και θέρμανση της πλάκας.

Ο τελικός έλεγχος της καθαρότητας των νέων προϊόντων, αλλά και ο χαρακτηρισμός τους επιτεύχθηκε μέσω φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Τα φάσματα ^1H NMR, έχουν καταγραφεί με το όργανο Varian V600 MHz του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε είτε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3) είτε δευτεριωμένο διμεθυλο-σουλφοξείδιο (DMSO-d_6), ανάλογα με τη χημική δομή της κάθε ένωσης. Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων δίνονται σε ppm, ενώ η πολλαπλότητα των σημάτων στα φάσματα ^1H NMR αναφέρεται ως: s (singlet, απλό), d (doublet, διπλό), t (triplet, τριπλό), m (multiplet, πολλαπλό), br (broad, ευρύ), dd (doublet of doublets, διπλή διπλών).

Ο προσδιορισμός των σημείων τήξης έγινε σε ανοικτούς τριχοδιαμετρικούς σωλήνες σε μια συσκευή Gallenkamp.

5.2. Συνθετική πορεία κουμαρινών

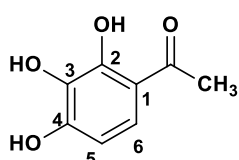
Σύνθεση της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (1^η μέθοδος) (1)



Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 1.98 mmol (250 mg) πυρογαλλόλης και 1.98 mmol (0.19 mL) οξικού ανυδρίτη, καθώς και 1-2 σταγόνες θειικού οξέος και θερμαίνονται στους 130 °C για 24 ώρες υπό συνεχή ανάδευση, παρουσία κάθετου ψυκτήρα κι υπό αδρανείς συνθήκες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 60% (PE)/ 40% (EtOAc). Στη συνέχεια, αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και προστίθενται 0.8 mL νερού, 0.2 mL αιθανόλης και 2-3 σταγόνες υδροχλωρίου. Έπειτα, η αντίδραση θερμαίνεται εκ νέου στους 130°C για δύο ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολουθεί εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση για απομάκρυνση του διαλύτη έως ότου παρατηρηθεί εναπόθεση στερεού προϊόντος στα τοιχώματα της σφαιρικής φιάλης. Τέλος, το προϊόν που προκύπτει ανακρυσταλλώνεται με περίσσεια οξικού αιθυλεστέρα και κατάλληλη ποσότητα εξανίου και λαμβάνεται με διήθηση (έκπλυση με κρύο εξάνιο) υπό τη μορφή κόκκινου στερεού. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ¹H NMR.

Απόδοση: 18%

Σύνθεση της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (2^η μέθοδος) (1)



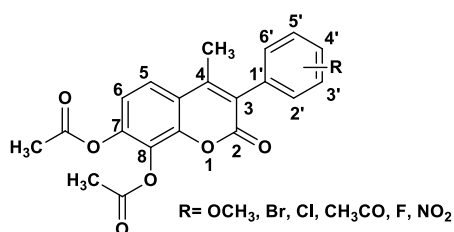
Σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 3.96 mmol (500 mg) πυρογαλλόλης και 4.40 mmol (0.25 mL) οξικού οξέος, καθώς και 1.46 mL συμπλόκου τριφθοριούχου βορίου-διαιθυλαιθέρα και θερμαίνονται στους 90-100 °C για 5 ώρες υπό συνεχή ανάδευση, παρουσία κάθετου ψυκτήρα κι υπό αδρανείς συνθήκες. Στη συνέχεια, αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, όπου προστίθενται 23.76 mL οξικού νατρίου 10% και η αντίδραση παραμένει να αναδεύεται όλο το βράδυ. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 60% (PE)/ 40% (EtOAc). Μετά το πέρας της αντίδρασης ακολουθεί εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα και εξάτμιση υπό ελαττωμένη πίεση για απομάκρυνση του διαλύτη έως ότου παρατηρηθεί εναπόθεση στερεού προϊόντος στα τοιχώματα της σφαιρικής φιάλης. Τέλος, το προϊόν που προκύπτει ανακρυσταλλώνεται με περίσσεια διχλωρομεθανίου και κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και λαμβάνεται υπό τη μορφή κίτρινου στερεού. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ¹H NMR.

Απόδοση: 55%

Σημείο τήξης: 150-152°C

¹H NMR (600MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 12.59 (s, 1H, 2-OH), 10.07 (s, 1H, 4-OH), 8.59 (s, 1H, 3-OH), 7.30 (d, J=9Hz, 1H, H-6), 6.40 (d, J=9Hz, 1H, H-5) 2.52 (s, 3H, CH₃)

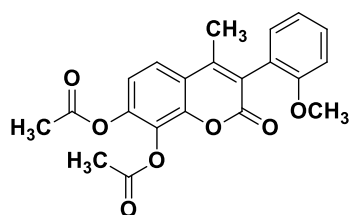
Γενική μέθοδος παρασκευής ακετυλοξυ-κουμαρινών



Κατάλληλη ποσότητα 2-, 3- ή 4-υποκατεστημένου-φαινυλοξικού οξέος (1 eq) προστίθεται σε σφαιρική φιάλη μαζί με κατάλληλη ποσότητα 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης (1.05 eq) και τριαιθυλαμίνης (Et₃N) (3.1 eq) παρουσία οξικού ανυδρίτη [(CH₃CO)₂O]. Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 130 °C για περίπου 3 ώρες, παρουσία κάθετου ψυκτήρα, υπό αδρανείς συνθήκες.

Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE)/ 30% (EtOAc). Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθεται νερό στο μίγμα και πραγματοποιείται εκχύλιση της υδατικής στιβάδας με διχλωρομεθάνιο, ενώ το οργανικό εκχύλισμα ξηραίνεται με θειικό νάτριο (Na₂SO₄) και έπειτα εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση. Ακολουθεί ανακρυστάλλωση με κατάλληλη ποσότητα μεθανόλης και διχλωρομεθανίου και παραλαβή του στερεού προϊόντος με διήθηση υπό κενό. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ¹H NMR.

Σύνθεση της 7,8-διακετυλοξυ-3-(2-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (3a)



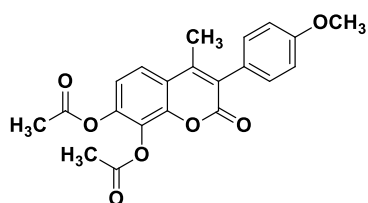
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 3.14 mL οξικού ανυδρίτη και 1.23 mL Et₃N προστίθενται 2.83 mmol (470.58 mg) 2-μεθοξυφαινυλοξικού οξέος και 2.97 mmol (500 mg) 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

Απόδοση: 23%

Σημείο τήξης: 159-160 °C

¹H NMR (600MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.55 (d, J=9Hz, 1H, H-5) 7.39 (t, J=7.8Hz, 1H, H-4') 7.17 (d, J=9Hz, 1H, H-6') 7.15 (d, J=9Hz, 1H, H-3') 7.04 (t, J=7.2Hz, 1H, H-5') 6.99 (d, J=8.4Hz, 1H, H-6) 3.77 (s, 3H, 2'-OCH₃) 2.42 (s, 3H, 4-CH₃) 2.34 (s, 3H, 8-CH₃) 2.21 (s, 3H, 7-CH₃)

Σύνθεση της 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (3b)



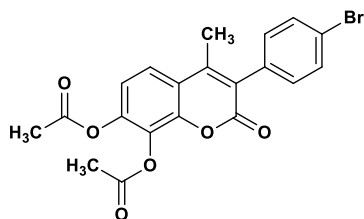
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 2.31 mL οξικού ανυδρίτη και 902.05 μL Et₃N προστίθενται 2.08 mmol (346.48 mg) 4-μεθοξυφαινυλοξικού οξέος και 2.19 mmol (368.10 mg) 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται κίτρινο στερεό.

Απόδοση: 36%

Σημείο τήξης: 180 °C

¹H NMR (600MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.55 (d, J=9Hz, 1H, H-5) 7.21 (d, J=9Hz, 2H, H-2' & H-6') 7.18 (d, J=8.4Hz, 1H, H-6) 6.99 (d, J=8.4Hz, 2H, H-3' & H-5') 3.85 (s, 3H, 4'-OCH₃) 2.42 (s, 3H, 4-CH₃) 2.35 (s, 3H, 8-CH₃) 2.31 (s, 3H, 7-CH₃)

Σύνθεση της 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (3c)



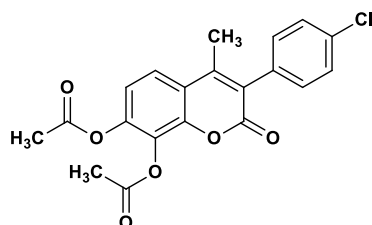
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης ακετυλοξυκουμαρινών, σε 2.51 mL οξικού ανυδρίτη και 980.44 μL Et_3N προστίθενται 2.26 mmol (487.23 mg) 4-βρωμοφαινυλοξικού οξέος και 2.38 mmol (400 mg) 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

Απόδοση: 62%

Σημείο τήξης: 208-209 °C

$^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.59 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H, H-3' & H-5') 7.56 (d, $J=9\text{Hz}$, 1H, H-5) 7.19 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H, H-6) 7.16 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H, H-2' & H-6') 2.42 (s, 3H, 4- CH_3) 2.35 (s, 3H, 8- CH_3) 2.30 (s, 3H, 7- CH_3)

Σύνθεση της 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (3d)



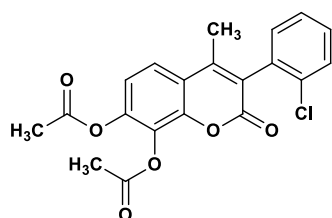
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης ακετυλοξυκουμαρινών, σε 3.14 mL οξικού ανυδρίτη και 1.23 mL Et_3N προστίθενται 2.83 mmol (483.12 mg) 4-χλωροφαινυλοξικού οξέος και 2.97 mmol (500 mg) 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 57%

Σημείο τήξης: 220-221 °C

$^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.56 (d, $J=9\text{Hz}$, 1H, H-5) 7.44 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H, H-2' & H-6') 7.22 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H, H-3' & H-5') 7.19 (d, $J=9\text{Hz}$, 1H, H-6) 2.42 (s, 3H, 4- CH_3) 2.35 (s, 3H, 8- CH_3) 2.30 (s, 3H, 7- CH_3)

Σύνθεση της 7,8-διακετυλοξυ-3-(2-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (3e)



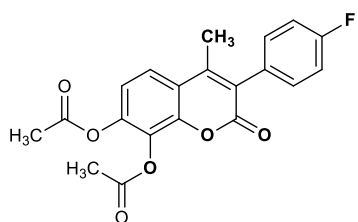
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης ακετυλοξυκουμαρινών, σε 3.76 mL οξικού ανυδρίτη και 1.47 mL Et_3N προστίθενται 3.40 mmol (579.72 mg) 2-χλωροφαινυλοξικού οξέος και 3.57 mmol (600 mg) 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 63%

Σημείο τήξης: 175-178 °C

$^1\text{H NMR}$ (600MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7.58 (d, $J=9\text{Hz}$, 1H, H-5) 7.51 (m, 1H, H-6') 7.37 (m, 2H, H-4' & H-5') 7.24 (m, 1H, H-3') 7.20 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H, H-6) 2.43 (s, 3H, 4- CH_3) 2.35 (s, 3H, 8- CH_3) 2.22 (s, 3H, 7- CH_3)

Σύνθεση της 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-φθοροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (3f)



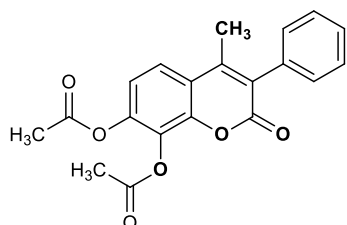
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης ακετυλοξυκουμαρινών, σε 2.82 mL οξικού ανυδρίτη και 1.10 mL Et₃N προστίθενται 2.55 mmol (392.86 mg) 4-φθοροφαινυλοξικού οξέος και 2.67 mmol (450 mg) 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 28%

Σημείο τήξης: 207-209 °C

¹H NMR (600MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.57 (d, J=9Hz, 1H, H-5) 7.26 (pseudotriplet, 2H, H-2' & H-6') 7.19 (d, J=9Hz, 1H, H-6) 7.16 (pseudotriplet, 2H, H-3' & H-5') 2.43 (s, 3H, 4-CH₃) 2.35 (s, 3H, 8-CH₃) 2.30 (s, 3H, 7-CH₃)

Σύνθεση της 7,8-διακετυλοξυ-3-φαινυλο-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (3g)



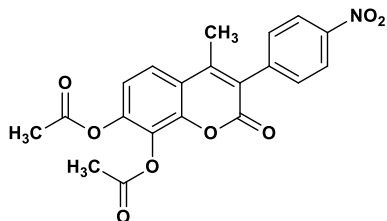
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης ακετυλοξυκουμαρινών, σε 3.14 mL οξικού ανυδρίτη και 1.23 mL Et₃N προστίθενται 2.83 mmol (385.57 mg) φαινυλοξικού οξέος και 2.97 mmol (500 mg) 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται λευκό στερεό.

Απόδοση: 35%

Σημείο τήξης: 218-220 °C

¹H NMR (600MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.56 (d, J=8.4Hz, 1H, H-5) 7.45 (m, 2H, H-3' & H-5') 7.40 (m, 1H, H-4') 7.27 (d, J=7.8Hz, 2H, H-2' & H-6') 7.18 (d, J=8.4Hz, 1H, H-6) 2.42 (s, 3H, 4-CH₃) 2.34 (s, 3H, 8-CH₃) 2.29 (s, 3H, 7-CH₃)

Σύνθεση της 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-νιτροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (3h)



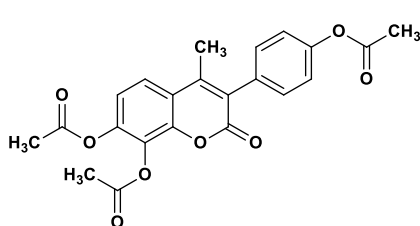
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης ακετυλοξυκουμαρινών, σε 3.14 mL οξικού ανυδρίτη και 1.23 mL Et₃N προστίθενται 2.83 mmol (513 mg) 4-νιτροφαινυλοξικού οξέος και 2.97 mmol (500 mg) 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης. Παραλαμβάνεται καφέ στερεό.

Απόδοση: 25%

Σημείο τήξης: 235-238 °C

¹H NMR (600MHz, CDCl₃): δ (ppm) 8.33 (d, J=8.4Hz, 2H, H-3' & H-5') 7.60 (d, J=8.4Hz, 1H, H-5) 7.49 (d, J=8.4Hz, 2H, H-2' & H-6') 7.23 (d, J=8.4Hz, 1H, H-6) 2.43 (s, 3H, 4-CH₃) 2.36 (s, 3H, 7-CH₃) 2.32 (s, 3H, 8-CH₃)

Σύνθεση της 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (3i)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 3.14 mL οξικού ανυδρίτη και 1.23 mL Et₃N προστίθενται 2.83 mmol (430.87 mg) 4-υδροξυ-φαινυλοξικού οξέος και 2.97 mmol (500 mg) 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης.

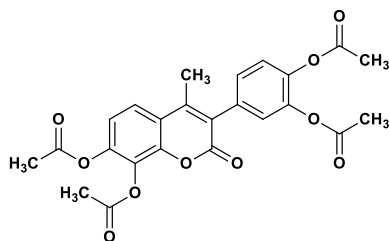
Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

Απόδοση: 54%

Σημείο τήξης: 198 °C

¹H NMR (600MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.57 (d, J=9Hz, 1H, H-5) 7.30 (d, J=9Hz, 2H, H-2' & H-6') 7.19 (d, J=9Hz, 2H, H-3' & H-5') 7.19 (d, J=9Hz, 1H, H-6) 2.42 (s, 3H, 4-CH₃) 2.35 (s, 3H, 4'-CH₃) 2.33 (s, 3H, 8-CH₃) 2.32 (s, 3H, 7-CH₃)

Σύνθεση της 7,8-διακετυλοξυ-3-(3,4-διακετυλοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (3j)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 3.14 mL οξικού ανυδρίτη και 1.23 mL Et₃N προστίθενται 2.83 mmol (476.18 mg) 3,4-διυδροξυ-φαινυλοξικού οξέος και 2.97 mmol (500 mg) 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης.

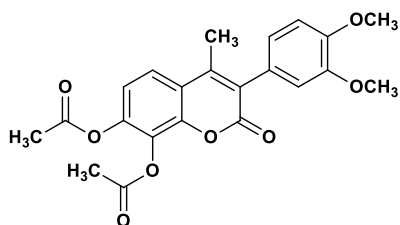
Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

Απόδοση: 69%

Σημείο τήξης: 184-186 °C

¹H NMR (600MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.57 (d, J=8.4Hz, 1H, H-5) 7.29 (d, J=8.4Hz, 1H, H-6) 7.19 (m, 2H, H-5' & H-6') 7.15 (s, 1H, H-2') 2.42 (s, 3H, 4-CH₃) 2.36 (s, 3H, 4'-CH₃) 2.34 (s, 3H, 3'-CH₃) 2.31 (s, 3H, 8-CH₃) 2.30 (s, 3H, 7-CH₃)

Σύνθεση της 7,8-διακετυλοξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (3k)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης ακετυλοξυ-κουμαρινών, σε 3.14 mL οξικού ανυδρίτη και 1.23 mL Et₃N προστίθενται 2.83 mmol (555.62 mg) 3,4-διμεθοξυ-φαινυλοξικού οξέος και 2.97 mmol (500 mg) 2,3,4-τριυδροξυ-ακετοφαινόνης.

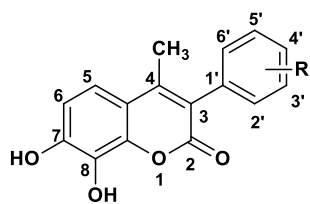
Παραλαμβάνεται καφέ στερεό.

Απόδοση: 49%

Σημείο τήξης: 184-185 °C

¹H NMR (600MHz, CDCl₃): δ (ppm) 7.55 (d, J=9Hz, 1H, H-5) 7.18 (d, J=9Hz, 1H, H-6') 6.95 (d, J=8.4Hz, 1H, H-5') 6.83 (d, J=8.4Hz, 1H, H-6) 6.80 (s, 1H, H-2') 3.92 (s, 3H, 4'-OCH₃) 3.88 (s, 3H, 3'-OCH₃) 2.42 (s, 3H, 4-CH₃) 2.35 (s, 3H, 8-CH₃) 2.32 (s, 3H, 7-CH₃)

Γενική μέθοδος απακετυλίωσης κουμαρινών

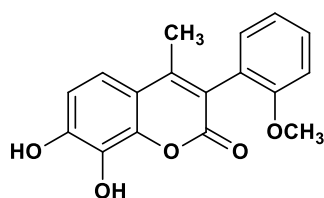


R= OCH₃, Br, Cl, OH, F, NO₂

Κατάλληλη ποσότητα της υποκατεστημένης ακετυλοξυκουμαρίνης (1 eq) προστίθεται σε σφαιρική φιάλη μαζί με μονοένυδρη υδραζίνη (NH₂NH₂·H₂O) (15 eq ανά ομάδα OH) σε διαλύτη μεθανόλη. Η αντίδραση αφήνεται για περίπου 1.5 ώρα στους 42°C υπό συνεχή ανάδευση, παρουσία κάθετου ψυκτήρα, υπό αδρανείς συνθήκες.

Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 60% (PE)/ 40% (EtOAc). Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθεται νερό στο μίγμα και πραγματοποιείται εκχύλιση της υδατικής στιβάδας με διάλυμα οξικού αιθυλεστέρα. Στη συνέχεια, το οργανικό εκχύλισμα ξηραίνεται με θειικό νάτριο (Na₂SO₄) κι έπειτα εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση έως την παραλαβή στερεού. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία ¹H NMR.

Σύνθεση της 7,8-διυδροξυ-3-(2-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (4a)



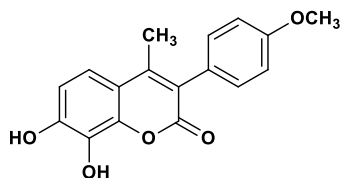
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο απακετυλίωσης κουμαρινών, σε μια σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.52 mmol (200 mg) 7,8-διακετυλοξυ-3-(2-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 15.69 mmol (0.75 mL) μονοένυδρης υδραζίνης και 8.48 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται κίτρινο στερεό.

Απόδοση: 56%

Σημείο τήξης:

¹H NMR (600MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.39 (t, J=7.2Hz, 1H, H-4') 7.15 (d, J=7.8Hz, 1H, H-6') 7.14 (d, J=9Hz, 1H, H-3') 7.10 (d, J=8.4Hz, 1H, H-5) 7.01 (t, J=7.2Hz, 1H, H-5') 6.83 (d, J=8.4Hz, 1H, H-6) 3.72 (s, 3H, 2'-OCH₃) 2.09 (s, 3H, 4-CH₃)

Σύνθεση της 7,8-διυδροξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (4b)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο απακετυλίωσης κουμαρινών, σε μια σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.44 mmol (170 mg) 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 13.34 mmol (0.64 mL) μονοένυδρης υδραζίνης και 7.21 mL μεθανόλης.

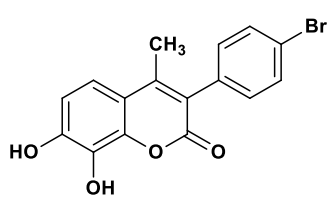
Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

Απόδοση: 84%

Σημείο τήξης:

¹H NMR (600MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.22 (d, J=8.4Hz, 2H, H-2' & H-6') 7.14 (d, J=8.4Hz, 1H, H-5) 6.99 (d, J=8.4Hz, 2H, H-3' & H-5') 6.83 (d, J=8.4Hz, 1H, H-6) 3.80 (s, 3H, 4'-OCH₃) 2.20 (s, 3H, 4-CH₃)

Σύνθεση της 7,8-διυδροξυ-3-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (4c)



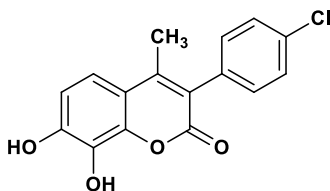
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο απακετυλίωσης κουμαρινών, σε μια σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.70 mmol (300 mg) 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 20.87 mmol (0.99 mL) μονοένυδρης υδραζίνης και 11.28 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται κίτρινο στερεό.

