



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

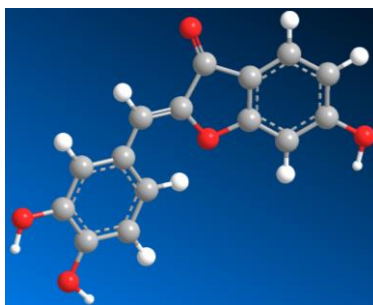
ΤΟΜΕΑΣ (Ι) ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Διπλωματική εργασία**

# Ολική σύνθεση της φυσικής ωρόνης σουλφουρετίνης και αναλόγων της

**Νέστωρ Ιωάννης Πολύζος**



**Επιβλέπουσα**

**Δρ. Αναστασία Δέτση**

Επίκουρη Καθηγήτρια ΕΜΠ

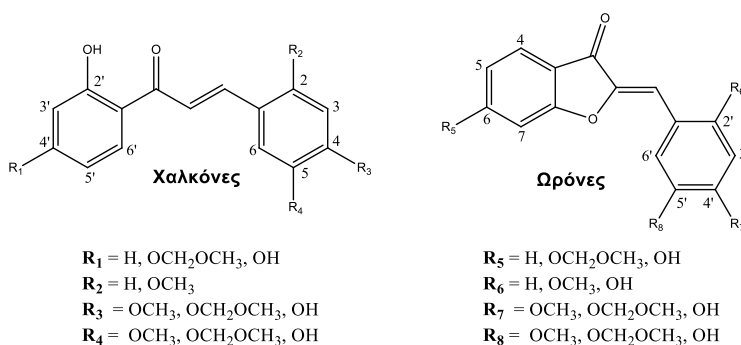
**Αθήνα 2016**



## Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ κατά το ακαδημαϊκό έτος 2015-2016. Σκοπός της εργασίας είναι η σύνθεση νέων χαλκόνων και ωρονών, συμπεριλαμβανομένης της φυσικής ωρόνης σουλφουρετίνης, και η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης τους.

Οι χαλκόνες και οι ωρόνες ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών και αποτελούν σημαντικές ομάδες φυσικών και συνθετικών ενώσεων με έντονη βιοδραστικότητα και ευρύ πεδίο ευεργετικών δράσεων, όπως αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική, αντιβακτηριακή και αντι-HIV.

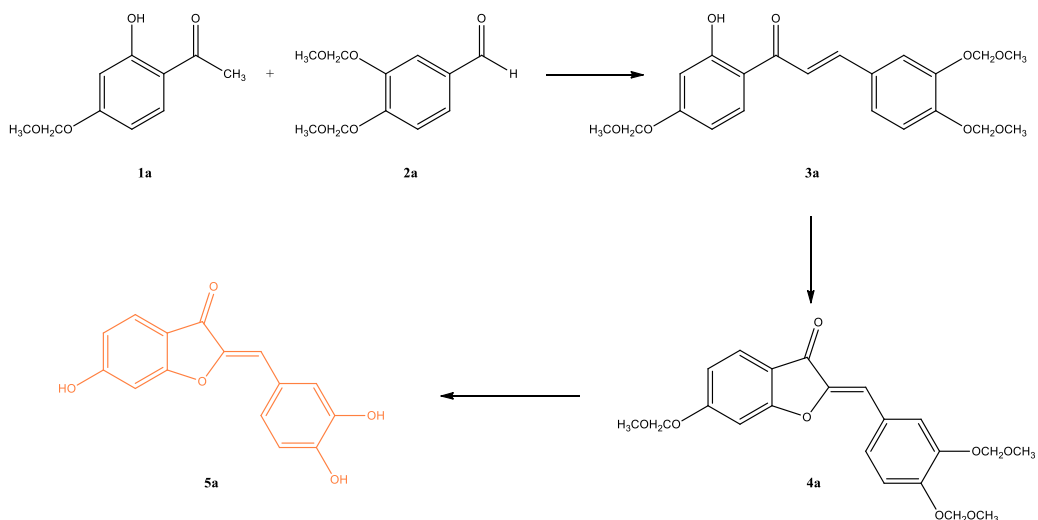


Δομή νέων χαλκόνων και ωρονών

Συντέθηκαν συνολικά 9 ενώσεις, εκ των οποίων 5 χαλκόνες και 4 ωρόνες και μελετήθηκε η βιολογική τους δράση. Η σύνθεση δύο χαλκόνων και τριών ωρονών εξ αυτών που συντέθηκαν, συμπεριλαμβανομένης της σουλφουρετίνης, δεν έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε η βιοσύνθεση της σουλφουρετίνης με χρήση του ενζύμου λακκάσης του μύκητα *Myceliophthora thermophila*.

Η σύνθεση των χαλκόνων και ωρονών πραγματοποιήθηκε μέσω αντιδράσεων συμπύκνωσης Claisen-Schmidt μεταξύ κατάλληλα υποκατεστημένων ακετοφαινονών και βενζαλδεϋδών. Οι ωρόνες συντέθηκαν μέσω αντιδράσεων οξειδωτικής κυκλοποίησης των αντίστοιχων χαλκόνων.

Η δομική ταυτοποίηση των νέων μορίων πραγματοποιήθηκε μέσω των φασματοσκοπικών μεθόδων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και φασματοσκοπίας μάζας (ESI-MS).



*Στάδια ολικής σύνθεσης της φυσικής ωρόνης σουλφουρετίνης*

Η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των ενώσεων εκτιμήθηκε *in vitro* με βάση την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH και την αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης που επάγεται από την ελεύθερη ρίζα AAPH. Όσον αφορά στην αντιφλεγμονώδη δράση των ενώσεων, μελετήθηκε η ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση της φυτικής λιποξυγονάσης (LOX).

Την καλύτερη ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH επέδειξε η 2',4',5'-τριϋδροξυ-ωρόνη (**5b**), με 100% δέσμευση της ρίζας στα 20 και 60 λεπτά μέτρησης, ακολουθούμενη από την 2',4',3,4-τετραϋδροξυχαλκόνη (**3d**), με 95.7 % και 95.3 % δέσμευση της ρίζας DPPH στα 20 και 60 λεπτά μέτρησης αντιστοίχως.

Αναφορικά με την αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης, τα καλύτερα αποτελέσματα εμφάνισε η 2'-υδροξυ-2,4,5-τριμεθοξυ-χαλκόνη (**3b**) με 67.3 % δέσμευση της ελεύθερης ρίζας AAPH. Από την κατηγορία των ωρονών, η σουλφουρετίνη **5a** βρέθηκε να δεσμεύει 53.2 % της ρίζας AAPH.

Όσον αφορά στην αντιφλεγμονώδη δράση, την χαμηλότερη τιμή  $IC_{50}$ , και συνεπώς την καλύτερη ανασταλτική δράση έναντι του ενζύμου της λιποξυγονάσης σόγιας (LOX), επέδειξε η 4'-μεθοξυμεθοξυ-2'-υδροξυ-2,4,5-τριμεθοξυ-χαλκόνη (**3c**) με τιμή  $IC_{50} = 45 \mu M$  ακολουθούμενη από τη χαλκόνη **3b** με τιμή  $IC_{50} = 75 \mu M$ . Οι νέες ωρόνες που συντέθηκαν δεν εμφάνισαν ισχυρή αναστολή του ενζύμου της λιποξυγονάσης σόγιας.

Τέλος, εξετάζοντας τη συνδυαστική δράση των νέων μορίων, εξήχθη το συμπέρασμα ότι η σουλφουρετίνη **5a** παρουσιάζει την καλύτερη συνδυαστική αντιοξειδωτική δράση δεσμεύοντας ικανοποιητικά τη ρίζα DPPH και αναστέλλοντας εξίσου ικανοποιητικά τη λιπιδική υπεροξειδωση, γεγονός που την καθιστά ισχυρό αντιοξειδωτικό. Την καλύτερη συνδυαστική αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση επέδειξε η χαλκόνη **3b** δεσμεύοντας ικανοποιητικά τη ρίζα AAPH και αναστέλλοντας αποτελεσματικά τη δράση της λιποξυγονάσης σόγιας.

**Λέξεις κλειδιά:** χαλκόνες, ωρόνες, σουλφουρετίνη, αντιοξειδωτική - αντιφλεγμονώδης δράση

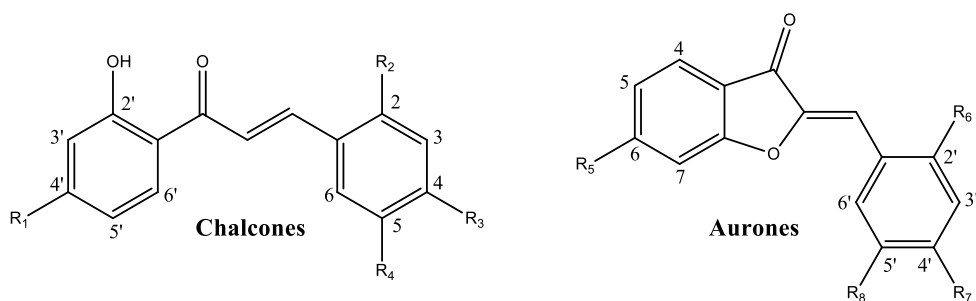
## Abstract

This diploma thesis was elaborated at the Laboratory of Organic Chemistry, School of Chemical Engineering at NTUA during the academic year 2015-2016. The aim of the present work is the synthesis, structure identification and study of the antioxidant and anti-inflammatory activity of novel chalcones and aurones.

Chalcones and aurones constitute flavonoid subclasses, which display a wide spectrum of biological activities including antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, antibacterial and anti-HIV activities.

A total of 9 compounds were synthesized, of which 5 chalcones and 4 aurones. Among these, 2 chalcones and 3 aurones constitute new compounds, the synthesis of which has not been reported yet in the literature. Subsequently, an attempt was made to biosynthesize sulfuretin using a *Myceliophthora thermophila* laccase.

More specifically, chalcones were synthesized by Claisen-Schmidt condensation and aurones by oxidative cyclization of the corresponding chalcones.

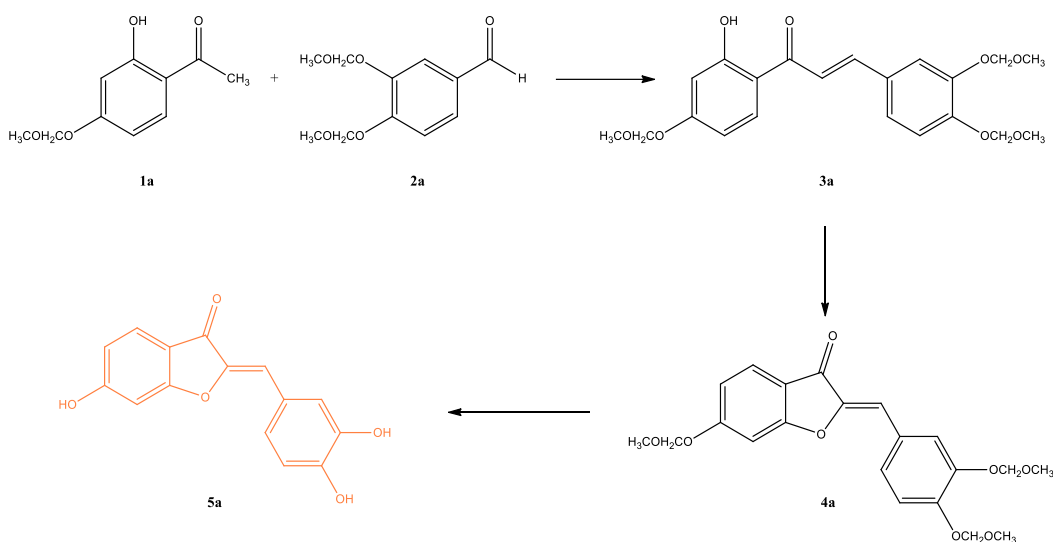


$R_1 = \text{H, OCH}_2\text{OCH}_3, \text{OH}$   
 $R_2 = \text{H, OCH}_3$   
 $R_3 = \text{OCH}_3, \text{OCH}_2\text{OCH}_3, \text{OH}$   
 $R_4 = \text{OCH}_3, \text{OCH}_2\text{OCH}_3, \text{OH}$

$R_5 = \text{H, OCH}_2\text{OCH}_3, \text{OH}$   
 $R_6 = \text{H, OCH}_3, \text{OH}$   
 $R_7 = \text{OCH}_3, \text{OCH}_2\text{OCH}_3, \text{OH}$   
 $R_8 = \text{OCH}_3, \text{OCH}_2\text{OCH}_3, \text{OH}$

*Chemical structure of novel chalcones and aurones*

The compounds were structurally characterized using NMR and ESI-MS spectroscopy.



The novel analogues were studied *in vitro* in order to evaluate their antioxidant and soybean lipoxygenase (LOX) inhibitory activity. The antioxidant activity of the synthesized compounds was evaluated by measuring their free radical DPPH scavenging ability and their lipid peroxidation inhibitory activity, by estimating their ability to scavenge the thermally produced AAPH radical.

2',4',5'-Trihydroxy-aurone (**5b**) exhibited the most potent DPPH scavenging ability, showing 100 % scavenging in 20 and 60 minutes. The sulfuretin precursor, 2',4',3,4-tetrahydroxy-chalcone (**3d**), displayed the second strongest scavenging ability (95.7 % and 95.3 % in 20 and 60 minutes, respectively).

The most potent lipid peroxidation inhibitor was chalcone 2,4,5-trimethoxy-chalcone (**3b**) showing 67.3 % AAPH scavenging. Regarding the group of aurones, sulfuretin **5a** exhibited the highest scavenging activity, with 53.2 % AAPH scavenging.

As for the anti-inflammatory activity, the highest soybean LOX inhibitory activity was displayed by chalcone 2'-hydroxy-4'-methoxymethoxy-2,4,5-trimethoxy-chalcone **3c**, showing  $IC_{50} = 45 \mu M$ , followed by chalcone **3b** with  $IC_{50} = 75 \mu M$ . The newly synthesized aurones did not exhibit any soybean lipoxygenase inhibitory activity.

Finally, it was concluded that sulfuretin **5a** exhibits the most potent combined antioxidant activity, displaying both promising DPPH and AAPH scavenging. Chalcone **3b** showed the most potent combined antioxidant and anti-inflammatory activity, with 67.3 % AAPH scavenging and  $IC_{50} = 75 \mu M$  for LOX inhibition.

**Keywords:** chalcones, aurones, sulfuretin, antioxidant – anti-inflammatory activity

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ κατά το ακαδημαϊκό έτος 2015-2016, υπό την επίβλεψη της Δρ. Αναστασίας Δέτση, Επίκουρης Καθηγήτριας ΕΜΠ.

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επίκουρη Καθηγήτρια Αναστασία Δέτση για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ μαζί της και να ασχοληθώ με τη σύνθεση οργανικών ενώσεων. Την ευχαριστώ βαθύτατα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής. Η διάθεση κι η όρεξη της με έκαναν να παραδειγματιστώ και να αγαπήσω το αντικείμενο της εργασίας μου. Η συμβολή της στη μελλοντική πορεία και τον προσανατολισμό μου είναι καθοριστική κι ανεκτίμητη.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον Καθηγητή ΕΜΠ Φανούριο Ζαννίκο και στον Επίκουρο Καθηγητή ΕΜΠ Ευάγγελο Τόπακα, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή και τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν για την κριτική ανάγνωση της εργασίας μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στην Ανδρομάχη Τζάνη, υποψήφια διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ΕΜΠ, για την καθοδήγηση και την υπομονή της κατά τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας μου. Η υποστήριξή της, ψυχολογική κι επιστημονική, ήταν πάντοτε ουσιαστική και πολύτιμη. Επίσης, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την πρόσχαρη διάθεσή της, η οποία συνέβαλε σημαντικά στην άψογη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τις Ελένη Καβέτσου και Ιωάννα Κωστοπούλου, υποψήφιες διδάκτορες του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ΕΜΠ, που υπήρξαν πάντοτε πρόθυμες να με βοηθήσουν σε οποιοδήποτε «εργαστηριακό αδιέξοδο». Τις ευχαριστώ για τη βοήθειά τους και την καταλυτική συμβολή τους στη δημιουργία φιλικής ατμόσφαιρας.

Ευχαριστώ επίσης την Καθηγήτρια Δήμητρα Χατζηπαύλου-Λίτινα, στον Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτέλειου Πανεπιστήμιου Θεσσαλονίκης, για την διεξαγωγή των *in vitro* βιοδοκιμασιών για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης των νέων συντιθέμενων ενώσεων.

Ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στον Επίκουρο Καθηγητή του ΕΜΠ Ευάγγελο Τόπακα και στην Αναστασία Ζέρβα, υποψήφια διδάκτορα του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας ΕΜΠ, για την ευγενική προσφορά του ενζύμου λακκάσης και την επιστημονική καθοδήγηση κατά τη βιοσύνθεση της σουλφουρετίνης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την κα Ζαμπία Κατσανεβάκη, ΕΕΔΙΠ στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας για τη βοήθειά της κατά τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη στήριξη και την συμπαράστασή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.



## Περιεχόμενα

|  |    |
|--|----|
| Περίληψη .....   | 2  |
| Abstract .....   | 4  |
| Ευχαριστίες .....  | 6  |
| Κατάλογος Σχημάτων .....   | 11 |
| Κατάλογος Πινάκων .....  | 12 |
| Κατάλογος Εικόνων .....  | 13 |
| Εισαγωγή .....   | 14 |
| 1. Θεωρητικό Μέρος .....   | 16 |
| 1.1 Φλαβονοειδή .....  | 16 |
| 1.2 Χαλκόνες .....   | 18 |
| 1.2.1 Γενική εισαγωγή .....  | 18 |
| 1.2.2 Οικολογικός ρόλος χαλκονών στη φύση .....                    | 18 |
| 1.2.3 Δομικά χαρακτηριστικά και σύνθεση χαλκονών .....             | 18 |
| 1.2.4 Βιολογική δράση χαλκονών .....                               | 21 |
| 1.3 Ωρόνες .....   | 35 |
| 1.3.1 Γενική Εισαγωγή .....  | 35 |
| 1.3.2 Οικολογικός ρόλος ωρονών στη φύση .....                      | 35 |
| 1.3.3 Δομικά χαρακτηριστικά ωρονών .....                           | 36 |
| 1.3.4 Βιοσύνθεση και χημική σύνθεση ωρονών .....                   | 36 |
| 1.3.5 Βιολογική δράση ωρονών .....                                 | 39 |
| 1.4 Αντιοξειδωτικά .....   | 44 |
| 1.4.1 Γενική εισαγωγή .....  | 44 |
| 1.4.2 Αντιοξειδωτικά ως δεσμευτές ελεύθερων ριζών .....            | 44 |
| 1.4.3 Δοκιμές εκτίμησης δραστηριότητας αντιοξειδωτικών .....       | 45 |
| 1.5 Αντιφλεγμονώδη .....   | 47 |
| 1.6 Λακκάση .....  | 47 |
| 2. Σχεδιασμός και μέθοδοι σύνθεσης νέων χαλκονών και ωρονών .....  | 49 |
| 2.1 Γενικές μέθοδοι σύνθεσης χαλκονών και ωρονών .....             | 49 |
| 2.2 Γενική μέθοδος προστασίας βενζαλδεϋδών και ακετοφαινονών ..... | 50 |

|   |    |
|---|----|
| 2.3 Γενική μέθοδος σύνθεσης χαλκονών (αντίδραση συμπύκνωσης Claisen-Schmidt)  | 51 |
| 2.3.1 Γενική μέθοδος σύνθεσης χαλκονών με KOH σε αιθανόλη   | 51 |
| 2.3.2 Γενική μέθοδος σύνθεσης χαλκονών με NaH σε διμεθυλοφορμαμίδιο   | 51 |
| 2.4 Γενική μέθοδος αποπροστασίας χαλκονών   | 53 |
| 2.4.1 Γενική μέθοδος αποπροστασίας χαλκονών με HCl 10% v/v σε μεθανόλη  | 53 |
| 2.5 Γενική μέθοδος σύνθεσης ωρονών (Αντίδραση οξειδωτικής κυκλοποίησης)   | 53 |
| 2.6 Γενική μέθοδος αποπροστασίας ωρονών   | 54 |
| 2.6.1 Γενική μέθοδος αποπροστασίας ωρονών με HCl 10% v/v σε μεθανόλη  | 54 |
| 2.6.2 Γενική μέθοδος αποπροστασίας ωρονών με BBr <sub>3</sub> σε ξηρό διχλωρομεθάνιο  | 55 |
| 3. Πειραματικό Μέρος  | 56 |
| 3.1 Όργανα και Συσκευές   | 56 |
| 3.2 Σύνθεση προστατευμένων βενζαλδεϋδών και ακετοφαινονών   | 57 |
| 3.2.1 2-υδροξυ-4-(μεθοξυμεθοξυ)-ακετοφαινόνη ( <b>1a</b> )  | 57 |
| 3.2.2 3,4-δι(μεθοξυμεθοξυ)βενζαλδεϋδη ( <b>2a</b> )   | 58 |
| 3.3 Σύνθεση χαλκονών  | 59 |
| 3.3.1 (E)-3-(3,4-δι(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)-1-(2'-υδροξυ-4'-(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη ( <b>3a</b> )                           | 59 |
| Σύνθεση της (E)-3-(3,4-δι(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)-1-(2'-υδροξυ-4'-(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ) προπ-2-εν-1-όνης ( <b>3a</b> ) με NaH σε dry DMF | 59 |
| 3.3.2 (E)-1-(2'-υδροξυφαινυλο)-3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)προπ-2-εν-όνη ( <b>3b</b> )  | 61 |
| 3.3.3 (E)-1-(2'-υδροξυ-4'-(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)-3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη ( <b>3c</b> )                                | 62 |
| 3.3.4 (E)-1-(2',4'-διυδροξυφαινυλ)-3-(3,4-διυδροξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη ( <b>3d</b> )  | 63 |
| 3.3.5 (E)-1-(2',4'-διυδροξυφαινυλ)-3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη   | 64 |
| 3.4 Σύνθεση ωρονών  | 65 |
| 3.4.1 (Z)-2-(3',4'-δι(μεθοξυμεθοξυ)βενζυλιδενο)-6-(μεθοξυμεθοξυ)βενζοφουραν-3(2H)-όνη ( <b>4a</b> )                                   | 65 |
| 3.4.2 (Z)-2-(2',4',5'-τριμεθοξυβενζυλιδενο)βενζοφουραν-2(2H)-όνη ( <b>4b</b> )  | 66 |
| 3.4.3 (Z)-2-(3',4'-διυδροξυβενζυλιδενο)-6-υδροξυβενζοφουραν-3(2H)-όνη (σουλφουρετίνη) ( <b>5a</b> )                                   | 67 |
| 3.4.4 (Z)-2-(2',4',5'-τριυδροξυβενζυλιδενο)βενζοφουραν-3(2H)-όνη ( <b>5b</b> )  | 69 |

|  |    |
|--|----|
| 3.5 Βιοσύνθεση σουλφουρετίνης ( <b>5a</b> ) με χρήση λακκάσης .....  | 70 |
| 3.6 Μελέτη αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης χαλκονών και ωρονών..   | 71 |
| 3.6.1 Προσδιορισμός της ικανότητας δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH .....   | 71 |
| 3.6.2 Προσδιορισμός της ικανότητας αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH).....   | 71 |
| 3.6.3 Προσδιορισμός της ικανότητας αναστολής του ενζύμου λιποξυγονάσης σόγιας .....  | 72 |
| 4. Πρότυπη ανάλυση φασμάτων <sup>1</sup> H NMR και ESI-MS .....  | 73 |
| 4.1 Φάσματα <sup>1</sup> H NMR .....   | 73 |
| 4.1.1 Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της 3,4-διμεθοξυμεθοξυ-βενζαλδεΐδης ( <b>2a</b> ).....  | 73 |
| 4.1.2 Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της ( <i>E</i> )-3-(3,4-δι(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)-1-(2'-υδροξυ-4'-(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)προπ-2-εν-1-όνης) ( <b>3a</b> ).....   | 74 |
| 4.1.3 Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της ( <i>Z</i> )-2-(3',4'-δι(μεθοξυμεθοξυ)βενζυλιδενο)-6-(μεθοξυμεθοξυ)βενζοφουραν-3(2 <i>H</i> )-όνης) ( <b>4a</b> ) ..... | 75 |
| 4.2 Φάσμα ESI-MS της ( <i>Z</i> )-2-(3',4'-δι(μεθοξυμεθοξυ)βενζυλιδενο)-6-(μεθοξυμεθοξυ)βενζοφουραν-3(2 <i>H</i> )-όνη ( <b>4a</b> ) .....                 | 76 |
| 5. Αποτελέσματα και συζήτηση αποτελεσμάτων .....   | 77 |
| 5.1 Αξιολόγηση βιολογικής δράσης χαλκονών.....   | 80 |
| 5.1.1 Δραστηκότητα χαλκονών εναντίον της ελεύθερης ρίζας DPPH.....   | 82 |
| 5.1.2 In vitro αναστολή του ενζύμου λιποξυγονάσης σόγιας (LOX) (Χαλκόνες) ....   | 82 |
| 5.1.3 Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Χαλκόνες) .....  | 83 |
| 5.1.4 Συνδυαστική βιολογική δράση χαλκονών .....   | 84 |
| 5.2 Αξιολόγηση βιολογικής δράσης ωρονών.....   | 85 |
| 5.2.1 Δραστηκότητα ωρονών εναντίον της ελεύθερης ρίζας DPPH .....  | 87 |
| 5.2.2 In vitro αναστολή του ενζύμου λιποξυγονάσης σόγιας (LOX) (Ωρόνες) .....  | 87 |
| 5.2.3 Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Ωρόνες) .....  | 87 |
| 5.2.4 Συνδυαστική βιολογική δράση ωρονών .....   | 88 |
| 6. Συμπεράσματα .....  | 89 |
| 7. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα .....   | 91 |
| 8. Βιβλιογραφία .....  | 92 |
| 9. Παράρτημα.....  | 95 |

## Κατάλογος Σχημάτων

|  |    |
|--|----|
| Σχήμα 1: Βασικές δομές φλαβονοειδών (1), ισοφλαβονοειδών (2) και νεοφλαβονοειδών (3).....                        | 17 |
| Σχήμα 2: Βασικές δομές ελασσόνων φλαβονοειδών.....   | 17 |
| Σχήμα 3: Γενική δομή χαλκονών.....   | 19 |
| Σχήμα 4:Μηχανισμός σχηματισμού χαλκονών μέσω της μεθόδου Claisen-Schmidt .....                                   | 20 |
| Σχήμα 5: Δομές υβριδίων χαλκονών-κουμαρινών.....   | 22 |
| Σχήμα 6: Δομές χαλκονών 3 και 4.....   | 22 |
| Σχήμα 7: Δομές φερροκενυλο-πυραζόλ-υποκατεστημένων χαλκονών.....   | 23 |
| Σχήμα 8: Δομή χαλκονών με λειτουργικότητες ιμίνης και ανθρακινόνης.....  | 24 |
| Σχήμα 9: Δομή 12 νέων αναλόγων χαλκονών με αντικαρκινικές δράσεις.....   | 24 |
| Σχήμα 10: Δομές χαλκονών με ανθελονοσιακή δράση.....   | 25 |
| Σχήμα 11: Δομή ανθελονοσιακής αλλυλιωμένης χαλκόνης.....   | 26 |
| Σχήμα 12: Δομές αμιδίων χαλκονών με κινολινονικό δακτύλιο.....   | 26 |
| Σχήμα 13: Δομές αναλόγων χαλκονών με αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση....                                  | 27 |
| Σχήμα 14: Δομή α-τριαζολυλ-χαλκόνης με αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση..                                  | 28 |
| Σχήμα 15: Δομές 1-(2',4'-διχλωροφαινυλ)-3-(αρυλ)-2-προπ-εν-1-ονών με αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση..... | 28 |
| Σχήμα 16: Δομές κινολινονών-χαλκονών με αντιπαρασιτική δράση.....  | 29 |
| Σχήμα 17: Δομές χαλκονών με αντιλειψμανιακή δράση.....   | 29 |
| Σχήμα 18: Δομές χαλκονών με αντι-HIV δράση.....  | 30 |
| Σχήμα 19: Δομές αλλυλιωμένων και μη- χαλκονών με αντιοξειδωτική δράση.....                                       | 31 |
| Σχήμα 20: Δομές χαλκονών με -SCH <sub>3</sub> , -CH <sub>3</sub> ομάδες κ.τ.λ. με αντιοξειδωτική δράση...        | 32 |
| Σχήμα 21: Δομές υδροξυ-χαλκονών με αντιοξειδωτική δράση.....   | 32 |
| Σχήμα 22: Δομές 2'-υδροξυχαλκονών με αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση...                                  | 33 |
| Σχήμα 23: Δομές χαλκονών με αντιφλεγμονώδη δράση.....  | 34 |
| Σχήμα 24: Δομές κινολινο-χαλκονών με αντιφλεγμονώδη δράση.....   | 34 |
| Σχήμα 25: Γενική δομή ωρονών.....  | 36 |
| Σχήμα 26: Γενικές βιοσυνθετικές οδοί ωρονών.....   | 37 |
| Σχήμα 27: Μέθοδοι χημικής σύνθεσης ωρονών.....   | 38 |
| Σχήμα 28: Δομές μεθοξυ-ωρονών με αντικαρκινική δράση.....  | 39 |
| Σχήμα 29: Δομή 3',4'-διμεθοξυ-ωρόνης με αντιοξειδωτική δράση.....  | 40 |
| Σχήμα 30: Δομές πολυ-υδροξυωρονών - αναστολείς της τυροσινάσης.....  | 40 |
| Σχήμα 31: Δομές υδροξυλιωμένων ωρονών με αντιϊική δράση.....   | 41 |
| Σχήμα 32: Δομές ωρονών με αντιλειψμανιακή δράση.....   | 41 |
| Σχήμα 33: Δομές αναλόγων σουλφουρετίνης με ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση.....                                      | 42 |
| Σχήμα 34: Δομή ωρόνης με την ισχυρότερη δραστικότητα κατά της νόσου Alzheimer .                                  | 43 |
| Σχήμα 35: Δομή σουλφουρετίνης - μόριο με ισχυρή αντιδιαβητική δράση.....   | 43 |
| Σχήμα 36: Α: Οι δύο δομές συντονισμού της ρίζας DPPH. ....   | 46 |
| Σχήμα 37: Συνοπτική περιγραφή συνθετικών σταδίων.....  | 49 |
| Σχήμα 38: Αντίδραση προστασίας βενζαλδεϋδών/ακετοφαινονών.....   | 50 |

|  |    |
|--|----|
| Σχήμα 39: Αντίδραση σύνθεσης χαλκονών / (i): υδατ. δ/μα KOH 20% w/v, EtOH.....               | 52 |
| Σχήμα 40: Αντίδραση σύνθεσης χαλκονών / (ii): NaH 60% w/w, dry DMF .....                     | 52 |
| Σχήμα 41: Αντίδραση αποπροστασίας χαλκόνης / (iii) : 10% v/v HCl, MeOH.....                  | 53 |
| Σχήμα 42: Αντιδράσεις οξειδωτικής κυκλοποίησης / (iv): Hg(OAc) <sub>2</sub> , πυριδίνη ..... | 54 |
| Σχήμα 43: Αντίδραση αποπροστασίας ωρόνης / (iii) : 10% v/v HCl, MeOH.....                    | 55 |
| Σχήμα 44: Αντίδραση αποπροστασίας ωρόνης / (v) : BBr <sub>3</sub> , dry DCM.....             | 55 |
| Σχήμα 45: Συντακτικός τύπος ακετοφαινόνης <b>1a</b> .....                                    | 57 |
| Σχήμα 46: Συντακτικός τύπος βενζαλδεΐδης <b>2a</b> .....                                     | 58 |
| Σχήμα 47: Συντακτικός τύπος χαλκόνης <b>3a</b> .....   | 59 |
| Σχήμα 48: Συντακτικός τύπος χαλκόνης <b>3b</b> .....   | 61 |
| Σχήμα 49: Συντακτικός τύπος χαλκόνης <b>3c</b> .....   | 62 |
| Σχήμα 50: Συντακτικός τύπος χαλκόνης <b>3d</b> .....   | 63 |
| Σχήμα 51: Συντακτικός τύπος χαλκόνης <b>3e</b> .....   | 64 |
| Σχήμα 52: Συντακτικός τύπος ωρόνης <b>4a</b> .....   | 65 |
| Σχήμα 53: Συντακτικός τύπος ωρόνης <b>4b</b> .....   | 66 |
| Σχήμα 54: Συντακτικός τύπος ωρόνης <b>5a</b> .....   | 67 |
| Σχήμα 55: Συντακτικός τύπος ωρόνης <b>5b</b> .....   | 69 |
| Σχήμα 56: Αντίδραση βιοσύνθεσης σουλφουρετίνης μέσω λακκάσης .....                           | 70 |
| Σχήμα 57: Στάδια ολικής σύνθεσης της φυσικής ωρόνης σουλφουρετίνης <b>5a</b> .....           | 77 |