Απόδοση: 66%

Σημείο τήξης:

¹H NMR (600MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.59 (d, J=7.8Hz, 2H, H-3' & H-5') 7.23 (d, J=7.2Hz, 2H, H-2' & H-6') 6.96 (br, 1H, H-5) 6.53 (br, 1H, H-6) 2.14 (s, 3H, 4-CH₃)

Σύνθεση της 7,8-διυδροξυ-3-(4-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (4d)



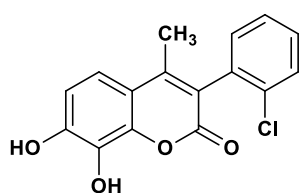
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο απακετυλίωσης κουμαρινών, σε μια σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.78 mmol (300 mg) 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 23.27 mmol (1.11 mL) μονοένυδρης υδραζίνης και 12.58 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται κίτρινο στερεό.

Απόδοση: 61%

Σημείο τήξης:

¹H NMR (600MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.50 (d, J=8.4Hz, 2H, H-2' & H-6') 7.34 (d, J=7.8Hz, 2H, H-3' & H-5') 7.16 (d, J=7.8Hz, 1H, H-5) 6.83 (d, J=8.4Hz, 1H, H-6) 2.19 (s, 3H, 4-CH₃)

Σύνθεση της 7,8-διυδροξυ-3-(2-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (4e)



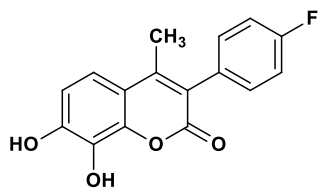
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο απακετυλίωσης κουμαρινών, σε μια σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.65 mmol (250 mg) 7,8-διακετυλοξυ-3-(2-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 19.39 mmol (0.92 mL) μονοένυδρης υδραζίνης και 10.48 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

Απόδοση: 80%

Σημείο τήξης:

¹H NMR (600MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.58 (d, J=8.4Hz, 1H, H-6') 7.44 (m, 2H, H-4' & H-5') 7.37 (dd, J=7.2Hz, j=2.4Hz, 1H, H-3') 7.18 (d, J=8.4Hz, 1H, H-5) 6.86 (d, J=9Hz, 1H, H-6) 2.10 (s, 3H, 4-CH₃)

Σύνθεση της 7,8-διυδροξυ-3-(4-φθοροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (4f)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο απακετυλίωσης κουμαρινών, σε μια σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.49 mmol (180 mg) 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-φθοροφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 14.58 mmol (0.70 mL) μονοένυδρης υδραζίνης και 7.88 mL μεθανόλης.

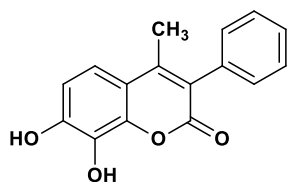
Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

Απόδοση: 83%

Σημείο τήξης:

¹H NMR (600MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.35 (pseudotriplet, 2H, H-2' & H-6') 7.26 (pseudotriplet, 2H, H-3' & H-5') 7.17 (d, J=8.4Hz, 1H, H-5) 6.84 (d, J=8.4Hz, 1H, H-6) 2.19 (s, 3H, 4-CH₃)

Σύνθεση της 7,8-διυδροξυ-3-φαινυλο-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (4g)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο απακετυλίωσης κουμαρινών, σε μια σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.65 mmol (230 mg) 7,8-διακετυλοξυ-3-φαινυλο-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 19.58 mmol (0.93 mL) μονοένυδρης υδραζίνης και 10.59 mL μεθανόλης.

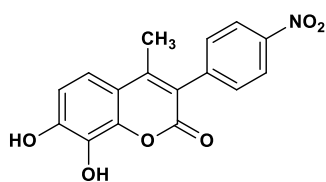
Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

Απόδοση: 87%

Σημείο τήξης:

¹H NMR (600MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.44 (t, J=7.8Hz, 2H, H-3' & H-5') 7.38 (t, J=7.8Hz, 1H, H-4') 7.29 (d, J=7.8Hz, 2H, H-2' & H-6') 7.16 (d, J=8.4Hz, 1H, H-5) 6.84 (d, J=9Hz, 1H, H-6) 2.19 (s, 3H, 4-CH₃)

Σύνθεση της 7,8-διυδροξυ-3-(4-νιτροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (4h)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο απακετυλίωσης κουμαρινών, σε μια σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.50 mmol (200 mg) 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-νιτροφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 15.10 mmol (0.72 mL) μονοένυδρης υδραζίνης και 8.16 mL μεθανόλης.

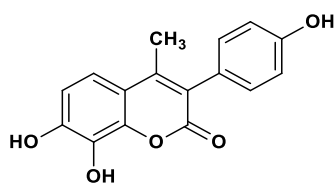
Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

Απόδοση: 95%

Σημείο τήξης:

¹H NMR (600MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 8.30 (d, J=9Hz, 2H, H-3' & H-5') 7.63 (d, J=9Hz, 2H, H-2' & H-6') 7.22 (d, J=9Hz, 1H, H-5) 6.87 (d, J=9Hz, 1H, H-6) 2.22 (s, 3H, 4-CH₃)

Σύνθεση της 7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (4i)



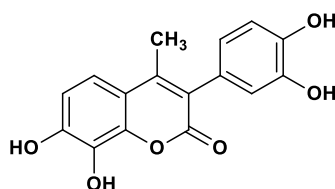
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο απακετυλίωσης κουμαρινών, σε μια σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.73 mmol (300 mg) 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 21.93 mmol (1.05 mL) μονοένυδρης υδραζίνης και 11.86 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

Απόδοση: 59%

Σημείο τήξης:

¹H NMR (600MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.13 (d, J=8.4Hz, 1H, H-5) 7.09 (d, J=8.4Hz, 2H, H-2' & H-6') 6.82 (m, 3H, H-6 & H-3' & H-5') 2.20 (s, 3H, 4-CH₃)

Σύνθεση της 7,8-διυδροξυ-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (4j)



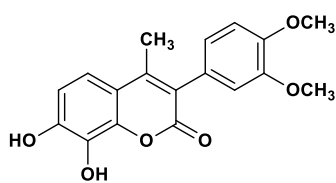
Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο απακετυλίωσης κουμαρινών, σε μια σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.75 mmol (350 mg) 7,8-διακετυλοξυ-3-(3,4-διακετυλοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 44.83 mmol (2 mL) μονοένυδρης υδραζίνης και 12.12 mL μεθανόλης. Παραλαμβάνεται κίτρινο στερεό.

Απόδοση: 73%

Σημείο τήξης:

¹H NMR (600MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.12 (d, J=8.4Hz, 1H, H-5) 6.82 (d, J=9Hz, 1H, H-6') 6.77 (d, J=7.8Hz, 1H, H-5') 6.65 (s, 1H, H-2') 6.52 (d, J=8.4Hz, 1H, H-6) 2.20 (s, 3H, 4-CH₃)

Σύνθεση της 7,8-διυδροξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (4k)



Σύμφωνα με τη γενική μέθοδο απακετυλίωσης κουμαρινών, σε μια σφαιρική φιάλη προστίθενται 0.73 mmol (300 mg) 7,8-διακετυλοξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης, 21.82 mmol (1.04 mL) μονοένυδρης υδραζίνης και 11.80 mL μεθανόλης.

Παραλαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

Απόδοση: 91%

Σημείο τήξης:

¹H NMR (600MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.15 (d, J=9Hz, 1H, H-5) 7.00 (d, J=7.8Hz, 1H, H-6') 6.88 (s, 1H, H-2') 6.83 (d, J=9Hz, 1H, H-6) 6.81 (d, J=8.4Hz, 1H, H-5') 3.80 (s, 3H, 3'-OCH₃) 3.74 (s, 3H, 4'-OCH₃) 2.21 (s, 3H, 4-CH₃)

6. Αξιολόγηση της βιοδραστικότητας των νέων κουμαρινικών παραγώγων

6.1. Προσδιορισμός της αναγωγής της σταθερής ρίζας DPPH

6.1.1. Υλικά & Συσκευές

Πίνακας 3. Υλικά και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο DPPH

Υλικά	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	Sigma-Aldrich
	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), 97%	Acros Organics
	Αιθανόλη, 99.8%	AppliChem Panreac
	Διμεθυλοσουλφοξειδίο (DMSO)	Fischer Scientific
Όργανα & Συσκευές	Plate reader	SPECTRA MAX 250 Molecular Devices
	Vortex	VELP SCIENTIFICA ZX3 Advanced Vortex Mixer

6.1.2. Πειραματική διαδικασία

- ✓ Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα DPPH 0.0025% (w/v) σε αιθανόλη. Το διάλυμα αφήνεται υπό μαγνητική ανάδευση για 20 min, απουσία φωτός.
- ✓ Στη συνέχεια, ζυγίζονται κατάλληλες ποσότητες των εξεταζόμενων ενώσεων και διαλύονται σε διμεθυλοσουλφοξειδίο με στόχο την επίτευξη συγκέντρωσης 4mM. Με κατάλληλες αραιώσεις προκύπτουν επίσης διαλύματα συγκεντρώσεων 3mM, 2mM, 1mM και 0.2mM (STOCK).
- ✓ Σε κάθε πηγάδι ενός πλακιδίου 96 θέσεων (96 well plate) προστίθενται 195μL DPPH καθώς και 5μL από κάθε μια από τις STOCK συγκεντρώσεις για την παραλαβή τελικών συγκεντρώσεων 100μM, 75μM, 50μM, 25μM, 5μM.
- ✓ Ακόμη, παρασκευάζονται δείγματα αναφοράς (control) τα οποία περιέχουν 195μL DPPH και 5μL DMSO.
- ✓ Το plate αναδεύεται ελαφρώς και αφήνεται σε σκοτάδι για 30 min και 60 min.
- ✓ Τέλος, με τη χρήση του reader λαμβάνεται η τιμή της απορρόφησης στα 515nm για κάθε δείγμα και εξετάζεται ως προς τα control.

Τα αποτελέσματα δίνονται σε (%) ποσοστό σε συγκέντρωση 100μM, καθώς και εκφρασμένα σε IC₅₀ για τα 30 και 60min. Για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο του DPPH χρησιμοποιήθηκε ως ένωση αναφοράς το Trolox.

Το πλακίδιο 96 θέσεων που φαίνεται παρακάτω χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση 11 ακετυλοξυ-κουμαρινικών παραγώγων και μιας υδροξυ-κουμαρίνης στις πέντε συγκεντρώσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω. Τα δείγματα που εμφανίζονται με μωβ χρώμα αποτελούν τις ενώσεις που δεν παρουσίασαν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση

σύμφωνα με τη μέθοδο DPPH και πρόκειται για τις ακετυλοξυ-κουμαρίνες. Αντιθέτως, το δείγμα που απέκτησε υποκίτρινο χρώμα αποδεικνύει την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH και αποτελεί την υδροξυκουμαρίνη.



Εικόνα 3. Πλακίδιο 96 θέσεων (96 well plate)

6.2. Προσδιορισμός AAPH

Τα νέα ακετυλοξυ-παράγωγα αξιολογήθηκαν για την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος, η οποία επάγεται από τον εκκινητή ελεύθερων ριζών AAPH.

Τα αποτελέσματα δίνονται σε (%) ποσοστό σε συγκέντρωση 100μM. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε ως ένωση αναφοράς επίσης το Trolox.

6.3. Προσδιορισμός της αναστολής της φυτικής λιποξυγονάσης από σόγια (LOX)

Οι ακετυλοξυ-κουμαρίνες αξιολογήθηκαν επίσης ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση της λιποξυγονάσης από σόγια, καθώς έχει βρεθεί ότι προσομοιάζει την ανθρώπινη σε μεγάλο βαθμό. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής αποτελούν ένδειξη αντιφλεγμονώδους δράσης, καθώς οι λιποξυγονάσες σχετίζονται με την παραγωγή πρόδρομων ενώσεων φλεγμονής, όπως πιο αναλυτικά έχει ήδη αναφερθεί στο εισαγωγικό κεφάλαιο.

Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε IC₅₀, ενώ ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το NDGA (Nordihydroguaiaretic acid).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Αποτελέσματα σύνθεσης και φασματοσκοπική μελέτη (NMR)

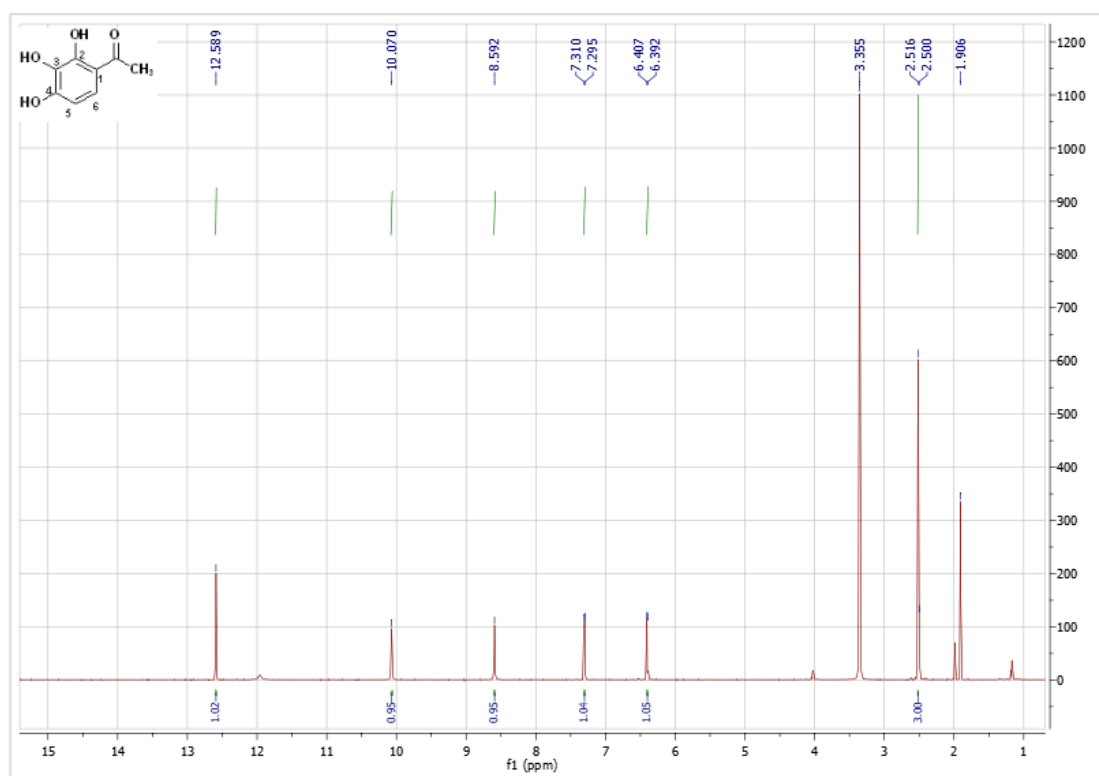
Στην παρούσα διπλωματική εργασία συντέθηκαν η 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνη, 11 ακετυλοξυ- και 11 υδροξυ-, σύνολο 22 κουμαρινικά ανάλογα και ταυτοποιήθηκαν όλα μέσω φασματοσκοπίας ^1H NMR.

Αρχικά εξετάστηκαν δύο εναλλακτικές πορείες σύνθεσης της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης, μέσω εστεροποίησης κατά Fischer και αναδιάταξης Fries, που διέφεραν ως προς το ένα αντιδρών εκ των δύο, αλλά και τις συνθήκες. Επιλέχθηκε η πορεία που απέδωσε υψηλότερες αποδόσεις και πιο καθαρό τελικό προϊόν μέσω της ανακρυστάλλωσης.

Η 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνη αποτέλεσε αντιδρών στην τροποποιημένη αντίδραση Perkin που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση των 11 ακετυλοξυ-κουμαρινικών παραγώγων. Οι αποδόσεις ήταν ικανοποιητικές και ο καθαρισμός των ενώσεων αυτών έγινε επίσης με ανακρυστάλλωση.

Τέλος, οι 11 ακετυλοξυ-κουμαρίνες οδήγησαν μέσω απακετυλίωσης στα 11 υδροξυ-κουμαρινικά ανάλογα, τα οποία συντέθηκαν με υψηλές αποδόσεις και δεν χρειάστηκαν καθαρισμό.

Παρακάτω, ακολουθεί φασματοσκοπική μελέτη των πιο χαρακτηριστικών μορίων από όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως. Συγκεκριμένα, θα αναλυθούν τα φάσματα ^1H NMR της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (**1**), της 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (**3d**) και της 7,8-διυδροξυ-3-(4-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (**4d**).

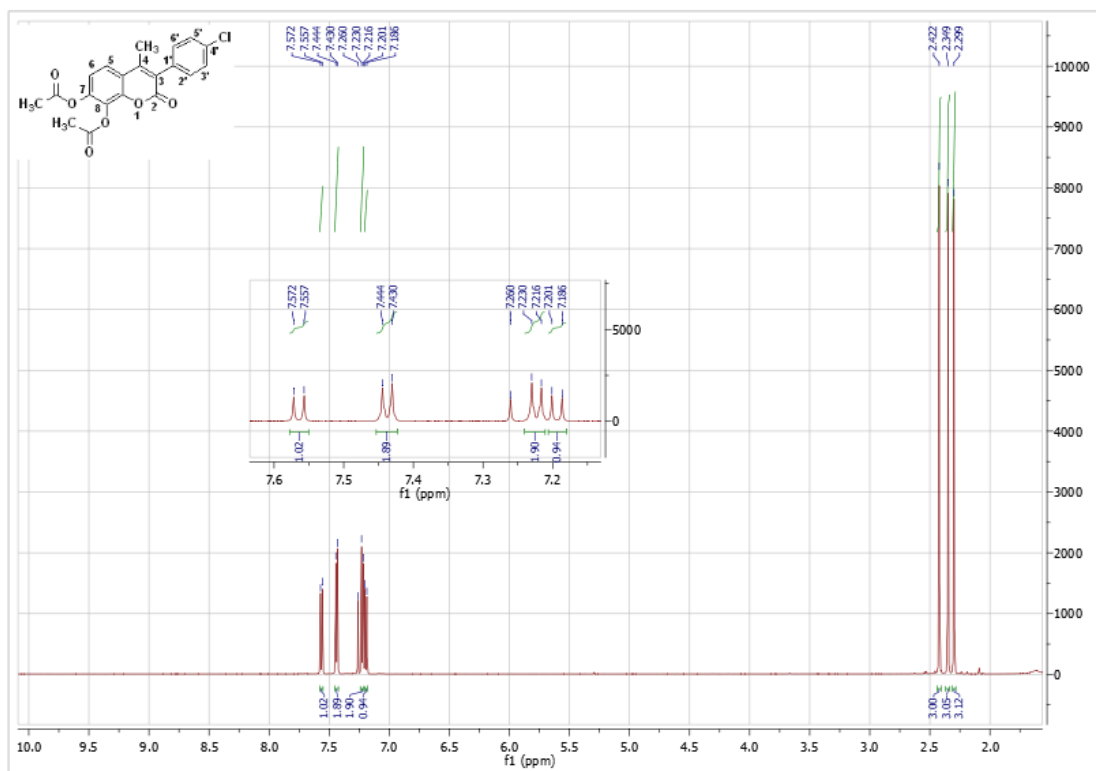


Εικόνα 4. Φάσμα ¹H NMR της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (1)

Όπως παρατηρείται στο παραπάνω φάσμα, στα 12.59 ppm εμφανίζεται μία απλή κορυφή που αποδίδεται στο υδροξύλιο της θέσης 2. Ομοίως, στα 10.07 και 8.59 ppm εμφανίζονται δύο απλές κορυφές που αντιστοιχούν στα 4-OH και 3-OH αντίστοιχα.

Στη συνέχεια ακολουθεί στα 7.30 ppm μία διπλή κορυφή που αποδίδεται στο H-6, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (H-5). Όπως αναμένεται, στα 6.40 ppm εντοπίζεται ακόμη μία διπλή κορυφή που αφορά το H-5.

Τέλος, στα 2.52 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή που ολοκληρώνεται για 3 πρωτόνια και αποδίδεται στα πρωτόνια του μεθυλίου της καρβονυλομάδας.



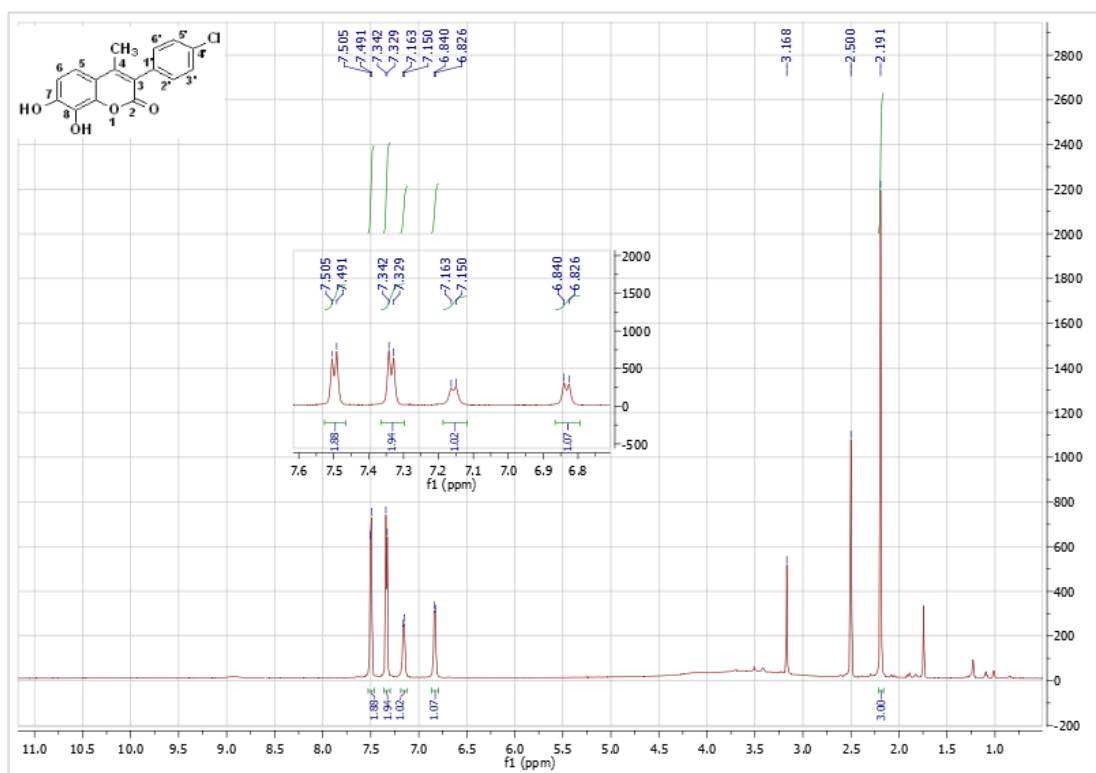
Εικόνα 5. Φάσμα ¹H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (**3d**)

Το φάσμα αυτό χαρακτηρίζεται από την παρουσία μίας διπλής κορυφής στα 7.56 ppm που αποδίδεται στο H-5, το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο.

Επίσης, εμφανίζεται μια χαρακτηριστική διπλή κορυφή στα 7.44 ppm που ολοκληρώνεται για 2 πρωτόνια και αποδίδεται στα ισοδύναμα πρωτόνια H-2' & H-6' του φαινολικού δακτυλίου. Ομοίως, η χαρακτηριστική διπλή κορυφή που εντοπίζεται στα 7.22 ppm ολοκληρώνεται για 2 πρωτόνια και αφορά τα ισοδύναμα H-3' & H-5'.

Η διπλή κορυφή που εμφανίζεται στα 7.19 ppm αντιστοιχεί στο H-6 του κουμαρινικού δακτυλίου, το γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο του H-5.

Τέλος στα 2.42, 2.35 και 2.30 ppm εντοπίζονται τρεις απλές κορυφές που η καθεμία ολοκληρώνεται για 3 πρωτόνια, τα οποία αποδίδονται στις μεθυλο-ομάδες των θέσεων 4-, 8- και 7- αντίστοιχα, του κουμαρινικού σκελετού.



Εικόνα 6. Φάσμα ¹H NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(4-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (**4d**)

Σύμφωνα με το παράπανω φάσμα, εμφανίζονται δύο διπλές κορυφές στα 7.50 και 7.34 ppm, οι οποίες ολοκληρώνονται η καθεμία για 2 πρωτόνια και αποδίδονται στα ισοδύναμα H-2' & H-6' και H-3' & H-5', του φαινολικού δακτυλίου.

Επίσης, στα 7.16 και 6.83 ppm εντοπίζονται δύο διπλές κορυφές που αντιστοιχούν στα H-5 και H-6, του κουμαρινικού σκελετού.

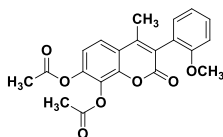
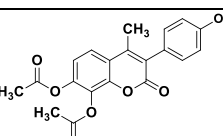
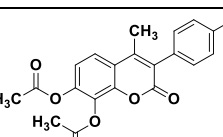
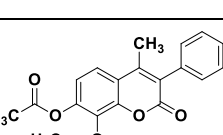
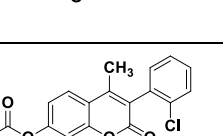
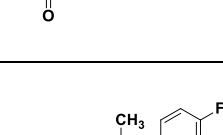
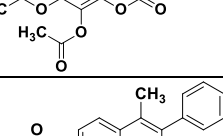
Τέλος εμφανίζεται μία απλή κορυφή στα 2.19 ppm, η οποία ολοκληρώνεται για 3 πρωτόνια και αποδίδεται στα πρωτόνια του μεθυλίου (4-CH₃).

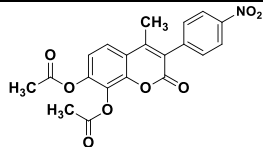
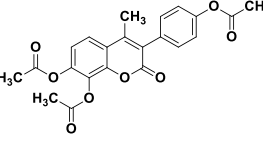
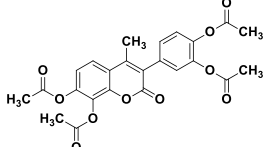
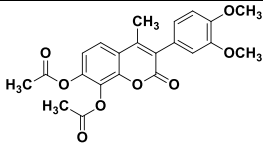
Τα πρωτόνια των -OH αποτελούν πολύ ευκίνητες ομάδες που συχνά δεν εμφανίζονται στα φάσματα ¹H NMR, ενώ σημαντικό ρόλο παίζουν ο διαλύτης, η συγκέντρωση και η θερμοκρασία. Πολλές φορές εμφανίζουν μια ευρεία κορυφή όπως αυτή που διακρίνεται ελαφρώς περίπου στα 9 ppm. Ωστόσο, η απουσία των απλών κορυφών των ακετυλοξυ-ομάδων μεταξύ 2-2.5 ppm επιβεβαιώνει την επιτυχή απακετυλίωση του μορίου.

2. Αξιολόγηση της βιοδραστικότητας

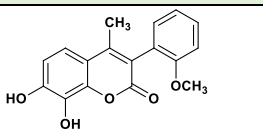
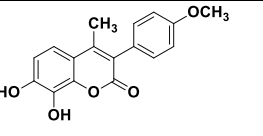
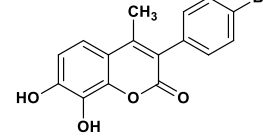
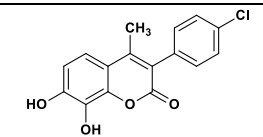
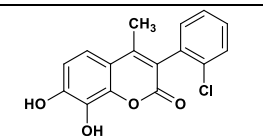
Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των *in vitro* βιοδοκιμών αντιοξειδωτικής δράσης (DPPH & AAPH), καθώς και αναστολής της φυτικής λιποξυγονάσης από σόγια (LOX) ως ένδειξη της αντιφλεγμονώδους δράσης τους.

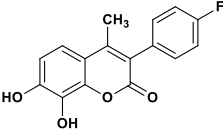
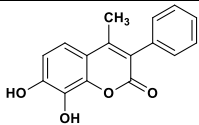
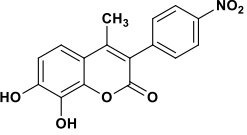
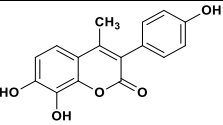
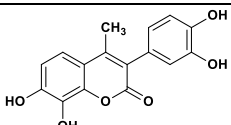
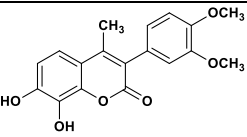
Πίνακας 4. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής (DPPH & AAPH) και της αντιφλεγμονώδους δράσης (LOX) των νέων ακετυλοξυ-κουμαρινικών παραγώγων

A/A	Δομή	DPPH 30min %100μM	DPPH 60min %100μM	AAPH %100μM	LOX	
					%100μM	IC ₅₀ (μM)
3a		no	no	43.7	91.7	26
3b		no	no	41.1	46.9	-
3c		no	no	45	47.3	-
3d		no	no	95.3	52.8	100
3e		no	no	81.9	no	-
3f		no	no	88.6	63.4	67.5
3g		no	no	68.1	82.4	19

3h		no	no	90.8	22	-
3i		no	no	80.5	14	-
3j		no	no	95.1	95.8	56
3k		no	no	88.9	79.9	52.5
ctrl	TROLOX	82.8	92.3	93		
ctrl	NGDA				93	0.45

Πίνακας 5. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής (DPPH & AAPH) και της αντιφλεγμονώδους δράσης (LOX) των νέων υδροξυ-κουμαρινικών παραγώγων

A/A	Δομή	DPPH 30min IC ₅₀ (μM)	DPPH 60min IC ₅₀ (μM)	AAPH %100μM	LOX	
					%100μM	IC ₅₀ (μM)
4a		25.7	11.6	53	33	-
4b		32.1	21.5	19	18	-
4c		31.3	9.8	43	2	-
4d		24.9	13.9	no	71	87.5
4e		18.9	9.5	70	63	87

4f		16.0	9.5	65	42	-
4g		15.9	9.2	78	52	-
4h		20.1	9.7	44	40	-
4i		12.5	8.7	78	81	52
4j		11.0	5.3	42	80	52.5
4k		22.2	10.8	63	72	85
ctrl	TROLOX	27.5	12	93		
ctrl	NGDA				93	0.45

2.1. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης (DPPH)

Υστερα από μελέτη των αποτελεσμάτων, παρατηρήθηκε ότι τα ακετυλοξυ-κουμαρινικά παράγωγα δεν παρουσίασαν ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, το οποίο μπορεί να αποδοθεί στην απουσία υδροξυλομάδων (-OH), καθώς και στην παρουσία των ακετυλοξυ-ομάδων που πιθανώς προκαλεί στερεοχημική παρεμπόδιση.

Αντίθετα, τα υδροξυ-κουμαρινικά ανάλογα παρουσίασαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση από τα πρώτα 30 min, η οποία ενισχύθηκε ακόμη περισσότερο μετά από 60 min.

Τα 11 υδροξυ-κουμαρινικά ανάλογα που μελετήθηκαν είχαν κοινή δομή στον κουμαρινικό σκελετό, αλλά διαφορετικές υποκαταστάσεις στον φαινολικό δακτύλιο της θέσης 3- του κουμαρινικού σκελετού. Ως αποτέλεσμα, εντοπίστηκαν διαφορετικές τιμές IC₅₀ σε ενώσεις που απαρτίζονταν μεν από το ίδιο χημικό στοιχείο στο φαινύλιο τους, αλλά δεν ήταν συνδεδεμένα στην ίδια θέση. Διαφορές εντοπίστηκαν επίσης, σε ενώσεις με υποκαταστάσεις στις ίδιες ακριβώς θέσεις, όμως με διαφορετικά χημικά στοιχεία στον φαινολικό δακτύλιο.

Συγκρίνοντας, λοιπόν, τις τιμές IC_{50} των υδροξυ-κουμαρινών για τα 60 min με την τιμή $IC_{50}=12 \mu M$ της ένωσης αναφοράς (Trolox) προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

Συνολικά, όλα τα υδροξυ-κουμαρινικά ανάλογα παρουσίασαν καλή αντιοξειδωτική δράση και τα 9 από τα 11 εξαιρετική, καθώς η δράση τους ήταν ισχυρότερη και από της ένωσης αναφοράς: $IC_{50}=(5.3-11.6) \mu M < IC_{50}=12 \mu M$. Το κατεχολικό σύστημα αποτελεί χαρακτηριστικό-«κλειδί» για την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής δράσης σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [19], το οποίο αποτέλεσε κριτήριο για το σχεδιασμό και τη σύνθεση των υδροξυ-αναλόγων και επιβεβαιώνεται στα αποτελέσματά μας.

Η ένωση που εμφάνισε τη μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH ήταν η **7,8-διυδροξυ-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (4j)** ($IC_{50}=5.3 \mu M$), ενώ η αμέσως επόμενη ήταν η 7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**4i**) ($IC_{50}=8.7 \mu M$). Η πρώτη ένωση διαθέτει 4 υδροξύλια και μάλιστα αυτά βρίσκονται σε όρθο θέση, επομένως διαθέτει δυο κατεχολικά συστήματα, ενισχύοντας ακόμα περισσότερο τη δράση της σε σχέση με την **4i** που διαθέτει 3 φαινολικά υδροξύλια.

Αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση παρουσίασαν επίσης, με $IC_{50}=(9.2-9.8) \mu M$ τα εξής υδροξυ-κουμαρινικά παράγωγα: η **4g** ($IC_{50}=9.2 \mu M$) η οποία δεν διαθέτει υποκατάσταση στο φαινολικό δακτύλιο, η 7,8-διυδροξυ-3-(4-φθοροφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**4f**) ($IC_{50}=9.5 \mu M$) με υποκατεστημένο φθόριο στη θέση 4', καθώς και η 7,8-διυδροξυ-3-(2-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**4e**) ($IC_{50}=9.5 \mu M$) που διαθέτει χλώριο στη θέση 2'. Επίσης, η 7,8-διυδροξυ-3-(4-νιτροφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**4h**) ($IC_{50}=9.7 \mu M$) με υποκατάσταση στη θέση 4' του φαινυλίου από μια νιτρο-ομάδα και αντίστοιχα με βρώμιο η 7,8-διυδροξυ-3-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**4c**) ($IC_{50}=9.8 \mu M$).

Ωστόσο, η αντιοξειδωτική συμπεριφορά της 7,8-διυδροξυ-3-(4-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνης (**4d**) ($IC_{50}=13.9 \mu M$), ήταν καλή αλλά όχι τόσο έντονη όσο της αντίστοιχης ένωσης, **4e** ($IC_{50}=9.5 \mu M$), όπου η υποκατάσταση του χλωρίου ήταν στη θέση 2' κι όχι στην 4' του φαινολικού δακτυλίου. Συνεπώς, η πάρα-υποκατάσταση μιας ομάδας Cl βοηθά στην ενίσχυση της δράσης.

Σημαντική αντιοξειδωτική δράση εμφάνισαν οι ενώσεις που διέθεταν μία μεθοξυ-ομάδα στη θέση 2' (**4a**) και δύο μεθοξυ-ομάδες στις θέσεις 3' & 4' (**4k**) στο φαινολικό δακτύλιο, ωστόσο η υποκατάσταση μιας μεθοξυ-ομάδας στη θέση 4' εμφάνισε συγκριτικά με τις προηγούμενες μικρότερη ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH. Συγκεκριμένα, η **4k** ($IC_{50}=10.8 \mu M$) με δύο μεθοξυ-ομάδες έδειξε με μικρή διαφορά πιο ισχυρή δράση έναντι της **4a** ($IC_{50}=11.6 \mu M$), που διαθέτει ορθο-μεθοξυ-υποκατάσταση, ενώ επέδειξε σημαντικά ισχυρότερη δράση έναντι της **4b** ($IC_{50}=21.5 \mu M$), της οποίας η μεθοξυ-ομάδα βρισκόταν στην θέση 4' του φαινυλίου.

Καταλήγοντας, εμφανώς μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH εμφάνισαν τα υδροξυ-κουμαρινικά ανάλογα που διέθεταν τον υψηλότερο αριθμό υδροξυλίων (4 και 3), υποκατεστημένα στον κουμαρινικό σκελετό (2) αλλά και στον φαινολικό δακτύλιο (1 ή 2). Τα υπόλοιπα παράγωγα διέθεταν 2 υδροξύλια στον κουμαρινικό σκελετό και στο φαινύλιο διαφορετικές υποκαταστάσεις το καθένα. Ανάλογα με το χημικό στοιχείο και τη θέση της υποκατάστασής του εμφανίστηκε διαφορετική τιμή IC_{50} . Στο σύνολο όμως, η πλειονότητα των υδροξυ-κουμαρινών (9/11) εμφάνισε σημαντική αντιοξειδωτική δράση με $IC_{50}<12 \mu M$, που διέθετε η ένωση αναφοράς (Trolox), ενώ στα ακετυλοξυ-κουμαρινικά παράγωγα δεν εντοπίστηκε δράση.

2.2. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης (AAPH)

Όσον αφορά την ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης, τόσο τα ακετυλοξυ- όσο και τα υδροξυ-κουμαρινικά παράγωγα, εμφάνισαν σημαντική δράση.

Τα αποτελέσματα που συλλέχθηκαν σε (%) ποσοστό σε συγκέντρωση 100μM για κάθε ένωση, συγκρίθηκαν με το ποσοστό αναστολής, 93%, που παρουσίασε η ένωση αναφοράς η οποία ήταν και στη συγκεκριμένη μέθοδο το Trolox.

Τα κουμαρινικά ανάλογα που μελετήθηκαν είχαν κοινή δομή στον κουμαρινικό σκελετό, αλλά διαφορετικές υποκαταστάσεις στον φαινολικό δακτύλιο της θέσης 3- του κουμαρινικού σκελετού. Κατά συνέπεια, προέκυψαν διαφορετικές τιμές αντιοξειδωτικής δράσης για κάθε ένωση λόγω διαφορετικών υποκαταστάσεων στο φαινύλιο, αλλά και των διαφορετικών θέσεων υποκατάστασης.

Ακετυλοξυ-κουμαρινικά ανάλογα

Εξαιρετική αντιοξειδωτική δράση παρουσίασαν η **7,8-διακετυλοξυ-3-(4-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (3d) (95.3%)** και η **7,8-διακετυλοξυ-3-(3,4-διακετυλοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (3j) (95.1%)**, όπως και η **7,8-διακετυλοξυ-3-(4-νιτροφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (3h) (90.8%)**, με ποσοστά αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης παρόμοια ή/και υψηλότερα της ένωσης αναφοράς.

Επιπλέον, αξιοσημείωτη ήταν η δράση που εντοπίστηκε τόσο στην **3k (88.9%)**, όσο και στην **3f (88.6%)**, με τις **3e (81.9%)** και **3i (80.5%)** να ακολουθούν. Σημαντική ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης εμφάνισε, επίσης, η **7,8-διακετυλοξυ-3-φαινυλο-4-μεθυλο-κουμαρίνη (3g) (68.1%)**.

Ωστόσο, σημαντική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι ενώ η **7,8-διακετυλοξυ-3-(2-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (3a) (43.7%)** και η **7,8-διακετυλοξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (3b) (41.1%)**, οι οποίες έχουν υποκατεστημένη μία μεθοξυ-ομάδα στις θέσεις 2' ή 4' του φαινολικού δακτυλίου αντίστοιχα, παρουσίασαν περιορισμένη αντιοξειδωτική δράση, η **3k** η οποία διαθέτει δύο μεθοξυ-ομάδες στις θέσεις 3' και 4' εμφάνισε σημαντικά ισχυρότερη δράση, 88.9%.

Ακόμη, παρατηρείται ότι ενώ η υποκατάσταση με μια ομάδα βρωμίου στη θέση 4' του αρωματικού δακτυλίου έχει ως αποτέλεσμα χαμηλή αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (45%), η υποκατάσταση στην ίδια θέση με μια βιοϊσοστερή ομάδα, όπως εκείνη του χλωρίου ή του φθορίου, ενισχύει σε μεγάλο βαθμό τη δράση (95.3% και 88.6% αντίστοιχα).

Συμπερασματικά, τα 11 ακετυλοξυ-κουμαρινικά παράγωγα που μελετήθηκαν εμφάνισαν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση μέσω της μεθόδου AAPH, παρά το γεγονός ότι με τη μέθοδο DPPH δεν εμφανίστηκε δράση. Αξίζει να σημειωθεί, επίσης, ότι 7 ενώσεις παρουσίασαν ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης σε ποσοστό μεγαλύτερο από 80%.

Υδροξυ-κουμαρινικά ανάλογα

Αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική δράση παρουσίασαν η **7,8-διυδροξυ-3-φαινυλο-4-μεθυλο-κουμαρίνη (4g) (78%)** και η **7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (4i) (78%)**.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η υποκατάσταση στη θέση 2- του φαινολικού δακτυλίου φαίνεται πως ευνοεί την δράση έναντι της λιπιδικής υπεροξειδωσής στην περίπτωση της υποκατάστασης με μια χλωρο- ή μεθοξυ- ομάδα. Πιο συγκεκριμένα, σημαντική ήταν και η δράση της **4e** (70%), με υποκατεστημένο χλώριο στη θέση 2- του φαινυλίου του κουμαρινικού σκελετού, σε σύγκριση με την **4d** με υποκατεστημένο χλώριο στη θέση 4-, η οποία δεν εμφάνισε καθόλου δράση. Ομοίως, η **4a** που διαθέτει μια μεθοξυ-ομάδα στη θέση 2- του φαινολικού δακτυλίου, παρουσίασε αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση (53%), σε αντίθεση με την **4b** με μια μεθοξυ-ομάδα στη θέση 4- (19%).

Υψηλή ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσής εμφάνισαν, επίσης, η 7,8-διυδροξυ-3-(4-φθοροφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**4f**) (65%) και η 7,8-διυδροξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**4k**) (63%).

Επομένως, τα 11 υδροξυ-κουμαρινικά παράγωγα που μελετήθηκαν εμφάνισαν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση μέσω της μεθόδου AAPH, όπως και με τη μέθοδο DPPH. Όμοια με τις ακετυλοξυ-κουμαρίνες, παρατηρήθηκε πως η δράση και των υδροξυ-κουμαρινών επηρεάστηκε τόσο από τις διαφορετικές υποκαταστάσεις στον φαινολικό δακτύλιο της θέσης 3- του κουμαρινικού σκελετού, όσο και από τις διαφορετικές θέσεις υποκατάστασης στο φαινύλιο.

2.3. Αξιολόγηση της ικανότητας αναστολής της λιποξυγονάσης (LOX)

Τα κουμαρινά ανάλογα αξιολογήθηκαν επίσης ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση της λιποξυγονάσης από σόγια και μελετήθηκαν ως προς τις διαφορετικές υποκατάστασεις που διέθετε η κάθε μία στον φαινολικό δακτύλιο της θέσης 3- του κουμαρινικού σκελετού.

Η ένωση αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε (NGDA) παρουσίασε $IC_{50}=0.45 \mu M$ και αποτέλεσε το μέτρο σύγκρισης για τις υπόλοιπες ενώσεις. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, οι 6 από τις 11 ακετυλοξυ-κουμαρίνες και οι 5 από τις 11 υδροξυ-κουμαρίνες, εμφάνισαν ένδειξη αντιφλεγμονώδους δράσης.