## Κατάλογος Πινάκων

|  |    |
|--|----|
| Πίνακας 1: Αποτελέσματα βιολογικής δραστηριότητας χαλκονών <b>3a-3d</b> .....            | 80 |
| Πίνακας 2: Βιβλιογραφικά δεδομένα βιολογικών δράσεων χαλκονών <sup>1</sup> .....         | 81 |
| Πίνακας 3: Αποτελέσματα βιολογικής δραστηριότητας ωρονών <b>4a-b</b> & <b>5a-b</b> ..... | 85 |
| Πίνακας 4: Βιβλιογραφικά δεδομένα βιολογικών δράσεων ωρονών <sup>1</sup> .....           | 86 |

## Κατάλογος Εικόνων

|   |     |
|---|-----|
| Εικόνα 1: Βιολογικές δράσεις χαλκονών.....  | 21  |
| Εικόνα 2: (E)-1-(2-υδροξυ-4-(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)-3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη .....  | 63  |
| Εικόνα 3: Σουλφουρετίνη <b>5a</b> .....   | 68  |
| Εικόνα 4: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της βενζαλδεΐδης <b>2a</b> (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....  | 73  |
| Εικόνα 5: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της χαλκόνης <b>3a</b> (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....  | 74  |
| Εικόνα 6: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της ωρόνης <b>4a</b> (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....  | 75  |
| Εικόνα 7: Φάσμα ESI-MS της ωρόνης <b>4a</b> .....   | 76  |
| Εικόνα 8: Σύγκριση φάσματος NMR (MeOD, 300 MHz) σουλφουρετίνης <b>5a</b> σε μεθανόλη με το φάσμα του προϊόντος βιοσύνθεσης σε μεθανόλη..... | 78  |
| Εικόνα 9: Φάσμα ESI-MS προϊόντος βιοσύνθεσης.....   | 79  |
| Εικόνα 10: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της ακετοφαινόνης <b>1a</b> (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....  | 95  |
| Εικόνα 11: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της βενζαλδεΐδης <b>2a</b> (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....   | 95  |
| Εικόνα 12: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της χαλκόνης <b>3a</b> (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....   | 96  |
| Εικόνα 13: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της χαλκόνης <b>3b</b> (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....   | 96  |
| Εικόνα 14: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της χαλκόνης <b>3c</b> (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....   | 97  |
| Εικόνα 15: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της χαλκόνης <b>3d</b> σε μεθανόλη (MeOD, 300 MHz).....   | 97  |
| Εικόνα 16: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της χαλκόνης <b>3d</b> (DMSO, 300 MHz).....   | 98  |
| Εικόνα 17: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της χαλκόνης <b>3e</b> (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....   | 98  |
| Εικόνα 18: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της ωρόνης <b>4a</b> (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....   | 99  |
| Εικόνα 19: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της ωρόνης <b>4b</b> (DMSO, 300 MHz).....   | 99  |
| Εικόνα 20: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της σουλφουρετίνης <b>5a</b> (MeOD, 300 MHz).....   | 100 |
| Εικόνα 21: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της σουλφουρετίνης <b>5a</b> (DMSO, 300 MHz).....   | 100 |
| Εικόνα 22: Σύγκριση φάσματος <sup>1</sup> H NMR (MeOD, 300 MHz) σουλφουρετίνης <b>5a</b> με το φάσμα του προϊόντος βιοσύνθεσης.....         | 101 |
| Εικόνα 23: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της ωρόνης <b>5b</b> (MeOD, 300 MHz).....   | 101 |
| Εικόνα 24: Φάσμα ESI-MS της χαλκόνης <b>3c</b> .....  | 102 |
| Εικόνα 25: Φάσμα ESI-MS της χαλκόνης <b>3d</b> (θετικό).....  | 103 |
| Εικόνα 26: Φάσμα ESI-MS της χαλκόνης <b>3d</b> (αρνητικό).....  | 103 |
| Εικόνα 27: Φάσμα ESI-MS της ωρόνης <b>4a</b> .....  | 104 |
| Εικόνα 28: Φάσμα ESI-MS της σουλφουρετίνης ( <b>5a</b> ) (θετικό).....  | 105 |
| Εικόνα 29: Φάσμα ESI-MS της σουλφουρετίνης ( <b>5a</b> ) (αρνητικό).....  | 105 |
| Εικόνα 30: Φάσμα ESI-MS της ωρόνης <b>5b</b> .....  | 106 |
| Εικόνα 31: Φάσμα ESI-MS προϊόντος βιοσύνθεσης (θετικό).....   | 107 |
| Εικόνα 32: Φάσμα ESI-MS προϊόντος βιοσύνθεσης (αρνητικό).....   | 107 |

## Εισαγωγή

Τα φλαβονοειδή συνιστούν μια κατηγορία φαινολικών ενώσεων που συναντώνται ευρέως στο φυτικό βασίλειο. Ο οικολογικός τους ρόλος περιορίζεται στη διαμόρφωση της φυσιολογίας των φυτών (π.χ. χρώμα ανθών και καρπών) αλλά και στην προστασία του γονιδιώματός τους. Χάρη στην έντονη βιοδραστικότητα που εμφανίζουν, τις τελευταίες δεκαετίες εξετάζονται με ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως ενώσεις με ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του ανθρώπου.

Οι χαλκόνες κι οι ωρόνες αποτελούν υποκατηγορίες των φλαβονοειδών με αντίστοιχη βιολογική δράση. Δεδομένης της ανάγκης για ανάπτυξη πιο ισχυρών και αποτελεσματικών φαρμάκων για τη θεραπεία πολλών θανάσιμων ασθενειών, διερευνώνται σε σημαντικό βαθμό παγκοσμίως οι μέθοδοι σύνθεσης χαλκονών και οι τρόποι απομόνωσης των εν λόγω ενώσεων από φυσικές πηγές όπως τα φυτά. Οι ωρόνες δεν έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό και απαντώνται σπάνια στη φύση. Οι πιο σημαντικές δράσεις των συγκεκριμένων ενώσεων είναι η αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης, αντικαρκινική, αντιβακτηριακή, αντιμικροβιακή, αντιμυκητιακή και αντι-HIV δράση, με πρόσφατες έρευνες να επιδεικνύουν ελπιδοφόρα αποτελέσματα όσον αφορά στην αντιμετώπιση της νόσου Alzheimer και του διαβήτη. Κατά συνέπεια, η έντονη βιοδραστικότητα των χαλκονών κι ωρονών καθιστά τη σύνθεση νέων μορίων και την αξιολόγηση των βιολογικών τους δράσεων φλέγον ερευνητικό θέμα.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση νέων χαλκονών κι ωρονών, συμπεριλαμβανομένης της φυσικής ωρόνης σουλφουρετίνης κι η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής κι αντιφλεγμονώδους δράσης τους. Συντέθηκαν συνολικά 9 νέες ενώσεις, εκ των οποίων 5 χαλκόνες και 4 ωρόνες και μελετήθηκε η βιολογική τους δράση. Η σύνθεση δύο χαλκονών και τριών ωρονών εξ αυτών που συντέθηκαν, συμπεριλαμβανομένης της σουλφουρετίνης, δεν έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Παράλληλα, επιχειρήθηκε η βιοσύνθεση της σουλφουρετίνης με χρήση του ενζύμου λακκάσης του μύκητα *Myceliophthora thermophila*.

Η εργασία χωρίζεται σε τέσσερα βασικά μέρη: το θεωρητικό μέρος, το πειραματικό μέρος, τα αποτελέσματα και συζήτηση αποτελεσμάτων και τα συμπεράσματα. Στο θεωρητικό μέρος γίνεται αναφορά στα φλαβονοειδή κι ιδιαίτερα στις χαλκόνες και τις ωρόνες. Παρουσιάζονται τα δομικά χαρακτηριστικά των ενώσεων, η περιβαλλοντική τους σημασία και πραγματοποιείται εκτενής αναφορά στις βιολογικές δράσεις τους μέσω ανασκόπησης της διεθνούς βιβλιογραφίας. Ακολούθως, παρατίθενται πληροφορίες σχετικά με τα αντιοξειδωτικά και αντιφλεγμονώδη και πιο συγκεκριμένα για τις ευεργετικές τους ιδιότητες για τον άνθρωπο. Τέλος, γίνεται αναφορά στο ένζυμο της λακκάσης και στη συμβολή του σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Ακολουθεί το πειραματικό μέρος στο οποίο αναφέρονται αρχικά τα όργανα κι οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν. Στη συνέχεια, αναλύονται οι μέθοδοι σύνθεσης χαλκονών κι ωρονών και παρατίθεται η σύνθεση της κάθε ένωσης ξεχωριστά. Τα συνθετικά στάδια των χαλκονών και ωρονών κυμαίνονται από ένα έως τέσσερα. Η σύνθεση των χαλκονών επιτυγχάνεται μέσω αντίδρασης συμπύκνωσης τύπου Claisen-Schmidt μεταξύ κατάλληλα

υποκατεστημένων 2-υδροξυ-ακετοφαινονών και βενζαλδεϋδών. Οι χαλκόνες που προκύπτουν από την αντίδραση συμπύκνωσης είναι δυνατόν να οδηγήσουν στις αντίστοιχες ωρόνες μέσω αντίδρασης οξειδωτικής κυκλοποίησης. Τέλος, τα ανάλογα ωρονών που αποτελούν προϊόντα οξειδωτικής κυκλοποίησης υποβάλλονται σε αντίδραση αποπροστασίας, οδηγώντας σε νέα ανάλογα. Επιπλέον, περιγράφεται η πειραματική διαδικασία βιοσύνθεσης της σουλφουρετίνης με χρήση λακκάσης του μύκητα *Myceliophthora thermophila*.

Οι συντιθέμενες χαλκόνες κι ωρόνες αξιολογούνται ως προς την ικανότητά τους να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH, να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξείδωση (μέσω της δέσμευσης της ρίζας AAPH) και να αναστέλλουν τη δράση της λιποξυγονάσης σόγιας (LOX). Τα αποτελέσματα των μελετών παρατίθενται αναλυτικά και γίνεται σχολιασμός της δράσης κάθε κατηγορίας ξεχωριστά καθώς και σύγκριση ανάμεσα στις χαλκόνες και τις ωρόνες με σκοπό την εξαγωγή συμπερασμάτων αναφορικά με τη σχέση δομής – δραστηριότητας των ενώσεων. Επιπλέον, τα αποτελέσματα συγκρίνονται με αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα προηγούμενων ερευνητικών εργασιών του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας.

Τέλος, στα συμπεράσματα, συνοψίζονται οι παρατηρήσεις και τα σχόλια που προέκυψαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ειδικότερα, συμπεραίνεται ότι τα ελπιδοφόρα αποτελέσματα τόσο της σύνθεσης όσο και της ισχυρής βιοδραστηριότητας των ενώσεων, συνιστούν την περαιτέρω έρευνα με σκοπό την ενδεχόμενη αξιοποίησή τους σε φαρμακευτικές εφαρμογές.



# 1. Θεωρητικό Μέρος

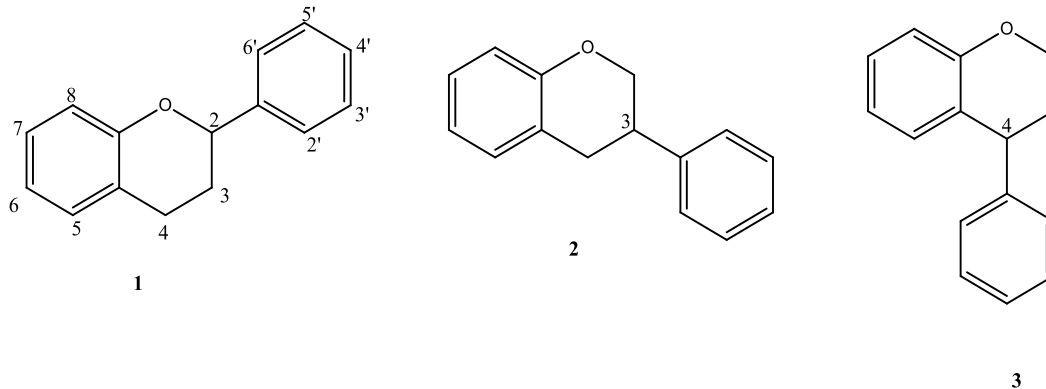
## 1.1 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν μία κατηγορία φαινολικών ενώσεων που απαντώνται ευρέως στο φυτικό βασίλειο. Διαδραματίζουν καταλυτικό ρόλο στη φυσιολογία των φυτών, δεδομένου ότι έχουν κεντρική θέση στη σύνθεση σημαντικών ουσιών, όπως είναι τα εικοσανοειδή, αλλά και στην προστασία του γονιδιώματος του φυτού, εξασφαλίζοντας έτσι την ακέραια μεταβίβαση της γενετικής πληροφορίας. Χαρακτηριστικό των φλαβονοειδών είναι ότι συνιστούν έγχρωμες ενώσεις και είναι υπεύθυνες για το χρώμα των ανθών και καρπών πολλών φυτών. Η χρωστική ικανότητα των συγκεκριμένων ενώσεων έγινε νωρίς αντιληπτή από τον άνθρωπο, με αποτέλεσμα τη χρησιμοποίησή τους ως χρωστικές. Εκτός των παραπάνω ιδιοτήτων τα φλαβονοειδή εμφανίζουν έντονη βιοδραστικότητα και κατά συνέπεια τις τελευταίες δεκαετίες εξετάζονται με ιδιαίτερη προσοχή ως ενώσεις με ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του ανθρώπου. Οι σημαντικότερες βιολογικές δράσεις των φλαβονοειδών που έχουν μέχρι σήμερα μελετηθεί και αναγνωρισθεί πειραματικά είναι η αντιφλεγμονώδης, η καρδιοπροστατευτική, η αντιελκώδης, η αντικαρκινική, η αντιθρομβωτική, η αντιοξειδωτική, η αντιαλλεργική, η αντιϊική δράση και η συμβολή τους στη θεραπεία του καταρράκτη και του HIV. <sup>1,2</sup>

Γενικά τα μόρια των φλαβονοειδών αποτελούνται από 15 άτομα άνθρακα και περιέχουν δύο αρωματικούς δακτυλίους με έξι άτομα άνθρακα (δακτύλιοι A και B) οι οποίοι συνδέονται με μία γέφυρα τριών ανθράκων  $C_6 - C_3 - C_6$ , εμφανίζουν με άλλα λόγια φαινυλβενζοπυρανική λειτουργικότητα (phenylbenzopyran functionality). Αναλόγως τη θέση σύνδεσης του αρωματικού δακτυλίου στο βενζοπυρανικό δακτύλιο, τα φυσικά αυτά προϊόντα είναι δυνατόν να ταξινομηθούν στις εξής κατηγορίες (Σχήμα 1):

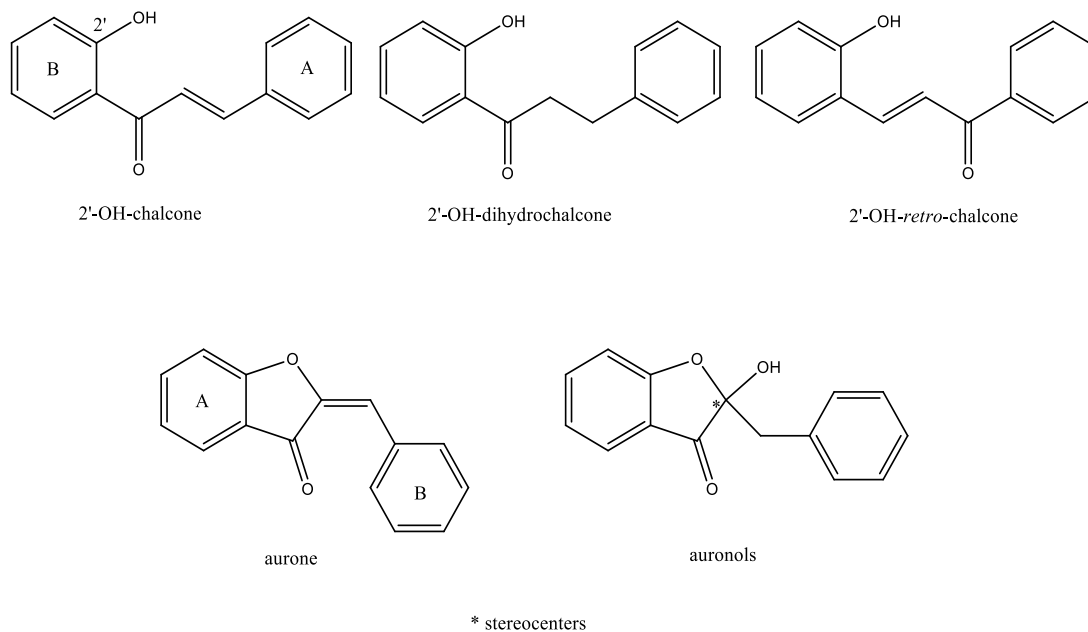
1. τα φλαβονοειδή (2-φαινυλβενζοπυράνια)
2. τα ισοφλαβονοειδή (3-βενζοπυράνια)
3. τα νεοφλαβονοειδή (4-βενζοπυράνια)

Συνήθως, οι συγκεκριμένες ομάδες μοιράζονται μία κοινή πρόδρομη χαλκόνη και συνεπώς είναι βιογενετικά και δομικά συγγενείς.



Σχήμα 1: Βασικές δομές φλαβονοειδών (1), ισοφλαβονοειδών (2) και νεοφλαβονοειδών (3)

Τα ελάσσονα φλαβονοειδή είναι δυνατόν να συγκροτήσουν μία επιπρόσθετη κατηγορία πέρα των τριών ανωτέρω κατηγοριών. Στην κατηγορία των ελασσόνων φλαβονοειδών ανήκουν οι χαλκόνες κι οι ωρόνες, οι οποίες αποτελούν κι αυτές φυσικά προϊόντα και σχηματίζουν επίσης γέφυρα τριών ανθράκων  $C_6 - C_3 - C_6$ . Οι 2'-υδροξυχαλκόνες (2'-hydroxychalcones), οι 2'-OH-διυδροχαλκόνες (2'-OH-dihydrochalcones), οι 2'-OH-ρετρο-χαλκόνες (2'-OH-retro-chalcone), οι ωρόνες (2-βενζυλιδενοκουμαρανόνες) (aurones) και οι ωρονόλες (auronols) συνιστούν ενώσεις της συγκεκριμένης κατηγορίας φλαβονοειδών (Σχήμα 2).<sup>3</sup>



Σχήμα 2: Βασικές δομές ελασσόνων φλαβονοειδών

## 1.2 Χαλκόνες

### 1.2.1 Γενική εισαγωγή

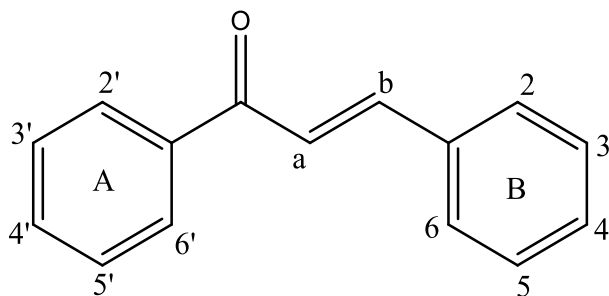
Οι χαλκόνες, φυσικά και συνθετικά μόρια, είναι σημαντικά μέλη μιας μεγάλης ομάδας βιολογικά ενεργών μορίων. Με σκοπό την ανάπτυξη πιο ισχυρών και πιο αποτελεσματικών φαρμάκων για τη θεραπεία πολλών θανάσιμων ασθενειών διερευνώνται σε μεγάλο βαθμό παγκοσμίως οι μέθοδοι σύνθεσης και οι τρόποι απομόνωσης των χαλκονών από φυσικές πηγές όπως τα φυτά. Τα τελευταία χρόνια, έχει δημοσιευτεί ικανός αριθμός ερευνητικών εργασιών, στις οποίες τονίζεται η σημασία των χαλκονών για την αντιμετώπιση ασθενειών όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, το HIV, η φυματίωση, η ελονοσία κ.ά. <sup>4</sup>

### 1.2.2 Οικολογικός ρόλος χαλκονών στη φύση

Πέραν της βιοσυνθετικής τους σημασίας, οι χαλκόνες διαδραματίζουν οικολογικό ρόλο αναφορικά με το χρώμα των φυτών. Οι συγκεκριμένες ενώσεις, που συνήθως έχουν έντονο κίτρινο χρώμα, βρίσκονται σε πολλά μέρη του φυτού, αλλά εμφανίζονται περισσότερο στα άνθη. Τα περισσότερα λουλούδια με κίτρινα άνθη, οφείλουν το χρώμα τους στην παρουσία καρετονοειδών, αλλά στην περίπτωση ορισμένων μελών αστεροειδών ή σύνθετων, οξαλιδών, χοιραδιοειδών, γεσνεριοειδών, ακανθοειδών και λειριοειδών, οι χαλκόνες συμβάλλουν σημαντικά στη χρώση της στεφάνης του άνθους. <sup>2</sup>

### 1.2.3 Δομικά χαρακτηριστικά και σύνθεση χαλκονών

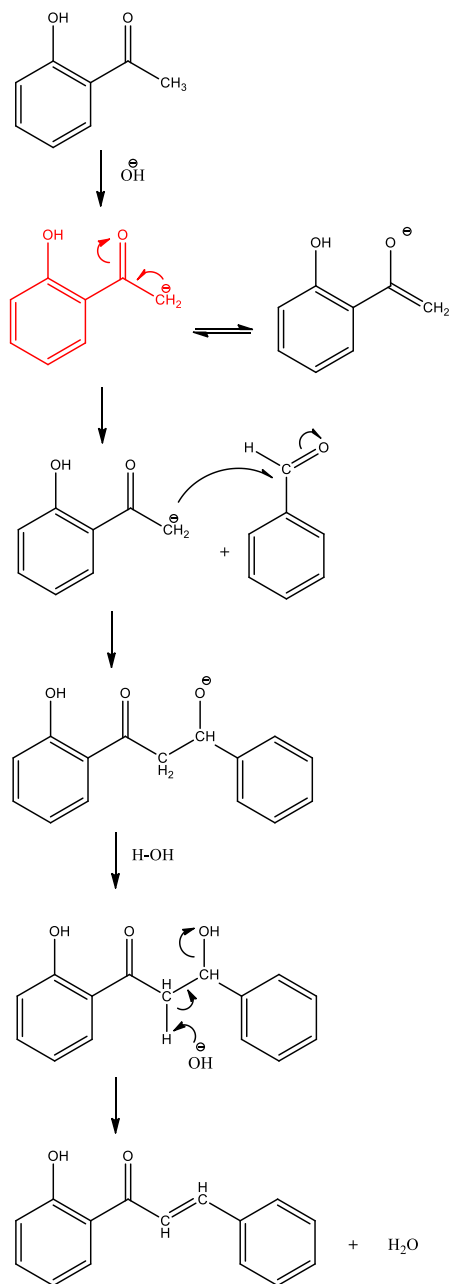
Οι χαλκόνες αποτελούν φλαβονοειδή ανοιχτής αλυσίδας στην οποία οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι συνδέονται με ένα α,β-ακόρεστο καρβονυλικό σύστημα τριών ανθράκων. Θεμελιωδώς είναι δυνατόν να θεωρηθούν παράγωγα φαινυλ-στερυλ-κετονών. Οι χαλκόνες που απαντώνται στη φύση είναι όλες υδροξυλιωμένες, άλλες σε μεγαλύτερο κι άλλες σε μικρότερο βαθμό. Εκτός από την υδροξυ-ομάδα, οι φυσικές χαλκόνες είναι δυνατόν να περιέχουν μεθοξυ-, πρενυλο-, και μεθυλο- ομάδες ως υποκαταστάτες στους δακτυλίους Α και Β. Όσον αφορά στην αρίθμηση των θέσεων υποκατάστασης στον πυρήνα της χαλκόνης, στον Α-δακτύλιο οι θέσεις αριθμούνται 2'-6' και στο Β-δακτύλιο αριθμούνται 2-6. (Σχήμα 3) (Η ονομασία των ενώσεων στην παρούσα εργασία θα γίνει κατά IUPAC.) <sup>2</sup>



Σχήμα 3: Γενική δομή χαλκονών

Τα μόρια τείνουν να εμφανίζουν τόσο cis- όσο και trans- δομές και μπορούν να κυκλοποιηθούν εύκολα προς σχηματισμό φλαβονών μέσω Michael προσθήκης.

Σχετικά με τη σύνθεση των χαλκονών έχουν αναφερθεί πολλές συνθετικές οδοί, με βασική τη γενική μέθοδο σύνθεσης μέσω αντιδράσεων συμπύκνωσης Claisen-Schmidt (Σχήμα 4) υπό ομοιογενείς συνθήκες παρουσία οξέος ή βάσης. Γενικά, για τη σύνθεσή τους έχουν χρησιμοποιηθεί ισχυρά αλκαλικά μέσα, όπως φυσικά φωσφορικά,  $Ba(OH)_2$ ,  $KOH$ ,  $NaOH$  κ.ά., όπως επίσης και οξέα συμπεριλαμβανομένων του p-τολουόλο-σουλφονικού οξέος,  $AlCl_3$ ,  $BF_3$ ,  $RuCl_3$  και ξηρού  $HCl$ .<sup>4</sup>



Απόσπαση όξινου Η της ακετοφαινόνης από το  $\text{HO}^-$  και σχηματισμός **ενολικού ιόντος**

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

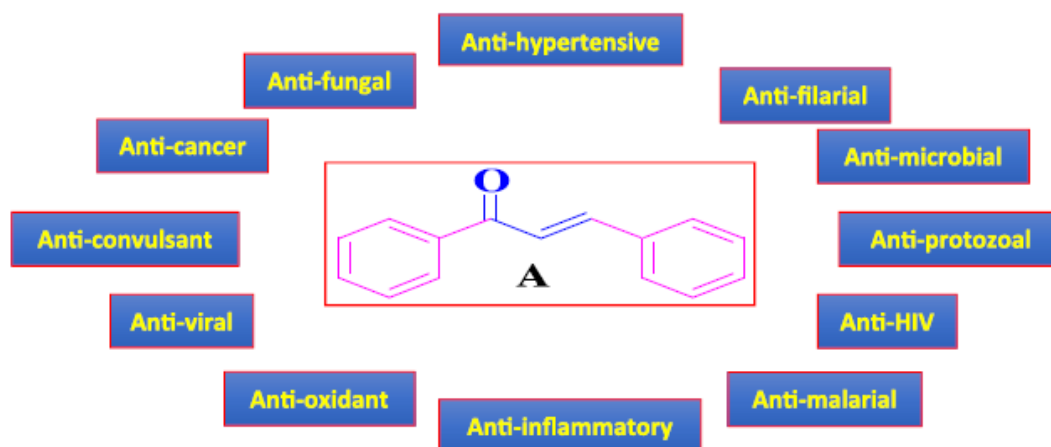
Αντίδραση οξέος - βάσεως και σχηματισμός του προϊόντος αλδολικής συμπύκνωσης

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

Σχήμα 4: Μηχανισμός σχηματισμού χαλκονών μέσω της μεθόδου Claisen-Schmidt

## 1.2.4 Βιολογική δράση χαλκονών

Οι χαλκόνες πιστεύεται ότι οφείλουν τη βιολογική τους δράση στην παρουσία του διπλού δεσμού σε συνδυασμό με την λειτουργικότητα της καρβονυλικής ομάδας, αφού η απομάκρυνση της συγκεκριμένης λειτουργικότητας καθιστά τα μόρια ανενεργά.<sup>4</sup>



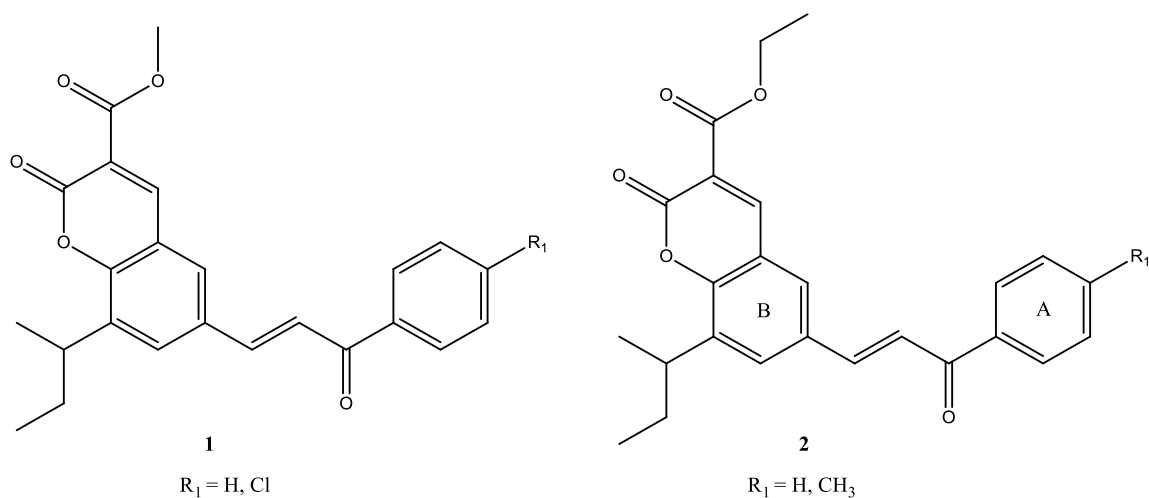
Εικόνα 1: Βιολογικές δράσεις χαλκονών

### Αντικαρκινική δράση

Ο καρκίνος αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως. Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες, ο αριθμός των ασθενών που έχουν διαγνωστεί με διαφορετικούς τύπους καρκίνου έχει σχεδόν διπλασιαστεί και αναμένεται να αυξηθεί ακόμα περισσότερο εάν δεν αναπτυχθούν αποτελεσματικές μέθοδοι θεραπείας. Παρόλο που τη σημερινή εποχή υπάρχουν διαθέσιμες μέθοδοι θεραπείας του καρκίνου, η περιορισμένη επιτυχημένη χρήση και οι παρενέργειές τους ωθούν τους ερευνητές στην ανάπτυξη νέων, ασφαλέστερων και επιλεκτικών (για κάθε περίπτωση καρκίνου) αντικαρκινικών παραγόντων. Η παρουσία παραγώγων χαλκονών ως κύριο συστατικό, είτε ως υποκαταστάτες σε βιοδραστικές ενώσεις αποτελεί έρεισμα για τη σύνθεση νέων ενώσεων με στόχο την αντιμετώπιση του καρκίνου. Την τελευταία πενταετία έχουν συντεθεί πολλά μόρια τα οποία εμφανίζουν ελπιδοφόρα αποτελέσματα.