Ακετυλοξυ-κουμαρινικά ανάλογα

Αναλυτικά, τόσο η 7,8-διακετυλοξυ-3-φαινυλο-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**3g**) ($IC_{50}=19 \mu M$) όσο και η 7,8-διακετυλοξυ-3-(2-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**3a**) ($IC_{50}=26 \mu M$) εμφάνισαν τη μεγαλύτερη ικανότητα αναστολής της δράσης της λιποξυγονάσης.

Η 7,8-διακετυλοξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**3k**) ($IC_{50}=52.5 \mu M$) διαθέτοντας δύο μεθοξυ-ομάδες, εμφάνισε ικανοποιητική αντιφλεγμονώδη δράση. Ωστόσο, η 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**3b**), με υποκατεστημένο ένα μεθοξείδιο στη θέση 4' κι όχι στη θέση 2' όπως η **3a** στο φαινολικό δακτύλιο, δεν παρουσίασε τέτοια ένδειξη.

Ικανοποιητική ήταν επίσης, η αντιφλεγμονώδης δράση που εμφάνισε η 7,8-διακετυλοξυ-3-(3,4-διακετυλοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**3j**) ($IC_{50}=56 \mu M$), η οποία διαθέτει δύο ακετυλοξυ-ομάδες στο φαινολικό δακτύλιο. Αντίθετα, στην 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**3i**), με μια ακετυλο-ομάδα στη θέση 4' του φαινολικού δακτυλίου, δεν εντοπίστηκε ικανότητα αναστολής της δράσης της λιποξυγονάσης.

Από τα ακετυλοξυ-κουμαρινικά παράγωγα που στο φαινύλιο της θέσης 3- του κουμαρινικού σκελετού διέθεταν υποκατεστημένα αλογόνα, καλή αντιφλεγμονώδη δράση παρουσίασε μόνο η **3f** ($IC_{50}=67.5 \mu M$) η οποία διέθετε φθόρο- υποκατάσταση. Στις 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**3c**), 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**3d**) και η 7,8-διακετυλοξυ-3-(2-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**3e**), δεν εντοπίστηκε ένδειξη δράσης.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, ισχυρότερη αντιφλεγμονώδη δράση εμφάνισε η 7,8-διακετυλοξυ-3-φαινυλο-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**3g**) ($IC_{50}=19 \mu M$), ενώ αξιόλογη δράση παρουσίασαν επίσης τα ακετυλοξυ-κουμαρινικά παράγωγα με υποκατεστημένες δύο μεθοξυ- ή δύο ακετυλοξυ-ομάδες στο φαινολικό δακτύλιο της θέσης 3- του κουμαρινικού σκελετού.

Υδροξυ-κουμαρινικά ανάλογα

Τη μεγαλύτερη ικανότητα αναστολής της δράσης της λιποξυγονάσης εμφάνισαν η **7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (4i)** ($IC_{50}=52 \mu M$) όσο και η **7,8-διυδροξυ-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (4j)** ($IC_{50}=52.5 \mu M$).

Ικανοποιητική ήταν επίσης, η αντιφλεγμονώδης δράση που εμφάνισε η **4k** ($IC_{50}=85 \mu M$), με δύο μεθοξυ-ομάδες στο φαινολικό δακτύλιο, σε αντίθεση με τις **4a** και **4b** που διέθεταν μόνο μια μεθοξυ- ομάδα και δεν παρουσίασαν καθόλου δράση, καθώς και οι **4e** ($IC_{50}=87 \mu M$) και **4d** ($IC_{50}=87.5 \mu M$), οι οποίες διαθέτουν υποκατεστημένο χλώριο στις θέσεις 2- και 4- αντίστοιχα, του φαινυλίου.

Συμπερασματικά, ισχυρότερη αντιφλεγμονώδη δράση εμφάνισαν τα υδροξυ-κουμαρινικά ανάλογα που διέθεταν τον υψηλότερο αριθμό υδροξυλίων (4 και 3), υποκατεστημένα στον κουμαρινικό σκελετό (2) αλλά και στον φαινολικό δακτύλιο (1 ή 2) (**4i**, **4j**), ενώ παρατηρήθηκε πως η παρουσία χλωρίου είτε στη θέση 2- είτε στη θέση 4- στο φαινολικό δακτύλιο (**4d**, **4e**), οδήγησε, επίσης, σε αξιόλογη αντιφλεγμονώδη δράση.

2.4. Σύγκριση βιοδραστικότητας ακετυλοξυ- και υδροξυ-κουμαρινών

Πίνακας 6. Σύγκριση αποτελεσμάτων βιοδραστικότητας ακετυλοξυ- και υδροξυ-κουμαρινών

A/A	DPPH 60min IC_{50} (μM)		AAPH %100 μM		LOX IC_{50} (μM)	
	3	4	3	4	3	4
a	no	11.6	43.7	53	26	-
b	no	21.5	41.1	19	-	-
c	no	9.8	45	43	-	-
d	no	13.9	95.3	no	100	87.5
e	no	9.5	81.9	70	-	87
f	no	9.5	88.6	65	67.5	-
g	no	9.2	68.1	78	19	-
h	no	9.7	90.8	44	-	-
i	no	8.7	80.5	78	-	52
j	no	5.3	95.1	42	56	52.5
k	no	10.8	88.9	63	52.5	85
ctrl	12		93		0.45	

Αντιοξειδωτική δράση (DPPH)

Όπως γίνεται εμφανές στον παραπάνω πίνακα, οι 7,8-διυδροξυ-κουμαρίνες παρουσίασαν εξαιρετική αντιοξειδωτική δράση μέσω της μεθόδου DPPH, έναντι των 7,8-διακετυλοξυ-κουμαρινών οι οποίες δεν εμφάνισαν καθόλου δράση. Επιβεβαιώνεται, λοιπόν, ότι η παρουσία κατεχολικού συστήματος αποτελεί δομική απαίτηση για την αποτελεσματική δέσμευση ριζών DPPH.

Αντιοξειδωτική δράση (AAPH)

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της μεθόδου AAPH, παρατηρείται πως στο σύνολό τους οι ακετυλοξυ-κουμαρίνες παρουσίασαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση, σε σχέση με τις αντίστοιχες υδροξυ-κουμαρίνες. Ιδιαίτερος για τις ενώσεις **3d** (95.3%), **3h** (90.8%) και **3j** (95.1%) οι οποίες εμφανίζουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση, παρατηρήθηκε ότι η απακετυλίωσή τους οδήγησε σε απώλεια της δράσης αυτής **4d** (no), **4h** (44%) και **3j** (42%). Εξαιρέση αποτελούν οι ενώσεις **3a** (43.7%)- **4a** (53%), **3g** (68.1%)- **4g** (78%).

Ικανότητα αναστολής της λιποξυγονάσης (LOX)

Όσον αφορά την ένδειξη αντιφλεγμονώδους δράσης, ενώ οι ακετυλοξυ-κουμαρίνες **3a** (26μM), **3g** (19μM) και **3f** (67.5μM) έχουν αξιόλογη δράση, οι αντίστοιχες υδροξυ-κουμαρίνες δεν παρουσίασαν καθόλου. Αντίθετα, ενώ οι **3e** και **3i** δεν εμφάνισαν αντιφλεγμονώδη συμπεριφορά, οι αντίστοιχες υδροξυ- **4e** (87μM) και **4i** (52μM) αποτελούν ικανούς αναστολείς της λιποξυγονάσης.

2.5. Συνδυασμένη βιοδραστικότητα κουμαρινών

Μελετώντας τη βιοδραστικότητα των ακετυλοξυ-κουμαρινικών αναλόγων (**3a-3k**), παρατηρήθηκε ότι η απουσία υποκατάστασης (**3g**), καθώς και η υποκατάσταση δύο ακετυλοξυ- (**3j**) ή δύο μεθοξυ- (**3k**) ομάδων, είχαν ως αποτέλεσμα εξίσου αξιόλογη αντιοξειδωτική (AAPH) και αντιφλεγμονώδη (LOX) δράση.

Πίνακας 7. Συνδυασμένη βιοδραστικότητα ακετυλοξυ-κουμαρινών

Ενώσεις	AAPH - %100μM	LOX - IC ₅₀ (μM)
3g	68.1	19
3j	95.1	56
3k	88.9	52.5

Αντίστοιχα, μελετώντας τη βιοδραστικότητα των υδροξυ-κουμαρινικών αναλόγων (**4a-4k**), παρατηρήθηκε ότι η ενώσεις που διαθέτουν 3 ή 4 υδροξύλια (**4i**, **4j**), έναντι των υπόλοιπων ενώσεων που διαθέτουν 2, εμφάνισαν αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική (DPPH % AAPH) και αντιφλεγμονώδη (LOX) δράση.

Πίνακας 8. Συνδυασμένη βιοδραστικότητα υδροξυ-κουμαρινών

Ενώσεις	DPPH - IC ₅₀ (μM)	AAPH - %100μM	LOX - IC ₅₀ (μM)
4i	8.7	78	52
4j	5.3	42	52.5

3. Φαρμακο-ομοιότητα

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα φαρμακο-ομοιότητας, για τα νέα ακετυλοξυ-κουμαρινικά ανάλογα.

Πίνακας 9. Φαρμακο-ομοιότητα των ακετυλοξυ-κουμαρινών

Compd.	milogP ^a	TPSA ^b	N ^o atoms	N ^o O, N ^c	N ^o OH, NH ^d	N ^o violations	N ^o rotational bonds ^e	Volume ^f	MW ^g	logBB ^h
3a	2.93	92.06	28	7	0	0	6	331.16	382.37	-0.30
3b	2.98	92.06	28	7	0	0	6	331.16	382.37	-0.29
3c	3.73	82.82	27	6	0	0	5	323.50	431.24	-0.09
3d	3.60	82.82	27	6	0	0	5	319.15	386.79	-0.11
3e	3.55	82.82	27	6	0	0	5	319.15	386.79	-0.11
3f	3.09	82.82	27	6	0	0	5	310.55	370.33	-0.19
3g	2.92	82.82	26	6	0	0	5	305.62	352.34	-0.21
3h	2.88	128.65	29	9	0	0	6	328.95	397.34	-0.68
3i	2.48	109.13	30	8	0	0	7	350.14	410.38	-0.54
3j	1.56	135.43	34	10	0	0	9	394.67	468.41	-0.95
3k	2.57	101.29	30	8	0	0	7	356.71	412.39	-0.45

^aΛογάριθμός συντελεστή κατανομής σε σύστημα n-οκτανόλης-νερού/λογάριθμος (milogP); ^bΤοπολογική πολική επιφάνεια (TPSA); ^cαριθμός δεκτών δεσμών υδρογόνου (n-ON); ^dαριθμός δοτών δεσμών υδρογόνου (n-OH/NH); ^eΑριθμός περιστρεφόμενων δεσμών (n-rotb); ^fΜμοριακός όγκος; ^gΜοριακό βάρος ^hΑιματοεγκεφαλικός φραγμός [www.molinspiration.com]

Η φαρμακο-ομοιότητα των παραγώγων προσδιορίστηκε από τον θεωρητικό υπολογισμό διαφόρων μοριακών ιδιοτήτων π.χ. (log P), τοπολογική πολική επιφάνεια (TPSA), δότες και δέκτες δεσμού υδρογόνου, περιστρεφόμενοι δεσμοί, αριθμός ατόμων και μοριακό βάρος. Επίσης, λήφθηκε υπόψιν ο κανόνας των 5 του Lipinski.

Αρχικά, όλες οι ενώσεις έχουν μοριακό βάρος μικρότερο από 500, με αποτέλεσμα να μπορούν εύκολα να μεταφερθούν, να διαχυθούν και να απορροφηθούν. Οι θεωρητικά υπολογιζόμενες τιμές logP λιποφιλίας της σειράς **3a-3k** βρέθηκαν να είναι μικρότερες από 5 και άρα συμφωνούν με τον κανόνα των 5 του Lipinski, υποδεικνύοντας ικανοποιητική διαπερατότητα διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης.

Υπολογίζοντας τον αριθμό των δεκτών δεσμών υδρογόνου (άτομα O και N) και τον αριθμό των δοτών δεσμού υδρογόνου (NH και OH) στις συντιθέμενες ενώσεις, φαίνεται ότι και οι δύο ιδιότητες ακολουθούν τον κανόνα του Lipinski (λιγότερο από 10 και 5, αντίστοιχα).

Τα εξετασθέντα παράγωγα φαίνεται να είναι *per os* ενεργά σύμφωνα με τον κανόνα των 5. Οι δεσμοί υδρογόνου των ενώσεων συσχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με την τοπολογική πολική επιφάνεια. Αυτή η ιδιότητα χρησιμοποιείται ως σημαντικός δείκτης της βιοδιαθεσιμότητας ενός βιοδραστικού μορίου.

Επιπλέον, η TPSA των κουμαρινικών αναλόγων παρατηρήθηκε στο εύρος 82.82-135.43 Å και είναι πολύ κάτω από το όριο των 160 Å, δείχνοντας καλή *per os* βιοδιαθεσιμότητα. Το ανώτερο όριο για TPSA για να εισχωρήσει ένα μόριο στον εγκέφαλο είναι περίπου 90 Å.

Οι ενώσεις **3a-3k** παρουσίασαν τιμές logBB μεταξύ 0.3 και -1, οπότε είναι δυνατή η πρόσβασή τους στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ενώ οι περιστρεφόμενοι δεσμοί σε όλα τα ακετυλοξυ-κουμαρινικά ανάλογα ήταν <10, που αποδεικνύει καλή βιοδιαθεσιμότητα.

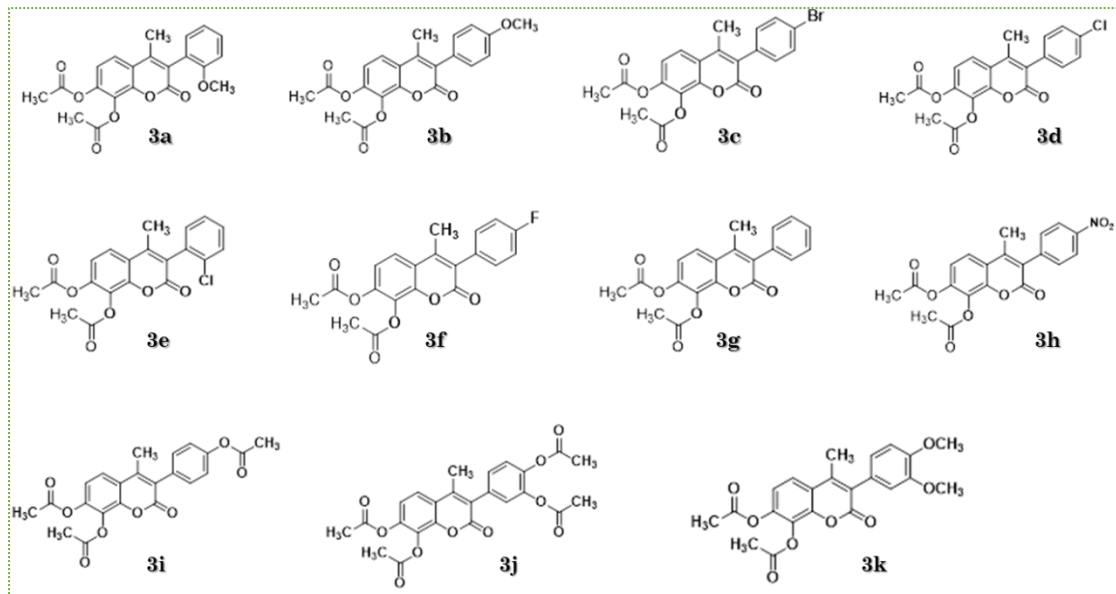
Παρατηρείται ότι οι ενώσεις που διαθέτουν αλογόνο (**3c, 3d, 3e, 3f**) και η **3g** η οποία δεν είναι υποκατεστημένη στον φαινολικό δακτύλιο της θέσης 3- του κουμαρινικού σκελετού, έχουν TPSA=82.82 Å δηλαδή <90 Å, τις υψηλότερες τιμές logBB (-0.09, -0.11, -0.11, -0.19 και -0.21 αντίστοιχα), τον μικρότερο αριθμό δεκτών δεσμών υδρογόνου (6), καθώς και τον μικρότερο αριθμό περιστρεφόμενων δεσμών (5).

Συμπερασματικά, όλα τα ακετυλοξυ-κουμαρινικά παράγωγα υπακούουν στον κανόνα των 5 του Lipinski και είναι *per os* ενεργά, ενώ οι ενώσεις **3c, 3d, 3e, 3f** και **3g** εμφάνισαν το καλύτερο προφίλ φαρμακο-ομοιότητας.

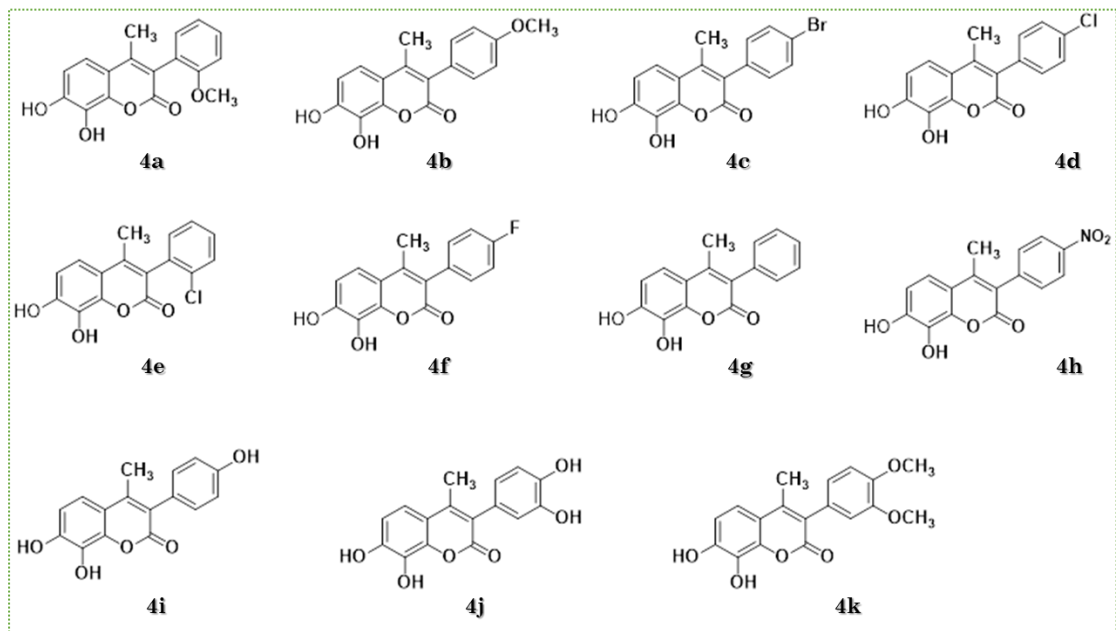
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η κουμαρίνη και τα φυσικά ή συνθετικά ανάλογά της, τα τελευταία χρόνια έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, λόγω της αξιοσημείωτης ποικιλίας των βιολογικών-φαρμακευτικών ιδιοτήτων που διαθέτουν. Πιο αναλυτικά, παρουσιάζουν αντιοξειδωτική, αντικαρκινική, αντική, αντιπηκτική, αλλά και αντιφλεγμονώδη δράση.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ο σχεδιασμός, η σύνθεση κι ο χαρακτηρισμός νέων κουμαρινικών αναλόγων, με στόχο την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης τους σε ειδικές *in vitro* βιοδοκιμές, αλλά και την αξιολόγησή τους ως προς τη φαρμακο-ομοιότητα. Συγκεκριμένα, συντέθηκαν 22 νέες κουμαρίνες και ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας ^1H NMR.



Εικόνα 7. Ακετυλοξυ-κουμαρινικά ανάλογα



Εικόνα 8. Υδροξυ-κουμαρινικά ανάλογα

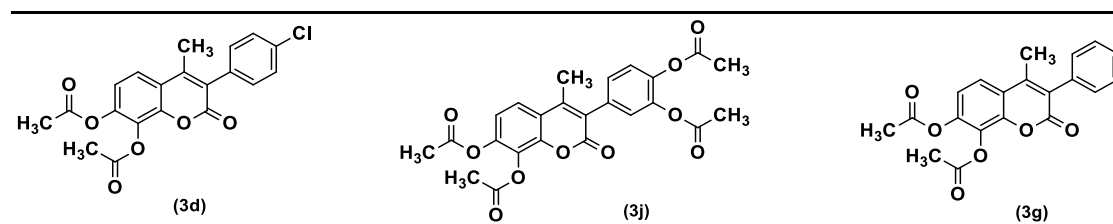
Αρχικά εξετάστηκαν δύο εναλλακτικές πορείες σύνθεσης της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης, μέσω εστεροποίησης κατά Fischer και αναδιάταξης Fries, που διέφεραν ως προς το ένα αντιδρών εκ των δύο, αλλά και τις συνθήκες. Επιλέχθηκε η πορεία που απέδωσε υψηλότερες αποδόσεις και πιο καθαρό τελικό προϊόν μέσω της ανακρυστάλλωσης.

Στη συνέχεια, η 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνη χρησιμοποιήθηκε ως αντιδρών στην τροποποιημένη αντίδραση Perkin που πραγματοποιήθηκε για τη σύνθεση των 11 ακετυλοξυ-κουμαρινικών παραγώγων. Οι ενώσεις αυτές συντέθηκαν σε ικανοποιητικές αποδόσεις και ο καθαρισμός τους έγινε με ανακρυστάλλωση.

Τέλος, οι 11 ακετυλοξυ-κουμαρίνες οδήγησαν μέσω απακετυλίωσης στα 11 υδροξυ-κουμαρινικά ανάλογα, με υψηλές αποδόσεις και χωρίς να χρειαστεί περαιτέρω καθαρισμός των προϊόντων.