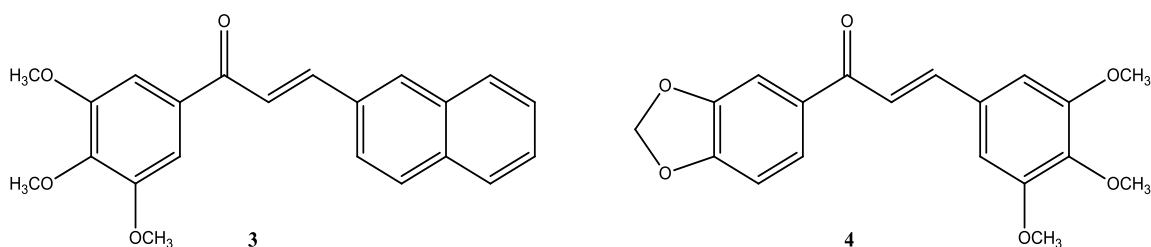
Γενικά, έχει παρατηρηθεί ότι τα μόρια που περιέχουν δύο φαρμακοφόρες ουσίες εμφανίζουν πολύ αξιολογες ιδιότητες αναφορικά με την αντιμετώπιση του καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα, η ερευνητική ομάδα του Sashidhara συνέθεσε και αξιολόγησε *in vitro* την δράση μιας σειράς υβριδίων χαλκονών-κουμαρινών ενάντια σε τέσσερις σειρές κυττάρων

ανθρώπινων καρκινωμάτων, KB (στοματικό καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων), C33A (καρκίνωμα του τραχήλου), MCF-7 (αδενοκαρκίνωμα μαστού), A549 (καρκίνωμα πνεύμονα) και μια σειρά φυσιολογικών ινοβλαστών (NIH3T3). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι δύο ενώσεις (**1** και **2**) (Σχήμα 5) εμφάνισαν ικανοποιητική δράση ενάντια σε όλες τις σειρές κυττάρων με ιδιαίτερα ικανοποιητικά αποτελέσματα κατά του καρκινώματος του τραχήλου (C33A). Η ένωση που περιέχει μεθυλ-ομάδα (-CH<sub>3</sub>) (**2**) επέδειξε τη μεγαλύτερη δραστηριότητα κατά του καρκινώματος του τραχήλου. Η παρουσία της λειτουργικότητας του εστέρα, κι ιδιαίτερα του μεθυλ-εστέρα στη θέση 3 και του κουμαρινικού δακτυλίου θεωρείται ότι διαδραματίζουν πολύ καθοριστικό ρόλο στην αντικαρκινική δράση των εν λόγω ενώσεων.<sup>4,5</sup>



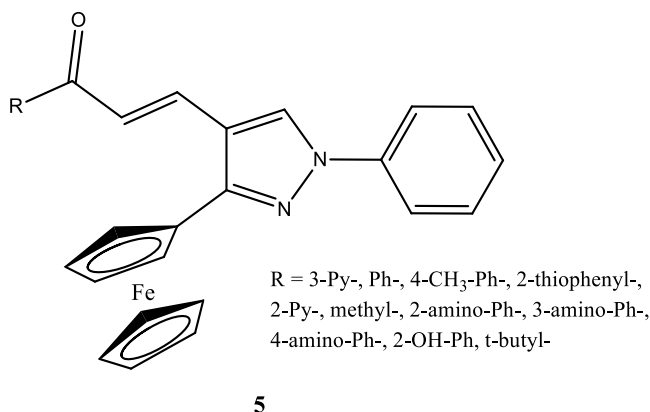
Σχήμα 5: Δομές υβριδίων χαλκονών-κουμαρινών

Η ερευνητική ομάδα του Salum, βασιζόμενη σε προβλέψεις μοντελοποιήσεων, συνέθεσε δύο σύνολα χαλκονών με δομικά χαρακτηριστικά κολχικίνης και εξέτασε την ικανότητα αναστολής της πρόσδεσης της τουμπουλίνης (κυτταροπλασματική πρωτεΐνη) και την κυτταροτοξικότητα σε L1210 (κύτταρα ποντικών οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας). Παρατηρήθηκε ότι η ένωση που περιέχει τρι-μεθοξυ-φαινυλο-δακτύλιο δίπλα στην καρβονυλομάδα (**3**) ήταν η πιο δραστική και στις δύο δοκιμασίες, ενώ η παρουσία παρόμοιας δραστηριότητας στο B-δακτύλιο (**4**) (Σχήμα 6) δεν είχε παρόμοια αποτελέσματα.<sup>4,6</sup>



Σχήμα 6: Δομές χαλκονών 3 και 4

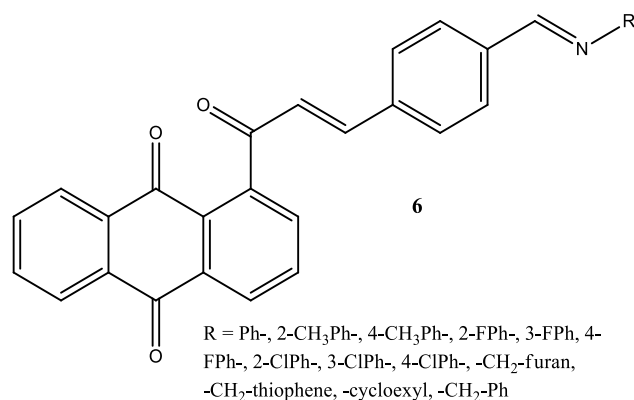
Κατά τους Ratkovic et al. επετεύχθη η σύνθεση φερροκενυλο-πυραζόλ-υποκατεστημένων παραγώγων χαλκονών και αξιολογήθηκε η αντι-πολλαπλασιαστική ικανότητα των ενώσεων σε τρεις κυτταρικές σειρές, συμπεριλαμβανομένων του αδενοκαρκινώματος του τραχήλου της μήτρας (HeLa), του μελανώματος Fem-x και μυελογενούς λευχαιμίας K562. Η πιο σημαντική κυτταροτοξικότητα παρατηρήθηκε για την ένωση που φέρει 3-πυριδυλ-ομάδα (**5**) (Σχήμα 7) και για όλες τις περιπτώσεις καρκίνου.<sup>4,7</sup>



Σχήμα 7: Δομές φερροκενυλο-πυραζόλ-υποκατεστημένων χαλκονών

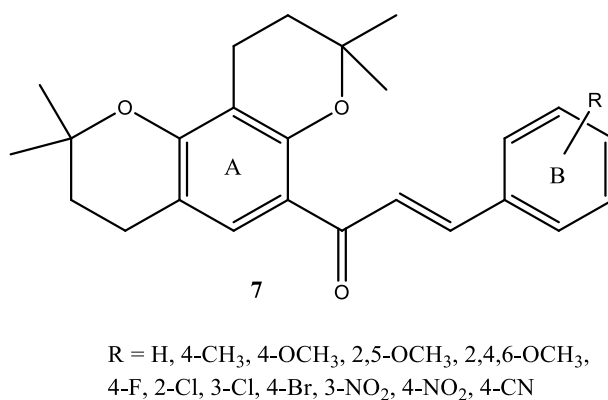
Η ερευνητική ομάδα του Kolundzija συνέθεσε ανάλογα χαλκονών που φέρουν λειτουργικότητες μίνης και ανθρακίνης και εξέτασε τη δραστηριότητά τους ενάντια σε HeLa καρκίνωμα ανθρώπινου παχέος εντέρου (LS174) και μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα (A549). Η ένωση **6**, η οποία φέρει φουρανικό δακτύλιο που είναι συνδεδεμένος με την ιμινο-ομάδα, βρέθηκε ότι είναι πιο δραστική ενάντια σε όλες τις εξετασθείσες περιπτώσεις καρκίνου. Η παρουσία ηλεκτρονιοδοτών υποκαταστατών (-Cl, -CF<sub>3</sub>) κι ιδιαίτερα σε μέτα- θέσεις θεωρείται υπεύθυνη για την κυτταροτοξική δραστηριότητα ενάντια στα HeLa κύτταρα. Επίσης, δοκιμάστηκαν παρόμοιες ενώσεις ενάντια σε σειρά κυττάρων ανθρώπινων ινοβλαστών εμβρυϊκού πνεύμονα (MRC5) και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ένωση **6** (Σχήμα 8) η οποία φέρει την 3-χλωρο-φαινυλ-ομάδα είχε την ισχυρότερη αντι-αγγειογενετική δράση.<sup>4,8</sup>





Σχήμα 8: Δομή χαλκονών με λειτουργικότητες μίνης και ανθρακινόνης

Ο Murthy κι οι συνεργάτες του συνέθεσαν δώδεκα νέα ανάλογα χαλκονών (**7**) (Σχήμα 9) και αξιολόγησαν τη βιολογική τους δράση έναντι επτά ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών: καρκίνου του προστάτη (PC-3), καρκίνου του μαστού (MCF-7), ανθρώπινης λευχαιμίας (HL-60), καρκίνου του παγκρέατος (MIAPaCa-2 και AsPC), μελάνωμα (MDA-MB-431) και καρκίνου του παχέος εντέρου (Caco-2). Η πλειοψηφία των ενώσεων εμφάνισε κυτταροτοξικότητα έναντι όλων των τύπων καρκίνου σε μικρές συγκεντρώσεις (της τάξεως των mM). Τρεις ενώσεις, οι οποίες φέρουν ομάδες ηλεκτρονιοδοτών (3-NO<sub>2</sub>, 4-NO<sub>2</sub> και 4-CN) στο B-δακτύλιο των χαλκονών, επέδειξαν ισχυρή δραστηριότητα έναντι στη σειρά HL-60 της ανθρώπινης λευχαιμίας.<sup>4,9</sup>

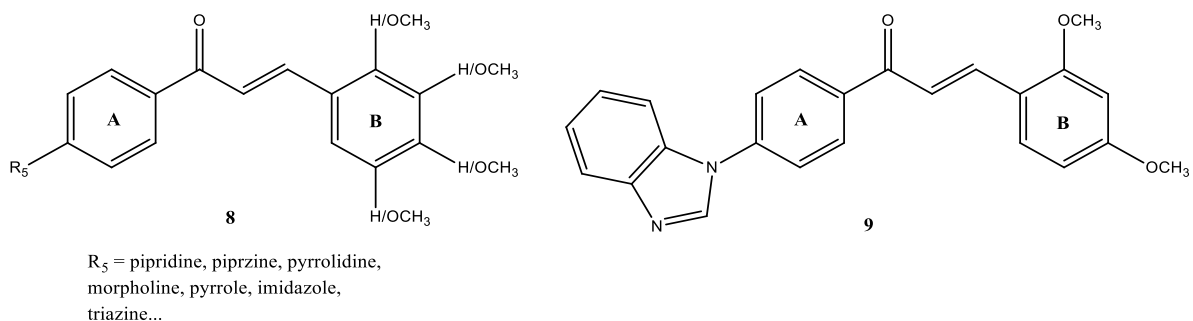


Σχήμα 9: Δομή 12 νέων αναλόγων χαλκονών με αντικαρκινικές δράσεις

## Ανθελονοσιακή δράση

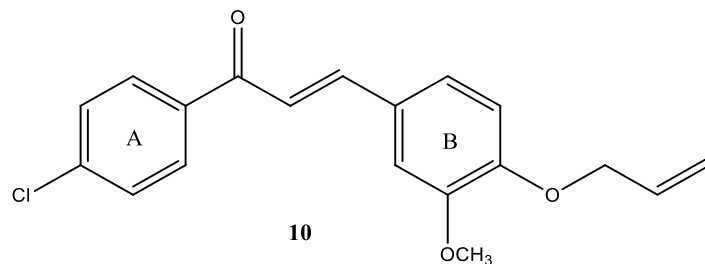
Η ελονοσία είναι ασθένεια η οποία προκαλείται από πρωτοζωϊκά παράσιτα του γένους *Plasmodium*. Ιδίως σε τροπικές χώρες αποτελεί σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας. Σύμφωνα με την έρευνα WHO (World Health Survey), περισσότεροι από 3 δισεκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως έχουν νοσήσει από τη συγκεκριμένη ασθένεια. Ο μεγάλος αριθμός ασθενών οφείλεται κυρίως στην αυξανόμενη αντοχή των παρασίτων στα φάρμακα που διατίθενται για την καταπολέμηση της ασθένειας. Συνεπώς, θεωρείται υψίστης σημασίας η ανάπτυξη νέων και πιο αποτελεσματικών φαρμάκων κατά της ελονοσίας. Ο Chen κι οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν την αξιολόγηση ανθελονοσιακή δράση των χαλκονών το 1994, όταν και απέδειξαν την δράση της λικοχαλκόνης A (Licochalcone A).<sup>4,10</sup>

Ο Yadav κι οι συνεργάτες του συνέθεσαν 27 νέα ανάλογα χαλκονών (**8**) (Σχήμα 10) και αξιολόγησαν *in vitro* την δράση τους κατά της ελονοσίας. Οι ενώσεις που φέρουν μεθοξυομάδες (-OCH<sub>3</sub>) στη θέση 2 και 4 του δακτυλίου B επέδειξαν καλή δραστηριότητα, ενώ παρόμοιες ομάδες στις θέσεις 3,4 και 5 εμφάνισαν λιγότερο ικανοποιητικά αποτελέσματα, πιθανόν λόγω της στερεοχημικής παρεμπόδισης του ενεργού κέντρου του ενζύμου πρωτεάση κυστεΐνης. Η ένωση 1-(4-βενζιμιδαζολ-1-υλ-φαινυλ)-3-(2,4-διμεθοξυφαινυλ-προπεν-1-όνη) (**9**) (Σχήμα 10) παρουσίασε την καλύτερη δραστηριότητα κατά της ελονοσίας.<sup>4,11</sup>



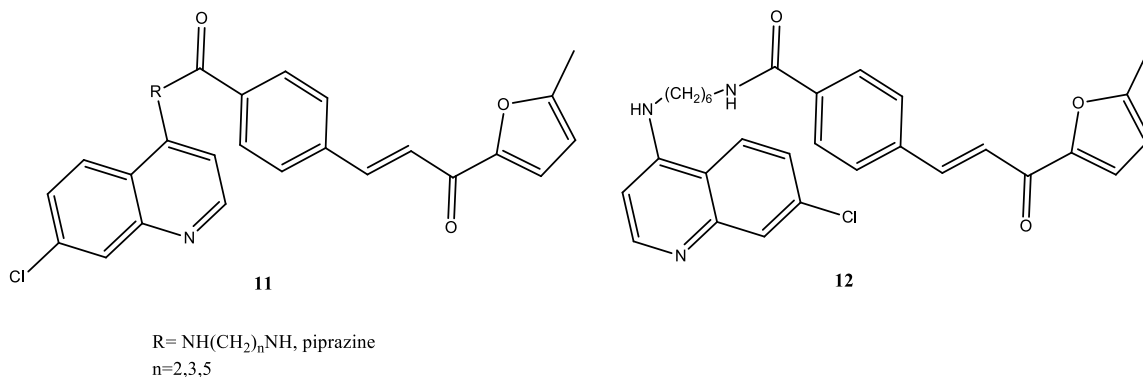
Σχήμα 10: Δομές χαλκονών με ανθελονοσιακή δράση

Η ερευνητική ομάδα της Sharma συνέθεσε και αξιολόγησε *in vitro* την ανθελονοσιακή δράση μιας σειράς αλλυλιωμένων χαλκονών έναντι δύο στελεχών (CQ-Pf3D7 και CQ-PfINDO) του *Plasmodium falciparum*. Οχτώ από τα συνολικά μόρια που συντέθηκαν επέδειξαν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η ένωση **10** (Σχήμα 11) η οποία φέρει -Cl (θέση 4 του A δακτυλίου), -allyoxy (θέση 4) και -OCH<sub>3</sub> (θέση 5 του δακτυλίου B) εμφάνισε την πιο υψηλή δραστηριότητα έναντι στο στέλεχος Pf3D7.<sup>4,12</sup>



Σχήμα 11: Δομή ανθελονοσιακής αλληλωμένης χαλκόνης

Ο Smit και η ερευνητική του ομάδα συνέθεσαν αμίδια χαλκονών τα οποία περιέχουν κινολινονικό δακτύλιο **11** (Σχήμα 12) και αξιολογήθηκαν *in vitro* ως προς τη δράση τους κατά των στελεχών CQ-ευαίσθητων (3D7) (ευαίσθητα στη χλωροκίνη) και CQ-ανθεκτικών (W2) (ανθεκτικά στη χλωροκίνη) του *P. falciparum* και της κυτταροτοξικότητας κατά του φυσιολογικού ινοβλαστού ανθρώπινου εμβρυϊκού πνεύμονα (WI-38) (Σχήμα 12). Όλα τα μόρια επέδειξαν ανθελονοσιακή δράση ενάντια και στα δύο εξεταζόμενα στελέχη. Παρά το γεγονός ότι είναι δυσδιάλυτη στο νερό, η ένωση που φέρει συνδέτη 1,6-διαμινοεξάνιο (**12**) (Σχήμα 12) αποδείχτηκε ότι αποτελεί το πιο ισχυρό και επιλεκτικό ανθελονοσιακό παράγωγο από τα μόρια που συντέθηκαν.<sup>4,13</sup>

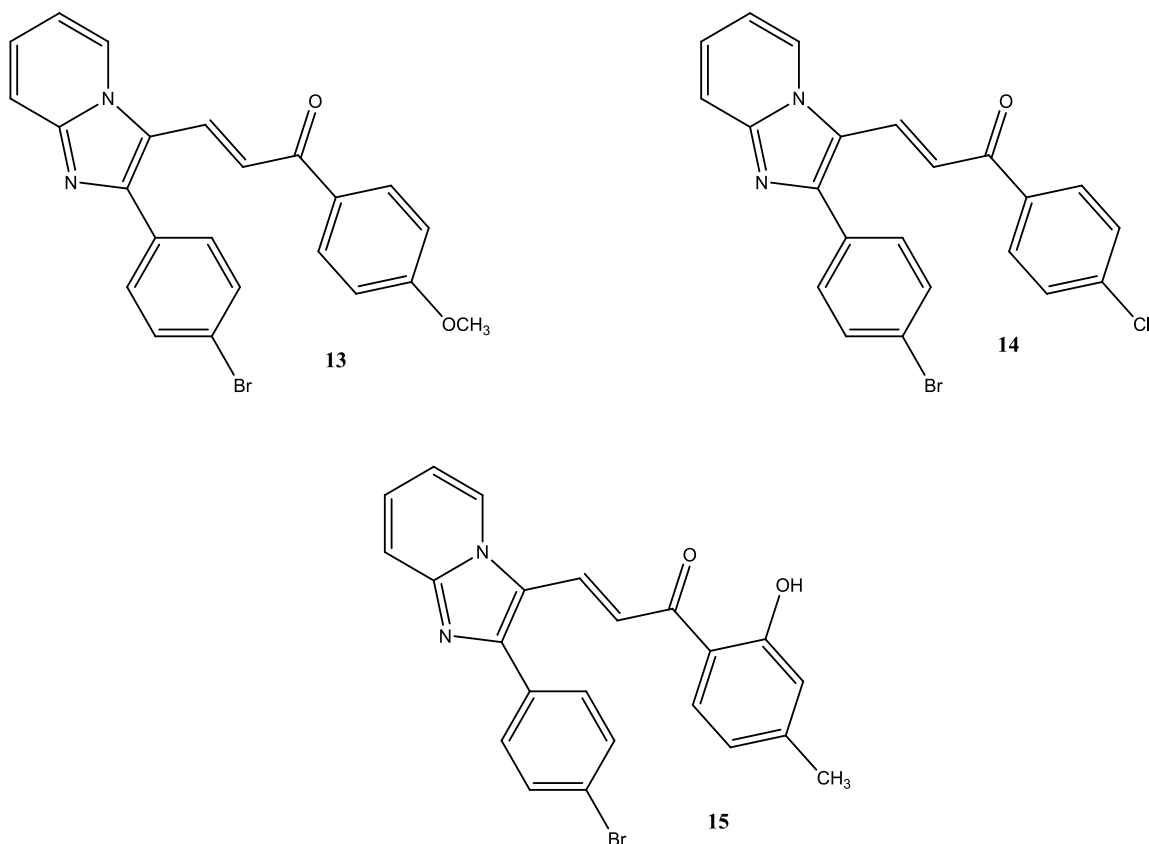


Σχήμα 12: Δομές αμιδίων χαλκονών με κινολινονικό δακτύλιο

### Αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση

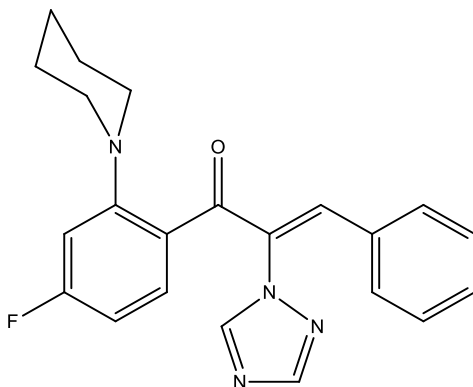
Η αντοχή των μικροβίων σε φάρμακα με πολλαπλές δράσεις αποτελεί μία από τις κυριότερες αιτίες για την ανησυχητική αύξηση των μολυσματικών ασθενειών ανά τον κόσμο. Συνεπώς, η ανακάλυψη νέων φαρμάκων με ισχυρή αντιμικροβιακή δράση, και ιδιαίτερος έναντι σε ανθεκτικά στελέχη, είναι αναγκαία. Αρκετές πρόσφατες δημοσιεύσεις επιδεικνύουν την σημαντικότητα των χαλκονών ως αντιμικροβιακοί παράγοντες.

Ο Bhale κι η ομάδα του συνέθεσαν κι εξέτασαν in vitro ανάλογα χαλκονών ως προς την αντιμικροβιακή τους (*Bacillus coccus*, *Staphylococcus aureus*, *Aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*) και την αντιμυκητιακή (*Aspergillus niger*) τους δραστηριότητα χρησιμοποιώντας τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ. Από τα μόρια που συντέθηκαν, οι ενώσεις **13** και **14** (Σχήμα 13) παρουσίασαν την υψηλότερη δραστηριότητα έναντι του *Aerogenes* και *S. Aureus*, ενώ η ένωση **15** ήταν η πιο δραστική έναντι του *B. Coccus* και *A. niger*.<sup>4,14</sup>



Σχήμα 13: Δομές αναλόγων χαλκονών με αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση

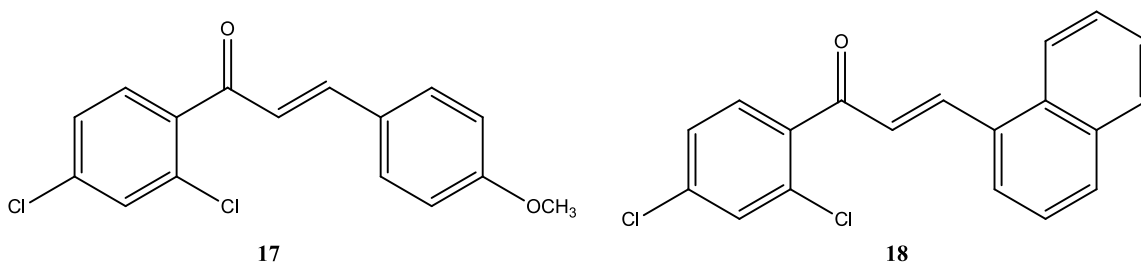
Η ερευνητική ομάδα του Ben-Tao Yin συνέθεσε και αξιολόγησε τη δράση α-τριαζολυλ-χαλκονών έναντι μιας σειράς βακτηριακών στελεχών (*MRSA*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Bacillus typhi*, *P. aeruginosa*, *Bacillus proteus*) και στελεχών μυκήτων (*Candida albicans*, *Candida mycoderma*). Το πιο δραστικό μόριο **16** (Σχήμα 14) εμφάνισε τη μέγιστη δραστηριότητα ενάντια στα στελέχη *MRSA*, *M. luteus* και *C. mycoderma* και τα αποτελέσματα ήταν συγκρίσιμα έως και καλύτερα από τα ήδη εφαρμόσιμα φάρμακα (*Chloromycin*, *Norfloxacin* και *Fluconazole*).<sup>4,15</sup>



16

Σχήμα 14: Δομή α-τριαζολυλ-χαλκόνης με αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση

Ο Mohammad και οι συνεργάτες του συνέθεσαν 1-(2',4'-διχλωροφαινυλ)-3-(αρυλ)-2-προπεν-1-όνες μέσω αντιδράσεων συμπύκνωσης Claisen-Schmidt και εξέτασαν τις ενώσεις ως προς την αντιμικροβιακή τους δράση με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ. Γενικά, τα μόρια που φέρουν ομάδες ηλεκτρονιοδοτών (μεθυλο-, ναφθυλο- ομάδες) επέδειξαν καλύτερη αντιμικροβιακή δράση. Η ένωση **17** (Σχήμα 15) εμφάνισε καλύτερη δράση έναντι της *E. coli* και ακολούθως έναντι του *B. subtilis* και του *Bacillus pumilis*. Η ένωση **18** (Σχήμα 15) η οποία φέρει ναφθυλο-ομάδα παρουσίασε τη μεγαλύτερη αντιμυκητιακή δραστηριότητα έναντι στον *A. niger*.<sup>4</sup>



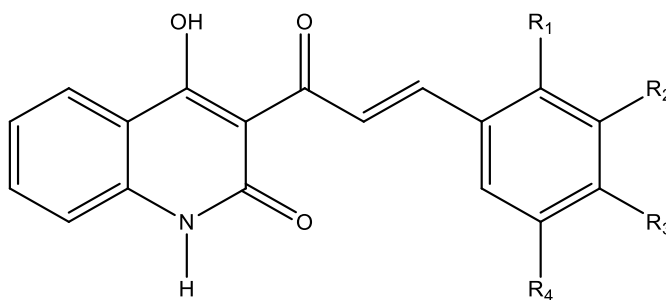
Σχήμα 15: Δομές 1-(2',4'-διχλωροφαινυλ)-3-(αρυλ)-2-προπεν-1-ονών με αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση

#### Αντιπαρασιτική δράση

Ασθένειες που προκαλούνται από πρωτοζωϊκά παράσιτα, τα οποία ανήκουν στα γένη *Trypanosoma* και *Leishmania*, είναι υπεύθυνες κάθε χρόνο για υψηλή θνησιμότητα και νοσηρότητα ασθενών και ιδιαίτερα σε χώρες χαμηλού βιοτικού επιπέδου. Τα φάρμακα αποτελούν τη μόνη λύση στην αντιμετώπιση των εν λόγω ασθενειών καθώς δεν υπάρχει άμεση δυνατότητα εφαρμογής εμβολιακής θεραπείας. Δύο κατηγορίες ενώσεων που

εμφανίζουν ελπιδοφόρα αποτελέσματα όσον αφορά στην αντιπαρασιτική τους δράση είναι οι χαλκόνες κι οι κινολινόνες.

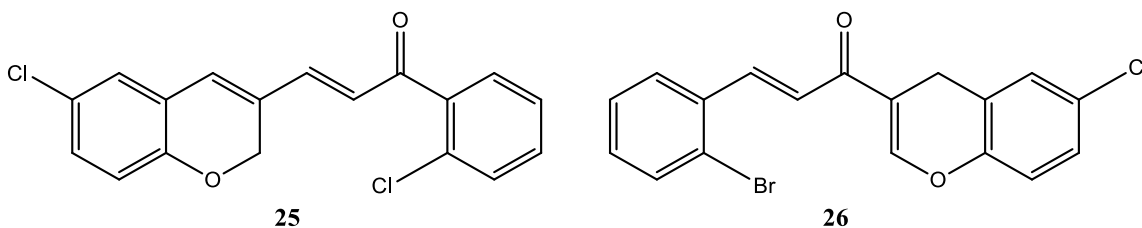
Η Μ. Roussaki κι οι συνεργάτες της σχεδίασαν, συνέθεσαν νέα υβρίδια κινολινονών-χαλκονών και αξιολόγησαν τη βιολογική δραστηριότητα τους έναντι των παρασίτων *Trypanosoma brucei* και *Leishmania infantum*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μόρια (**19-24**) (Σχήμα 16) τα οποία συντέθηκαν είχαν σημαντική μικροβιοκτόνο δράση και χαμηλή κυτταροτοξικότητα. Το υβριδικό μόριο **24** (Σχήμα 16) επέδειξε αντιπαρασιτικές ιδιότητες ενάντια και στους δύο οργανισμούς και μάλιστα εμφάνισε την πιο ισχυρή δράση έναντι του *L. infantum*.<sup>16</sup>



- 19:** R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>  
**20:** R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=R<sub>4</sub>=H  
**21:** R<sub>1</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>2</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub>=OH  
**22:** R<sub>1</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OCH<sub>3</sub>  
**23:** R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=H, R<sub>3</sub>=OH  
**24:** R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>4</sub>=C<sub>3</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, R<sub>3</sub>=OH

Σχήμα 16: Δομές κινολινονών-χαλκονών με αντιπαρασιτική δράση

Η ερευνητική ομάδα του Nazarian συνέθεσαν μια σειρά χαλκονοειδών που περιείχαν 6-χλωρο-2H-χρωμεν-3-υλ-ομάδες και εξετάστηκε in vitro η δραστηριότητα των ενώσεων έναντι σε παράσιτα προμαστιγωτών της *Leishmania*. Όλες οι ενώσεις επέδειξαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα παρά τις δομικές τους διαφορές. Τα μόρια **25** και **26** (Σχήμα 17) τα οποία φέρουν 2-χλωρο-φαινυλ- και 2-βρωμοφαινυλ- δακτυλίους αντιστοίχως εμφάνισαν τη μεγαλύτερη δραστηριότητα.<sup>4,17</sup>

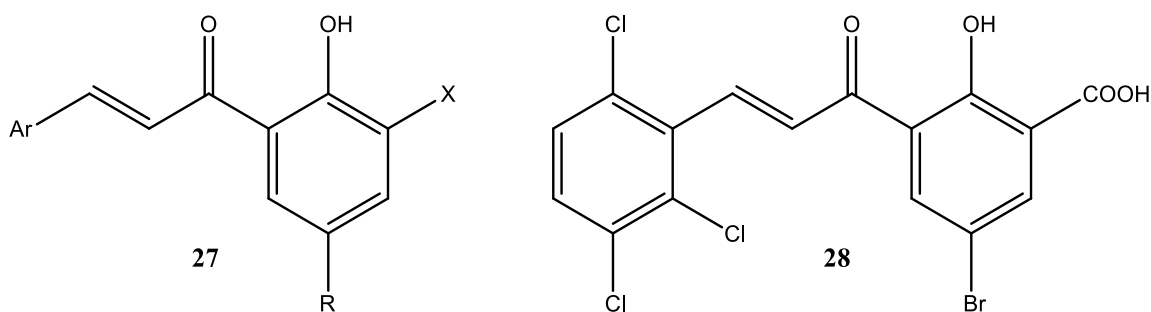


Σχήμα 17: Δομές χαλκονών με αντιλεϊσμανιακή δράση

## Αντι-HIV δράση

Οι συνέπειες του συνδρόμου επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS) είναι γνωστές και οι προσπάθειες εύρεσης θεραπείας της νόσου εντείνονται όλο και περισσότερο με το πέρασμα των χρόνων. Ο ιός HIV (ιός ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας) είναι υπεύθυνος για την πρόκληση της νόσου, παρεμβαίνοντας στο ανοσοποιητικό σύστημα και παρεμποδίζοντας τη λειτουργία του. Τα παρόντα διατιθέμενα φάρμακα δεν είναι επαρκώς αποτελεσματικά και συνεπώς είναι απαραίτητη η έρευνα προς ανακάλυψη νέων και ισχυρών φαρμάκων κατά του ιού.