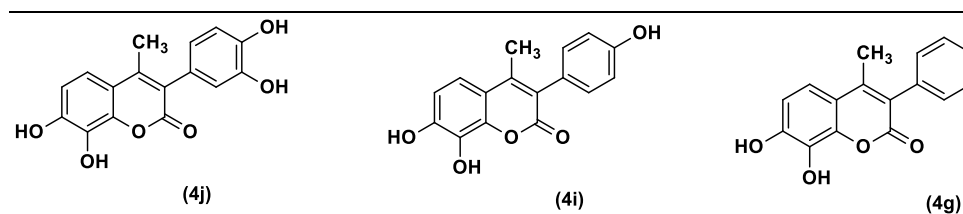
Τα νέα κουμαρινικά ανάλογα αξιολογήθηκαν μέσω των μεθόδων DPPH και AAPH για την αντιοξειδωτική τους δράση. Αξιολογήθηκαν επίσης, για την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση της λιποξυγονάσης από σόγια (LOX), μελέτη της οποίας τα αποτελέσματα αποτελούν ένδειξη αντιφλεγμονώδους δράσης.

Τα ακετυλοξυ-κουμαρινικά παράγωγα παρότι δεν παρουσίασαν ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, εμφάνισαν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση μέσω της μεθόδου AAPH. Τα παράγωγα **3d** (95.3%100μM) και **3j** (95.1%100μM) παρουσίασαν την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, ενώ την ισχυρότερη αντιφλεγμονώδη δράση εμφάνισε η **3g** (IC₅₀=19 μM).



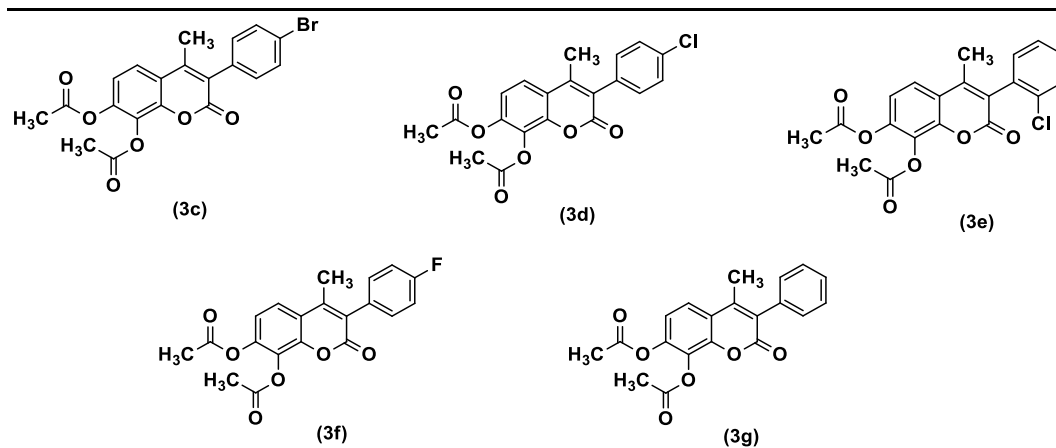
Σχήμα 33. Ακετυλοξυ-κουμαρίνες που εμφάνισαν την υψηλότερη βιοδραστητικότητα

Τα υδροξυ-κουμαρινικά παράγωγα στην πλειονότητά τους εμφάνισαν εξαιρετική αντιοξειδωτική δράση, εξαιτίας του κατεχολικού συστήματος που διαθέτουν. Επομένως, εμφανώς μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση εμφάνισαν μέσω DPPH η **4j** (IC₅₀=5.3 μM) και η **4i** (IC₅₀=8.7 μM), ενώ μέσω της μεθόδου AAPH η **4g** (78%) και η **4i** (78%). Τέλος, τη μεγαλύτερη ικανότητα αναστολής της δράσης της λιποξυγονάσης εμφάνισαν η **4i** (IC₅₀=52 μM) και η **4j** (IC₅₀=52.5 μM).



Σχήμα 34. Υδροξυ-κουμαρίνες που εμφάνισαν την υψηλότερη βιοδραστητικότητα

Παρατηρήθηκε επίσης, πως όλες οι ακετυλοξυ-κουμαρίνες υπακούουν στον κανόνα των 5 του Lipinski και είναι *per os* ενεργές. Οι ενώσεις που διαθέτουν αλογόνο (**3c**, **3d**, **3e**, **3f**) και η **3g** η οποία δεν είναι υποκατεστημένη στον φαινολικό δακτύλιο της θέσης 3-του κουμαρινικού σκελετού, είχαν TPSA=82.82 Å δηλαδή <90 Å, τις υψηλότερες τιμές logBB (-0.09, -0.11, -0.11, -0.19 και -0.21 αντίστοιχα), τον μικρότερο αριθμό δεκτών δεσμών υδρογόνου (6), καθώς και τον μικρότερο αριθμό περιστρεφόμενων δεσμών (5). Επομένως, οι ενώσεις **3c**, **3d**, **3e**, **3f** και **3g** εμφάνισαν το καλύτερο προφίλ φαρμακο-ομοιότητας.



Σχήμα 35. Ακετυλοξυ-κουμαρίνες που εμφάνισαν το καλύτερο προφίλ φαρμακο-ομοιότητας

Μελετώντας τη βιοδραστικότητα των ακετυλοξυ-κουμαρινικών αναλόγων (**3a-3k**), παρατηρήθηκε ότι η απουσία υποκατάστασης (**3g**), καθώς και η υποκατάσταση δύο ακετυλοξυ- (**3j**) ή δύο μεθοξυ- (**3k**) ομάδων, είχαν ως αποτέλεσμα εξίσου αξιόλογη αντιοξειδωτική (AAPH) και αντιφλεγμονώδη (LOX) δράση.

Πίνακας 10. Συνδυασμένη βιοδραστικότητα ακετυλοξυ-κουμαρινών

Ενώσεις	3g	3j	3k
AAPH - %100μM	68.1	95.1	88.9
LOX - IC ₅₀ (μM)	19	56	52.5

Αντίστοιχα, μελετώντας τη βιοδραστικότητα των υδροξυ-κουμαρινικών αναλόγων (**4a-4k**), παρατηρήθηκε ότι οι ενώσεις που διαθέτουν 3 ή 4 υδροξύλια (**4i**, **4j**), έναντι των υπόλοιπων ενώσεων που διαθέτουν 2, εμφάνισαν αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική (DPPH & AAPH) και αντιφλεγμονώδη (LOX) δράση.

Πίνακας 11. Συνδυασμένη βιοδραστικότητα υδροξυ-κουμαρινών

Ενώσεις	DPPH - IC ₅₀ (μM)	AAPH - %100μM	LOX - IC ₅₀ (μM)
4i	8.7	78	52
4j	5.3	42	52.5

Συμπερασματικά, η βιολογική δράση των νέων κουμαρινών επηρεάστηκε τόσο από τις διαφορετικές υποκαταστάσεις στον φαινολικό δακτύλιο της θέσης 3- του κουμαρινικού σκελετού, όσο και από τις διαφορετικές θέσεις υποκατάστασης στο φαινύλιο.

ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μελέτη των νέων κουμαρινικών αναλόγων, τα οποία συντέθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, είναι πολύ ενθαρρυντικά και μας οδηγούν στην περαιτέρω μελέτη των μορίων αυτών κυρίως ως προς τη βιοδραστικότητά τους.

Επικείμενο στόχο αποτελεί λοιπόν, η αξιολόγηση της φαρμακο-ομοιότητας των 11 υδροξυ-κουμαρινών, ώστε να είναι εφικτή η σύγκριση των αποτελεσμάτων αυτών με τα αντίστοιχα για τις ακετυλοξυ-κουμαρίνες.

Επίσης, προτείνεται η μελέτη επιπλέον δράσεων και πρωτίστως της κυτταροτοξικότητας των κουμαρινών, έναντι των καρκινικών σεριών ανθρώπινου νευροβλαστώματος (SK-N-SH) και του τραχήλου της μήτρας (HeLa), καθώς αποτελέσματα που έχουν προκύψει για κουμαρινικά παράγωγα από την ερευνητική μας ομάδα στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π., αποδεικνύουν αξιόλογη αντικαρκινική δράση.

Θεωρείται χρήσιμο να ερευνηθεί και η περαιτέρω δομική τροποποίηση του κουμαρινικού σκελετού, αφού θα μπορούσε να μας οδηγήσει σε χρήσιμα συμπεράσματα ως προς τη σχέση δομής - βιολογικής δράσης των κουμαρινικών αναλόγων.

Επιπροσθέτως, μια προσέγγιση για μελλοντική σύνθεση κουμαρινικών αναλόγων, αφορά στην έρευνα εναλλακτικών συνθετικών πορειών, πιο φιλικών προς το περιβάλλον, οι οποίες θα εξασφαλίσουν και μεγαλύτερες αποδόσεις σύνθεσης.

Τέλος, προτείνεται η μελέτη του εγκλεισμού των ενώσεων που διαθέτουν το καλύτερο προφίλ βιοδραστικότητας σε κατάλληλο φορέα εγκλεισμού, με στόχο την ελεγχόμενη απελευθέρωσή τους και την πιθανή βελτίωση της βιολογικής τους δράσης.

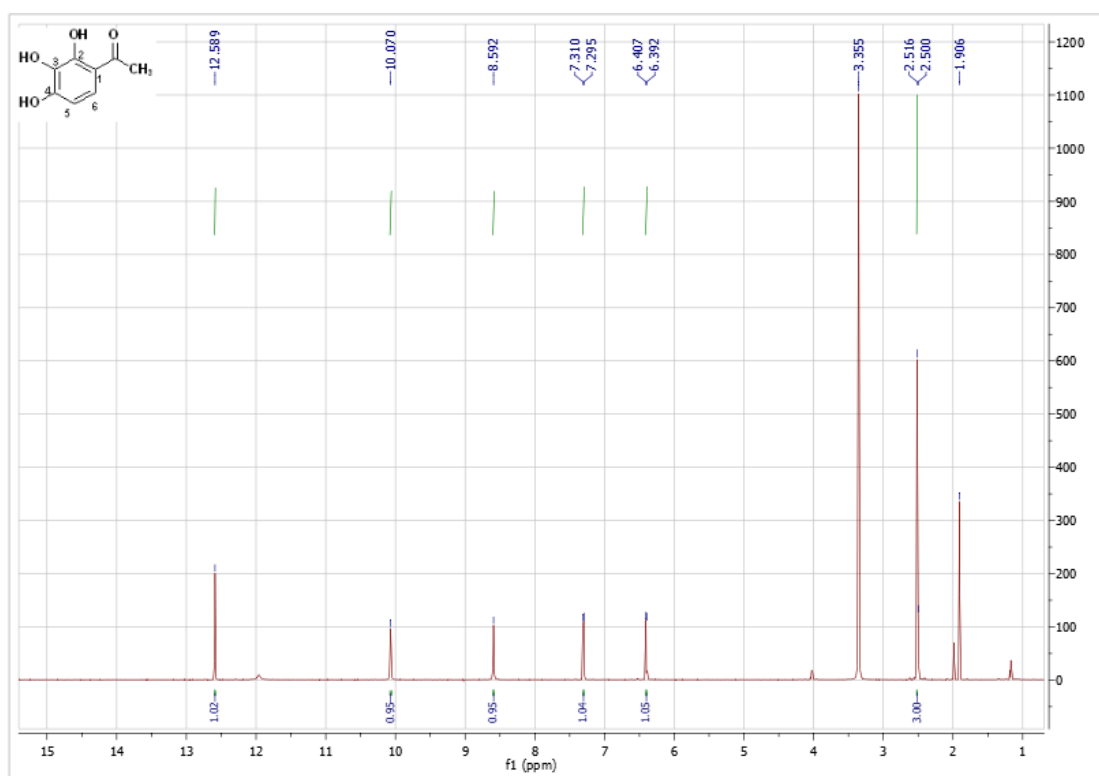
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Borges, F., Roleira, F., Milhazes, N., Santana, L., & Uriarte, E. (2005). Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. *Current medicinal chemistry*, 12(8), 887-916.
- [2] Kavetsou, E., Gkionis, L., Galani, G., Gkolfinopoulou, C., Argyri, L., Pontiki, E., ... & Detsi, A. (2017). Synthesis of prenyloxy coumarin analogues and evaluation of their antioxidant, lipoxygenase (LOX) inhibitory and cytotoxic activity. *Medicinal Chemistry Research*, 26(4), 856-866.
- [3] Jain, P. K., & Joshi, H. (2012). Coumarin: chemical and pharmacological profile. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(6), 236-240.
- [4] Thakur, A., Singla, R., & Jaitak, V. (2015). Coumarins as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies. *European journal of medicinal chemistry*, 101, 476-495.
- [5] Klenkar, J., & Molnar, M. (2015). Natural and synthetic coumarins as potential anticancer agents. *J. Chem. Pharm. Res*, 7, 1223-1238.
- [6] Yu, D., Suzuki, M., Xie, L., Morris-Natschke, S. L., & Lee, K. H. (2003). Recent progress in the development of coumarin derivatives as potent anti-HIV agents. *Medicinal research reviews*, 23(3), 322-345.
- [7] Hassan, M. Z., Osman, H., Ali, M. A., & Ahsan, M. J. (2016). Therapeutic potential of coumarins as antiviral agents. *European journal of medicinal chemistry*, 123, 236-255.
- [8] Kostova, I., Raleva, S., Genova, P., & Argirova, R. (2006). Structure-activity relationships of synthetic coumarins as HIV-1 inhibitors. *Bioinorganic chemistry and applications*, 2006.
- [9] Manolov, I., Dimitrov, I., Danchev, N., & Kostadinova, I. (2016). Synthesis, Toxicological, Anticoagulant Activity and Quantumchemical Study of Bis-coumarins and Other Coumarin Derivatives. *World Journal of Research and Review*, 3(4).
- [10] Fan, P., Gao, Y., Zheng, M., Xu, T., Schoenhagen, P., & Jin, Z. (2018). Recent progress and market analysis of anticoagulant drugs. *Journal of thoracic disease*, 10(3), 2011.
- [11] Asif, M. (2015). Pharmacologically potentials of different substituted coumarin derivatives. *Chemistry International*, 1(1), 1-11.
- [12] Lushchak, V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*, 224, 164-175.
- [13] Roussaki, M., Zelianaios, K., Kavetsou, E., Hamilakis, S., Hadjipavlou-Litina, D., Kontogiorgis, C., ... & Detsi, A. (2014). Structural modifications of coumarin derivatives: Determination of antioxidant and lipoxygenase (LOX) inhibitory activity. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 22(23), 6586-6594.
- [14] Borges Bubols, G., da Rocha Vianna, D., Medina-Reimon, A., von Poser, G., Maria Lamuela-Raventos, R., Lucia Eifler-Lima, V., & Cristina Garcia, S. (2013). The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 13(3), 318-334.

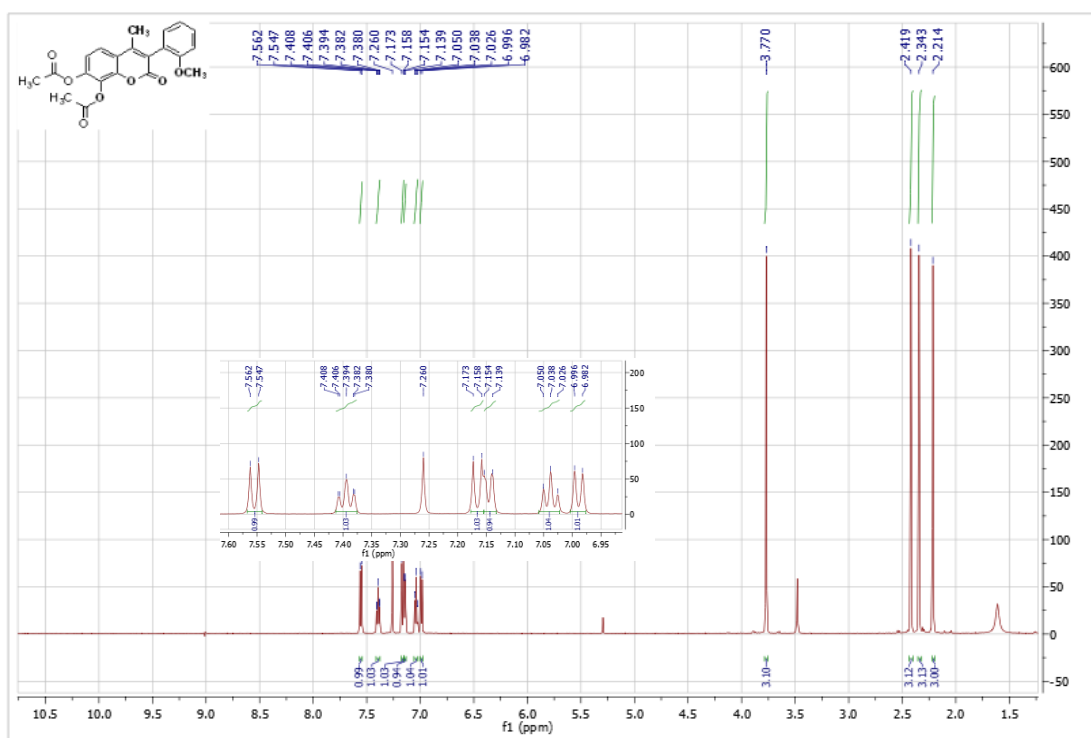
- [15] Kostova, I., Bhatia, S., Grigorov, P., Balkansky, S., S Parmar, V., K Prasad, A., & Saso, L. (2011). Coumarins as antioxidants. *Current medicinal chemistry*, 18(25), 3929-3951.
- [16] Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015). Reprint of "Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays". *Journal of functional foods*, 18, 782-796.
- [17] Ρουσσάκη, Μ. (2014). Σχεδιασμός και σύνθεση νέων βιοδραστικών ενώσεων ανάλογων των κουμαρινών (Doctoral dissertation, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο (ΕΜΠ). Σχολή Χημικών Μηχανικών. Τομέας Χημικών Επιστημών. Εργαστήριο Οργανικής Χημείας).
- [18] Vianna, D. R., Bubols, G., Meirelles, G., Silva, B. V., da Rocha, A., Lanznaster, M., ... & Eifler-Lima, V. L. (2012). Evaluation of the antioxidant capacity of synthesized coumarins. *International journal of molecular sciences*, 13(6), 7260-7270.
- [19] Roussaki, M., Kontogiorgis, C. A., Hadjipavlou-Litina, D., Hamilakis, S., & Detsi, A. (2010). A novel synthesis of 3-aryl coumarins and evaluation of their antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(13), 3889-3892.
- [20] Hiramoto, K., Johkoh, H., Sako, K. I., & Kikugawa, K. (1993). DNA breaking activity of the carbon-centered radical generated from 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH). *Free radical research communications*, 19(5), 323-332.
- [21] Yoshida, Y., Itoh, N., Saito, Y., Hayakawa, M., & Niki, E. (2004). Application of water-soluble radical initiator, 2, 2'-azobis-[2-(2-imidazolin-2-yl) propane] dihydrochloride, to a study of oxidative stress. *Free radical research*, 38(4), 375-384.
- [22] Iranshahi, M. E. H. R. D. A. D., Askari, M., Sahebkar, A., & Adjipavlou-Litina, D. (2015). Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and lipoxygenase inhibitory activities of the prenylated coumarin umbelliprenin. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(2), 99-103.
- [23] Grover, J., & Jachak, S. M. (2015). Coumarins as privileged scaffold for anti-inflammatory drug development. *RSC Advances*, 5(49), 38892-38905.
- [24] Vilar, S., Chakrabarti, M., & Costanzi, S. (2010). Prediction of passive blood-brain partitioning: straightforward and effective classification models based on in silico derived physicochemical descriptors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 28(8), 899-903.
- [25] Benet, L. Z., Hosey, C. M., Ursu, O., & Oprea, T. I. (2016). BDDCS, the rule of 5 and drugability. *Advanced drug delivery reviews*, 101, 89-98.
- [26] Arrico, L., Abbouda, A., Bianchi, S., & Malagola, R. (2014). Acute monolateral proptosis and orbital myositis in a patient with discoid lupus erythematosus: a case report. *Journal of medical case reports*, 8(1), 375.
- [27] Δημόπουλος, Β., & Τσαντίλη-Κακουλίδου, Α. (2015). Βασικές αρχές σχεδιασμού και ανάπτυξης φαρμάκων.
- [28] E. Kavetsou, A. Katopodi, L. Argyri, E. Chainoglou, E. Pontiki, D. Hadjipavlou-Litina, A. Chroni, A. Detsi, Novel 3-aryl-5-substituted-coumarin analogues: synthesis and bioactivity profile (submitted).

- [29] Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W., & Kopple, K. D. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of medicinal chemistry*, 45(12), 2615-2623.
- [30] Potdar, M. K., Mohile, S. S., & Salunkhe, M. M. (2001). Coumarin syntheses via Pechmann condensation in Lewis acidic chloroaluminate ionic liquid. *Tetrahedron Letters*, 42(52), 9285-9287.
- [31] De, S. K., & Gibbs, R. A. (2005). An efficient and practical procedure for the synthesis of 4-substituted coumarins. *Synthesis*, 2005(08), 1231-1233.
- [32] Daru, J., & Stirling, A. (2011). Mechanism of the Pechmann reaction: a theoretical study. *The Journal of organic chemistry*, 76(21), 8749-8755.
- [33] Chandrasekhar, S., & Karri, P. (2006). Revised mechanism and improved methodology for the Perkin condensation. Resuscitation of the mechanism involving benzal acetate and the improbability of the enolate of acetic anhydride. *Tetrahedron letters*, 47(13), 2249-2251.
- [34] Johnson, J. R. (2004). The Perkin Reaction and Related Reactions. *Organic reactions*, 1, 210-265.
- [35] Zimmerman, H. E., & Ahramjian, L. (1959). Overlap control of carbanionoid reactions. II. 1 The stereochemistry of the perkin reaction and related condensation reactions. *Journal of the American Chemical Society*, 81(9), 2086-2091.
- [36] Cope, A. C. (1937). Condensation reactions. I. The condensation of ketones with cyanoacetic esters and the mechanism of the Knoevenagel reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 59(11), 2327-2330.
- [37] Κατωπόδη, Α., & Katorodi, Α. (2018). Σύνθεση νέων βιοδραστικών κουμαρινικών αναλόγων και εγκλεισμός επιλεγμένων κουμαρινών σε β-κυκλοδεξτρίνη.
- [38] Jang, M. H., Piao, X. L., Kim, J. M., Kwon, S. W., & Park, J. H. (2008). Inhibition of cholinesterase and amyloid-β aggregation by resveratrol oligomers from *Vitis amurensis*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 22(4), 544-549.
- [39] L. G. Wade, JR. (2012) 'Οργανική Χημεία' Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις ΤΖΙΟΛΑ
- [40] Heravi, M. M., Khaghaninejad, S., & Mostofi, M. (2014). Pechmann reaction in the synthesis of coumarin derivatives. In *Advances in heterocyclic chemistry* (Vol. 112, pp. 1-50). Academic Press.
- [41] Majumder, P. L., & Majumder, S. (1993). Further Evidence for the Mechanism of Formation of Coumarin by Perkin Reaction from salicylaldehyde and a Novel Synthesis of 1, 1-diphenyl-2 (2'-hydroxyphenyl) ethene from O-α, α-diphenylacetylsalicylaldehyde with Et₃N. *Eur. J. Med. Chem*, 28, 572-578.

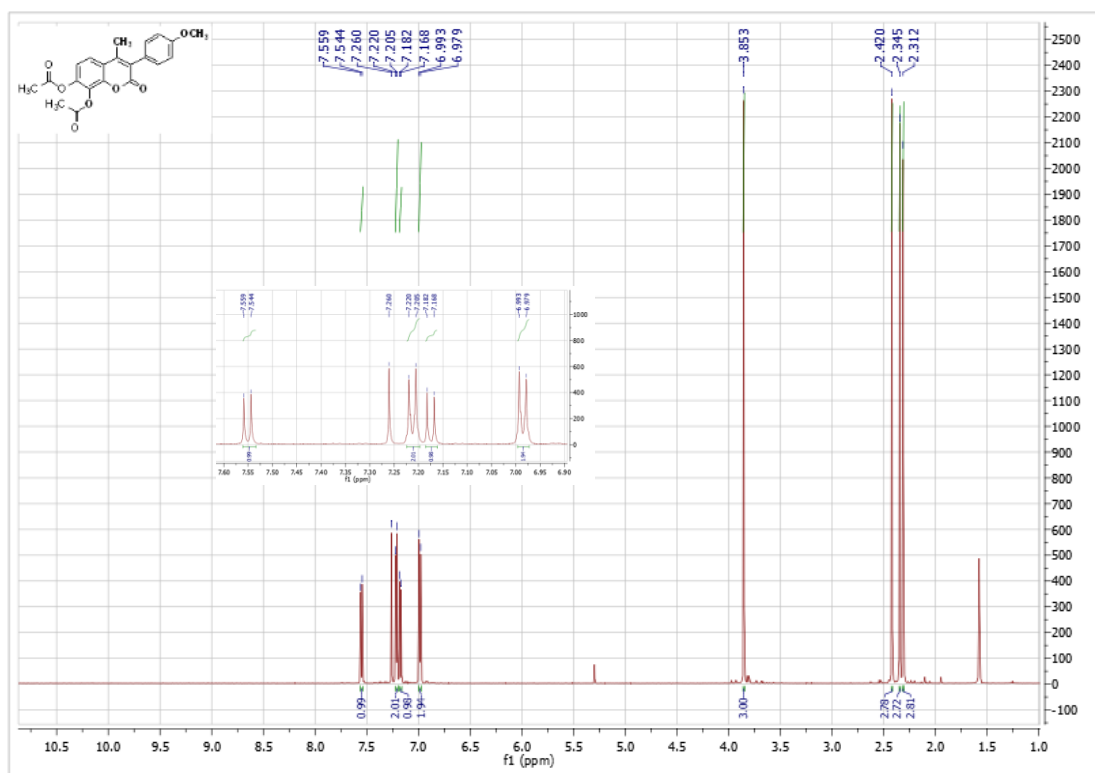
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ



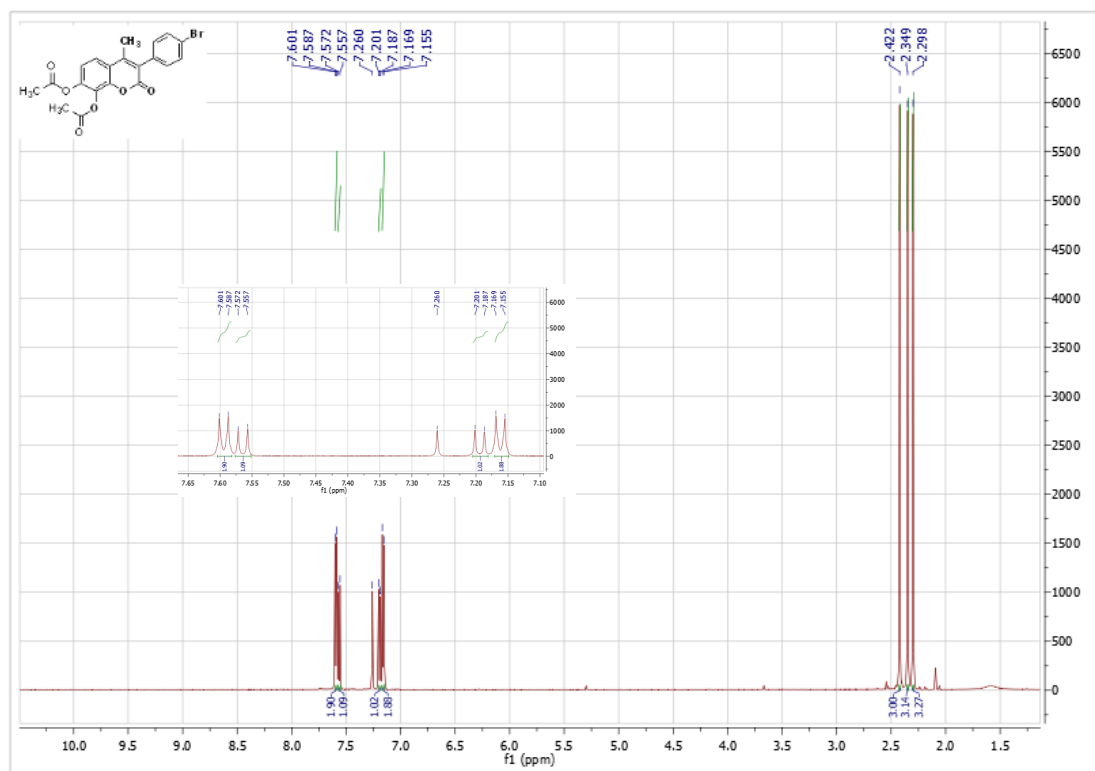
Εικόνα 9. Φάσμα ^1H NMR της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (1)



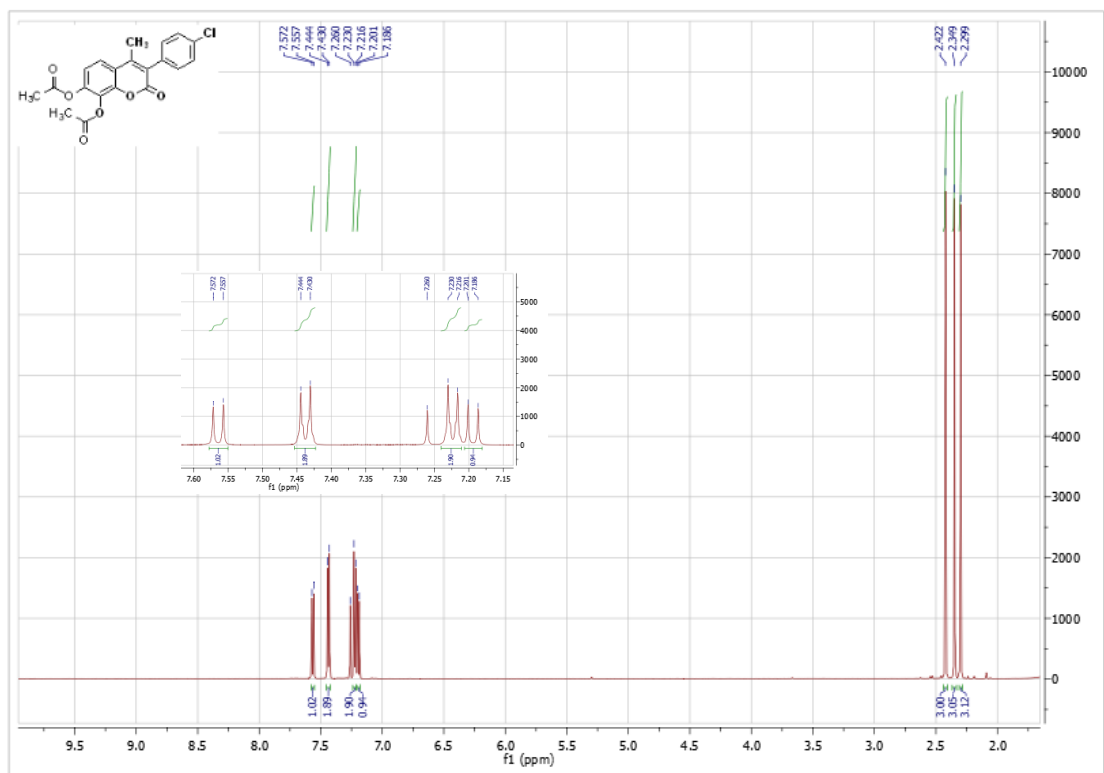
Εικόνα 10. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-(2-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2Η-χρωμεν-2-όνης (3a)



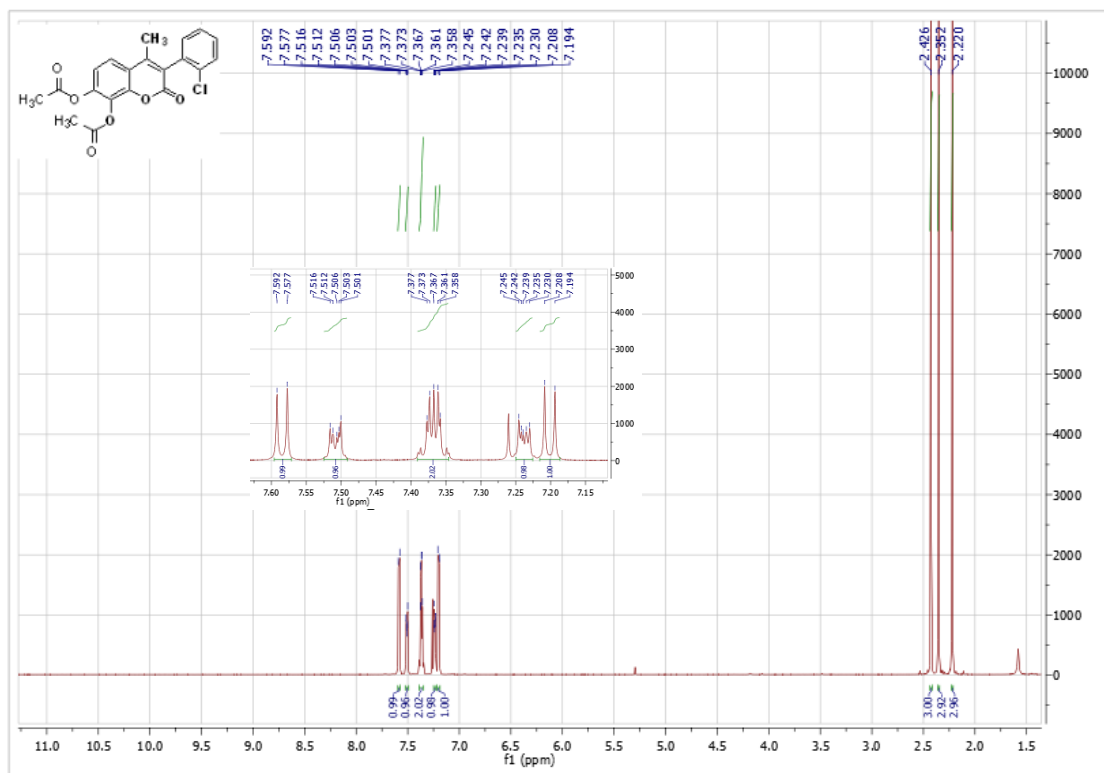
Εικόνα 11. Φάσμα ¹H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (3b)



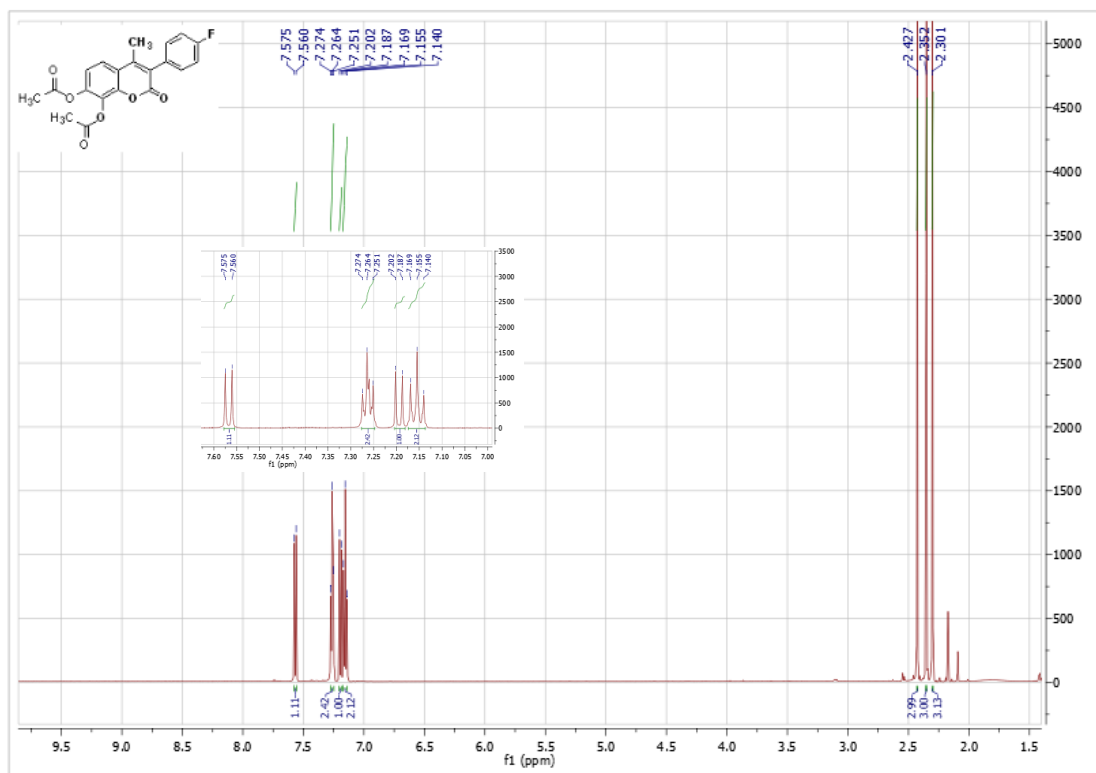
Εικόνα 12. Φάσμα ¹H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (3c)



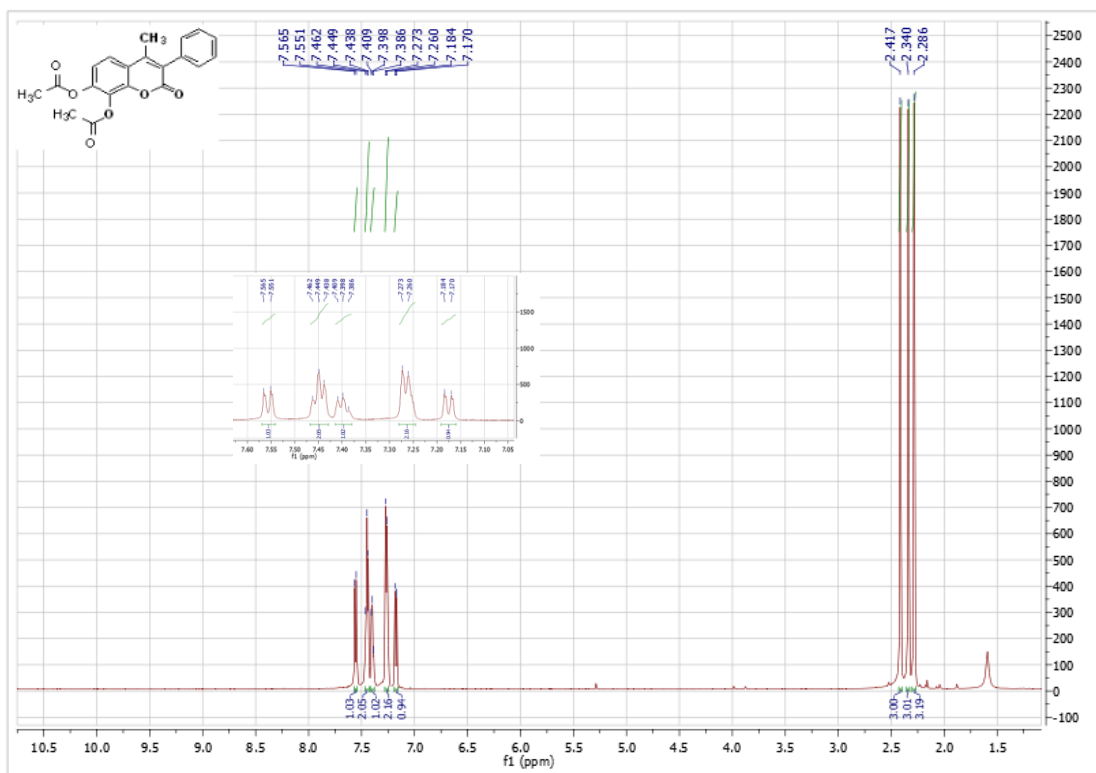
Εικόνα 13. Φάσμα ¹H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (3d)



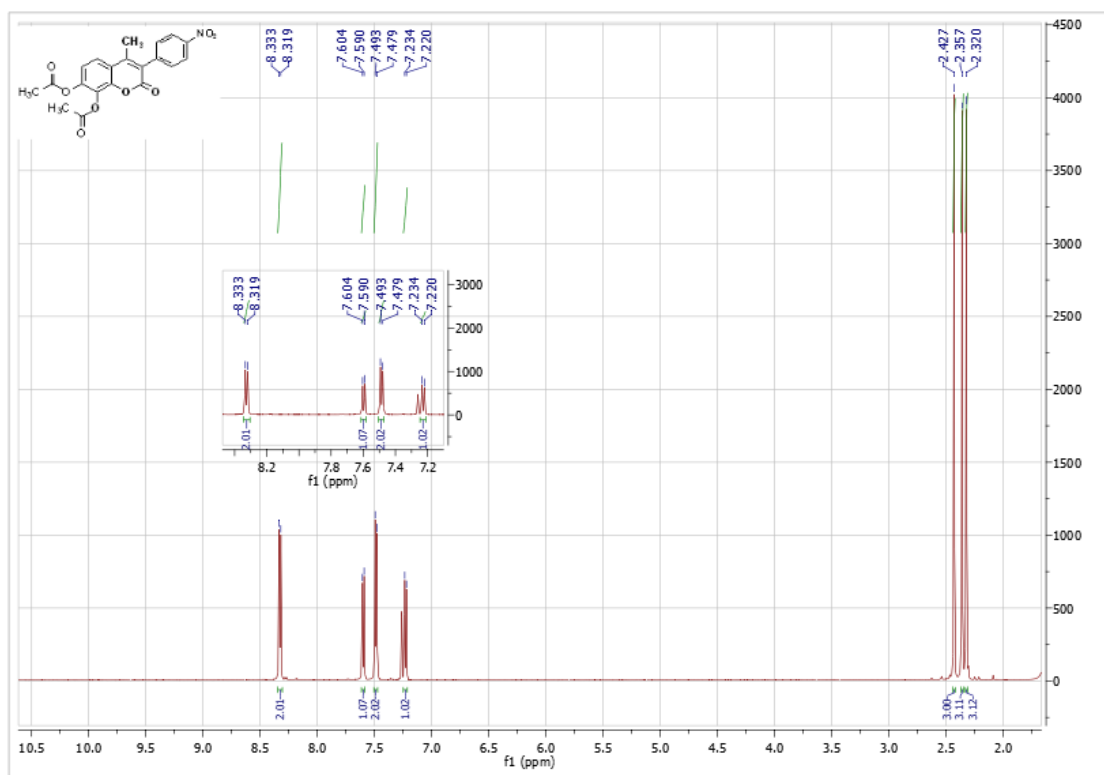
Εικόνα 14. Φάσμα ¹H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-(2-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (3e)