Οι Sharma et al. σχεδίασαν, συνέθεσαν νέα 3-κετο-σαλικυλικά οξέα-παράγωγα χαλκονών (**27**) (Σχήμα 18) κι εξέτασαν τη δραστηριότητα τους ως αντι-HIV παράγοντες μέσω παρεμπόδισης του ενζύμου HIV-1 integrase, το οποίο είναι απαραίτητο για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του ιού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι γενικά οι ενώσεις που φέρουν βρώμιο ως υποκαταστάτη αποτέλεσαν τις πιο ισχυρές, ακολουθούμενες από τις ενώσεις με φθόριο ως υποκαταστάτη και τέλος τις ενώσεις που φέρουν χλώριο. Η αντικατάσταση του Br με μεθυλο-ομάδα μείωσε σημαντικά τη δραστηριότητα των παραγόμενων ενώσεων. Το 5-βρωμο-2-υδροξυ-3-(3-(2,3,6-τριχλωροφαινυλ)ακρυλοϋλ)βενζοϊκό οξύ (**28**) (Σχήμα 18) εμφάνισε τα καλύτερα αποτελέσματα.<sup>4,18</sup>



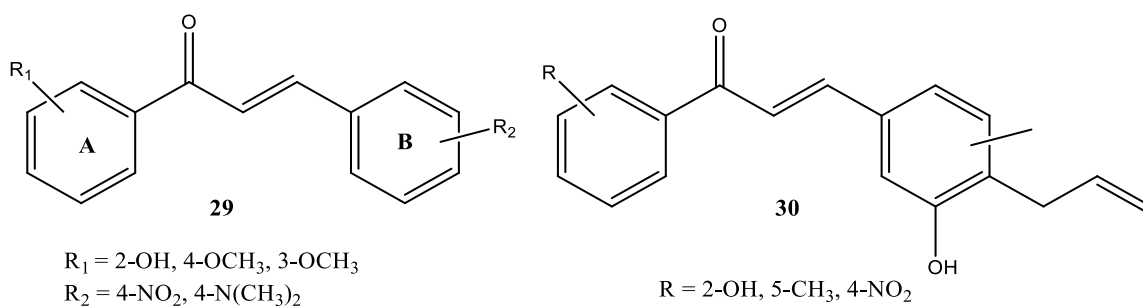
Ar = Ph, 2-Cl-Ph, 2-F-Ph, 3-Cl-Ph, 4-Cl-Ph,  
4-Br-Ph, 4-I-Ph, 2,4-Cl-Ph, 2,3-Cl-Ph, 2,3,4-  
MeO-Ph, 2,5-Cl-Ph, 2,3-MeO-Ph etc.  
X = COOH, CN, NO<sub>2</sub>  
R = Cl, Br, F, CH<sub>3</sub>

Σχήμα 18: Δομές χαλκονών με αντι-HIV δράση

## Αντιοξειδωτική δράση

Κατά την οξείδωση ελευθέρων ριζών οξυγόνου είναι δυνατόν να αλλοιωθούν DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια κ.τ.λ. με αποτέλεσμα τη γήρανση και την εμφάνιση ασθενειών που σχετίζονται με τον καρκίνο και την αθηροσκλήρυνση. Κατά συνέπεια, η απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών από τον οργανισμό διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για τη διατήρηση της ομοιόστασής του. Τα αντιοξειδωτικά έχουν την τάση να «παγιδεύουν» τις ελεύθερες ρίζες κι οι χαλκόνες έχει αποδειχθεί ότι αποτελούν ελπιδοφόρες αντιοξειδωτικές ενώσεις.

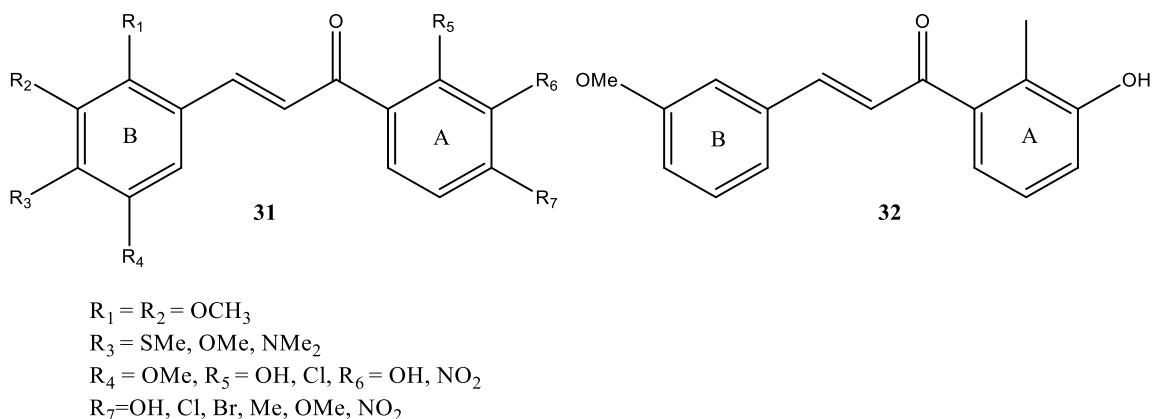
Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο συμπύκνωσης Claisen-Schmidt, ο Doan κι οι συνεργάτες του συνέθεσαν νέες χαλκόνες (**29**) και τα αλλυλιωμένα τους παράγωγα (**30**) (Σχήμα 19) κι εν συνεχεία αξιολόγησαν την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω της μεθόδου DPPH. Όλα τα αλλυλιωμένα παράγωγα χαλκονών εμφάνισαν καλή αντιοξειδωτική δράση, ενώ τα μη-αλλυλιωμένα αποδείχθηκαν αδρανή. Η ένωση που φέρει υδροξυλ- και μεθυλ- ομάδες στις θέσεις 2 και 5 αντίστοιχα του δακτυλίου A επέδειξε την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση.<sup>4,19</sup>



Σχήμα 19: Δομές αλλυλιωμένων και μη-χαλκονών με αντιοξειδωτική δράση

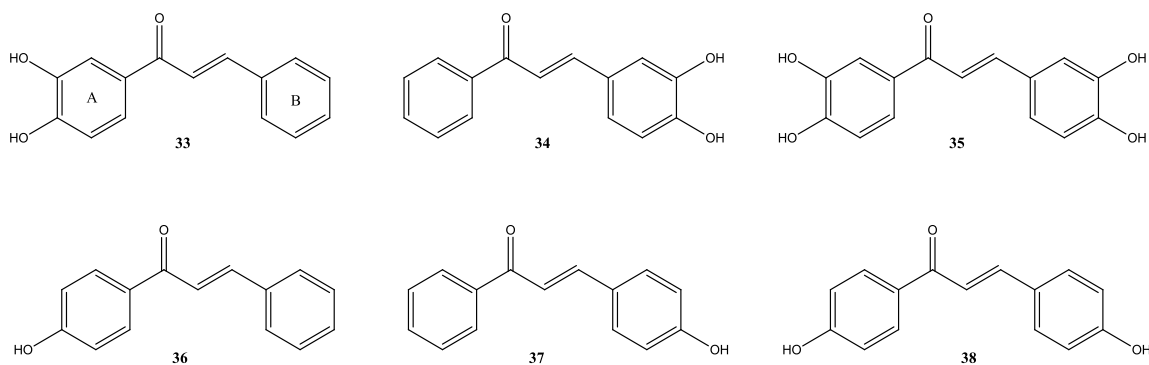
Ο Sivakumar κι η ερευνητική του ομάδα συνέθεσαν, επίσης μέσω αντιδράσεων συμπύκνωσης Claisen Schmidt, ανάλογα χαλκονών (**31**) (Σχήμα 20) κι εξέτασαν με διάφορες δοκιμασίες την αντιοξειδωτική τους δράση. Οι ενώσεις που φέρουν υδροξυλ-ομάδα στο δακτύλιο A, -SCH<sub>3</sub> και -CH<sub>3</sub> ομάδες στην πάρα θέση του δακτυλίου B επέδειξαν καλή αντιοξειδωτική δραστηριότητα καθ' όλες τις δοκιμασίες. Η χαλκόνη **32** (Σχήμα 20) που φέρει υδροξυλ- και μεθοξυ- ομάδες στη μέτα θέση του δακτυλίου A και B αντιστοίχως, εμφάνισε την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με τα υπόλοιπα μόρια.<sup>4,20</sup>





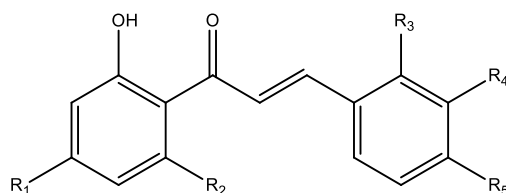
Σχήμα 20: Δομές χαλκονών με  $-\text{SCH}_3$ ,  $-\text{CH}_3$  ομάδες κ.τ.λ. με αντιοξειδωτική δράση

Ο Yi-Ping Qian κι οι συνεργάτες του συνέθεσαν υδροξυ-χαλκόνες (**33-38**) (Σχήμα 21) και μελέτησαν την αντιοξειδωτική τους δράση έναντι της σταθερής ρίζας galvinoxyl ( $\text{GO}\cdot$ ) σε αιθανόλη και οξικό αιθυλεστέρα και έναντι της ελεύθερης ρίζας υπεροξειδωσης λιπιδίων των ανθρωπίνων ερυθρών αιμοσφαιρίων και θραύσης κλώνου DNA. Μελέτες κινητικής δεύτερης τάξης μέσω φασματοσκοπίας UV-Vis έδειξαν ότι ο αριθμός κι η θέση των υδροξυλ-ομάδων επηρεάζουν σημαντικά την κατακράτηση της ρίζας  $\text{GO}\cdot$  σε οξικό αιθυλεστέρα και εμφανίζουν την εξής φθίνουσα σειρά (από την καλύτερη στη χειρότερη δράση) **35** > **34** > **33** > **38** > **37** > **36**. Όσον αφορά στην κατακράτηση της  $\text{GO}\cdot$  σε αιθανόλη, η φθίνουσα σειρά της αντιοξειδωτικής δράσης των ενώσεων είναι **34** > **35** > **33** > **38** > **37** > **36** κατά την οποία, εξαιρουμένης της **34**, όλα τα μόρια εμφάνισαν παρόμοια δράση με εκείνη που εμφάνισαν στον οξικό αιθυλεστέρα. Οι χαλκόνες που φέρουν το μεγαλύτερο αριθμό υδροξυλίων εμφάνισαν την καλύτερη παρεμπόδιση της επαγόμενης ρίζας AAPH στις μελέτες για τη θραύση του κλώνου DNA και η φθίνουσα σειρά δραστηριότητας έχει ως εξής: **35** > **34** > **33** > **38** > **37** > **36**.<sup>4,21</sup>



Σχήμα 21: Δομές υδροξυ-χαλκονών με αντιοξειδωτική δράση

Η Α. Detsi κι οι συνεργάτες της συνέθεσαν 2'-υδροξυ-χαλκόνες (Σχήμα 22) κι αξιολόγησαν τόσο την αντιοξειδωτική τους δράση μέσω της δοκιμασίας DPPH όσο και την αντιφλεγμονώδη τους δράση με βάση την αναστολή του ενζύμου της λιποξυγονάσης (LOX). Τα αποτελέσματα των δοκιμασιών επέδειξαν ότι η υψηλή παγίδευση της ρίζας DPPH δεν συνοδεύεται πάντα από υψηλή ανασταλτική δράση της λιποξυγονάσης. Η χαλκόνη **39** εμφάνισε ευεργετικά αποτελέσματα όσον αφορά στην αντιοξειδωτική της δράση και είναι δυνατόν να αποδοθεί στο γεγονός ότι αποτελεί πολυφαινολική ένωση. Αναφορικά με την αντιφλεγμονώδη δράση των συντιθέμενων ενώσεων, οι χαλκόνες **40** και **41** επέδειξαν ισχυρή δραστηριότητα έναντι του ενζύμου της λιποξυγονάσης αλλά χαμηλή έως μέτρια αντιοξειδωτική δράση. Σε δομικό επίπεδο η χαλκόνη **42**, η οποία φέρει μεθοξυ-ομάδες στις θέσεις 2' και 4' του Α-δακτυλίου, εμφάνισε την πιο ελπιδοφόρα συνδυαστική αντιοξειδωτική-αντιφλεγμονώδη δράση.<sup>1</sup>



|           | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>   | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> | R <sub>5</sub>  |
|-----------|------------------|------------------|----------------|----------------|-----------------|
| <b>39</b> | OH               | OH               | H              | OH             | OH              |
| <b>40</b> | H                | H                | H              | H              | CH <sub>3</sub> |
| <b>41</b> | H                | H                | H              | H              | Cl              |
| <b>42</b> | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> | H              | H              | CH <sub>3</sub> |

Σχήμα 22: Δομές 2'-υδροξυχαλκονών με αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση

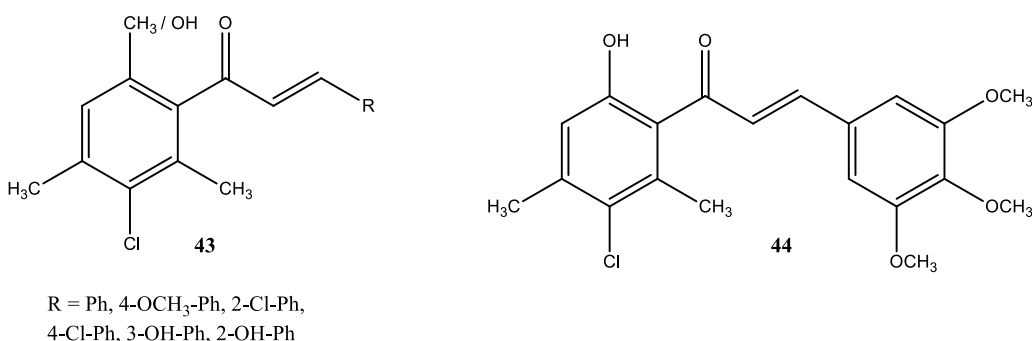
### Αντιφλεγμονώδης δράση

Η φλεγμονή είναι το αποτέλεσμα της ανοσολογικής απόκρισης του σώματος έναντι επιβλαβών ερεθισμάτων, όπως τα εγκαύματα, οι αλλεργίες ή η μόλυνση από παθογόνους οργανισμούς.

Η ανθεκτικότητα της φλεγμονής στο ανθρώπινο σώμα είναι δυνατόν να οδηγήσει σε διάφορες ασθένειες όπως η αθηροσκλήρυνση, ο διαβήτης, η αρθρίτιδα κι ο καρκίνος. Μέχρι στιγμής, τα διατιθέμενα αντιφλεγμονώδη φάρμακα συνδέονται με αρκετές παρενέργειες συμπεριλαμβανομένων γαστρεντερικών και τοξικότητα για τα νεφριά και το γαστρεντερικό σύστημα. Συνεπώς, γίνεται σημαντική προσπάθεια παγκοσμίως για την

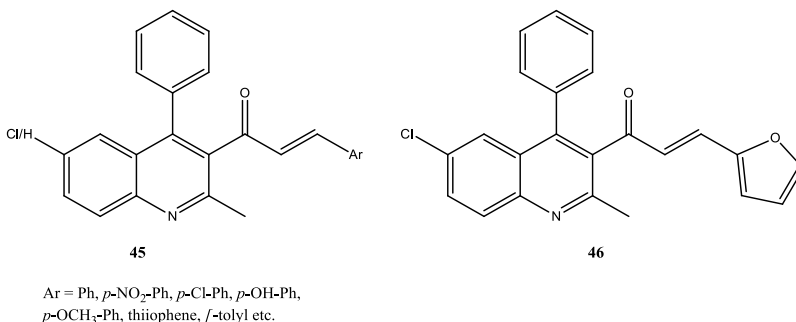
ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών και λιγότερο τοξικών φαρμάκων. Το ένζυμο COX που καταλύει τη μετατροπή των αραχιδονικών προσταγλανδινών και θρομβοξανών αποτελεί σημαντικό στόχο για το σχεδιασμό νέων αντιφλεγμονωδών παραγόντων.

Οι Bano et al. συνέθεσαν νέες χαλκόνες (**43-44**) (Σχήμα 23) και αξιολόγησαν την αντιφλεγμονώδη τους δράση, η οποία σύμφωνα με τα αποτελέσματα αποδείχθηκε συγκρίσιμη με εκείνη της ινδομεθακίνης (φάρμακο που είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ως αναφορά). Παράλληλα, μελέτες έδειξαν ότι η ύπαρξη υποκαταστατών -NO<sub>2</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -Cl σε όρθο- ή πάρα- θέσεις υποβάθμισε σημαντικά τη δραστηριότητα, ενώ η υποκατάσταση της μέτα- θέσης με μεθοξυ-ομάδα ενίσχυσε την δραστηριότητα ενώσεων. Η χαλκόνη **44** (Σχήμα 23), η οποία φέρει τρι-μεθοξυ-φαινυλ-δακτύλιο, εμφάνισε την υψηλότερη αντιφλεγμονώδη δράση.<sup>4,22</sup>



Σχήμα 23: Δομές χαλκονών με αντιφλεγμονώδη δράση

Η ερευνητική ομάδα του Kotra συνέθεσε μόρια κινολινο-χαλκονών (**45**) (Σχήμα 24) κι αξιολόγησε την αντιφλεγμονώδη δράση της. Η ένωση **46** (Σχήμα 24) η οποία φέρει φουρυλικό δακτύλιο και χλώριο ως υποκαταστάτη επέδειξε ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση. Παράλληλα, οι περισσότερες δραστικές ενώσεις εμφάνισαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα όσον αφορά στην τοξικότητά τους, καθώς αποδείχθηκαν μη τοξικές κατά τις δοκιμασίες οξείας τοξικότητας κατάποσης.<sup>4,23</sup>



Σχήμα 24: Δομές κινολινο-χαλκονών με αντιφλεγμονώδη δράση

## 1.3 Ωρόνες

### 1.3.1 Γενική Εισαγωγή

Οι ωρόνες ((Z-)2-βενζυλιδενοβενζοφουραν-3-(2H)-όνες), αποτελούν μέλη της ομάδας των ελασσόνων φλαβονοειδών και αναφέρθηκαν για πρώτη φορά από τους Geissman και Heaton το 1943, οι οποίοι απομόνωσαν ωρόνες από τα άνθη των λουλουδιών *Coreopsis grandiflora* κι έκτοτε έχουν ευρεθεί σε κίτρινα άνθη ποικίλων λουλουδιών. Οι εν λόγω ενώσεις δεν έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό και απαντώνται σπάνια στη φύση μετρώντας μέχρι σήμερα περίπου 500 μόρια, τα οποία έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία, από φυσικές πηγές, κυρίως ανθοφόρα φυτά, μερικά είδη φτέρης, βρύα και θαλάσσια καφέ άλγη. Παρόλα αυτά ο ρόλος των ωρονών στα φυτά παραμένει κρίσιμος για ορισμένα είδη. Αντιπροσωπευτικές φυσικές ωρόνες είναι η ωρεοσιδίνη (aureusidin), η σουλφουρετίνη (sulfuretin) κι η μαριτιμετίνη (maritimetin).<sup>1,24</sup>

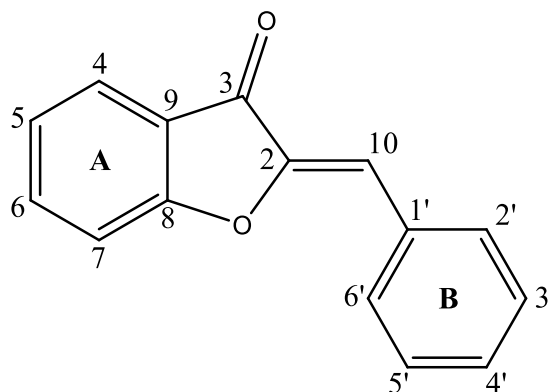
Όσον αφορά στις θεραπευτικές ιδιότητες των ωρονών για τους ανθρώπους, βάσει βιβλιογραφικών πηγών είναι πολύ ελπιδοφόρες λόγω της αντιοξειδωτικής, αντικαρκινικής, αντιμικροβιακής, αντι-ιικής, αντιλειψμανιακής, αντι-ορμονικής, αντιφλεγμονώδους, κατά της παχυσαρκίας, αντιδιαβητικής δράσης τους και για το γεγονός ότι αποτελούν πιθανούς αποτελεσματικούς παράγοντες για τη θεραπεία της νόσου του Alzheimer. Κατά συνέπεια, τα τελευταία χρόνια υπάρχει πρόοδος αναφορικά με την έρευνα των ωρονών ως πιθανά φάρμακα για τις θεραπευτικές περιοχές που αναφερθήκαν παραπάνω.<sup>24</sup>

### 1.3.2 Οικολογικός ρόλος ωρονών στη φύση

Οι ωρόνες βρίσκονται κυρίως στα δικοτυλήδονα φυτά κι ειδικά στις οικογένειες *Anacardiaceae*, *Asteraceae*, *Gesneriaceae*, *Leguminosae*, *Oxalidaceae*, *Plumbaginaceae*, *Rubiaceae*, *Rhamnaceae* και *Plantaginaceae*, αλλά έχουν εντοπιστεί και παράγωγα των ενώσεων σε μονοκοτυλήδονα φυτά. Τα άνθη, οι σπόροι, τα φύλλα και το εσωτερικό του κορμού των παραπάνω φυτών αποτελούν συχνές πηγές ωρονών, οι οποίες διαδραματίζουν διάφορες βιολογικές λειτουργίες για τα εν λόγω φυτά. Τα συγκεκριμένα φλαβονοειδή είναι υπεύθυνα για το κίτρινο και το πορτοκαλί χρώμα ορισμένων λουλουδιών. Μερικές ενώσεις έχουν αναγνωριστεί για τη δράση τους ως φυτοαλεξίνες κι ότι επιτελούν καταλυτικό ρόλο στην προστασία των φυτών κατά της σήψης και των εντόμων.<sup>24</sup>

### 1.3.3 Δομικά χαρακτηριστικά ωρονών

Η δομή των ωρονών βασίζεται στη δομή των 2-βενζυλιδενουκουμαρανών. Το συμβατικό σύστημα αρίθμησης των ωρονών προτείνει την αρίθμηση των θέσεων 4 έως 7 στον Α-δακτύλιο, όπου η θέση 4 είναι βιοσυνθετικά ισοδύναμη με τη θέση 5 στα συνήθη φλαβονοειδή και τη θέση 2' στις χαλκόνες. (Σχήμα 25) <sup>2</sup>

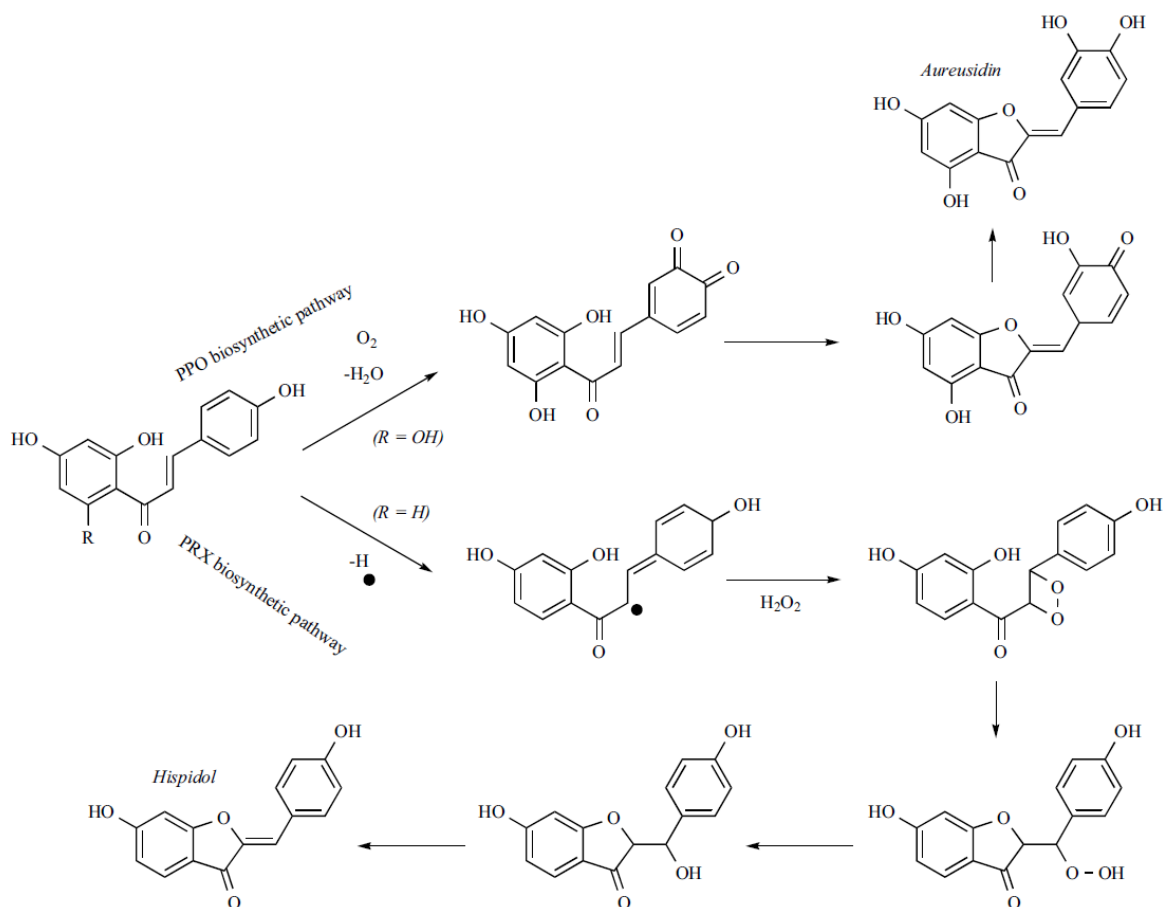


Σχήμα 25: Γενική δομή ωρονών

### 1.3.4 Βιοσύνθεση και χημική σύνθεση ωρονών

#### *Βιοσύνθεση ωρονών*

Γενικά είναι ευρέως γνωστές δύο βιοσυνθετικές οδοί για την παρασκευή των ωρονών από πρόδρομα μόρια χαλκονών. Η μία οδός πραγματοποιείται μέσω ενός ενζύμου φυτικής πολυφαινολικής οξειδάσης (συνήθως συνθάση της ωρεοσιδίνης) κι η δεύτερη μέσω ενός ενζύμου υπεροξειδάσης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα βιοσύνθεσης ωρονών είναι για την πρώτη μέθοδο: η παρασκευή της ωρεοσιδίνης και για τη δεύτερη οδό: η σύνθεση της ισπιδόλης (hispidol) (Σχήμα 26).<sup>24</sup>



Σχήμα 26: Γενικές βιοσυνθετικές οδοί ωρονών

### Χημική σύνθεση ωρονών

Οι βιοσυνθετικοί μηχανισμοί των ωρονών από χαλκόνες αποτέλεσαν έρεισμα για τους χημικούς στην προσπάθεια σύνθεσης ωρονών, προσαρμόζοντας τις βιοσυνθετικές πορείες σε μεθόδους χημικής σύνθεσης στο εργαστήριο.

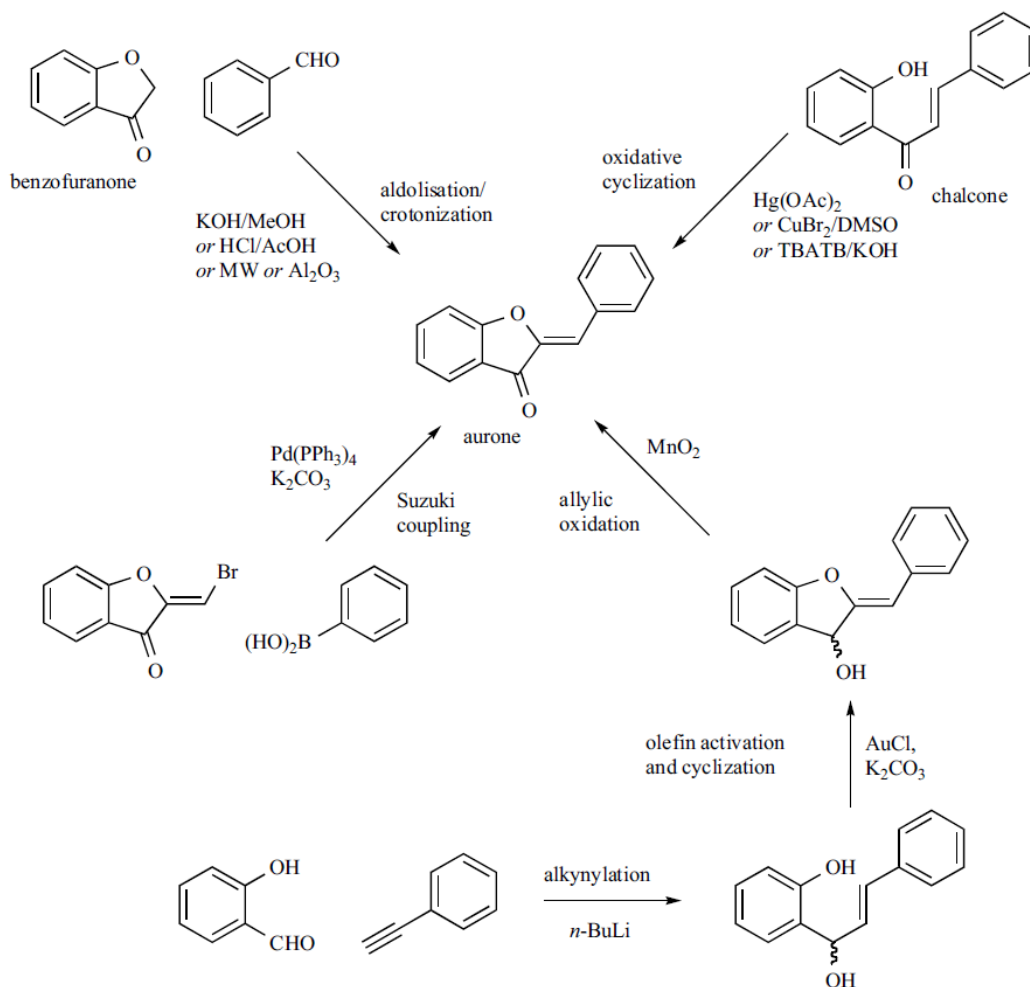
Η γενική μέθοδος σύνθεσης ωρονών είναι η οξειδωτική κυκλοποίηση των χαλκόνων. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει πραγματοποιηθεί υπό διάφορες συνθήκες, χρησιμοποιώντας οξικό υδράργυρο (II) (mercury (II) acetate), νιτρικό θάλλιο (II) (thallium (II) nitrate), τριβρωμίδιο του τετραβουτυλαμμωνίου (tetrabutylammonium tribromide) ή βρωμίδιο του χαλκού (II) (copper(II) bromide). Τα παραπάνω αντιδραστήρια, ωστόσο, έχουν περιορισμένη χρήση, δεδομένου ότι είναι απαραίτητη η ύπαρξη μερικών συγκεκριμένων δομικών χαρακτηριστικών στις πρόδρομες χαλκόνες.

Στην πραγματικότητα, η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος σύνθεσης ωρονών είναι η αλδολική συμπύκνωση μιας βενζοφουραν-3(2H)-όνης σε ένα παράγωγο βενζαλδεΐδης. Η προαναφερθείσα αντίδραση είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί υπό βασικό ή οξικό

περιβάλλον ή χωρίς διαλύτη σε μικροκυματικές συνθήκες (microwave conditions), οι οποίες μάλιστα οδηγούν σε καλές αποδόσεις. Η συγκεκριμένη συνθετική οδός είναι κατάλληλη για ένα ευρύ φάσμα μορίων, συμπεριλαμβανομένων των πιο ευαίσθητων.

Τέλος, μια πρόσφατη μέθοδος περιλαμβάνει σύζευξη Suzuki μεταξύ μιας 2-(βρωμομεθυλεν)-βενζοφουραν-3(2H)-όνης και ενός φαινυλοβορονικού οξέος. Η συγκεκριμένη μέθοδος βέβαια έχει χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή ενός μόνο μορίου (μιας τριμεθοξυ-ωρόνης) και συνεπώς είναι δύσκολο να αξιολογηθεί η ευελιξία της.<sup>24</sup>

Στο σχήμα 27 παρουσιάζονται και παραστατικά οι χημικές μέθοδοι σύνθεσης ωρονών.<sup>24</sup>



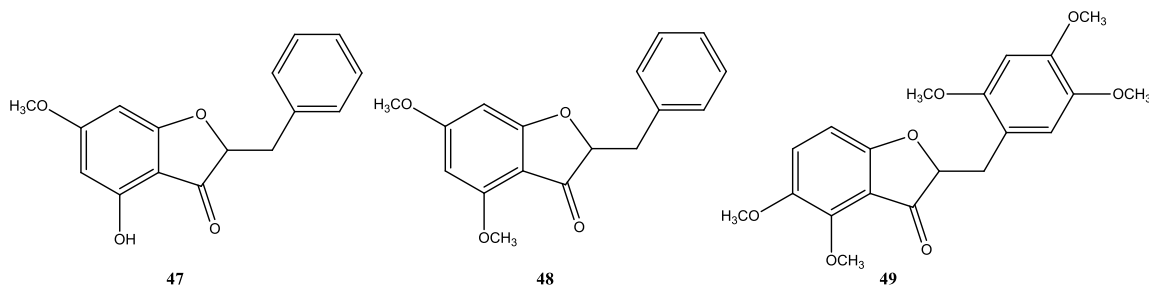
Σχήμα 27: Μέθοδοι χημικής σύνθεσης ωρονών

### 1.3.5 Βιολογική δράση ωρονών

#### Αντικαρκινική δράση

Η ικανότητα των κυττάρων, μικροοργανισμών και ιών να αντιστέκονται σε θεραπευτικές αγωγές αποτελεί σημαντικό κλινικό εμπόδιο. Το συγκεκριμένο φαινόμενο ονομάζεται αντίσταση σε πολύ-φάρμακα (MDR: Multi-Drug Resistance) και συχνά προϋποθέτει την μεταφορά μορίων διαμέσου μεμβρανών. Αναφορικά με τον καρκίνο, ο πρώτος «μεταφορέας» μεμβράνης που αναφέρθηκε η συμμετοχή του στην αντίσταση κατά των πολυ-φαρμάκων ήταν η Ρ-γλυκοπρωτεΐνη (P-gp), η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο MDR1/ABCB1.

Η ερευνητική ομάδα του Boumendjel ήταν η πρώτη που ανέφερε τη δυναμική δραστηριότητα των ωρονών. Πιο συγκεκριμένα, οι μελέτες έδειξαν ότι οι 4-υδροξυ-6-μεθοξυ-ωρόνη (**47**) και 4,6-διμεθοξυ-ωρόνη (**48**) (Σχήμα 28) επιδεικνύουν υψηλή συγγένεια με το νουκλεοτίδιο δέσμευσης (NBD2) της πρωτεΐνης. Πιο πρόσφατα, οι ήδη αναφερθείσες ωρόνες ευρέθηκε ότι είχαν καλύτερα αποτελέσματα απ' ότι χαλκόνες και φλαβόνες στην ικανότητα διέγερσης της πακλιταξέλης (ενός υποστρώματος της P-gp) σε ανθεκτικά καρκινικά κύτταρα. Τα πιο ελπιδοφόρα αποτελέσματα έδωσε η 4,5,3',4',6'-πεντα-μεθοξυ-ωρόνη (**49**) (Σχήμα 28) σε βαθμό 10 φορές μείωση της εκροής ανθεκτικών κυττάρων.<sup>24,25</sup>

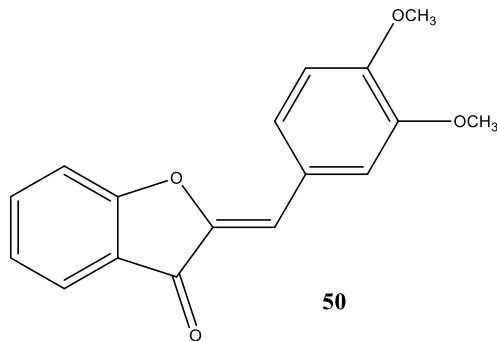


Σχήμα 28: Δομές μεθοξυ-ωρονών με αντικαρκινική δράση

#### Αντιοξειδωτική δράση

Όσον αφορά στην αντιοξειδωτική δράση των ωρονών η A. Detsi κι οι συνεργάτες της συνέθεσαν χαλκόνες κι ωρόνες τις οποίες στη συνέχεια αξιολόγησαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση. Παρά το γεγονός ότι σχεδόν όλες οι ενώσεις βρέθηκαν αδρανείς, η 3',4' διμεθοξυ-ωρόνη (**50**) (Σχήμα 29) επέδειξε ικανοποιητική δραστηριότητα.



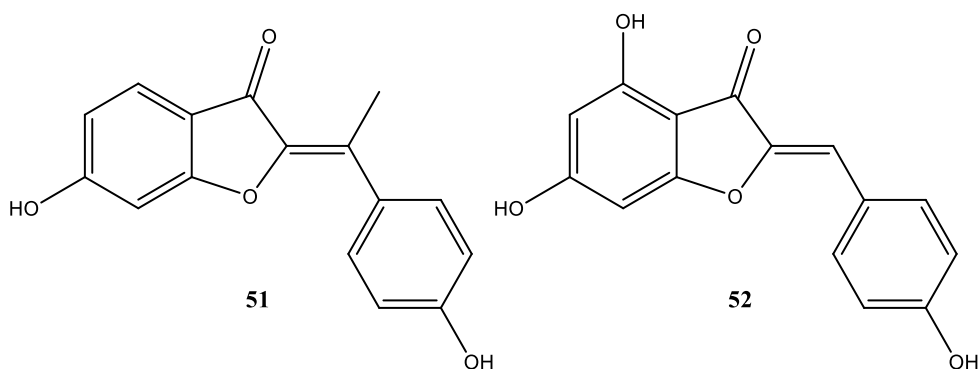


Σχήμα 29: Δομή 3',4'-διμεθοξυ-ωρόνης με αντιοξειδωτική δράση

### Δράση κατά του ενζύμου της τυροσινάσης

Η μελανίνη αποτελεί τη βασική χρωστική ουσία για το δέρμα των ανθρώπων και των θηλαστικών, το οποίο και προστατεύει από την υπερϊώδη ακτινοβολία και άλλες περιβαλλοντικές απειλές. Η τυροσινάση καταλύει τα δύο πρώτα στάδια της μελανογένεσης (βιοσύνθεση μελανινών) σε μελανοκύτταρα. Δεδομένου ότι η μετατροπή της L-τυροσίνης σε I-DOPA και DOPAquinone αντιπροσωπεύει το κρίσιμο στάδιο της βιοσύνθεσης, η αναστολή του ενζύμου της τυροσινάσης συνιστά πολύ σημαντικό στόχο για τη θεραπεία των διαταραχών που σχετίζονται με τη μελανίνη όπως είναι οι υπερμελαγχρώσεις. Ένας σημαντικός αριθμός φλαβονοειδών έχει επιδείξει υψηλή παρεμποδιστική δράση του ενζύμου της τυροσινάσης, ανάμεσά τους κι οι ωρόνες.

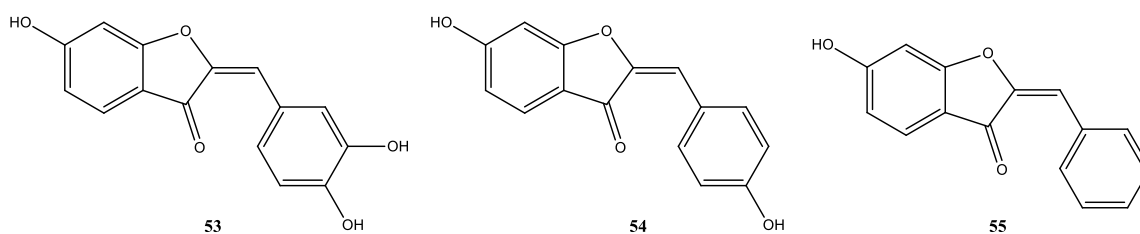
Προσφάτως, οι Okombi et al. απέδειξαν ότι πολυ-υδροξυλιωμένες ωρόνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αναστολείς της τυροσινάσης που προέρχεται από ανθρώπινα μελανοκύτταρα. Μεταξύ των εξεταζόμενων ωρονών, η φυσικά απαντώμενη ισπιδόλη (**51**) (hispidol) και η 4,6,4'-τριυδροξυωρόνη (**52**) (Σχήμα 30) επέδειξαν την υψηλότερη δραστηριότητα.<sup>24,26</sup>



Σχήμα 30: Δομές πολυ-υδροξυωρονών - αναστολείς της τυροσινάσης

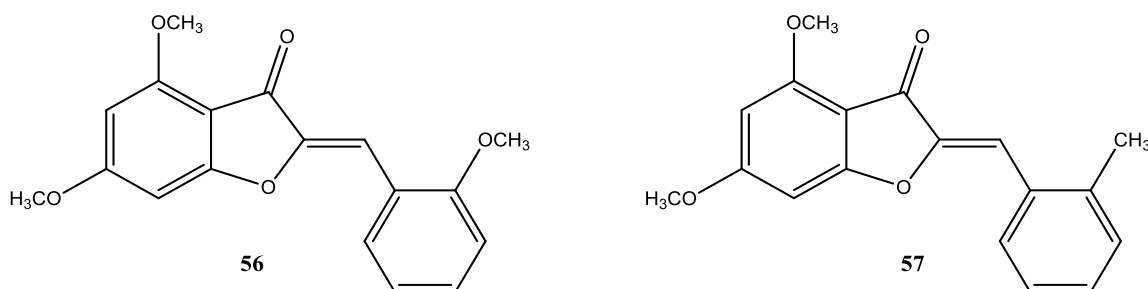
### Αντιμικροβιακή και αντι-ικική δράση

Οι Liu et al. απέδειξαν ότι μερικά παράγωγα της σουλφουρετίνης (**53**) αποτελούν ισχυρούς αναστολείς των νευραμινιδασών των ιών της γρίπης Α και Β και τους ισχυρότερους αναστολείς συγκριτικά με τα υπόλοιπα φλαβονοειδή που εξετάστηκαν. Οι νευραμινιδάσες είναι ένζυμα τα οποία σχετίζονται με την απελευθέρωση ιών από τα μολυσμένα κύτταρα-ξενιστές. Κατά συνέπεια, η αναστολή των συγκεκριμένων ενζύμων έχει προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον αφού είναι δυνατόν να αποτρέψει την εξάπλωση της μόλυνσης. Τα μόρια **53-55** που εμφάνισαν τα πιο ενθαρρυντικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 31 και όπως εύκολα παρατηρείται είναι όλα υδροξυλιωμένα.<sup>24,27</sup>



Σχήμα 31: Δομές υδροξυλιωμένων ωρονών με αντιϊική δράση

Όσον αφορά την αντιπαρασιτική δράση κι ειδικά την αντιλειτουργική δράση των ωρονών, η M. Roussaki κι οι συνεργάτες της συνέθεσαν ανάλογα ωρονών κι αξιολόγησαν την δραστηριότητά τους κατά της λεισμανίασης. Οι ωρόνες **56** και **57** (Σχήμα 32) επέδειξαν την ισχυρότερη αντιλειτουργική δραστηριότητα κι παράλληλα εμφάνισαν χαμηλή κυτταροτοξικότητα.<sup>24,28</sup>

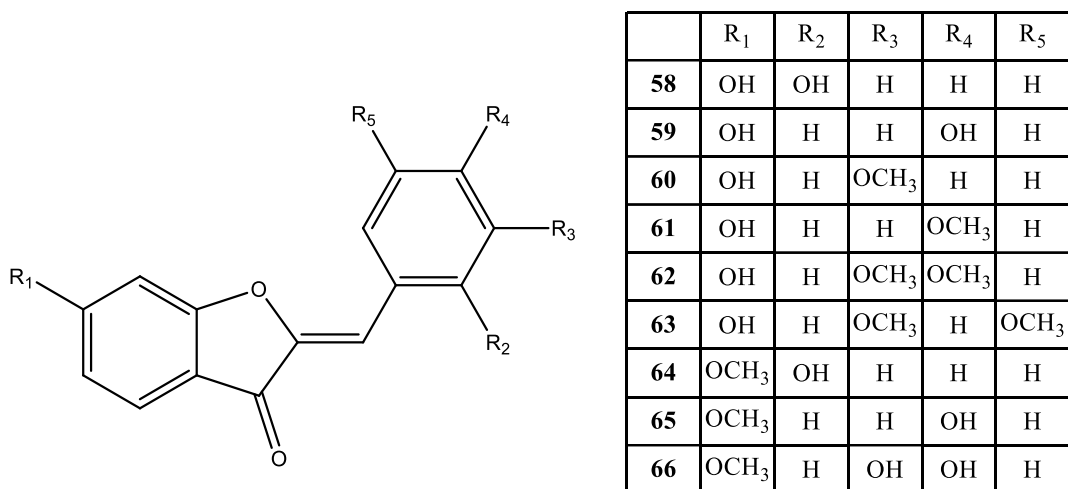


Σχήμα 32: Δομές ωρονών με αντιλειτουργική δράση

### Αντιφλεγμονώδης δράση

Η φλεγμονή είναι το αποτέλεσμα της ανοσολογικής απόκρισης του σώματος έναντι επιβλαβών ερεθισμάτων, όπως τα εγκαύματα, οι αλλεργίες ή η μόλυνση από παθογόνους οργανισμούς.

Οι Shin et al. εξέτασαν την επιρροή της υποκατάστασης του Β-δακτυλίου ωρονών, κι ιδιαίτερα αναλόγων της σουλφουρετίνης, στην δραστηριότητά τους κατά της φλεγμονής. Σε διάφορες δοκιμασίες οι ενώσεις **58-66** (Σχήμα 33) επέδειξαν υψηλή αντιφλεγμονώδη δράση. Η κατανομή των υδροξυ-ομάδων ή μεθοξυ-ομάδων στα ενεργά μόρια ποικίλει επομένως δεν είναι δυνατή η εξαγωγή αξιόπιστου συμπεράσματος αναφορικά με την σχέση δραστηριότητας και της δομής των ωρονών.<sup>24,29</sup>

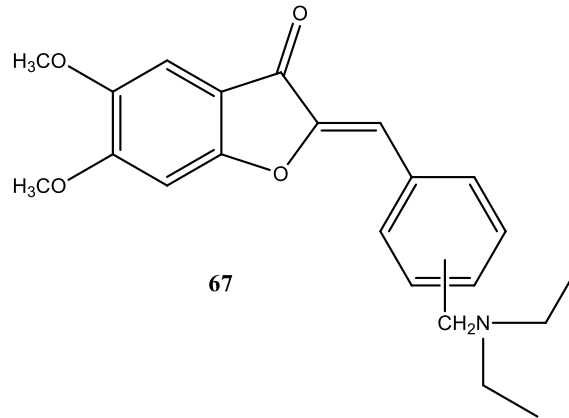


Σχήμα 33: Δομές αναλόγων σουλφουρετίνης με ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση

### Δράση κατά της νόσου Alzheimer

Η νόσος Alzheimer είναι μια νευροεκφυλιστική πάθηση η οποία χαρακτηρίζεται από μια προοδευτική απώλεια νοητικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένων των απωλειών που σχετίζονται με τη μνήμη. Για τη θεραπεία της νόσου η κύρια κατηγορία φαρμάκων αποτελείται από αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης. Παρόλο που οι συγκεκριμένοι αναστολείς δεν σταματούν την εξέλιξη της νόσου, βοηθούν στην προσωρινή θεραπεία νοητικών απωλειών και μπορούν να βελτιώσουν την ποιότητα ζωής των ασθενών.

Οι Sheng et al. σχεδίασαν, συνέθεσαν και αξιολόγησαν ανάλογα ωρονών ως προς τη δράση τους κατά της νόσου του Alzheimer. Οι περισσότερες ενώσεις που συντέθηκαν επέδειξαν ικανοποιητικά αποτελέσματα κι η ένωση **67** (Σχήμα 34) εμφάνισε την ισχυρότερη δραστηριότητα.<sup>24,30</sup>

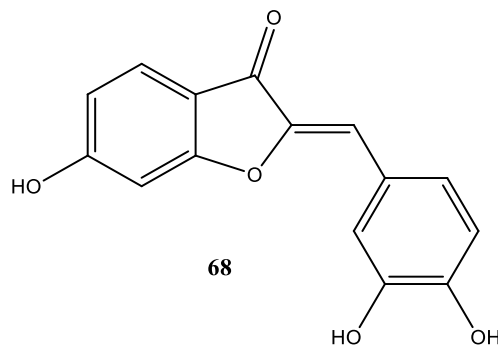


Σχήμα 34: Δομή ωρόνης με την ισχυρότερη δραστικότητα κατά της νόσου Alzheimer

### Αντιδιαβητική δράση

Ο σακχαρώδης διαβήτης χαρακτηρίζεται από χρόνια υπεργλυκαιμία και από ισχυρή ανεπάρκεια παραγωγής ινσουλίνης. Ένα από τα ένζυμα που σχετίζονται με το διαβήτη είναι η αναγωγή της αλδόξης (ALR2). Το συγκεκριμένο ένζυμο καταλύει την αναγωγή της γλυκόζης σε σορβιτόλη. Η δράση του συνεπώς συνεισφέρει στην εξέλιξη του διαβήτη κι η αποτελεσματική αναστολή του έχουν ήδη αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Ομοίως, ο σχηματισμός των τελικών προϊόντων της γλυκοζυλίωσης (AGE) είναι συνέπεια της παρατεταμένης υπεργλυκαιμίας και είναι δυνατόν να οδηγήσει επιπλοκές όπως ο καταρράκτης κι η νευροπάθεια.

Οι Lee et al. απομόνωσαν φλαβονοειδή από το δέντρο *Rhus verniciflua* με σκοπό τη μελέτη της δράσης των προϊόντων κατά του διαβήτη. Μεταξύ των μορίων που απομονώθηκαν ήταν κι η σουλφουρετίνη (**68**) (Σχήμα 35), η οποία εμφάνισε την καλύτερη δραστικότητα ενάντια στην ανθρώπινη ALR2 με αποτελέσματα παρόμοια με ήδη χρησιμοποιούμενο φάρμακο (epalrestat). Παράλληλα, η σουλφουρετίνη επέδειξε πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα κι ως προς την αναστολή της AGE με δέκα φορές καλύτερα αποτελέσματα από το μόριο αναφοράς (aminoguanidine).<sup>24,31</sup>



Σχήμα 35: Δομή σουλφουρετίνης - μόριο με ισχυρή αντιδιαβητική δράση

## 1.4 Αντιοξειδωτικά

### 1.4.1 Γενική εισαγωγή

Ως αντιοξειδωτικά χαρακτηρίζονται οι ενώσεις οι οποίες όταν είναι παρούσες σε μικρές συγκεντρώσεις σε ευπαθή υποστρώματα επιβραδύνουν σημαντικά ή αναστέλλουν την οξείδωση τους. Συνεπώς, είναι προφανές ότι τα αντιοξειδωτικά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού.<sup>32</sup>

Συγκρίνοντας τα συνθετικά και φυσικά αντιοξειδωτικά, μπορεί να διαπιστώσει κανείς ότι πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα εμφανίζουν και οι δύο κατηγορίες. Τα συνθετικά είναι καθαρές ενώσεις, αποτελεσματικές, σχετικά φτηνές, εύκολα διαθέσιμες και θεωρούνται ως αβλαβείς, όταν προστίθενται στις επιτρεπτές από τη νομοθεσία συγκεντρώσεις. Βασικό μειονέκτημά τους είναι ότι αντιμετωπίζονται ως χημικά πρόσθετα από τους καταναλωτές, γεγονός που συνιστά το μεγάλο πλεονέκτημα των φυσικών αντιοξειδωτικών.<sup>33</sup>

### 1.4.2 Αντιοξειδωτικά ως δεσμευτές ελεύθερων ριζών

Τα φυσικά αντιοξειδωτικά όπως και τα συνθετικά δρουν ως δεσμευτές των πολύ δραστικών ελευθέρων ριζών, βοηθώντας με αυτό τον τρόπο στη μετατροπή τους σε λιγότερο δραστικές ενώσεις.

Οι ελεύθερες ρίζες είναι χημικά είδη που φέρουν ένα μονήρες ηλεκτρόνιο. Είναι εξαιρετικά δραστικές, ικανές να ξεκινήσουν ταχείες αντιδράσεις που αποσταθεροποιούν άλλα μόρια και παράγουν πολλές άλλες ελεύθερες ρίζες.<sup>33</sup>

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου παίζουν κεντρικό ρόλο στην αιτιολογία διαφόρων ασθενειών όπως η αρθρίτιδα, ο καρκίνος και η αρτηριοσκλήρυνση. Η οξειδωτική βλάβη του DNA μπορεί να προωθήσει τη γήρανση και η παρουσία του ενδοκυτταρικού οξυγόνου, επίσης, είναι δυνατόν να είναι υπεύθυνη για τη έναρξη μιας αλυσίδας ακούσιων αντιδράσεων σε κυτταρικό επίπεδο οι οποίες δυνητικά προκαλούν βλάβες σε κρίσιμα βιομόρια των κυττάρων.<sup>34</sup>

Η πιο σημαντική συνέπεια της ύπαρξης και δράσης των ριζών οξυγόνου είναι η πρόκληση μεταλλάξεων στο μιτοχονδριακό και πυρηνικό DNA. Ο μηχανισμός της βλάβης περιλαμβάνει προσβολή μεμονωμένων βάσεων και διάσπαση των δύο αλυσίδων του DNA. Βλάβη στο μιτοχονδριακό DNA γενικά καταλήγει σε μεταλλάξεις που επηρεάζουν την παραγωγή ενέργειας, η οποία εκδηλώνεται σε λειτουργίες που απαιτούν υψηλά ποσά ενέργειας, όπως η μυϊκή συστολή.<sup>35</sup>

Αποδεδειγμένη είναι επίσης η συσχέτιση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου με την αγγειακή νόσο. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου επάγουν την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου, το οποίο όπως και το NO, διαχέεται ταχέως στα κύτταρα και επιδρώντας στη δομή του αμινοξέος κυστεΐνη των πρωτεϊνών μεταβάλλοντας τη λειτουργία τους. Η χρόνια

παραγωγή ελεύθερων ριζών μπορεί να υπερβεί τις αντιοξειδωτικές δυνατότητες των κυτταρικών ενζυμικών και μη μηχανισμών, με αποτέλεσμα την εμμένουσα ενδοθυλιακή ενεργοποίηση και την αγγειακή νόσο. Μια σημαντική πηγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου είναι τα μιτοχόνδρια, στα οποία υπό κανονικές συνθήκες η παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου και η δράση της μιτοχονδριακής δισμουτάσης του υπεροξειδίου διατηρούνται σε ισορροπία κατά την οξειδωτική φωσφορλίωση. Η ισορροπία αυτή μπορεί να διαταραχθεί σε συνθήκες υποξίας ή αύξησης του υποστρώματος της ενζυμικής αντίδρασης, όπως συμβαίνει στη μεταβολική διαταραχή που σχετίζεται με την παχυσαρκία ή το σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, περιπτώσεις που χαρακτηρίζονται από υπεργλυκαιμία και αύξηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων.<sup>36</sup>

Ιδιαίτερη θέση ανάμεσα στα φυσικά αντιοξειδωτικά κατέχουν τα φλαβονοειδή, τα οποία απαντώνται ως συστατικά σε όλα τα φυτά και είναι από τις πιο σύνθετες κατηγορίες χημικών της φύσης.<sup>33</sup> Οι χαλκόνες κι οι ωρόνες όπως έχει αναφερθεί παραπάνω ανήκουν στην γενική κατηγορία των φλαβονοειδών και συνεπώς τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονη ερευνητική δραστηριότητα όσον αφορά στην μελέτη της αντιοξειδωτικής τους δράση όπως και άλλων βιολογικών τους δράσεων.

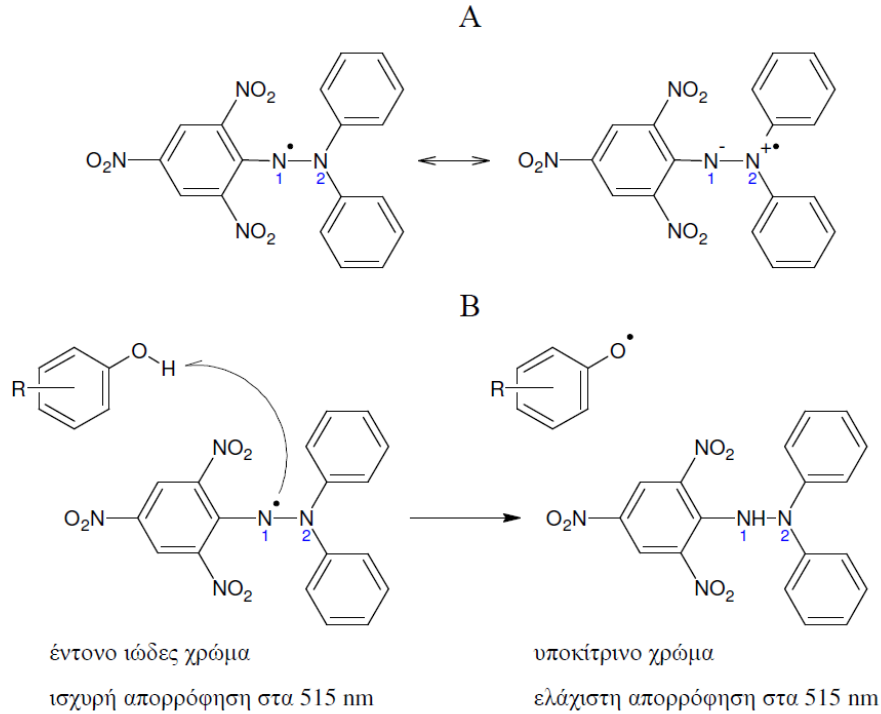
#### 1.4.3 Δοκιμές εκτίμησης δραστηριότητας αντιοξειδωτικών

Δεδομένου ότι κατά τη διάρκεια της δοκιμής η σύσταση της εξεταζόμενης ουσίας είναι δυνατόν να διαφοροποιείται, η δοκιμή εκτίμησης της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών πρέπει να είναι ταχεία. Οι δοκιμές αφορούν κατά κύριο λόγο τους δεσμευτές ελευθέρων ριζών και βασίζονται στη χρήση έγχρωμων εμπορικά διαθέσιμων ριζών. Τα προϊόντα αναγωγής τους από τα αντιοξειδωτικά είναι άχρωμα προϊόντα γεγονός που επιτρέπει τη φωτομετρική παρακολούθηση των αντιδράσεων. Χρησιμοποιώντας τις καμπύλες μείωσης της απορρόφησης σε συγκεκριμένα μήκη κύματος είναι δυνατόν να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα όσον αφορά στην κινητική δέσμευσης των ριζών από τα αντιοξειδωτικά καθώς και στη στοιχειομετρία των αντιδράσεων. Δύο χαρακτηριστικές δοκιμές είναι η δοκιμή DPPH και η δοκιμή FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), οι οποίες αναλύονται ακολούθως.<sup>33</sup>

##### *Δοκιμή DPPH*

Κατά τη συγκεκριμένη δοκιμή χρησιμοποιείται η ρίζα του 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζυλίου (DPPH) η οποία φέρει έντονο ιώδες χρώμα, απορροφά ισχυρά στα 515 nm και εμφανίζει μεγάλη σταθερότητα λόγω των αποκαθιστάμενων δομών συντονισμού (Σχήμα 36A). Κατά την αντίδραση με το υπό εξέταση σύστημα (ένωση ή μίγμα ενώσεων), η ρίζα του αποσπά άτομα H και παράγει την αντίστοιχη υδραζίνη. Η τελευταία ουσία, εξαιτίας της απουσίας του μονήρους ηλεκτρονίου, απορροφά ελάχιστα στα μήκη κύματος της ορατής ακτινοβολίας (Σχήμα 36B). Αναλόγως το πλήθος των φαινολικών υδρογόνων

και την επιδεικτικότητα τους στην απόσπαση, η αντίδραση κάθε αντιοξειδωτικού με το DPPH διαφοροποιείται στοιχειομετρικά και κινητικά. Γενικά ένα αντιοξειδωτικό χαρακτηρίζεται τόσο πιο αποτελεσματικό όσο μεγαλύτερο είναι το πλήθος των ριζών που μπορεί να δεσμεύσει και μικρότερο το χρονικό διάστημα που επιτελεί τη δράση του.<sup>33</sup>



Σχήμα 36: A: Οι δύο δομές συντονισμού της ρίζας DPPH.

B: Η αντίδραση του DPPH με τους δεσμευτές ελευθέρων ριζών<sup>33</sup>

### Δοκιμή FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Η συγκεκριμένη μέθοδος δεν βασίζεται στην αναγωγή κάποιας πρότυπης ρίζας, αλλά ενός αναλόγου της φερροΐνης, του συμπλόκου του  $\text{Fe}^{3+}$  με την τριπυριδυλτριαζίνη  $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{3+}$ . Μελετάται η αναγωγική δράση των αντιοξειδωτικών που μετατρέπουν το παραπάνω σύμπλοκο στο έντονου κυανού χρώματος  $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{2+}$  σε όξινο περιβάλλον. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται στα 593 nm ή ως ισοδύναμα δράσης κάποιου καθιερωμένου αντιοξειδωτικού. Ωστόσο, αυτού του είδους η αναγωγική ικανότητα δεν αντανακλά κατ' ανάγκη και την αντιοξειδωτική δράση και η μέθοδος έχει τεθεί υπό αμφισβήτηση από ορισμένους ερευνητές.<sup>33</sup>

## 1.5 Αντιφλεγμονώδη

Οι λιποξυγονάσες (LOX) είναι σιδηρούχα ένζυμα και συναντώνται ευρέως σε φυτά και ζώα. Ο βιολογικός τους ρόλος είναι να καταλύουν την οξειδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων όπως το λινελαϊκό οξύ (σε φυτά) και το αραχιδονικό οξύ (στα θηλαστικά) σε συγκεκριμένες θέσεις των υδροϋπεροξειδίων. Στον ανθρώπινο οργανισμό, η λιποξυγονάση διαδραματίζει καταλυτικό ρόλο στη βιοσύνθεση των λευκοτριενίων, δηλαδή των φλεγμονωδών μεσολαβητών που ελευθερώνονται κυρίως από μυελικά κύτταρα. Λόγω, λοιπόν, της δράσης της λιποξυγονάσης σε διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις έχει αναπτυχθεί έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον με σκοπό την ανακάλυψη αναστολέων του ενζύμου. Συνεπώς, οι αναστολείς της λιποξυγονάσης είχαν προσελκύσει αρχικά το ενδιαφέρον των ερευνητών ως πιθανοί παράγοντες για τη θεραπεία φλεγμονωδών ασθενειών κι αλλεργιών αλλά πλέον το θεραπευτικό τους δυναμικό έχει επεκταθεί σε συγκεκριμένες περιπτώσεις καρκίνου και καρδιαγγειακών παθήσεων. Η πλειονότητα των αναστολέων της LOX είναι αντιοξειδωτικά ή δεσμευτές ελευθέρων ριζών. Ωστόσο, η δραστηριότητά τους μπορεί να έχει αντίκτυπο στη διαμόρφωση του τελικού χρώματος ή της γεύσης σε διάφορα τρόφιμα.

Τα φλαβονοειδή, όπως η κερκετίνη (quercetin), ισοκερκετίνη (isoquercitrin), απιγενίνη (apigenin) και λυτεολίνη (luteolin), είναι οι πιο ισχυροί αναστολείς της 5- λιποξυγονάσης μεταξύ των φαινολικών φυσικών προϊόντων. Μελέτες για την ανασταλτική δράση της 5- λιποξυγονάσης φυσικών φλαβονοειδών, δείχνουν ότι η παρουσία μίας δομής κατεχόλης ή ενός λιπόφιλου υποκαταστάτη καθίσταται αναγκαία στις πολύ υδροξυλιωμένες ενώσεις. Οι χαλκόνες που συντίθενται μπορούν να αξιολογηθούν για την αναστολή της λιποξυγονάσης της σόγιας μέσω απορρόφησης ακτινοβολίας UV. <sup>1</sup>

## 1.6 Λακκάση

Η λακκάση (οξειδοαναγωγή βενζενεδιόλης οξυγόνου, EC 1.10.3.2) αποτελεί ένζυμο το οποίο ανήκει στην οικογένεια των οξειδασών που καταλύουν την οξείδωση πολλών φαινολικών ενώσεων και αρωματικών αμινών χρησιμοποιώντας το μοριακό οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων. Η καταλυτική δράση της λακκάσης συντελείται με την αναγωγή του οξυγόνου σε νερό που συνοδεύεται με την οξείδωση ενός ευρέος φάσματος υποστρωμάτων, όπως οι διφαινόλες, πολυφαινόλες, φαινόλες με διάφορους υποκαταστάτες, βενζολοθειόλες, αρωματικές αμίνες, διαμίνες και άλλες ξενοβιοτικές ενώσεις. Η καταλυτική δράση της λακκάσης είναι δυνατόν να επεκταθεί και σε μη φαινολικά υποστρώματα με την ενσωμάτωση οργανικών μεσολαβητών χαμηλού μοριακού βάρους.