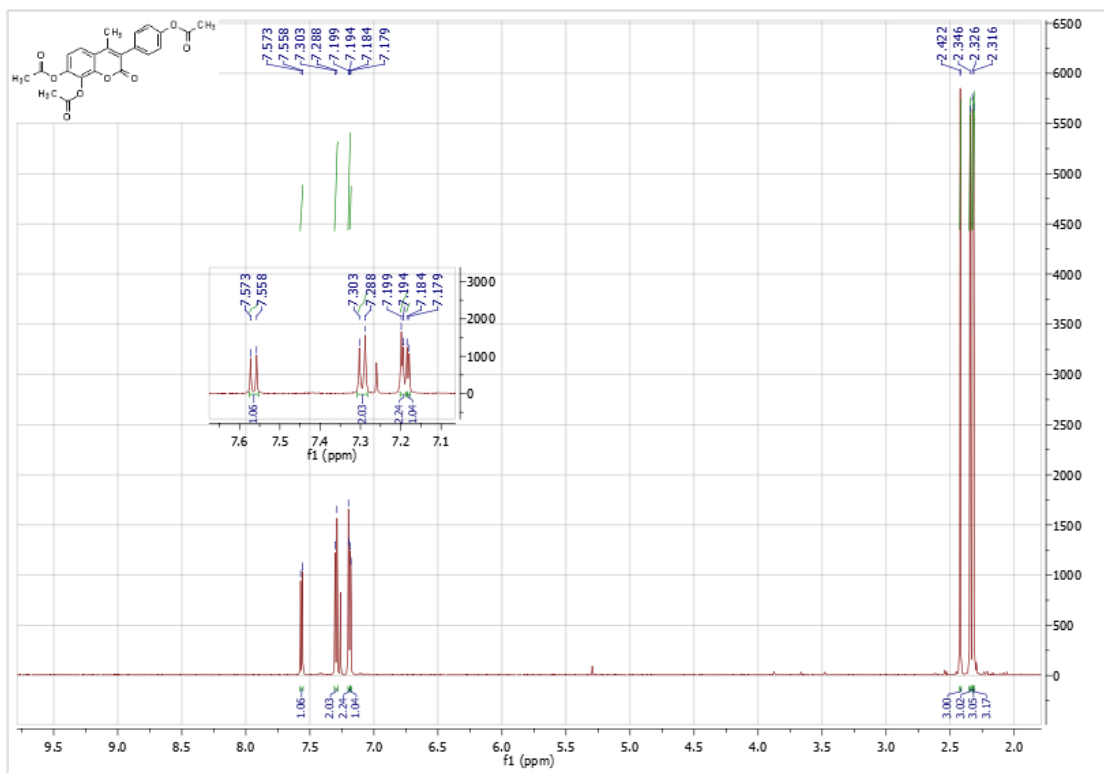
Εικόνα 15. Φάσμα ¹H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-φθοροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (3f)



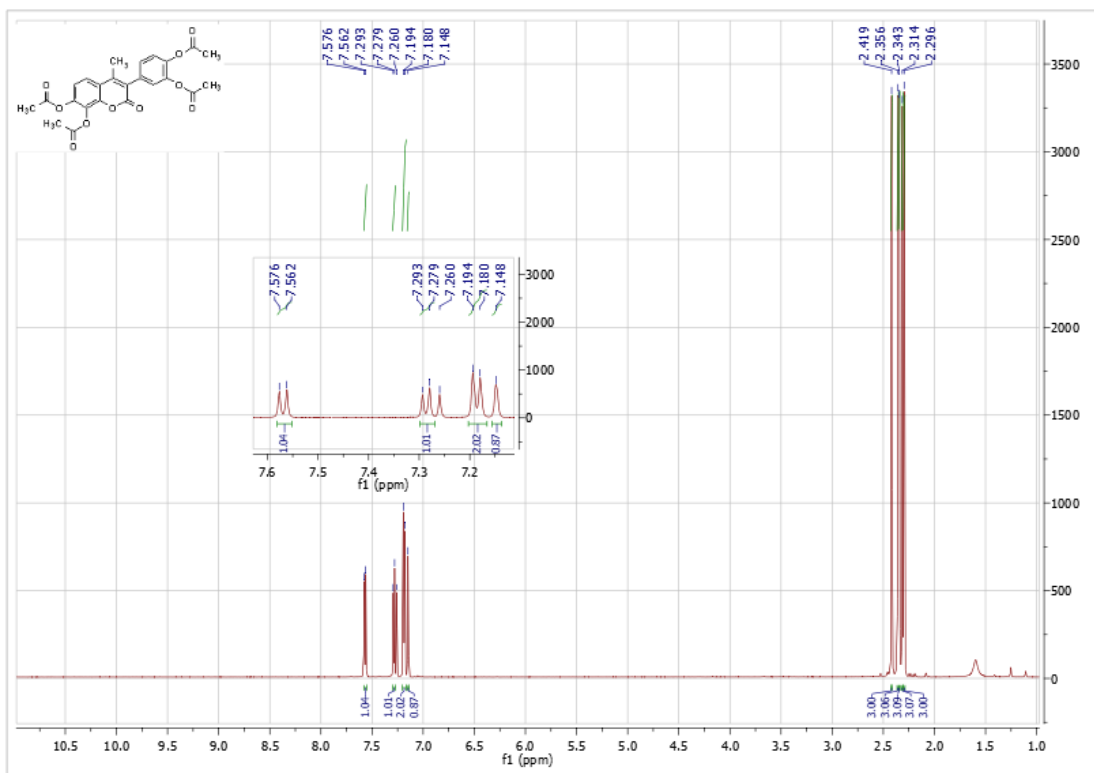
Εικόνα 16. Φάσμα ¹H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-φαινυλο-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (3g)



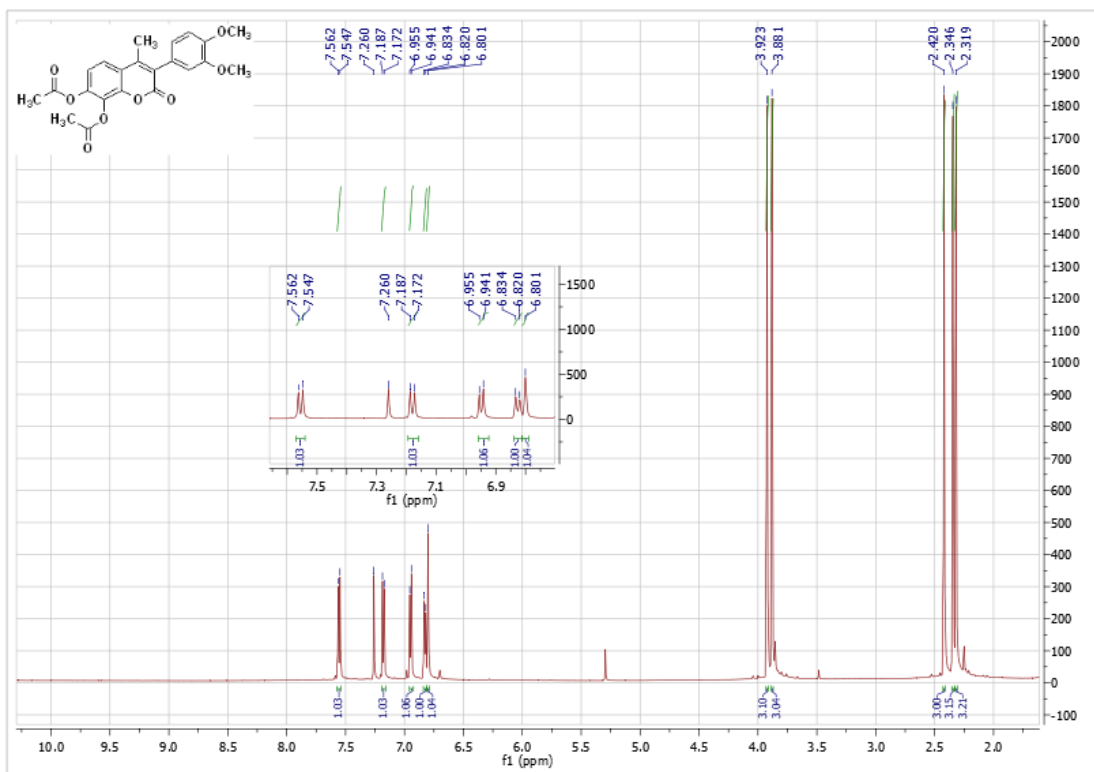
Εικόνα 17. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-νιτροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (3h)



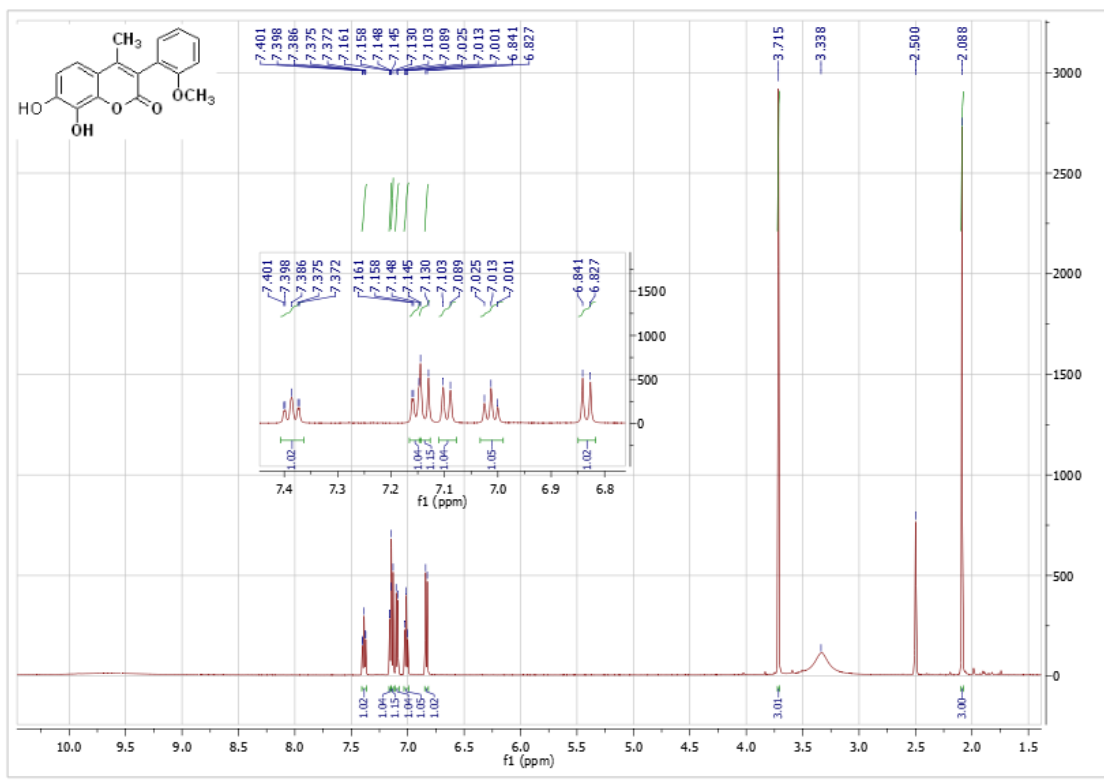
Εικόνα 18. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (3i)



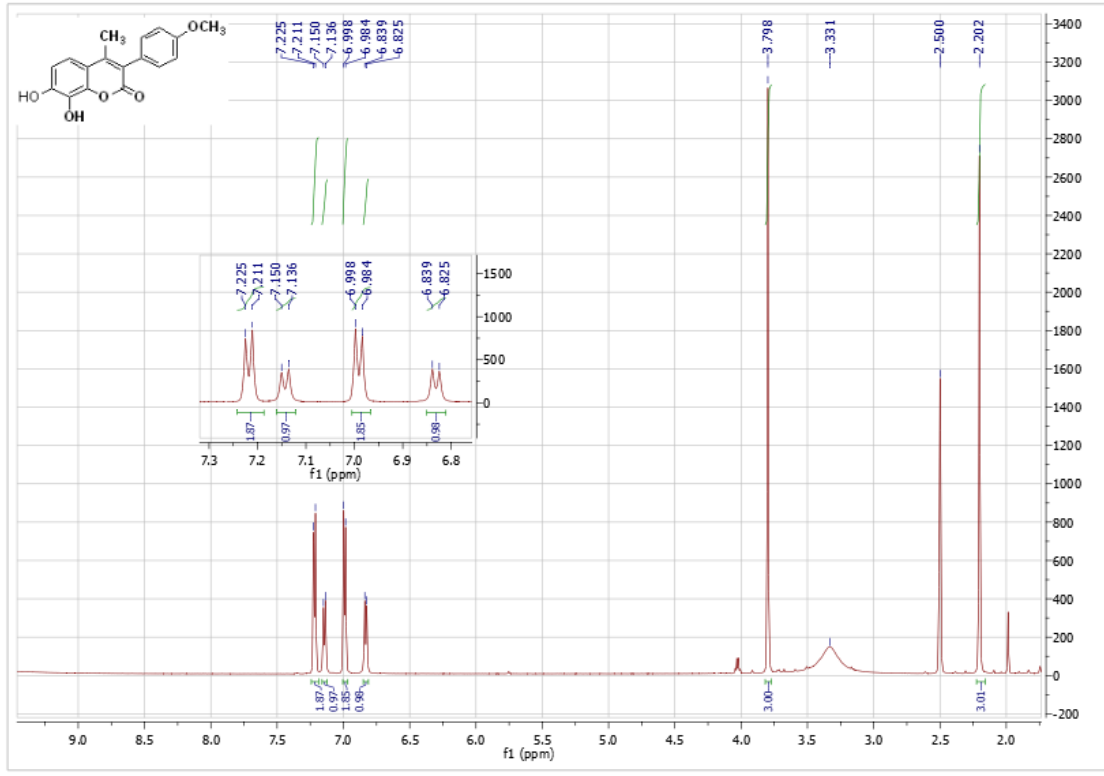
Εικόνα 19. Φάσμα ¹H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-(3,4-διακετυλοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (3j)



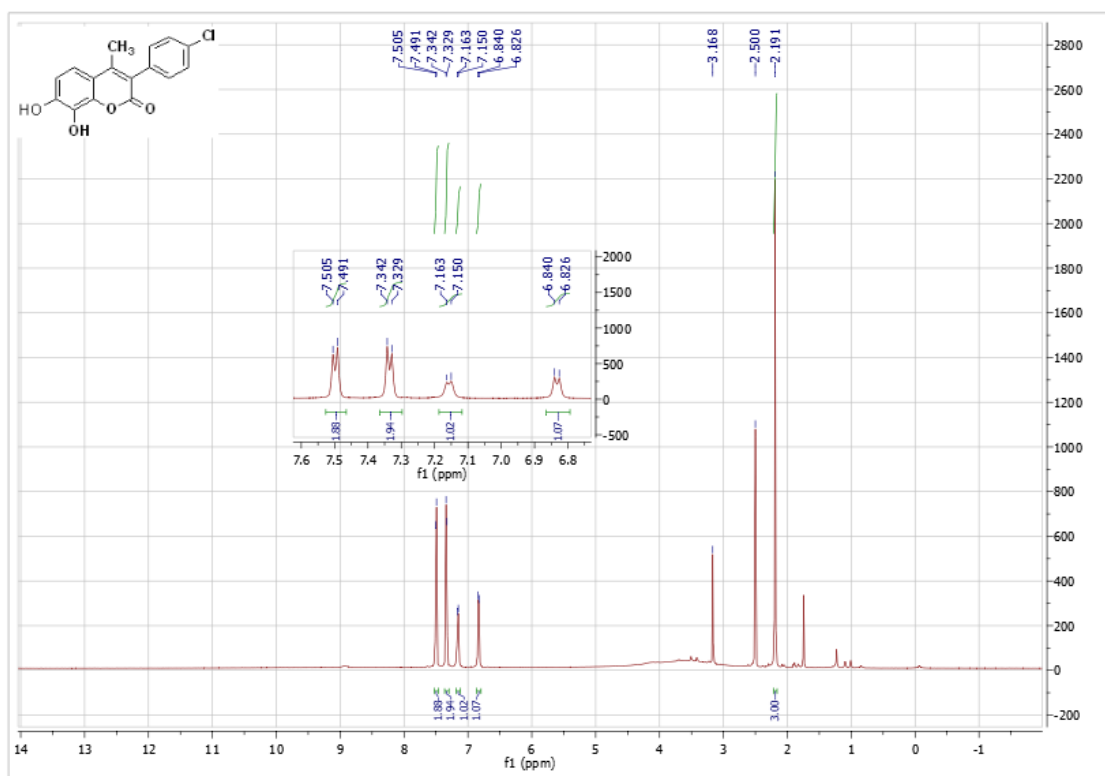
Εικόνα 20. Φάσμα ¹H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (3k)



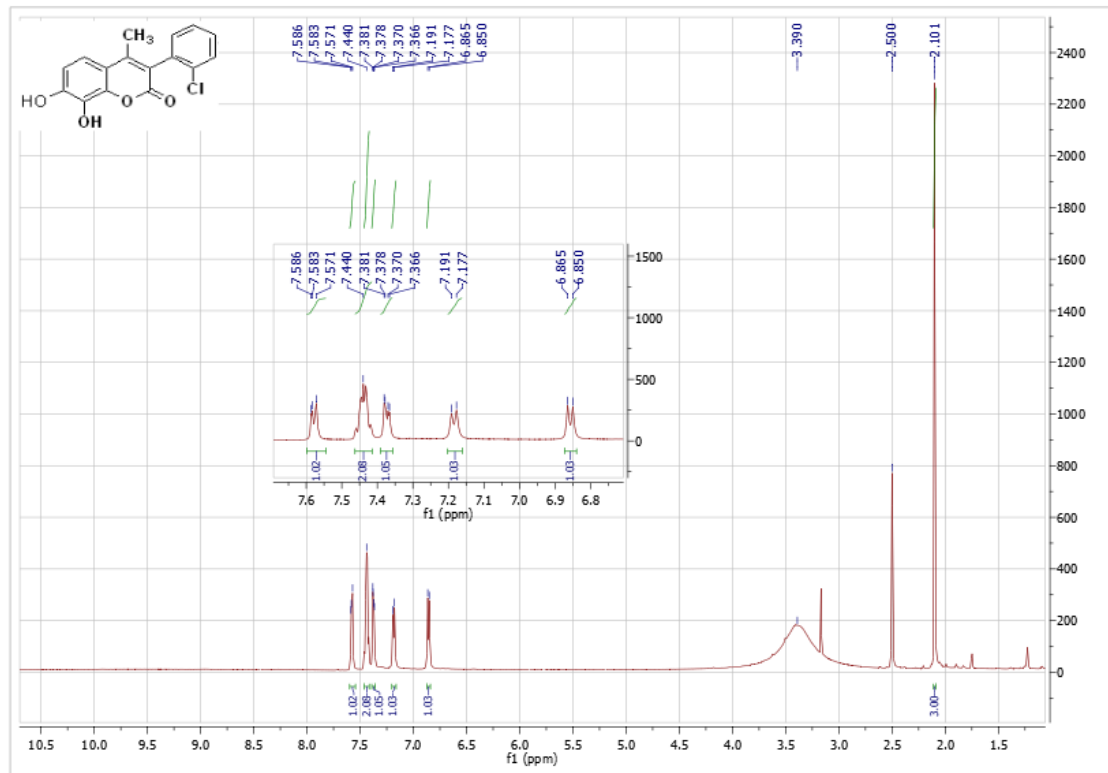
Εικόνα 21. Φάσμα ¹H NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(2-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (4a)



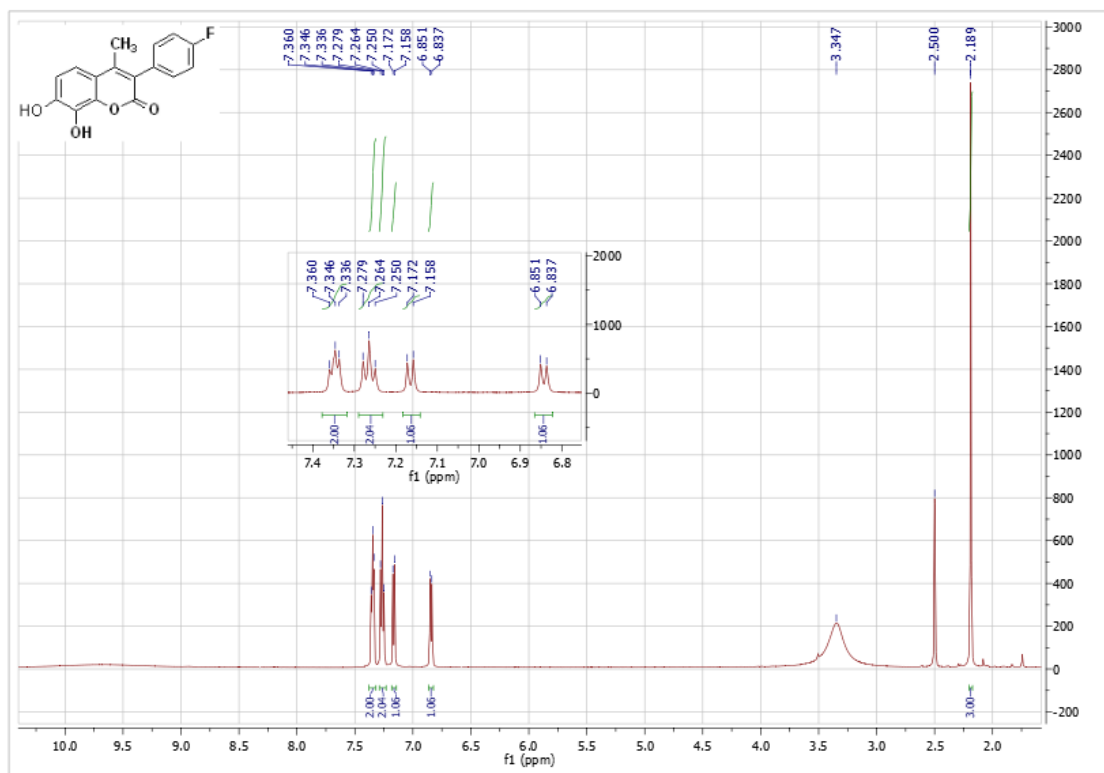
Εικόνα 22. Φάσμα ¹H NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (4b)