Στην οικογένεια των οξειδοαναγωγικών ενζύμων που μπορούν να καταλύσουν την οξείδωση φαινολικών ενώσεων ανήκουν και οι υπεροξειδάσες, οι τυροσινάσες και οι



οξειδάσες χολερυθρίνης. Σε σύγκριση με τις τυροσινάσες, οι λακκάσες εμφανίζουν μεγαλύτερο φάσμα υποστρωμάτων κατάλυσης. Επίσης, οι υπεροξειδάσες έχουν το υψηλότερο οξειδοαναγωγικό δυναμικό, δεδομένου ότι είναι σε θέση να καταλύουν άμεσα την οξείδωση των μη φαινολικών ενώσεων χωρίς την παρουσία μεσολαβητή. Η χρήση οξυγόνου από λακκάσες ως ένα μη περιοριστικό δέκτη ηλεκτρονίων τις καθιστά τα πιο κατάλληλα ένζυμα για βιομηχανικές και περιβαλλοντικές εφαρμογές.

Οι λακκάσες εμφανίζονται ευρέως σε φυτά και μύκητες. Επιπλέον, τα γονίδια που κωδικοποιούν για λακκάσες έχουν ανιχνευθεί σε γονιδιώματα βακτηρίων, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι λακκάσες είναι διαδεδομένες και σε βακτήρια. Ωστόσο, από το μεγάλο αριθμό των συγκεκριμένων ενζύμων που έχουν χαρακτηριστεί, λίγα είναι βακτηριακής προέλευσης. Οι βακτηριακές λακκάσες πιστεύεται ότι έχουν πολλές ιδιότητες που τις κάνουν να διαφέρουν από τις μυκητιακές λακκάσες, όπως η υψηλή θερμοκή σταθερότητα, η σταθερότητα σε αλκαλικό pH, η ενεργοποίηση του ενζύμου από άλας υψηλής συγκέντρωσης. Οι παραπάνω ιδιότητες των βακτηριακών λακκασών εξασφαλίζουν τη μεγάλη δυναμική τους σε πολλές βιοτεχνολογικές μεθόδους.

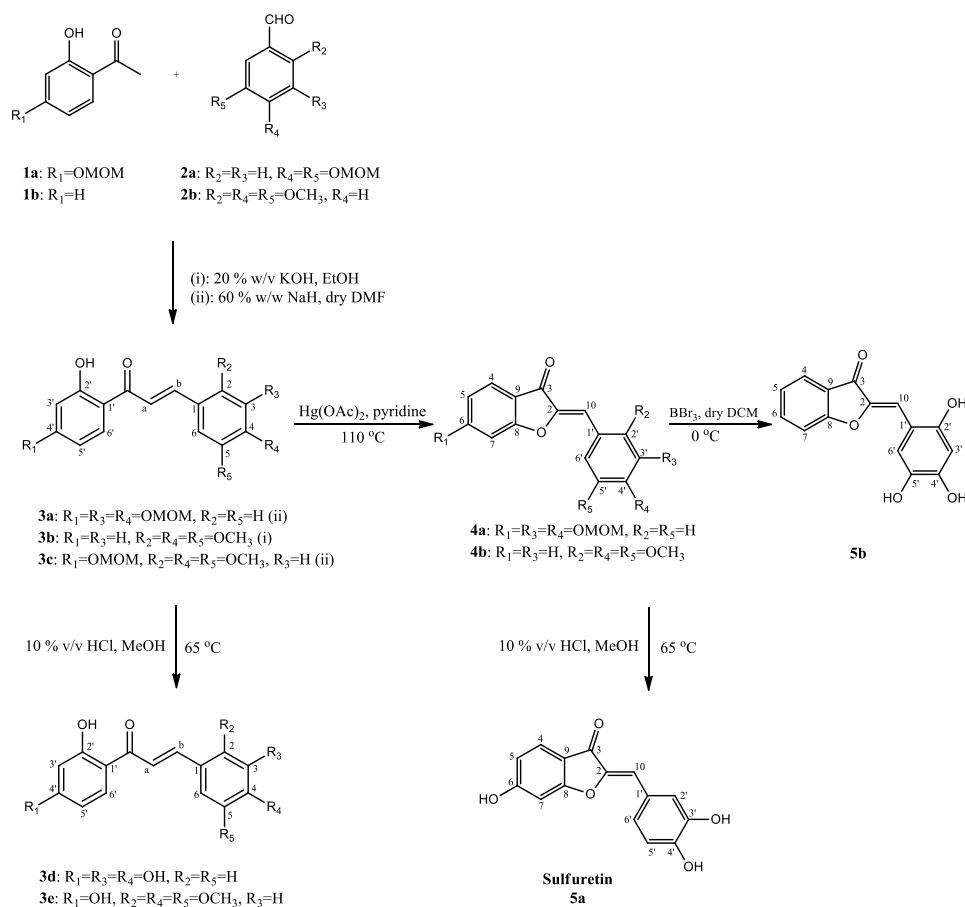
Η λακκάση που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία προήλθε από το θερμόφιλο μύκητα *Myceliophthora thermophila*. Οι θερμόφιλοι μύκητες αντιπροσωπεύουν μια δυνητική αποθήκη θερμοσταθερών ενζύμων για χρήση σε βιομηχανικές εφαρμογές. Επιπλέον, είναι δυνατό να αποτελέσουν «εργοστάσια κυττάρων» με σκοπό την παραγωγή χημικών προϊόντων και υλικών σε υψηλές θερμοκρασίες. Τα ένζυμα των θερμόφιλων μυκήτων συνήθως αντέχουν σε υψηλότερες θερμοκρασίες από τα ένζυμα μεσόφιλων μυκήτων. Ειδικότερα, η λακκάση του μύκητα *Myceliophthora thermophila* παρουσιάζει βέλτιστη ενεργότητα σε pH = 6 και σε θερμοκρασία 60 °C αλλά μπορεί να γίνει ασταθής εάν μείνει για μεγάλο χρονικό διάστημα στους 60 °C και παρουσιάζει χαμηλή ενεργότητα κάτω από τους 30 °C.

Μέχρι στιγμής, οι λακκάσες έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές, όπως για παράδειγμα σε αντιδράσεις οξείδωσης συνθετικής οργανικής χημείας, τροφίμων, επεξεργασίας λυμάτων, απολιγνίνωσης, διαδικασίες λεύκανσης και βιονανοτεχνολογίας.<sup>37-39</sup>

## 2. Σχεδιασμός και μέθοδοι σύνθεσης νέων χαλκονών και ωρονών

### 2.1 Γενικές μέθοδοι σύνθεσης χαλκονών και ωρονών

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο σχεδιασμός, η σύνθεση και η ταυτοποίηση δομής μέσω φασματοσκοπικών μεθόδων (NMR, UV-Vis, MS) νέων χαλκονών και ωρονών. Η σύνθεση των χαλκονών επιτυγχάνεται μέσω αντίδρασης συμπύκνωσης τύπου Claisen-Schmidt μεταξύ κατάλληλα υποκατεστημένων 2-υδροξυ-ακετοφαινονών και βενζαλδεΐδων και εναλλακτικών μεθόδων σύνθεσης που αναλύονται παρακάτω. Οι 2-υδροξυ-ακετοφαινόνες και οι βενζαλδεΐδες που χρησιμοποιούνται, λαμβάνονται είτε ως εμπορικά αντιδραστήρια είτε ως προϊόντα αντιδράσεων προστασίας ακετοφαινονών και βενζαλδεΐδων. Οι χαλκόνες που προκύπτουν από την αντίδραση συμπύκνωσης είναι δυνατόν να οδηγήσουν στις αντίστοιχες ωρόνες μέσω αντίδρασης οξειδωτικής κυκλοποίησης. Τέλος, τα ανάλογα ωρονών που αποτελούν προϊόντα οξειδωτικής κυκλοποίησης μπορούν να υποβληθούν σε αντίδραση αποπροστασίας, έτσι ώστε να απομακρυνθούν, αναλόγως την ωρόνη, οι μεθυλο-ομάδες (-OCH<sub>3</sub>) ή οι μεθοξυ-μεθυλ-ομάδες (MOM). Συνεπώς, τα συνθετικά στάδια των χαλκονών και ωρονών κυμαίνονται από ένα έως τέσσερα (Σχήμα 37) και περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια.



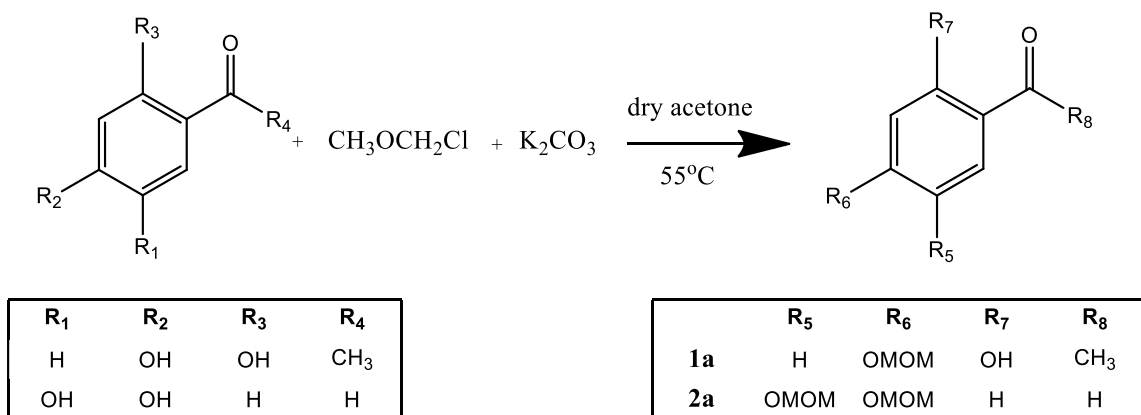
Σχήμα 37: Συνοπτική περιγραφή συνθετικών σταδίων

## 2.2 Γενική μέθοδος προστασίας βενζαλδεϋδών και ακετοφαινονών

Η παρασκευή των προστατευμένων βενζαλδεϋδών (3,4-δι(μεθοξυμεθοξυ)βενζαλδεϋδης (**2a**)) και 2-υδροξυ-ακετοφαινονών (2-υδροξυ-4-(μεθοξυμεθοξυ)-ακετοφαινόνης (**1a**)) (Σχήμα 38) πραγματοποιείται μέσω αντίδρασης αρχικών υδροξυ-υποκατεστημένων βενζαλδεϋδών και ακετοφαινονών με χλωρο-μεθυλ-αιθυλ-αιθέρα και ανθρακικό κάλιο σε διαλύτη ξηρή ακετόνη (Σχήμα 38). Η γραμμομοριακή αναλογία των αντιδρώντων βενζαλδεϋδών/ακετοφαινονών, χλωρομεθυλμεθυλαιθέρα και ανθρακικό κάλιο είναι 1:2.5:5 αντιστοίχως. Η αντίδραση αφήνεται overnight, υπό ανάδευση, στους 55°C και πραγματοποιείται reflux υπό αδρανείς συνθήκες μέσω παροχής N<sub>2</sub>. Η προσθήκη του χλωρομεθυλμεθυλαιθέρα γίνεται στάγδην. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).

Μετά το πέρας της αντίδρασης πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό του παραγόμενου μίγματος έτσι ώστε να αφαιρεθεί το ανθρακικό κάλιο. Ακολούθως, το μίγμα εξατμίζεται για να απομακρυνθεί η ακετόνη και προκύπτει ελαιώδες υγρό.

Προκειμένου να επιτευχθεί καθαρισμός του μίγματος πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα (Petroleum Ether) : οξικού αιθυλεστέρα (Ethyl Acetate). Σε περίπτωση που το μίγμα δε διαλύεται στο σύστημα διαλυτών, πραγματοποιείται ξηρή προσθήκη του μίγματος στη στήλη (dry packing). Τα κλάσματα με το επιθυμητό προϊόν συλλέγονται σε σφαιρική φιάλη και ακολουθεί εξάτμιση υπό κενό ώστε να απομακρυνθούν οι διαλύτες και να προκύψει το τελικό προϊόν σε ικανοποιητική συνθήως καθαρότητα. Η απόδοση των αντιδράσεων προστασίας κυμαίνονται μεταξύ 60-80%.



Σχήμα 38: Αντίδραση προστασίας βενζαλδεϋδών/ακετοφαινονών

## 2.3 Γενική μέθοδος σύνθεσης χαλκονών (αντίδραση συμπύκνωσης Claisen-Schmidt)

### 2.3.1 Γενική μέθοδος σύνθεσης χαλκονών με KOH σε αιθανόλη

Η αντίδραση συμπύκνωσης Claisen-Schmidt αποτελεί υποκατηγορία των αντιδράσεων καρβονυλικής συμπύκνωσης, μέσω της οποίας πραγματοποιήθηκε η σύνθεση ορισμένων χαλκονών με αρχικά αντιδραστήρια 2-υδροξυ-ακετοφαινόνης και βενζαλδεΐδες (Σχήμα 39).

Η γραμμομοριακή αναλογία των αντιδρώντων 2-υδροξυ-ακετοφαινόνης, βενζαλδεΐδης και 20% w/v υδατικού διαλύματος KOH είναι 1:1:3 αντιστοίχως. Για κάθε mmol ακετοφαινόνης/βενζαλδεΐδης χρησιμοποιούνται 3.5 mL αιθανόλης. Η αντίδραση πραγματοποιείται υπό ανάδευση, με reflux υπό αδρανής συνθήκες (παροχή N<sub>2</sub>) και διαρκεί είτε 2-4 h στους 78°C είτε 24 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).

Μετά το πέρας της αντίδρασης το προκύπτον μίγμα ψύχεται σε παγόλουτρο κι οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% v/v έως ότου αποκτήσει pH=1. Με την προσθήκη του υδατικού διαλύματος HCl παρατηρείται καταβύθιση του προϊόντος υπό τη μορφή στερεού (συνήθως παρατηρείται και αλλαγή χρώματος του μίγματος), το οποίο παραλαμβάνεται έπειτα από διήθηση υπό κενό, έκπλυση με υδατικό διάλυμα HCl 10% και ξήρανση. Σε περίπτωση μη καταβύθισης στερεού, πραγματοποιείται εκχύλιση του μίγματος με οξικό αιθυλεστέρα (3 x 15 mL). Τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται, ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και ακολουθεί εξάτμιση υπό κενό του διαλύτη. Τέλος, το μίγμα τοποθετείται σε αντλία υψηλού κενού για πλήρη απομάκρυνση τυχόν εναπομείναντος διαλύτη.

Προκειμένου να επιτευχθεί καθαρισμός του ιζήματος πραγματοποιείται ανακρυστάλλωση με εξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα στους 69°C και παραμονή του μίγματος σε συνθήκες ψύξης για 24 h με σκοπό την πλήρη καταβύθιση των κρυστάλλων του επιθυμητού προϊόντος. Το στερεό προϊόν της ανακρυστάλλωσης διηθείται υπό κενό και εκπλένεται με εξάνιο και στη συνέχεια τοποθετείται στον ξηραντήρα με σκοπό την απομάκρυνση της εναπομένουσας υγρασίας. Σε περίπτωση που προκύπτει προϊόν ελαιώδες υγρό, ο καθαρισμός του μίγματος γίνεται μέσω χρωματογραφίας στήλης σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα/οξικού αιθυλεστέρα. Τα επιθυμητά κλάσματα της στήλης ενώνονται και εξατμίζονται υπό κενό μέχρι πλήρη απομάκρυνση του συστήματος των διαλυτών. Οι αποδόσεις των αντιδράσεων είναι της τάξεως του 40-50%.

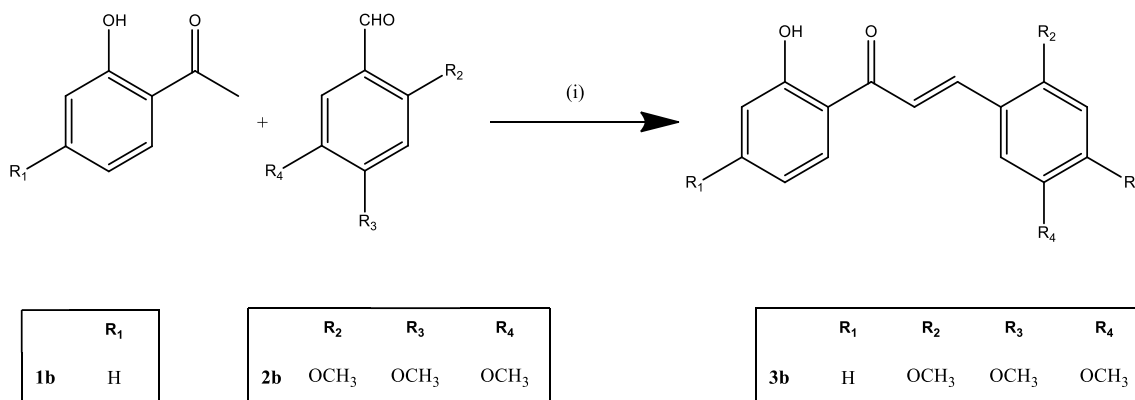
### 2.3.2 Γενική μέθοδος σύνθεσης χαλκονών με NaH σε διμεθυλοφορμαμίδιο

Εναλλακτικά, δοκιμάστηκε άλλη μία μεθοδολογία σύνθεσης χαλκονών με καταλύτη 60% w/w υδρίδιο του νατρίου σε διαλύτη ξηρό διμεθυλοφορμαμίδιο (dry DMF) (Σχήμα 40). Η γραμμομοριακή αναλογία των αντιδρώντων 2-υδροξυ-ακετοφαινόνης, βενζαλδεΐδης και 60% w/w NaH είναι 1:1:3 αντιστοίχως. Για κάθε mmol ακετοφαινόνης/βενζαλδεΐδης

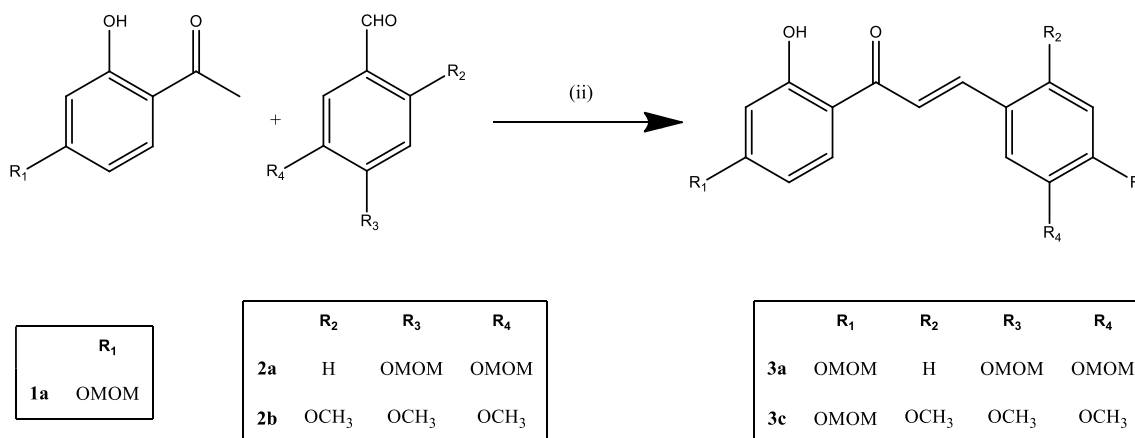
χρησιμοποιούνται 2 mL ξηρού διμεθυλοφορμαμιδίου. Η αντίδραση αφήνεται overnight, υπό ανάδευση και παροχή N<sub>2</sub>, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).

Μετά το πέρας της αντίδρασης, το προκύπτον μίγμα ψύχεται σε παγόλουτρο κι οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% v/v έως ότου το μίγμα αποκτήσει pH=1. Ακολούθως, το μίγμα εκχυλίζεται με διαιθυλαιθέρα (3 x 15 mL) και τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται κι εκχυλίζονται με νερό (2 x 15 mL). Τα τελικά οργανικά εκχυλίσματα ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και εξατμίζονται υπό κενό. Τέλος, το προκύπτον μίγμα τοποθετείται σε αντλία υψηλού κενού για περαιτέρω απομάκρυνση πιθανών εναπομεινάντων διαλυτών.

Για τον καθαρισμό του τελικού στερεού προϊόντος, πραγματοποιείται ανακρυστάλλωση με εξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα στους 69°C και παραμονή του μίγματος σε συνθήκες ψύξης για 24 h με σκοπό την πλήρη καταβύθιση των κρυστάλλων του επιθυμητού προϊόντος. Το στερεό προϊόν της ανακρυστάλλωσης διηθείται υπό κενό με έκπλυση του ιζήματος με εξάνιο και στη συνέχεια τοποθετείται στον ξηραντήρα με σκοπό την απομάκρυνση της εναπομένουσας υγρασίας. Οι αποδόσεις των αντιδράσεων είναι της τάξεως του 30-40%.



Σχήμα 39: Αντίδραση σύνθεσης χαλκονών / (i): υδατ. δ/μα KOH 20% w/v, EtOH



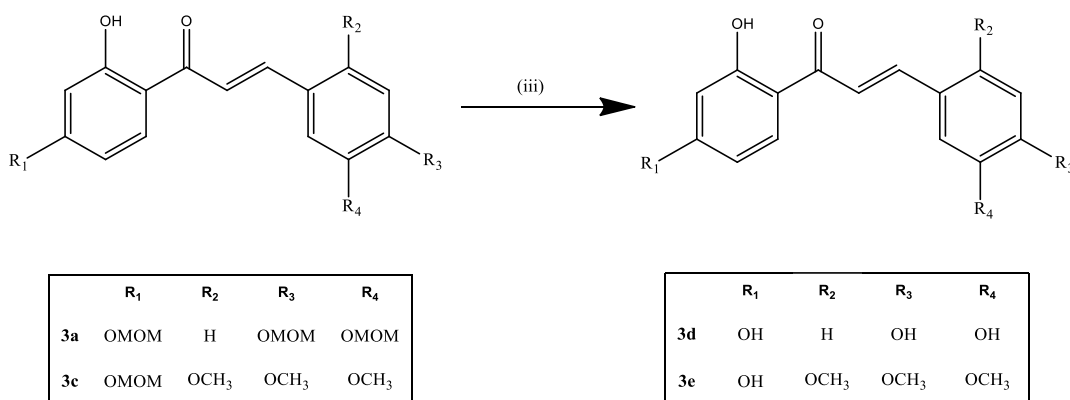
Σχήμα 40: Αντίδραση σύνθεσης χαλκονών / (ii): NaH 60% w/w, dry DMF

## 2.4 Γενική μέθοδος αποπροστασίας χαλκονών

### 2.4.1 Γενική μέθοδος αποπροστασίας χαλκονών με HCl 10% v/v σε μεθανόλη

Για την απομάκρυνση των μεθοξυμεθοξυ-ομάδων ακολουθείται διαφορετική μεθοδολογία. Η αντίδραση πραγματοποιείται ανάμεσα στις υποκατεστημένες χαλκόνες με υδατικό διάλυμα 10% v/v HCl σε διαλύτη μεθανόλη (Σχήμα 41). Για κάθε mmol χαλκόνης απαιτούνται 8 mL υδατικού διαλύματος 10% v/v HCl και 20 mL μεθανόλης. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα υπό ανάδευση, reflux, παροχή N<sub>2</sub>, σε θερμοκρασία 65°C και διαρκεί 15-20 min. Η προσθήκη του υδατικού διαλύματος 10% v/v HCl γίνεται στάγδην.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθεται νερό στο μίγμα προς εξουδετέρωση του HCl. Ακολούθως, το μίγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται και ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Τέλος, το μίγμα εξατμίζεται υπό κενό και τοποθετείται σε αντλία υψηλού κενού. Οι αποδόσεις της συγκεκριμένης μεθόδου κυμαίνονται μεταξύ 70 – 80 %.



Σχήμα 41: Αντίδραση αποπροστασίας χαλκόνης / (iii) : 10% v/v HCl, MeOH

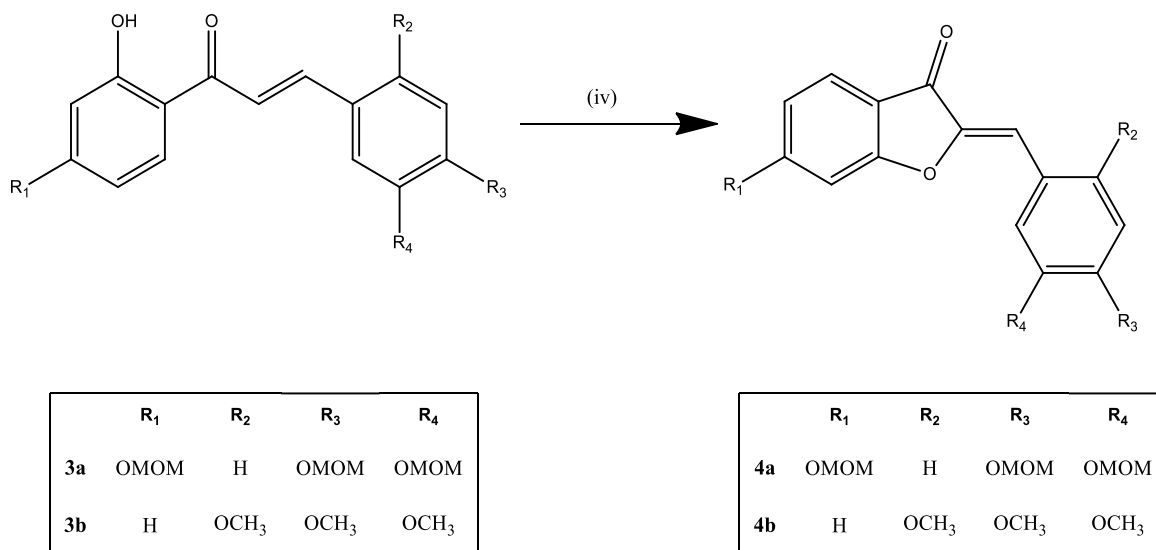
## 2.5 Γενική μέθοδος σύνθεσης ωρονών (Αντίδραση οξειδωτικής κυκλοποίησης)

Μέσω της αντίδρασης της οξειδωτικής κυκλοποίησης των χαλκονών επιτυγχάνεται η σύνθεση των αντίστοιχων ωρονών (Σχήμα 42). Η παρασκευή των ωρονών γίνεται μέσω αντίδρασης χαλκονών με οξικό υδράργυρο σε γραμμομοριακή αναλογία 1:1.25 σε διαλύτη πυριδίνη. Για κάθε mmol χαλκόνης χρησιμοποιούνται 10 mL πυριδίνης. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 110°C, υπό ανάδευση και αδρανείς συνθήκες. Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) και ολοκληρώνεται μετά το πέρας 2 h.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθεται νερό και πάγος στο μίγμα, το οποίο στη συνέχεια οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% v/v μέχρι pH=1. Ακολουθεί εκχύλιση του μίγματος με διχλωρομεθάνιο και ξήρανση με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> των οργανικών εκχυλισμάτων.

Τα οργανικά εκχυλίσματα εξατμίζονται υπό κενό και τέλος το στερεό προϊόν που προκύπτει τοποθετείται προς ξήρανση σε αντλία υψηλού κενού.

Για τον καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιείται ανακρυστάλλωση με μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο. Όσον αφορά στις αποδόσεις των αντιδράσεων κυμαίνονται μεταξύ 60-80%.



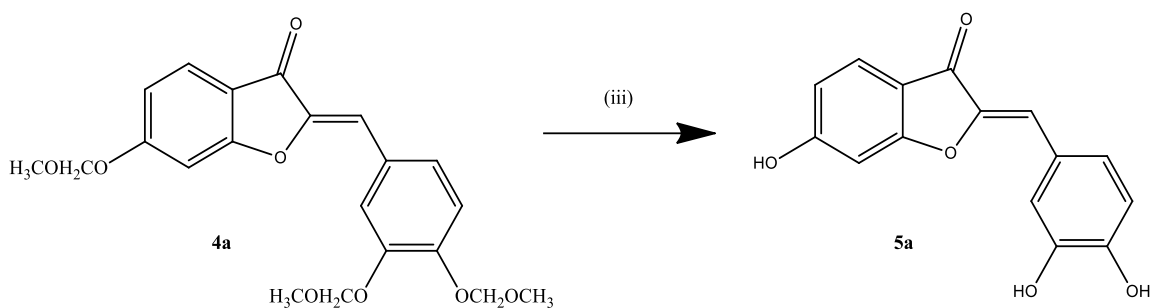
Σχήμα 42: Αντιδράσεις οξειδωτικής κυκλοποίησης / (iv): Hg(OAc)<sub>2</sub>, πυριδίνη

## 2.6 Γενική μέθοδος αποπροστασίας ωρονών

### 2.6.1 Γενική μέθοδος αποπροστασίας ωρονών με HCl 10% v/v σε μεθανόλη

Για την απομάκρυνση των μεθοξυμεθοξυ-ομάδων ακολουθείται διαφορετική μεθοδολογία. Η αντίδραση πραγματοποιείται ανάμεσα στις υποκατεστημένες ωρόνες με υδατικό διάλυμα 10% v/v HCl σε διαλύτη μεθανόλη (Σχήμα 43). Για κάθε mmol ωρόνης απαιτούνται 8 mL υδατικού διαλύματος 10% v/v HCl και 20 mL μεθανόλης. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα υπό ανάδευση, reflux, παροχή N<sub>2</sub>, σε θερμοκρασία 65°C και διαρκεί 15-20 min. Η προσθήκη του υδατικού διαλύματος 10% v/v HCl γίνεται στάγδην.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθεται νερό στο μίγμα προς εξουδετέρωση του HCl. Ακολούθως, το μίγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα και τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται και ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Τέλος, το μίγμα εξατμίζεται υπό κενό και τοποθετείται σε αντλία υψηλού κενού. Οι αποδόσεις της συγκεκριμένης μεθόδου προκύπτουν 70 - 92%.



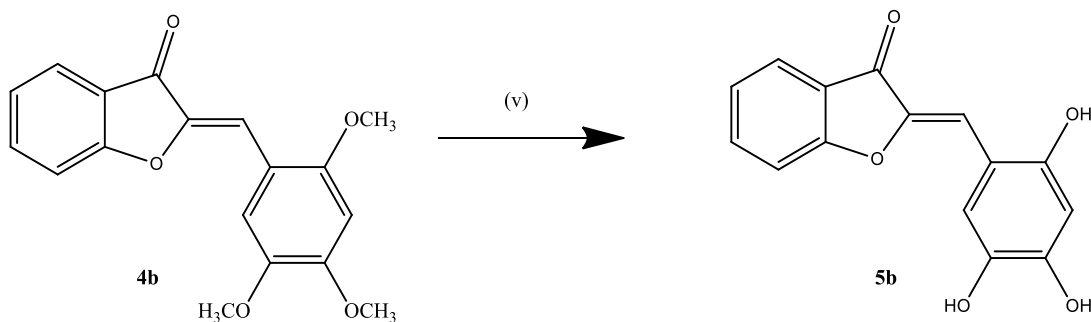
Σχήμα 43: Αντίδραση αποπροστασίας ωρόνης / (iii) : 10% v/v HCl, MeOH

### 2.6.2 Γενική μέθοδος αποπροστασίας ωρονών με BBr<sub>3</sub> σε ξηρό διχλωρομεθάνιο

Στην παρούσα διπλωματική εργασία δοκιμάστηκαν δύο μεθοδολογίες αντιδράσεων αποπροστασίας χαλκονών και ωρονών. Κατά τις αντιδράσεις αποπροστασίας απομακρύνονται οι μεθυλο-ομάδες από τους μεθοξυ-υποκαταστάτες και οι μεθοξυμεθυλο-ομάδες (-MOM) από τους μεθοξυμεθοξυ-υποκαταστάτες (OMOM).

Για την απομάκρυνση των μεθυλο-ομάδων πραγματοποιείται αντίδραση των υποκατεστημένων με μεθοξυ-υποκαταστάτες ωρονών ή χαλκονών με τριβρωμιούχο βόριο (BBr<sub>3</sub>) σε διαλύτη ξηρό διχλωρομεθάνιο (dry DCM). Για κάθε mol μεθοξυ-ομάδα απαιτούνται 5 mol BBr<sub>3</sub>. Η αντίδραση διαρκεί 24 h, υπό ανάδευση, αδρανείς συνθήκες (παροχή N<sub>2</sub>) και σε θερμοκρασία 0°C (Σχήμα 44).

Αφότου ολοκληρωθεί η αντίδραση προστίθεται πάγος και νερό στο μίγμα και αφήνεται για 15-30 min. Ακολουθεί εκχύλιση του μίγματος με οξικό αιθυλεστέρα και τα οργανικά εκχυλίσματα ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, εξατμίζονται υπό κενό και τελικά προκύπτει στερεό προϊόν. Με σκοπό τον καθαρισμό του προϊόντος είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί ανακρυστάλλωση με μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο. Οι αποδόσεις της συγκεκριμένης αντίδρασης είναι της τάξεως 60-70%.



Σχήμα 44: Αντίδραση αποπροστασίας ωρόνης / (v) : BBr<sub>3</sub>, dry DCM



## 3. Πειραματικό Μέρος

### 3.1 Όργανα και Συσκευές

Ο χαρακτηρισμός κι η ταυτοποίηση της δομής των ενώσεων που συντέθηκαν πραγματοποιήθηκε μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού  $^1\text{H}$  NMR και μέσω φασματοσκοπίας μάζας ESI-MS.

Για τη λήψη των φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού,  $^1\text{H}$  NMR, χρησιμοποιήθηκε το όργανο Varian Gemini 300 MHz του Εθνικού Ιδρύματος Έρευνών.

Για τη λήψη των φασμάτων μάζας ESI-MS χρησιμοποιήθηκε το όργανο Varian 500 MS IT Mass Spectrometer του Κέντρου Περιβάλλοντος και Ποιότητας Ζωής (Οριζόντιο Εργαστήριο) της Σχολής Χημικών Μηχανικών.

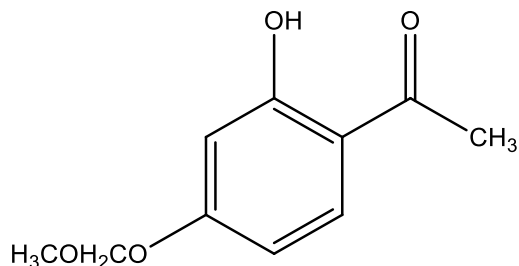
Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων δίνονται σε ppm. Η πολλαπλότητα των σημάτων στα φάσματα  $^1\text{H}$  NMR αναφέρονται ως: s (singlet, απλό), d (doublet, διπλό), t (triplet, τριπλό), q (quartet, τετραπλό), m (multiplet, πολλαπλό), br (broad, ευρύ). Οι σταθερές συζεύξεως J δίνονται σε Hz.

Τα σημεία τήξης έχουν ληφθεί σε ανοικτούς τριχοδιαμετρικούς σωλήνες σε συσκευή Gallenkamp και δεν έχουν διορθωθεί.

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

## 3.2 Σύνθεση προστατευμένων βενζαλδεϋδών και ακετοφαινονών

### 3.2.1 2-υδροξυ-4-(μεθοξυμεθοξυ)-ακετοφαινόνη (**1a**)



Σχήμα 45: Συντακτικός τύπος ακετοφαινόνης **1a**

Η παραπάνω προστατευμένη ακετοφαινόνη **1a** (Σχήμα 45) παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο προστασίας βενζαλδεϋδών και ακετοφαινονών. Πιο συγκεκριμένα, αντιδρούν 3.5 mmol (531.1 mg) της 2,4-διϋδροξυακετοφαινόνης και 5.27 mmol (περίπου 0.4 mL) χλωρομεθυλμεθυλαιθέρα σε 39 mL ξηρής ακετόνης και 10 mmol (1.9 g) ανθρακικού καλίου (Σχήμα 38). Η γραμμομοριακή αναλογία των αντιδρώντων 2,4-διϋδροξυακετοφαινόνη, χλωρομεθυλμεθυλαιθέρα και ανθρακικό κάλιο είναι 1:1.5:3 αντιστοίχως. Η αντίδραση αφήνεται υπό ανάδευση σε reflux, overnight στους 55°C και παροχή N<sub>2</sub>.

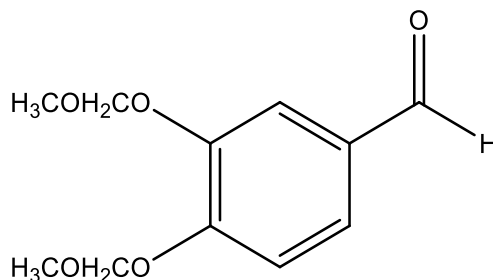
Μετά το τέλος της αντίδρασης πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό του παραγόμενου μίγματος έτσι ώστε να αφαιρεθεί το ανθρακικό κάλιο. Ακολούθως, το διήθημα εξατμίζεται για να απομακρυνθεί η ακετόνη και προκύπτει σκούρο πορτοκαλί ελαιώδες υγρό.

Με σκοπό τον καθαρισμό του μίγματος πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα (Petroleum Ether) : οξικού αιθυλεστέρα (Ethyl Acetate) σε αναλογία 9:1. Δεδομένου ότι το μίγμα δε διαλύεται στο σύστημα διαλυτών, πραγματοποιείται ξηρή προσθήκη του μίγματος στη στήλη (dry packing) (το μίγμα διαλύεται σε μεθανόλη). Τα κλάσματα με το επιθυμητό προϊόν συλλέγονται κι ακολουθεί εξάτμιση υπό κενό και ξήρανση σε αντλία υψηλού κενού έως ότου προκύψει χαμηλού σημείου τήξεως τελικό προϊόν χρώματος ανοιχτού πορτοκαλί.

Η απόδοση της αντίδρασης και η ανάλυση του φάσματος που προκύπτει μετά από έλεγχο του προϊόντος μέσω φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H NMR έχουν ως εξής:

- Απόδοση αντίδρασης: 80 % (548 mg)
- <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 12.58 (s, 1H, -OH), 7.65 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H-6), 6.60 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H-3), 6.56 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H, H-5), 5.22 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>-), 3.50 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 2.59 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>)

### 3.2.2 3,4-δι(μεθοξυμεθοξυ)βενζαλδεΐδη (**2a**)



Σχήμα 46: Συντακτικός τύπος βενζαλδεΐδης **2a**

Η βενζαλδεΐδη **2a** (Σχήμα 46) που απεικονίζεται παραπάνω παρασκευάζεται με βάση τη γενική μέθοδο προστασίας βενζαλδεΐδών και ακετοφαινονών. Πιο αναλυτικά, αντιδρούν 3.6 mmol (500 mg) της 3,4-διυδροξυβενζαλδεΐδης και 9 mmol (724.59 mg → 0.7 mL) χλωρομεθυλμεθυλαιθέρα σε 60 mL ξηρής ακετόνης και 18 mmol (2.49 g) ανθρακικού καλίου (Σχήμα 38). Η γραμμομοριακή αναλογία των αντιδρώντων 3,4-διυδροξυβενζαλδεΐδη, χλωρομεθυλμεθυλαιθέρα και ανθρακικό κάλιο είναι 1:2.5:5 αντιστοίχως. Η αντίδραση αφήνεται overnight υπό ανάδευση και reflux στους 55°C και παροχή N<sub>2</sub>.

Μετά το πέρας της αντίδρασης πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό του παραγόμενου μίγματος έτσι ώστε να αφαιρεθεί το ανθρακικό κάλιο. Ακολούθως, το διήθημα εξατμίζεται για να απομακρυνθεί η ακετόνη και προκύπτει κίτρινο ελαιώδες υγρό.

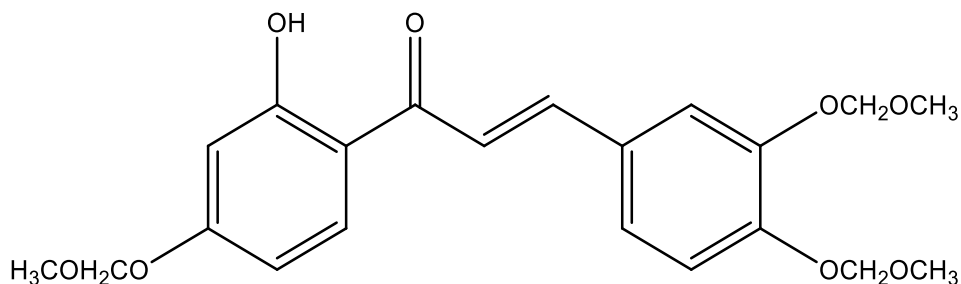
Προκειμένου να επιτευχθεί καθαρισμός του μίγματος πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα (Petroleum Ether) : οξικού αιθυλεστέρα (Ethyl Acetate) σε αναλογία 8:2 (2 x 100 mL) αρχικά και 7:3 (2 x 100 mL) στη συνέχεια. Δεδομένου ότι το μίγμα δε διαλύεται στο σύστημα διαλυτών, πραγματοποιείται ξηρή προσθήκη του μίγματος στη στήλη (dry packing) (το μίγμα διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα). Τα κλάσματα με το επιθυμητό προϊόν συλλέγονται κι ενώνονται. Ακολουθεί εξάτμιση υπό κενό των εν λόγω κλασμάτων και μετά την αφαίρεση των διαλυτών προκύπτει τελικό προϊόν στερεό λευκού χρώματος.

Η απόδοση της αντίδρασης, το σημείο τήξης του προϊόντος και η ανάλυση του φάσματος που προκύπτει μετά από έλεγχο του προϊόντος μέσω φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H NMR έχουν ως εξής:

- Απόδοση αντίδρασης: 62 % (503.6 mg)
- Σημείο τήξης: 61.2-62 °C
- <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 9.82 (s, 1H, H (C = O)), 7.64 (d, J = 1.9 Hz, 1H, H-3), 7.47 (dd, J = 8.3, 1.9 Hz, 1H, H-2), 7.23 (d, J = 1.0 Hz, 1H, H-6), 5.30 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>- (MOM)), 5.27 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>- (MOM)), 3.51 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> (MOM)), 3.51 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> (MOM))

### 3.3 Σύνθεση χαλκονών

#### 3.3.1 (E)-3-(3,4-δι(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)-1-(2'-υδροξυ-4'-(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη (**3a**)



Σχήμα 47: Συντακτικός τύπος χαλκόνης **3a**

Η χαλκόνη **3a** (Σχήμα 47) συντίθεται βάσει της γενικής μεθόδου σύνθεσης χαλκονών με KOH σε αιθανόλη. Πιο αναλυτικά, 3.35 mmol (657 mg) της 2-υδροξυ-4-(μεθοξυμεθοξυ)-ακετοφαινόνης (**1a**) αντιδρούν με 3.35 mmol (757 mg) της 3,4-δι(μεθοξυμεθοξυ)βενζαλδεΰδης (**2a**) σε 12 mL αιθανόλης και 6.2 mL 20% w/v υδατικού διαλύματος KOH. Η γραμμομοριακή αναλογία των αντιδρώντων 2-υδροξυ-4-(μεθοξυμεθοξυ)-ακετοφαινόνης (**1a**), 3,4-δι(μεθοξυμεθοξυ)βενζαλδεΰδης (**2a**) και 20% w/v υδατικού διαλύματος KOH είναι 1:1:3 αντιστοίχως. Η αντίδραση αφήνεται overnight και πραγματοποιείται υπό ανάδευση και παροχή N<sub>2</sub> σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Μετά το πέρας της αντίδρασης το προκύπτον μίγμα ψύχεται σε παγόλουτρο κι οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% v/v έως ότου το μίγμα αποκτήσει pH=1. Με την προσθήκη του υδατικού διαλύματος HCl παρατηρείται καταβύθιση του προϊόντος υπό τη μορφή γελλοειδούς, για το οποίο δεν ενδείκνυται η διήθηση. Συνεπώς, το μίγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (3 x 20 mL) και τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται, ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και εξατμίζονται υπό κενό. Ακολούθως, το προκύπτον μίγμα τοποθετείται σε αντλία υψηλού κενού για περαιτέρω απομάκρυνση πιθανών εναπομεινάντων διαλυτών. Η ταυτοποίηση δομής του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H NMR.

Σχόλιο: Μέσω της φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H NMR κρίθηκε πώς το προϊόν δεν ήταν ικανοποιητικής καθαρότητας και έτσι επόμενο στόχο αποτέλεσε η σύνθεση της χαλκόνης **3a** σε διαφορετικές συνθήκες αντίδρασης όπως παρουσιάζεται στην πορεία.

*Σύνθεση της (E)-3-(3,4-δι(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)-1-(2'-υδροξυ-4'-(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)προπ-2-εν-1-όνης (**3a**) με NaH σε dry DMF*

Εναλλακτικά, η χαλκόνη **3a** (Σχήμα 47) παρασκευάζεται με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης χαλκονών με NaH σε dry DMF. Σε αυτή την περίπτωση, αντιδρούν 2.13 mmol (418 mg) της 2-υδροξυ-4-(μεθοξυμεθοξυ)-ακετοφαινόνης (**1a**) και 2.13 mmol (504 mg) της 3,4-δι(μεθοξυμεθοξυ)βενζαλδεΰδης (**2a**) σε 4.5 mL ξηρού διμεθυλοφορμαμίδιου και

255.43 mg 60% w/w υδριδίου του νατρίου (Σχήμα 39). Η γραμμομοριακή αναλογία των αντιδρώντων 2-υδροξυ-4-(μεθοξυμεθοξυ)-ακετοφαινόνης (**1a**), 3,4-δι(μεθοξυμεθοξυ)βενζαλδεΐδης (**2a**) και 60% w/w NaH είναι 1:1:3 αντιστοίχως. Η αντίδραση αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και υπό ανάδευση για 24 h σε αδρανείς συνθήκες μέσω παροχής N<sub>2</sub>.

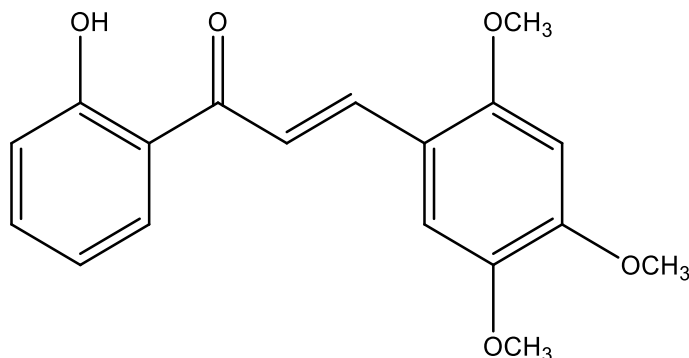
Μετά το πέρας της αντίδρασης, το προκύπτον μίγμα ψύχεται σε παγόλουτρο κι οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% v/v έως ότου το μίγμα αποκτήσει pH=1. Με την προσθήκη του υδατικού διαλύματος HCl παρατηρείται καταβύθιση του προϊόντος υπό τη μορφή λεπτόκοκκου στερεού. Το μίγμα εκχυλίζεται με διαιθυλαιθέρα (3 x 15 mL) και τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται κι εκχυλίζονται με νερό (2 x 15 mL). Τα τελικά οργανικά εκχυλίσματα ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και εξατμίζονται υπό κενό. Ακολούθως, το προκύπτον μίγμα τοποθετείται σε αντλία υψηλού κενού για περαιτέρω απομάκρυνση πιθανών εναπομεινάντων διαλυτών. Το προϊόν που προκύπτει είναι κίτρινο-πορτοκαλί στερεό.

Για τον καθαρισμό της χαλκόνης **3a** πραγματοποιείται ανακρυστάλλωση με εξάνιο/οξικό αιθyleστέρα στους 69°C και παραμονή του μίγματος σε συνθήκες ψύξης για 24 h με σκοπό την πλήρη καταβύθιση των κρυστάλλων του επιθυμητού προϊόντος.

Η απόδοση της αντίδρασης, το σημείο τήξης του προϊόντος και η ανάλυση του φάσματος που προκύπτει μετά από έλεγχο του προϊόντος μέσω φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H NMR έχουν ως εξής:

- Απόδοση αντίδρασης: 40 % (342 mg)
- Σημείο τήξης: 88.2 – 89.0 °C
- <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 13.30 (s, 1H, OH), 7.85 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-6'), 7.83 (d, J = 15.6 Hz, 1H, Hb), 7.48 (d, J = 2.1 Hz, 1H, H-5), 7.45 (d, J = 15.6 Hz, 1H, Ha), 7.30 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H-2), 7.20 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-6), 6.65 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-3'), 6.60 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H, H-5'), 5.31 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>- (MOM)), 5.31 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>- (MOM)), 5.24 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>- (MOM)), 3.58 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> (MOM)), 3.55 (s, -CH<sub>3</sub> (MOM)), 3.52 (s, -CH<sub>3</sub> (MOM))

### 3.3.2 (E)-1-(2'-υδροξυφαινυλο)-3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)προπ-2-εν-όνη (**3b**)



Σχήμα 48: Συντακτικός τύπος χαλκόνης **3b**

Η χαλκόνη **3b** (Σχήμα 48) που απεικονίζεται στο παραπάνω σχήμα παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο σύνθεσης χαλκονών με KOH σε αιθανόλη. Συγκεκριμένα, αντιδρούν 3.7 mmol (500 mg) της 2-υδροξυ-ακετοφαινόνης (**1b**) και 3.7 mmol (721 mg) της 2,4,5-τριμεθοξυ-βενζαλδεΐδης (**2b**) σε 6 mL αιθανόλης και 3.1 mL 20% w/v υδατικού διαλύματος KOH (Σχήμα 39). Η γραμμομοριακή αναλογία των αντιδρώντων 2-υδροξυ-ακετοφαινόνης, 2,4,5-τριμεθοξυ-βενζαλδεΐδης και 20% w/v υδατικού διαλύματος KOH είναι 1:1:3 αντιστοίχως. Η αντίδραση πραγματοποιείται υπό ανάδευση, reflux και παροχή N<sub>2</sub> για 4 h στους 78°C.

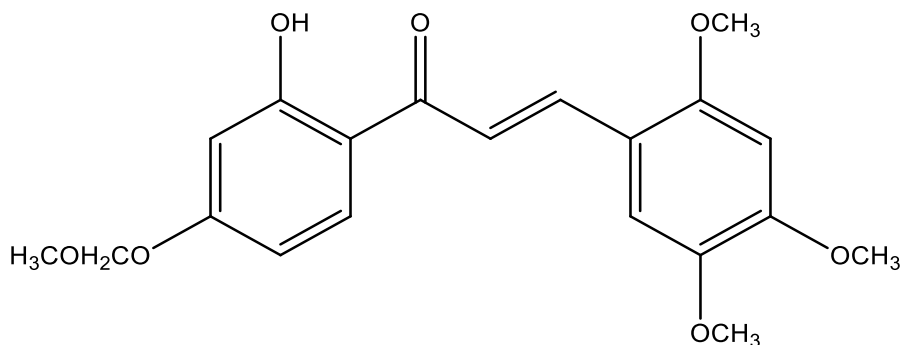
Το μίγμα που προκύπτει μετά το πέρας της αντίδρασης, ψύχεται σε παγόλουτρο κι οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% v/v έως ότου το μίγμα αποκτήσει pH=1. Με την προσθήκη του υδατικού διαλύματος HCl παρατηρείται καταβύθιση του προϊόντος υπό τη μορφή στερεού, το οποίο διηθείται υπό κενό εκπλένοντας το ίζημα με υδατικό διάλυμα HCl 10% και στη συνέχεια ξηραίνεται. Το ίζημα που προκύπτει είναι πορτοκαλί-κίτρινο στερεό.

Για τον καθαρισμό του ιζήματος πραγματοποιείται ανακρυστάλλωση με εξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα στους 69°C. Το ανακρυσταλλωμένο μίγμα που προκύπτει αφήνεται στο ψυγείο για 24 h με σκοπό την πλήρη καταβύθιση των κρυστάλλων του επιθυμητού προϊόντος.

Η απόδοση της αντίδρασης, το σημείο τήξης του προϊόντος και η ανάλυση του φάσματος που προκύπτει μετά από έλεγχο του προϊόντος μέσω φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H NMR έχουν ως εξής:

- Απόδοση αντίδρασης: 47 % (546.3 mg)
- Σημείο τήξης: 118.4 – 119.6 °C
- <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 13.03 (s, 1H, -OH), 8.21 (d, J = 15.4 Hz, 1H, H<sub>b</sub>), 7.92 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-6'), 7.62 (d, J = 15.4 Hz, 1H, H<sub>a</sub>), 7.47 (t, J = 7.7 Hz, 1H, H-4'), 7.13 (s, 1H, H-6), 7.01 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-3'), 6.93 (t, J = 7.5 Hz, 1H, H-5'), 6.52 (s, 1H, H-3), 3.98 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.95 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.94 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>)

### 3.3.3 (E)-1-(2'-υδροξυ-4'-(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)-3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη (3c)



Σχήμα 49: Συντακτικός τύπος χαλκόνης 3c

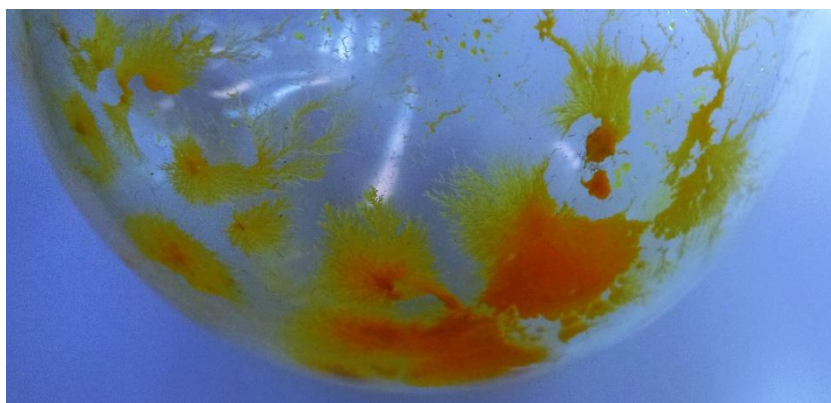
Η χαλκόνη **3c** (Σχήμα 49) συντίθεται με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης χαλκονών με NaH σε dry DMF. Πιο αναλυτικά, αντιδρούν 0.306 mmol (60 mg) της 2-υδροξυ-4-(μεθοξυμεθοξυ)-ακετοφαινόνης (**1a**) και 0.306 mmol (60 mg) της 2,4,5-τριμεθοξυβενζαλδεΐδης (**2b**) σε 0.8 mL ξηρού διμεθυλοφορμαμίδιου (dry DMF) και 0.917 mmol (36.67 mg) 60% w/w υδριδίου του νατρίου (NaH) (Σχήμα 40). Η γραμμομοριακή αναλογία των αντιδρώντων 2-υδροξυ-4-(μεθοξυμεθοξυ)-ακετοφαινόνης, 2,4,5-τριμεθοξυβενζαλδεΐδης και 60% w/w υδριδίου του νατρίου είναι 1:1:3 αντιστοίχως. Η αντίδραση αφήνεται overnight και πραγματοποιείται υπό ανάδευση και παροχή N<sub>2</sub> σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Μετά το τέλος της αντίδρασης, το μίγμα τοποθετείται σε παγόλουτρο και οξινίζεται με υδατικό διάλυμα HCl 10% v/v μέχρι pH=1. Με την προσθήκη του διαλύματος HCl καταβυθίζεται κίτρινο στερεό αλλά μετά από μικρό χρονικό διάστημα παρατηρείται διάλυση του στερεού στο διάλυμα. Κατά συνέπεια, πραγματοποιείται εκχύλιση του μίγματος με διχλωρομεθάνιο (3 x 15 mL). Η υδατική φάση εκχυλίζεται περαιτέρω με διαιθυλαιθέρα (3 x 15 mL) και τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται και εκχυλίζονται με νερό (3 x 15 mL). Ακολούθως, όλα τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται και ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Στη συνέχεια, το μίγμα εξατμίζεται υπό κενό και τελικά τοποθετείται σε αντλία υψηλού κενού. Το προϊόν που προκύπτει είναι κίτρινο ελαιώδες υγρό.

Προκειμένου να επιτευχθεί καθαρισμός του προϊόντος, πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα : οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 7.5:2.5. Δεδομένου ότι το μίγμα δε διαλύεται στο σύστημα διαλυτών, μεταφέρεται στη στήλη αφότου διαλυθεί σε οξικό αιθυλεστέρα. Τα κλάσματα με το επιθυμητό προϊόν συλλέγονται κι ενώνονται. Ακολουθεί εξάτμιση υπό κενό των εν λόγω κλασμάτων και μετά την περαιτέρω αφαίρεση των διαλυτών σε αντλία υψηλού κενού προκύπτει τελικό στερεό προϊόν κίτρινου - πορτοκαλί χρώματος (Εικόνα 2).

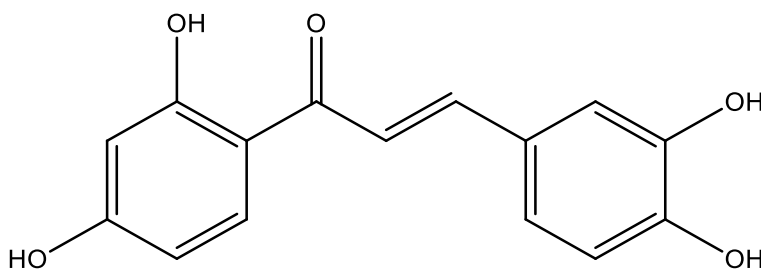
Η απόδοση της αντίδρασης, το σημείο τήξης του προϊόντος και η ανάλυση του φάσματος που προκύπτει μετά από έλεγχο του προϊόντος μέσω φασματοσκοπίας  $^1\text{H NMR}$  έχουν ως εξής:

- Απόδοση αντίδρασης: 39 % (145.3 mg)
- Σημείο τήξης: 86.2 – 86.8 °C
- $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 13.48 (s, 1H, -OH), 8.17 (d,  $J = 15.5$  Hz, 1H, Hb), 7.85 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, H-5'), 7.54 (d,  $J = 15.0$  Hz, 1H, Ha), 7.12 (s, 1H, H-3'), 6.64 (s, 1H, H-6), 6.59 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, H-6'), 6.54 (s, 1H, H-3), 5.23 (s, 2H, -OCH<sub>2</sub>-), 4.03 – 3.90 (m, 9H, -OCH<sub>3</sub>), 3.51 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub> (MOM))
- MS (ESI):  $m/z = 375.2$  (37 %)  $[\text{M}+1]^+$ , 397.3 (28 %)  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 221.3 (47 %)  $[\text{M} - 3 \times \text{OCH}_3 - 1 \times \text{OMOM} + 1]^+$  ή  $[\text{M} - \text{A δακτύλιο}]$



Εικόνα 2: (E)-1-(2-υδροξυ-4-(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)-3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη

### 3.3.4 (E)-1-(2',4'-διϋδροξυφαινυλ)-3-(3,4-διϋδροξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη (3d)



Σχήμα 50: Συντακτικός τύπος χαλκόνης 3d

Η χαλκόνη **3d** (Σχήμα 50) που απεικονίζεται στο παραπάνω σχήμα παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας χαλκονών με 10% v/v HCl σε μεθανόλη. Πιο συγκεκριμένα, αντιδρούν 0.1175 mmol (47.5 mg) της (E)-3-(3,4-δι(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)-1-(2'-υδροξυ-4'-(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)προπ-2-εν-1-όνης (**3a**) σε 1 mL υδατικού διαλύματος 10% v/v HCl και 2.2 mL μεθανόλης (Σχήμα 41). Η



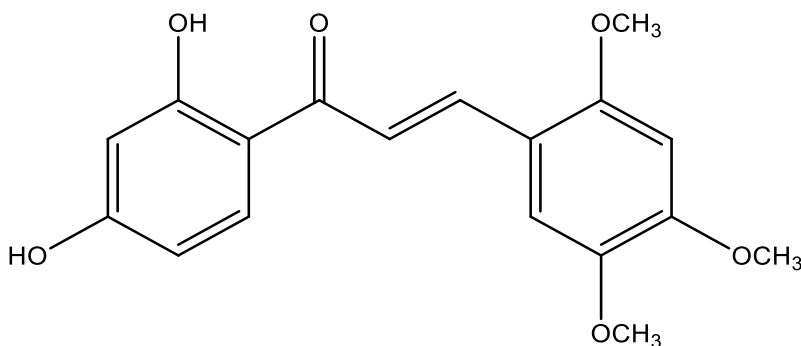
αντίδραση πραγματοποιείται στους 65°C, υπό ανάδευση, αδρανείς συνθήκες, reflux και διαρκεί 15-20 min. Η ποσότητα του υδατικού διαλύματος 10% v/v HCl γίνεται στάγδην.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθεται νερό στο μίγμα προς εξουδετέρωση του HCl. Ακολούθως, πραγματοποιείται εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (3 x 15 mL) και τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται και ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Τέλος, το μίγμα εξατμίζεται υπό κενό και τοποθετείται σε αντλία υψηλού κενού. Μετά το τέλος της υπό κενό εξάτμισης προκύπτει πορτοκαλί-κόκκινο στερεό.

Η απόδοση της αντίδρασης, το σημείο τήξης του προϊόντος και η ανάλυση του φάσματος που προκύπτει μετά από έλεγχο του προϊόντος μέσω φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H NMR έχουν ως εξής:

- Απόδοση αντίδρασης: 70 % (22.4 mg)
- Σημείο τήξης: > 180 °C (με αποσύνθεση)
- <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, MeOD): δ (ppm) 7.92 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-5), 7.70 (d, J = 15.2 Hz, 1H, Hb), 7.52 (d, J = 15.3 Hz, 1H, Ha), 7.16 (d, J = 1.7 Hz, 1H, H-3'), 7.09 (dd, J = 8.1, 1.7 Hz, 1H, H-5'), 6.80 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-6'), 6.40 (dd, J = 8.8, 2.3 Hz, 1H, H-6), 6.28 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-2)
- <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) 13.53 (s, 1H, OH-2'), 10.60 (s, 1H, OH-4'), 9.71 (s, 1H, OH-4), 9.06 (s, 1H, OH-3), 8.11 (d, J = 8.9 Hz, 1H, H-6'), 7.63 (s, 2H, H-3' & H-2), 7.222 (d, J = 17.1 Hz, 1H, Hb), 7.216 (d, J = 17.1 Hz, 1H, Ha), 6.79 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-5'), 6.38 (dd, J = 8.8, 2.3 Hz, 1H, H-6), 6.25 (d, J = 2.3 Hz, 1H, H-5)
- MS (ESI) (θετικό): m/z = 273.16 (50 %) [M + 1]<sup>+</sup>, 206.61 (77 %) [M - 4 x -OH + 2]<sup>+</sup>
- MS (ESI) (αρνητικό): m/z = 271.2 (100%) [M-1]<sup>-</sup>, 542.79 (92 %) [2 x (M - 1)]<sup>-</sup>

### 3.3.5 (*E*)-1-(2',4'-διϋδροξυφαινυλ)-3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη (**3e**)



Σχήμα 51: Συντακτικός τύπος χαλκόνης **3e**

Η χαλκόνη **3e** (Σχήμα 51) παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας χαλκονών με 10% v/v HCl σε μεθανόλη. Πιο συγκεκριμένα, αντιδρούν 0.157 mmol (58.7 mg) της (*E*)-1-(2'-υδροξυ-4'-(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)-3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνης (**3c**) σε 1 mL υδατικού διαλύματος 10% v/v HCl και 3 mL μεθανόλης (Σχήμα

41). Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 65°C, υπό ανάδευση, αδρανείς συνθήκες, reflux και διαρκεί 15-20 min. Η προσθήκη του υδατικού διαλύματος 10% v/v HCl γίνεται σταγόδην.