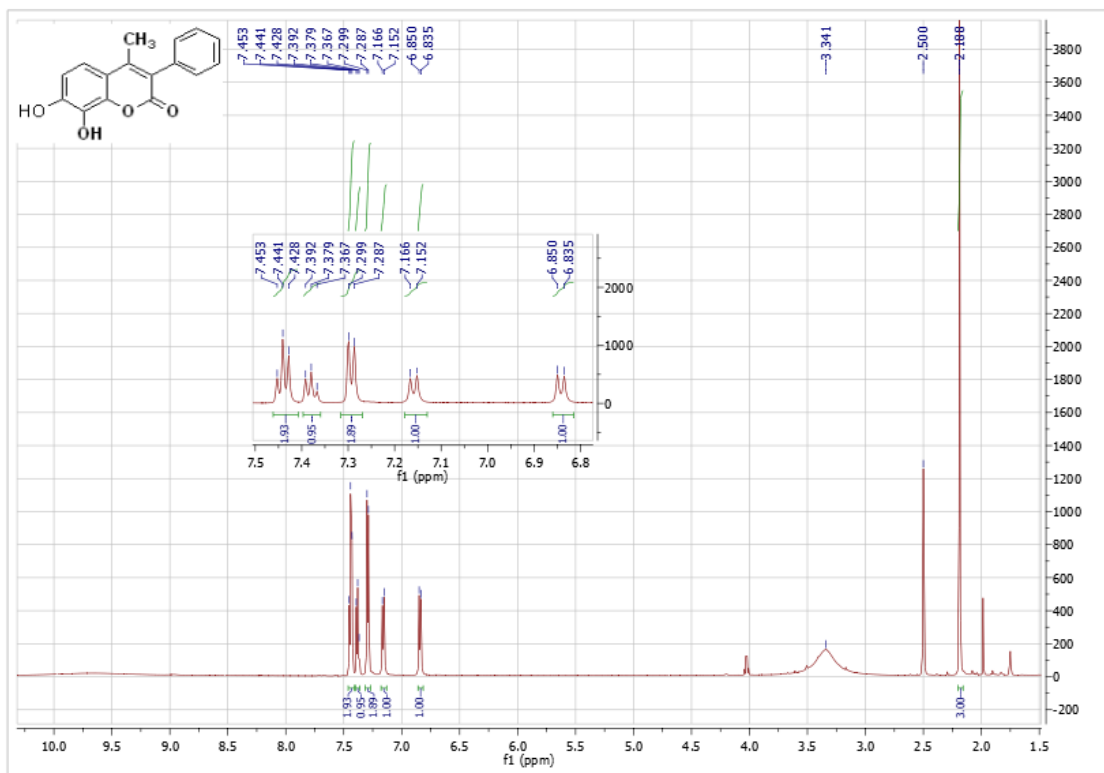
Εικόνα 23. Φάσμα ¹H NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(4-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (4d)



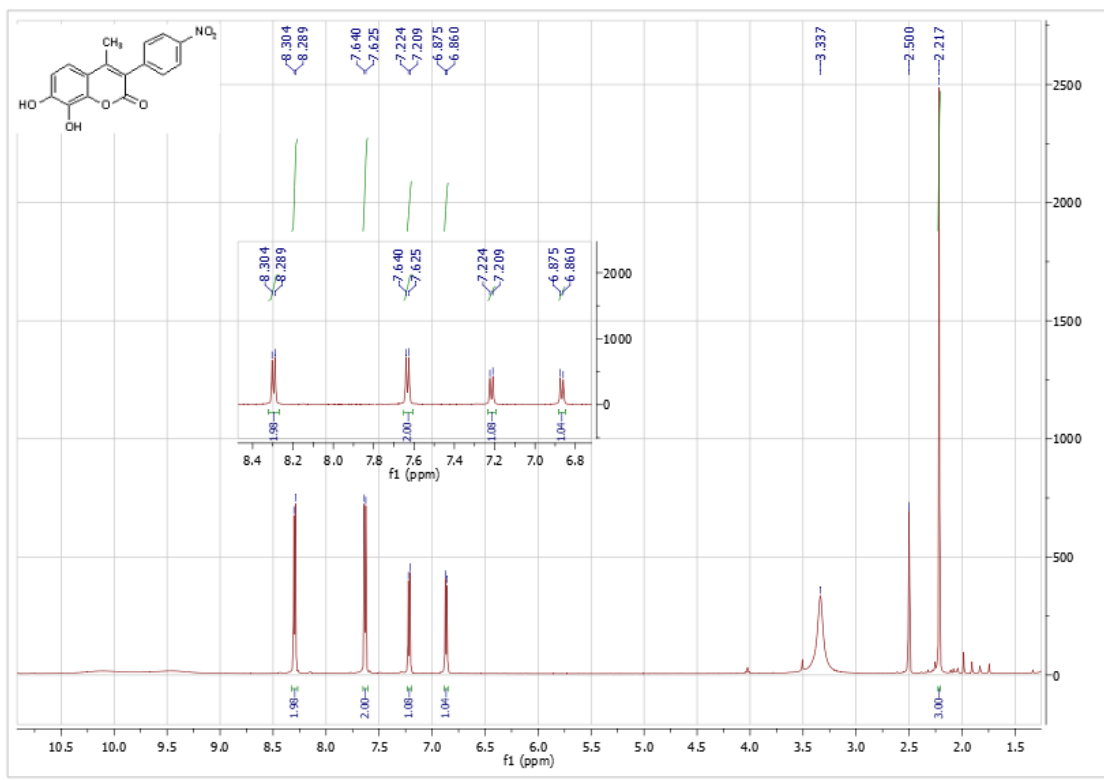
Εικόνα 24. Φάσμα ¹H NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(2-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (4e)



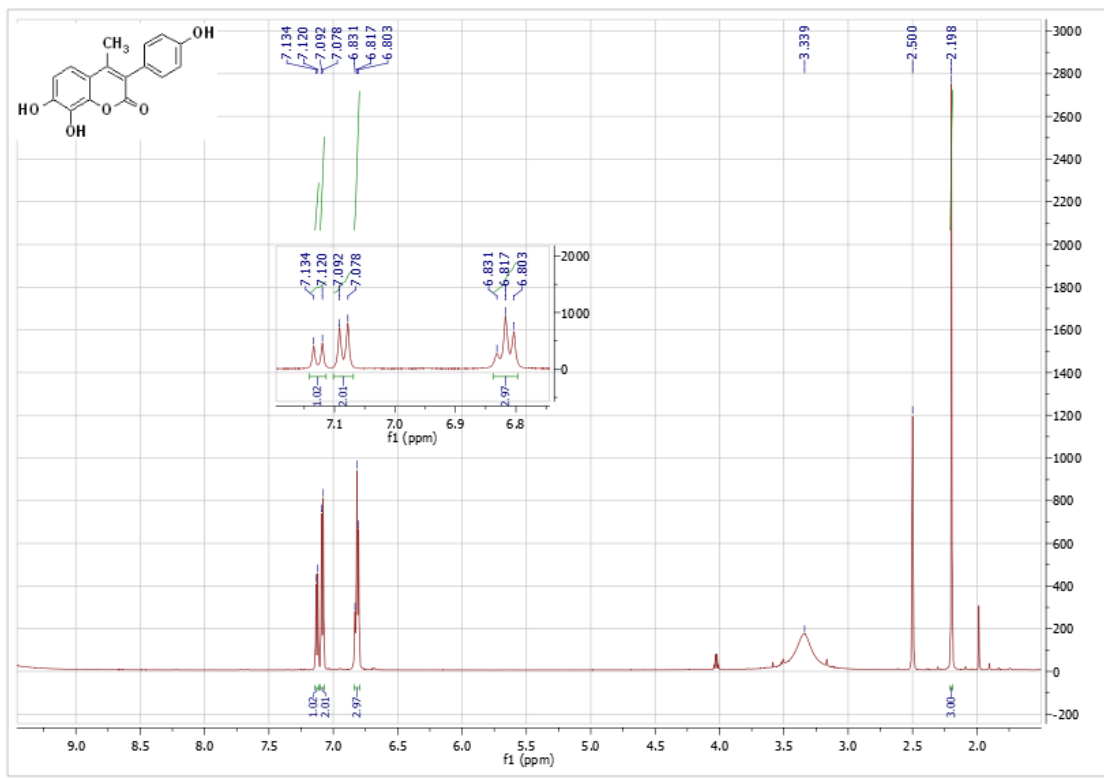
Εικόνα 25. Φάσμα ¹H NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(4-φθοροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (4f)



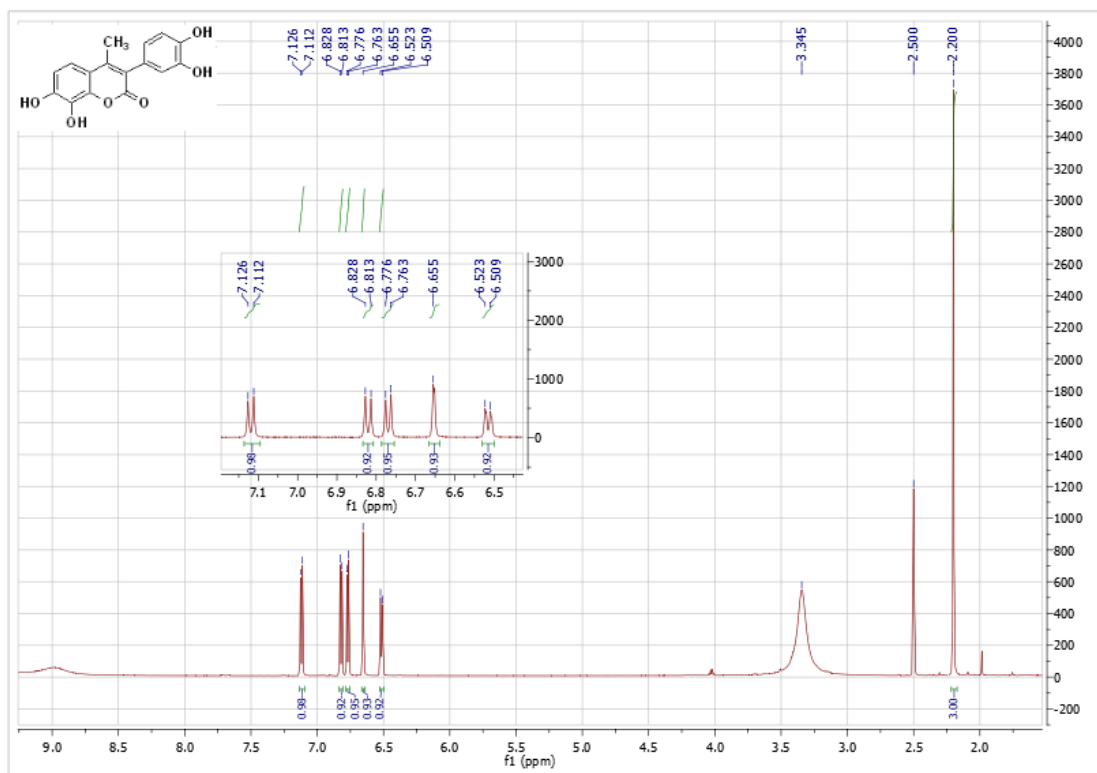
Εικόνα 26. Φάσμα ¹H NMR της 7,8-διυδροξυ-3-φαινυλο-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (4g)



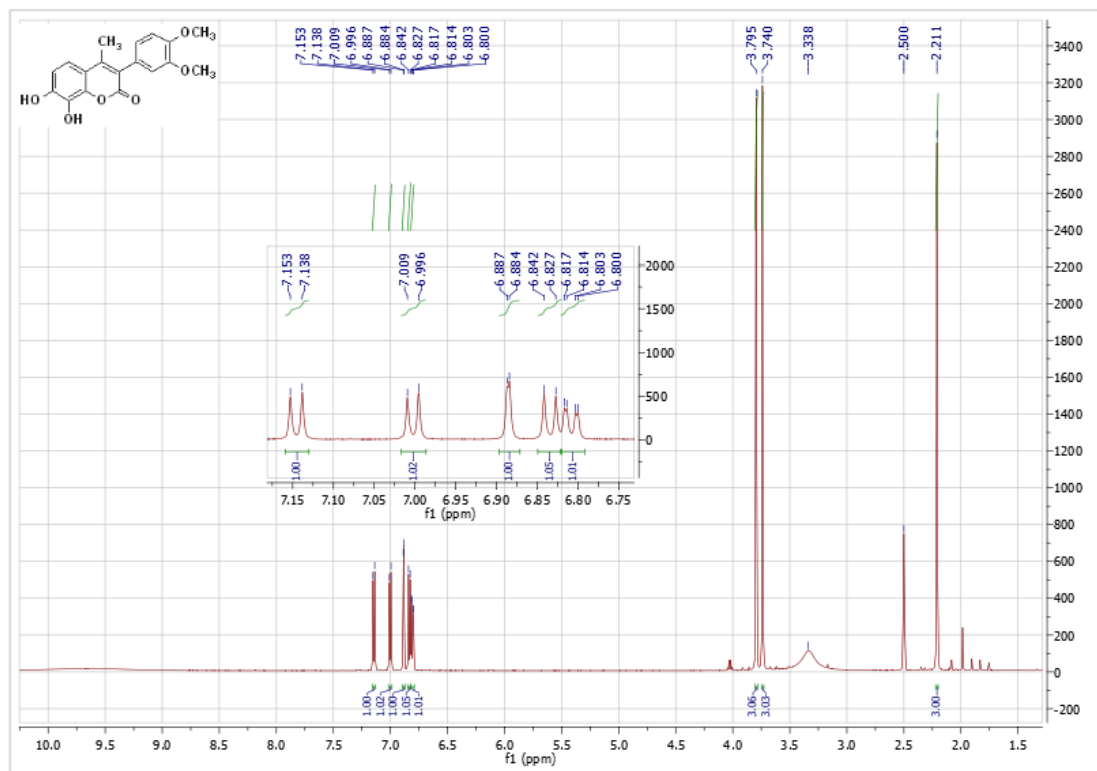
Εικόνα 27. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(4-νιτροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (**4h**)



Εικόνα 28. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (**4i**)



Εικόνα 29. Φάσμα ¹H NMR της 7,8-διδροξυ-3-(3,4-διδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (4j)



Εικόνα 30. Φάσμα ¹H NMR της 7,8-διδροξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H-χρωμεν-2-όνης (4k)

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Φυτικά είδη πλούσια σε κουμαρινικά παράγωγα.....	8
Εικόνα 2. Διάκριση βενζοπυρονών	8
Εικόνα 3. Πλακίδιο 96 θέσεων (96 well plate).....	43
Εικόνα 4. Φάσμα ^1H NMR της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (1).....	45
Εικόνα 5. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H- χρωμεν-2-όνης (3d).....	46
Εικόνα 6. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(4-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H- χρωμεν-2-όνης (4d).....	47
Εικόνα 7. Ακετυλοξυ-κουμαρινικά ανάλογα	58
Εικόνα 8. Υδροξυ-κουμαρινικά ανάλογα.....	58
Εικόνα 9. Φάσμα ^1H NMR της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (1).....	66
Εικόνα 10. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-(2-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H- χρωμεν-2-όνης (3a).....	66
Εικόνα 11. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H- χρωμεν-2-όνης (3b).....	67
Εικόνα 12. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-2H- χρωμεν-2-όνης (3c).....	67
Εικόνα 13. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H- χρωμεν-2-όνης (3d).....	68
Εικόνα 14. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-(2-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H- χρωμεν-2-όνης (3e).....	68
Εικόνα 15. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-φθοροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H- χρωμεν-2-όνης (3f).....	69
Εικόνα 16. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-φαινυλο-4-μεθυλο-2H- χρωμεν-2-όνης (3g).....	69
Εικόνα 17. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-νιτροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H- χρωμεν-2-όνης (3h).....	70
Εικόνα 18. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-ακετυλοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H- χρωμεν-2-όνης (3i).....	70
Εικόνα 19. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-(3,4-διακετυλοξυφαινυλο)-4-μεθυλο- 2H-χρωμεν-2-όνης (3j).....	71
Εικόνα 20. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διακετυλοξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H- χρωμεν-2-όνης (3k).....	71
Εικόνα 21. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(2-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H- χρωμεν-2-όνης (4a).....	72
Εικόνα 22. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(4-μεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2H- χρωμεν-2-όνης (4b).....	72
Εικόνα 23. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(4-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H- χρωμεν-2-όνης (4d).....	73
Εικόνα 24. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(2-χλωροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H- χρωμεν-2-όνης (4e).....	73
Εικόνα 25. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(4-φθοροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H- χρωμεν-2-όνης (4f).....	74
Εικόνα 26. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διυδροξυ-3-φαινυλο-4-μεθυλο-2H- χρωμεν-2-όνης (4g).....	74
Εικόνα 27. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(4-νιτροφαινυλο)-4-μεθυλο-2H- χρωμεν-2-όνης (4h).....	75

Εικόνα 28. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(4-υδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2Η- χρωμεν-2-όνης (4i)	75
Εικόνα 29. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(3,4-διυδροξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2Η- χρωμεν-2-όνης (4j)	76
Εικόνα 30. Φάσμα ^1H NMR της 7,8-διυδροξυ-3-(3,4-διμεθοξυφαινυλο)-4-μεθυλο-2Η- χρωμεν-2-όνης (4k)	76

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Ακετυλοξυ-κουμαρίνες που εμφάνισαν την υψηλότερη βιοδραστικότητα	2
Σχήμα 2. Ακετυλοξυ-κουμαρίνες που εμφάνισαν το καλύτερο προφίλ φαρμακο- ομοιότητας	3
Σχήμα 3. Υδροξυ-κουμαρίνες που εμφάνισαν την υψηλότερη βιοδραστικότητα	3
Σχήμα 4. Η κουμαρίνη ως βασικός πυρήνας για τη σύνθεση νέων κουμαρινικών αναλόγων	9
Σχήμα 5. (a) 4-υδροξυκουμαρίνες, (b) 7-υδροξυκουμαρίνες	10
Σχήμα 6. (a) Δαφνετίνη, (b) 6,7-διυδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη	11
Σχήμα 7. 7,8-διακετυλοξυ-3-(4-μεθυλοσουλοφαινυλο)-κουμαρίνη.....	11
Σχήμα 8. 3-αρυλο-κουμαρινικά παράγωγα	11
Σχήμα 9. Διαφορετικές κατηγορίες κουμαρινών, αποτελεσματικές έναντι διαφόρων ιογενών ασθενειών	13
Σχήμα 10. Χημική δομή βαρφαρίνης	14
Σχήμα 11. (a) 4-hydroxy-3-[(2-oxo-2H-chromen-3-yl)-(4-carboxyphenyl)methyl]- coumarin (b) 3-[6-oxo-(6H,7H)-benzopyrano[4,3-b]benzopyran-8-nitro-11-methoxy-7- yl]-4-hydroxy-coumarin	14
Σχήμα 12. Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS).....	15
Σχήμα 13. Χημική δομή σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH.....	16
Σχήμα 14. Η αντίδραση της ρίζας DPPH με δεσμευτές ελευθέρων ριζών.....	17
Σχήμα 15. Χημική δομή Trolox.....	17
Σχήμα 16. Κατεχολικό σύστημα.....	18
Σχήμα 17. Χημική δομή 2,2 αζοδισ-(2-αμιδινοπροπανο)-υδροχλωριδίου (AAPH)	18
Σχήμα 18. Διάσπαση μορίου AAPH	19
Σχήμα 19. Χημική δομή NDGA.....	20
Σχήμα 20. Πορείες ισορροπίας του φαρμάκου στον οργανισμό	21
Σχήμα 21. Αντίδραση Pechmann.....	23
Σχήμα 22. Αντίδραση Perkin.....	24
Σχήμα 23. Αντίδραση Knoevenagel.....	25
Σχήμα 24. Μόρια οδηγού.....	26
Σχήμα 25. 1 ^η συνθετική πορεία 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (1)	27
Σχήμα 26. 2 ^η συνθετική πορεία 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (1).....	27
Σχήμα 27. Συνθετική πορεία 7,8-διακετυλοξυ-3-αρυλοκουμαρινών (3a-3k).....	28
Σχήμα 28. Συνθετική πορεία 7,8-διυδροξυ-3-αρυλοκουμαρινών (4a-4k).....	28
Σχήμα 29. Μηχανισμός σύνθεσης της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης (1)	29
Σχήμα 30. Μηχανισμός εστεροποίησης κατά Fischer	30
Σχήμα 31. Αναδιάταξη Fries.....	30
Σχήμα 32. Τροποποιημένη αντίδραση Perkin-Oglialoro.....	31
Σχήμα 33. Ακετυλοξυ-κουμαρίνες που εμφάνισαν την υψηλότερη βιοδραστικότητα.....	59
Σχήμα 34. Υδροξυ-κουμαρίνες που εμφάνισαν την υψηλότερη βιοδραστικότητα.....	59
Σχήμα 35. Ακετυλοξυ-κουμαρίνες που εμφάνισαν το καλύτερο προφίλ φαρμακο- ομοιότητας	60

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Κατηγορίες κουμαρινικών αναλόγων και χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτών	9
Πίνακας 2. Μελέτη εναλλακτικών συνθηκών αντίδρασης σύνθεσης της 2,3,4-τριυδροξυακετοφαινόνης	27
Πίνακας 3. Υλικά και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο DPPH	42
Πίνακας 4. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής (DPPH & AAPH) και της αντιφλεγμονώδους δράσης (LOX) των νέων ακετυλοξυ-κουμαρινικών παραγώγων	48
Πίνακας 5. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής (DPPH & AAPH) και της αντιφλεγμονώδους δράσης (LOX) των νέων υδροξυ-κουμαρινικών παραγώγων	49
Πίνακας 6. Συνδυασμένη βιοδραστικότητα ακετυλοξυ-κουμαρινών	55
Πίνακας 7. Συνδυασμένη βιοδραστικότητα υδροξυ-κουμαρινών	55
Πίνακας 8. Σύγκριση αποτελεσμάτων βιοδραστικότητας ακετυλοξυ- και υδροξυ-κουμαρινών.....	54
Πίνακας 9. Φαρμακο-ομοιότητα των ακετυλοξυ-κουμαρινών	56
Πίνακας 10. Συνδυασμένη βιοδραστικότητα ακετυλοξυ-κουμαρινών.....	60
Πίνακας 7. Συνδυασμένη βιοδραστικότητα υδροξυ-κουμαρινών	60