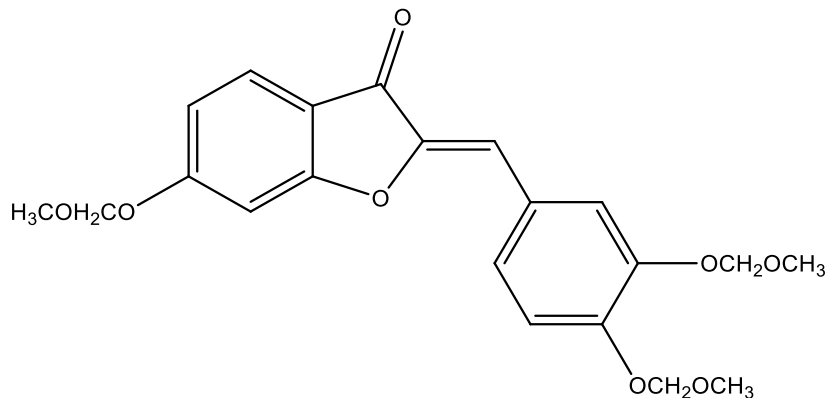
Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθεται νερό στο μίγμα προς εξουδετέρωση του HCl και παρατηρείται καταβύθιση κίτρινου γαλακτώματος. Ακολούθως, πραγματοποιείται εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (3 x 15 mL) και τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται και ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Τέλος, το μίγμα εξατμίζεται υπό κενό και τοποθετείται σε αντλία υψηλού κενού. Μετά το τέλος της υπό κενό εξάτμισης προκύπτει στερεό προϊόν έντονου πορτοκαλί χρώματος.

Η απόδοση της αντίδρασης, το σημείο τήξης του προϊόντος και η ανάλυση του φάσματος που προκύπτει μετά από έλεγχο του προϊόντος μέσω φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H NMR έχουν ως εξής:

- Απόδοση αντίδρασης: 92 % (47.7 mg)
- Σημείο τήξης: 158.2 – 160.3 °C
- <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 8.16 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H, H<sub>b</sub>), 7.84 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H, H-5'), 7.52 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, H<sub>a</sub>), 7.12 (s, 1H, H-3), 6.54 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, H-6'), 6.49 (s, 1H, H-6), 6.44 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H, H-3'), 3.97 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.93 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.90 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>).

### 3.4 Σύνθεση ωρονών

#### 3.4.1 (*Z*)-2-(3',4'-δι(μεθοξυμεθοξυ)βενζυλιδενο)-6-(μεθοξυμεθοξυ)βενζοφουραν-3(2*H*)-όνη (**4a**)



Σχήμα 52: Συντακτικός τύπος ωρόνης **4a**

Η ωρόνη **4a** (Σχήμα 52) που απεικονίζεται στο παραπάνω σχήμα, συντίθεται με βάση τη γενική μέθοδο σύνθεσης ωρονών με οξειδωτική κυκλοποίηση. Η χαλκόνη (*E*)-3-(3,4-δι(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)-1-(2'-υδροξυ-4'-(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη (**3a**) αντιδρά με οξικό υδράργυρο (Hg(OAc)<sub>2</sub>) με γραμμομοριακή αναλογία 1:1.25 σε διαλύτη πυριδίνη. Συγκεκριμένα, αντιδρούν 0.347 mmol (140,4 mg) με 0.434 mmol (138.29 mg)

οξικού υδραργύρου σε 3.5 mL πυριδίνης (Σχήμα 42). Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 110°C, υπό ανάδευση, αδρανείς συνθήκες, reflux και διαρκεί 2 h.

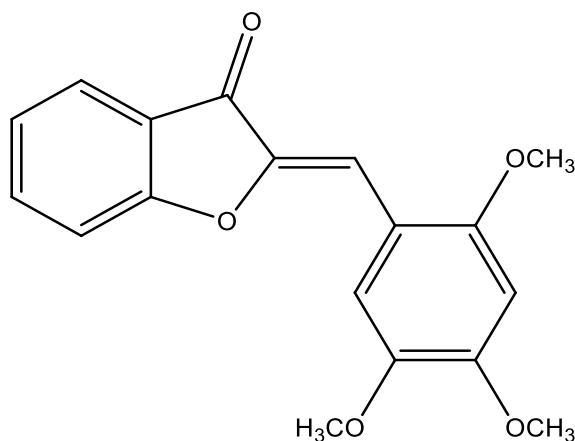
Μετά το πέρας της αντίδρασης, στο μίγμα προστίθεται πάγος και στη συνέχεια υδατικό διάλυμα HCl 10% μέχρις ότου το μίγμα αποκτήσει pH=1. Ακολούθως, το μίγμα εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο (3 x 15 mL) και τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται, ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Το μίγμα εξατμίζεται υπό κενό προς απομάκρυνση του διαλύτη και τελικά παραλαμβάνεται στερεό κίτρινου χρώματος.

Προκειμένου να επιτευχθεί καθαρισμός του προκύπτοντος στερεού, πραγματοποιείται ανακρυστάλλωση με σύστημα διαλυτών μεθανόλη/διχλωρομεθάνιο στους 65°C και παραμονή του μίγματος σε συνθήκες ψύξης για 24 h με σκοπό την πλήρη καταβύθιση των κρυστάλλων του επιθυμητού προϊόντος.

Όσον αφορά στην απόδοση της αντίδρασης, στο σημείο τήξης του προϊόντος και στην ανάλυση της φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H NMR ισχύουν:

- Απόδοση αντίδρασης: 60 % (84.3 mg)
- Σημείο τήξης: 140.2 – 141.4 °C (με αποσύνθεση)
- <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 7.71 (d, J = 8.8 Hz, 2H, H-4 & H-5), 7.55 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-5'), 7.21 (s, 1H, H-7), 6.95 (s, 1H, H-2'), 6.85 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-6'), 6.78 (s, 1H, H-10), 5.31 (s, 6H, -CH<sub>2</sub>- (MOM)), 3.58 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> (MOM)), 3.55 (s, 6H, -CH<sub>3</sub> (MOM))
- MS (ESI): m/z = 425.3 (100 %) [M + Na]<sup>+</sup>, 403.2 (34 %) [M + 1]<sup>+</sup>

#### 3.4.2 (Z)-2-(2',4',5'-τριμεθοξυβενζυλιδενό)βενζοφουραν-2(2H)-όνη (**4b**)



Σχήμα 53: Συντακτικός τύπος ωρόνης **4b**

Η παρασκευή της ωρόνης **4b** (Σχήμα 53) επιτυγχάνεται ακολουθώντας τη γενική μέθοδο σύνθεσης ωρονών με οξειδωτική κυκλοποίηση. Η πρόδρομη χαλκόνη (*E*)-1-(2'-υδροξυφαινυλο)-3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)προπ-2-εν-όνη (**3b**) αντιδρά με οξικό υδράργυρο (Hg(OAc)<sub>2</sub>) με γραμμομοριακή αναλογία 1:1.25 σε διαλύτη πυριδίνη. Συγκεκριμένα, αντιδρούν 0.447 mmol (150 mg) με 0.578 mmol (184.25 mg) οξικού

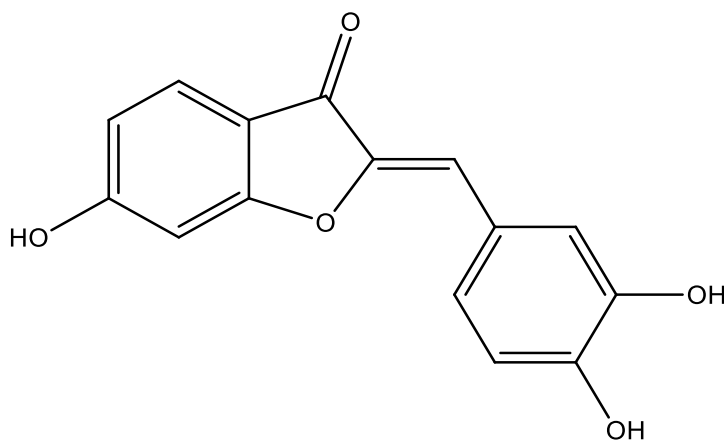
υδραργύρου σε 4.8 mL πυριδίνης (Σχήμα 42). Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 110-°C, υπό ανάδευση, αδρανείς συνθήκες, reflux και διαρκεί 1.5 h.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, στο μίγμα προστίθεται πάγος και στη συνέχεια υδατικό διάλυμα HCl 10% μέχρις ότου το μίγμα αποκτήσει pH=1. Ακολούθως, το μίγμα εκχυλίζεται με διχλωρομεθάνιο (3 x 15 mL) και τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται, ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Το μίγμα εξατμίζεται υπό κενό προς απομάκρυνση του διαλύτη. Τελικά, παραλαμβάνεται στερεό κίτρινου χρώματος.

Όσον αφορά στην απόδοση της αντίδρασης, στο σημείο τήξης του προϊόντος και στην ανάλυση της φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H NMR ισχύουν:

- Απόδοση αντίδρασης: 74 % (112.7 mg)
- Σημείο τήξης: 181.2-183.4°C
- <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) 7.78 (s, 1H, H-10), 7.76-7.73 (m, 2H, H-4 & H-5) 7.56 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-7), 7.28 (t, J = 7.4 Hz, 1H, H-6), 7.17 (s, 1H, H-6'), 6.77 (s, 1H, H-3'), 3.92 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.89 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3.82 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>)

#### 3.4.3 (Z)-2-(3',4'-διυδροξυβενζυλιδENO)-6-υδροξυβενζοφουραν-3(2H)-όνη (σουλφουρετίνη) (**5a**)



Σχήμα 54: Συντακτικός τύπος ωρόνης **5a**

Η σουλφουρετίνη (ωρόνη **5a**) (Σχήμα 54) παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπροστασίας ωρονών με 10% v/v HCl σε μεθανόλη. Πιο συγκεκριμένα, αντιδρούν 0.119 mmol (48.2 mg) της (Z)-2-(3',4'-δι(μεθοξυμεθοξυ)βενζυλιδENO)-6-(μεθοξυμεθοξυ)βενζοφουραν-3(2H)-όνης (**4a**) σε 1 mL υδατικού διαλύματος 10% v/v HCl και 2.25 mL μεθανόλης (Σχήμα 43). Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 65°C, υπό ανάδευση, αδρανείς συνθήκες, reflux και διαρκεί 15-20 min. Η προσθήκη του υδατικού διαλύματος 10% v/v HCl γίνεται στάγδην.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθεται νερό στο μίγμα προς εξουδετέρωση του HCl. Ακολούθως, πραγματοποιείται εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (4 x 15 mL) και τα

οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται και ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Τέλος, το μίγμα εξατμίζεται υπό κενό και τοποθετείται σε αντλία υψηλού κενού. Μετά το τέλος της υπό κενό εξάτμισης προκύπτει πορτοκαλί στερεό (Εικόνα 3).

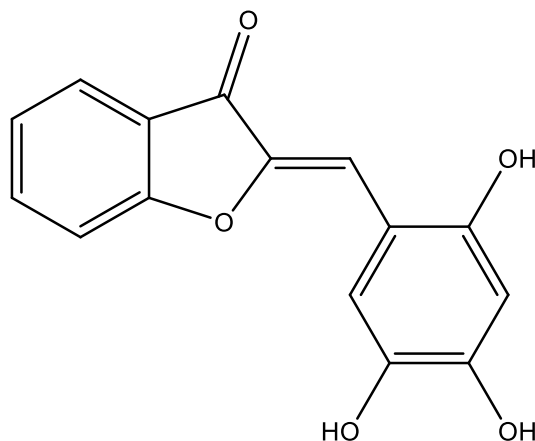
Η απόδοση της αντίδρασης, το σημείο τήξης του προϊόντος και η ανάλυση του φάσματος που προκύπτει μετά από έλεγχο του προϊόντος μέσω φασματοσκοπίας <sup>1</sup>H NMR έχουν ως εξής:

- Απόδοση αντίδρασης: 92 % (29.6 mg)
- Σημείο τήξης: > 250 °C (με αποσύνθεση)
- <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, MeOD): δ (ppm) 7.59 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-4), 7.50 (s, 1H, H-10), 7.22 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-6'), 6.82 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-5'), 6.68 (d, J = 6.0 Hz, 3H, H-2', H-5 & H-7)
- <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO): δ (ppm) 9.23 (s, 1H, OH-6), 11.04 (s, 1H, OH-3'), 9.60 (s, 1H, OH-4'), 7.57 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-4), 7.42 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-7), 7.22 (dd, J = 8.2, 1.8 Hz, 1H, H-5), 6.81 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-5'), 6.72 (d, J = 1.5 Hz, 1H, H-2'), 6.68 (dd, J = 8.4, 1.8 Hz, 1H, H-6'), 6.61 (s, 1H, H-10)
- MS (ESI) (θετικό): m/z = 271.14 (67 %) [M+1]<sup>+</sup>, 562.75 (42 %) [2 x M +Na]<sup>+</sup>
- MS (ESI) (αρνητικό): m/z = 269.23 (33 %) [M - 1]<sup>+</sup>, 538.86 (100 %) [2 x (M - 1)]<sup>+</sup>



Εικόνα 3: Σουλφουρετίνη 5a

#### 3.4.4 (Z)-2-(2',4',5'-τριϋδροξυβενζυλιδενο)βενζοφουραν-3(2H)-όνη (**5b**)



Σχήμα 55: Συντακτικός τύπος ωρόνης **5b**

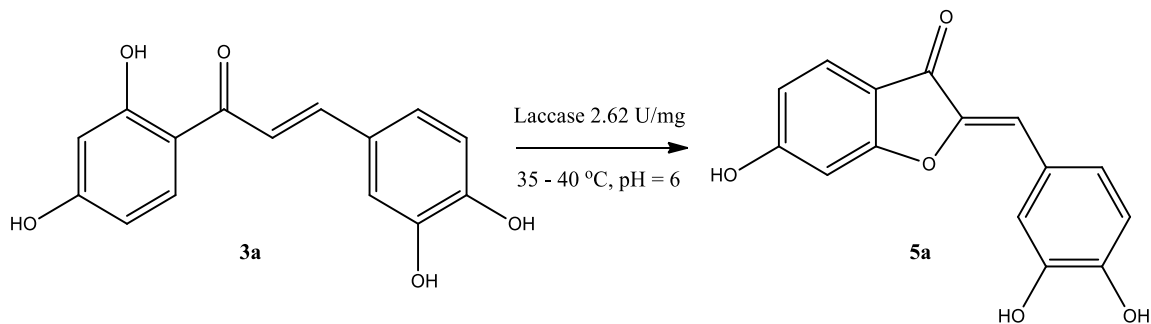
Η παραπάνω ωρόνη **5b** (Σχήμα 55) παρασκευάζεται σύμφωνα με τη γενική μέθοδο αποπραστασίας ωρονών με  $\text{BBr}_3$  σε ξηρό διχλωρομεθάνιο (dry DCM). Πιο συγκεκριμένα, αντιδρούν 0.16 mmol (50 mg) της (Z)-2-(2',4',5'-τριμεθοξυβενζυλιδενο)βενζοφουραν-2(2H)-όνης (**4b**) με 2.4 mmol (2.4 mL) τριβρωμιούχου βορίου ( $\text{BBr}_3$ ) σε 2 mL ξηρού διχλωρομεθανίου (dry DCM) (Σχήμα 44). Η γραμμομοριακή αναλογία της προστατευμένης ωρόνης και του τριβρωμιούχου βορίου είναι 1:15 (1:3 για κάθε μεθοξυομάδα  $-\text{OCH}_3$ ). Η αντίδραση διαρκεί 2 h σε θερμοκρασία  $0^\circ\text{C}$  και πραγματοποιείται υπό ανάδευση και αδρανείς συνθήκες.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, το προκύπτον μίγμα αναμειγνύεται με νερό και πάγο για 25 min και αποκτά πορτοκαλί-κόκκινο χρώμα. Ακολούθως, το μίγμα εκχυλίζεται με οξικό αιθυλεστέρα (3 x 15 mL) και τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται και ξηραίνονται με  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Εν συνεχεία, εξατμίζεται υπό κενό ο οξικός αιθυλεστέρας από τα εκχυλίσματα και τελικά προκύπτει σκούρο πορτοκαλί-κόκκινο στερεό, το οποίο τοποθετείται σε αντλία υψηλού κενού για πλήρη απομάκρυνση του διαλύτη.

Όσον αφορά στην απόδοση της αντίδρασης, στο σημείο τήξης του προϊόντος και στην ανάλυση της φασματοσκοπίας  $^1\text{H NMR}$  και UV-Vis ισχύουν:

- Απόδοση αντίδρασης: 62 % (26.8 mg)
- Σημείο τήξης:  $> 250^\circ\text{C}$  (με αποσύνθεση)
- $^1\text{H NMR}$  (300 MHz, MeOD):  $\delta$  (ppm) 7.74 (s, 1H, H-10), 7.72 (d,  $J = 2.9$  Hz, 1H, H-4), 7.67 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H-5), 7.44 (s, 1H, H-6'), 7.37 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, H-7), 7.23 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H, H-6), 6.38 (s, 1H, H-3')
- MS (ESI):  $m/z = 271.2$  (55 %)  $[\text{M} + 1]^+$ , 255.3 (100 %)  $[\text{M} - 1 \times \text{OH} + 1]^+$
- UV-Vis: (MeOH, Peak: 202.4 nm, Abs=0.775453, C=0.02373 mg/mL)

### 3.5 Βιοσύνθεση σουλφουρετίνης (**5a**) με χρήση λακκάσης



Σχήμα 56: Αντίδραση βιοσύνθεσης σουλφουρετίνης μέσω λακκάσης

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω η λακκάση είναι ένζυμο που καταλύει την οξειδωση φαινολικών ενώσεων κι έχει χρησιμοποιηθεί για την οργανική σύνθεση διαφόρων ενώσεων. Η βιοσύνθεση της σουλφουρετίνης με χρήση λακκάσης ακολουθεί την πορεία της γενικής βιοσυνθετικής μεθόδου μέσω ενζύμου φυτικής πολυφαινολικής οξειδάσης (Σχήμα 26).

Η λακκάση του μύκητα *Myceliophthora thermophila*, που χρησιμοποιείται, έχει ενεργότητα 2.62 U/mg (51.57 mg/mL) σε βέλτιστες συνθήκες pH = 6 και σε θερμοκρασία 60 °C αλλά μπορεί να γίνει ασταθής εάν μείνει για μεγάλο χρονικό διάστημα στους 60 °C και παρουσιάζει χαμηλή ενεργότητα κάτω από τους 30 °C.

Ως 1 Unit ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που παράγει 1 μmol οξειδωμένου προϊόντος ανά λεπτό, σε pH = 6 και θερμοκρασία 60 °C.

Όσον αφορά στην αντίδραση, αντιδρούν 15.1 mg της χαλκόνης **3a** ((*E*)-1-(2,4-διϋδροξυφαινυλ)-3-(3,4-διϋδροξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνης) σε 0.04 mL λακκάσης και 3.26 mL ρυθμιστικού διαλύματος pH = 6 (Dipotassium Hydrogen Phosphate – Potassium Dihydrogen Phosphate). Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 35 - 40 °C, υπό ανάδευση, παρουσία O<sub>2</sub> και αφήνεται για μία ημέρα.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθεται HCl 10 % v/v μέχρι pH = 4 και στη συνέχεια γίνεται προσθήκη NaCl. Ακολουθεί διήθηση με HCl για την απομάκρυνση του NaCl και στη συνέχεια εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc) (3 x 15 mL) έτσι ώστε να παρασυρθεί η οργανική επιθυμητή φάση. Τα οργανικά εκχυλίσματα ενώνονται, ξηραίνονται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και εξατμίζονται υπό κενό. Τέλος, το μίγμα τοποθετείται σε αντλία υψηλού κενού και τελικά προκύπτει πορτοκαλί ελαιώδες προϊόν.

Η ταυτοποίηση δομής του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H NMR και ESI-MS. Το φάσμα <sup>1</sup>H NMR (Εικόνα 21) έδειξε ότι προϊόν δεν ήταν ικανοποιητικής καθαρότητας, αλλά η σύγκρισή του με το φάσμα της χημικά συντιθέμενης σουλφουρετίνης (**5a**) επέδειξε ελπιδοφόρα αποτελέσματα που ενισχύουν την περαιτέρω έρευνα της συγκεκριμένης αντίδρασης. Το φάσμα ESI-MS (Εικόνα 29) αποκάλυψε την ύπαρξη της αρχικά αντιδρούσας χαλκόνης **3a**, γεγονός που αποδεικνύει την πιθανή αποτυχία

βιοσύνθεσης της σουλφουρετίνης. Παρόλα αυτά, η σύγκριση των φασμάτων ESI-MS της σουλφουρετίνης προερχόμενη από χημική σύνθεση και του φάσματος βιοσυντιθέμενου μίγματος επέδειξε κοινές κορυφές, οι οποίες δεν εμφανίζονται στο αντίστοιχο φάσμα της χαλκόνης **3a**. Επομένως, είναι πιθανή η ύπαρξη της σουλφουρετίνης στο μίγμα της βιοσύνθεσης. Παράλληλα, επειδή τα μοριακά βάρη της χαλκόνης **3a** και της σουλφουρετίνης **5a** διαφέρουν μόλις 2 μονάδες, δεν είναι εύκολη η ξεκάθαρη παρατήρηση ξεχωριστής κορυφής για την ωρόνη στο φάσμα ESI-MS του μίγματος βιοσύνθεσης.

### 3.6 Μελέτη αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης χαλκονών και ωρονών

Η αντιοξειδωτική δράση των ενώσεων που συντέθηκαν προσδιορίζεται με βάση την ικανότητα τους να δεσμεύουν την σταθερή ελεύθερη ρίζα DPPH και να αναστέλλουν την λιπιδική υπεροξειδωση η οποία επάγεται από την ελεύθερη ρίζα AAPH. Όσον αφορά την αντιφλεγμονώδη δράση, αξιολογούνται οι ενώσεις ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν το ένζυμο της λιποξυγονάσης σόγιας.

#### 3.6.1 Προσδιορισμός της ικανότητας δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH

Οι ενώσεις διαλύονται σε DMSO, και στη συνέχεια προστίθενται σε αιθανολικό διάλυμα DPPH (0.05 mM) απόλυτης αιθανόλης μέχρι τελικής συγκέντρωσης 0.1 mM. Το μίγμα αναδεύεται έντονα και αφήνεται σε ηρεμία 20 ή 60 λεπτά. Καταγράφεται η απορρόφηση στα 517 nm και υπολογίζεται μέσω αυτής, το ποσοστό της αντιοξειδωτικής δράσης. Όλα τα τεστ γίνονται τρεις φορές και τα αποτελέσματα προκύπτουν μετά από τον υπολογισμό του μέσου όρου.<sup>1,40</sup>

#### 3.6.2 Προσδιορισμός της ικανότητας αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH)

Η αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης από τις ενώσεις που παρασκευάστηκαν υπολογίζεται από την οξείδωση του λινολεϊκού οξέος σε υδατικό αιώρημα, κάτι που παρατηρείται στα 234 nm. Το 2,2,-αζοδις-(2-αμιδινοπροπανο) διϋδροχλωρίδιο (AAPH) χρησιμοποιείται σαν εκκινητής των ελευθέρων ριζών.<sup>1,41</sup>

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



### 3.6.3 Προσδιορισμός της ικανότητας αναστολής του ενζύμου λιποξυγονάσης σόγιας

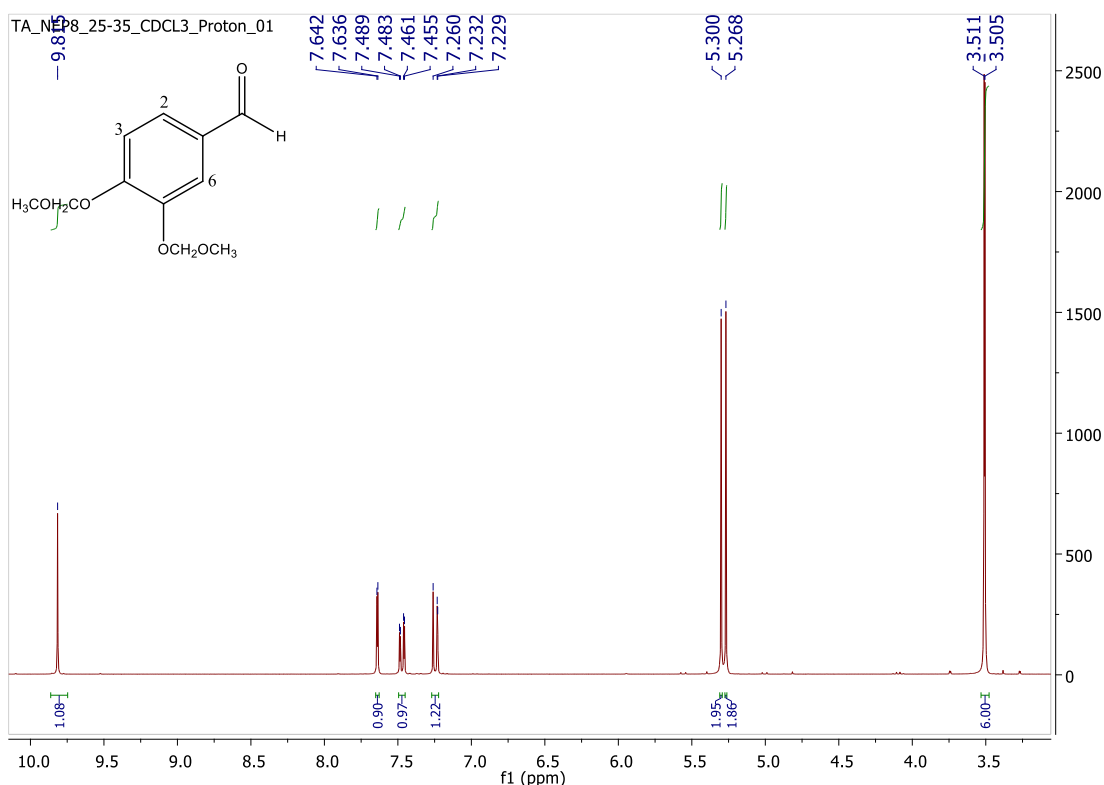
Οι υπό εξέταση ενώσεις διαλύονται σε DMSO και αφήνονται να επωαστούν σε θερμοκρασία δωματίου με λινολεϊκό νάτριο (0.1 mL) και 0.2 mL ενζυμικού διαλύματος ( $1/9 \times 10^{-4}$  w/v σε φυσιολογικό ορό) σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris pH= 9. Η μετατροπή του sodium λινολεϊκού νατρίου σε 13-υδροπεροξυλινολεϊκό οξύ στα 234 nm καταγράφεται και συγκρίνεται με τον κατάλληλο πρότυπο αναστολέα.<sup>1,40</sup>

Σημειώνεται ότι τα πειράματα μελέτης αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης των ενώσεων πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Τμήματος Φαρμακευτικής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

## 4. Πρότυπη ανάλυση φασμάτων $^1\text{H}$ NMR και ESI-MS

### 4.1 Φάσματα $^1\text{H}$ NMR

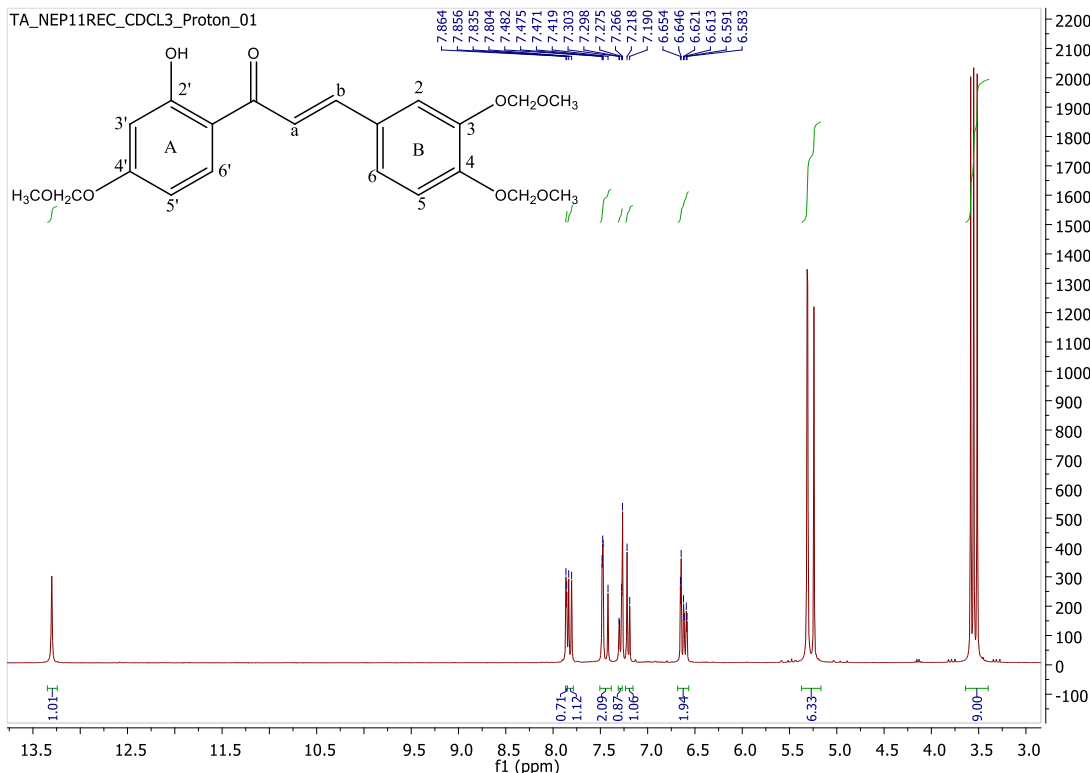
#### 4.1.1 Φάσμα $^1\text{H}$ NMR της 3,4-διμεθοξυμεθοξυ-βενζαλδεΐδης (**2a**)



Εικόνα 4: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της βενζαλδεΐδης **2a** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)

Στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της 3,4-διμεθοξυμεθοξυ-βενζαλδεΐδης **2a** παρατηρείται στα χαμηλά πεδία (9.82 ppm) το πρωτόνιο του υδρογόνου του καρβονυλικού άνθρακα κι εμφανίζεται ως απλή κορυφή. Ακολούθως, παρατηρούνται στην περιοχή 7.23-7.64 ppm τα αρωματικά πρωτόνια (εκτός της κορυφής 7.26 ppm στην οποία αντιστοιχεί ο δευτεριωμένος διαλύτης  $\text{CDCl}_3$ ) και πιο συγκεκριμένα στα 7.23 ppm εμφανίζεται το H-6 ως διπλή κορυφή με  $J = 1.03$  Hz λόγω σύζευξης με το H-2. Στα 7.47 ppm αντιστοιχεί το H-2 ως διπλή διπλών κορυφή με  $J = 1.9$  Hz λόγω σύζευξης με το H-3 και  $J = 8.3$  Hz λόγω σύζευξης με το H-6. Στα 7.64 ppm εμφανίζεται το H-3 ως διπλή κορυφή με  $J = 1.9$  Hz λόγω σύζευξης με το H-2. Τα τέσσερα πρωτόνια  $-\text{CH}_2-$  των μεθοξυμεθοξυ-ομάδων εμφανίζουν σήμα στα 5.30 και 5.27 ppm υπό τη μορφή δύο απλών κορυφών. Τέλος, τα 6 πρωτόνια  $\text{CH}_3-$  των μεθοξυμεθοξυ-ομάδων παρατηρούνται στα 3.51 ppm ως δύο απλές κορυφές.

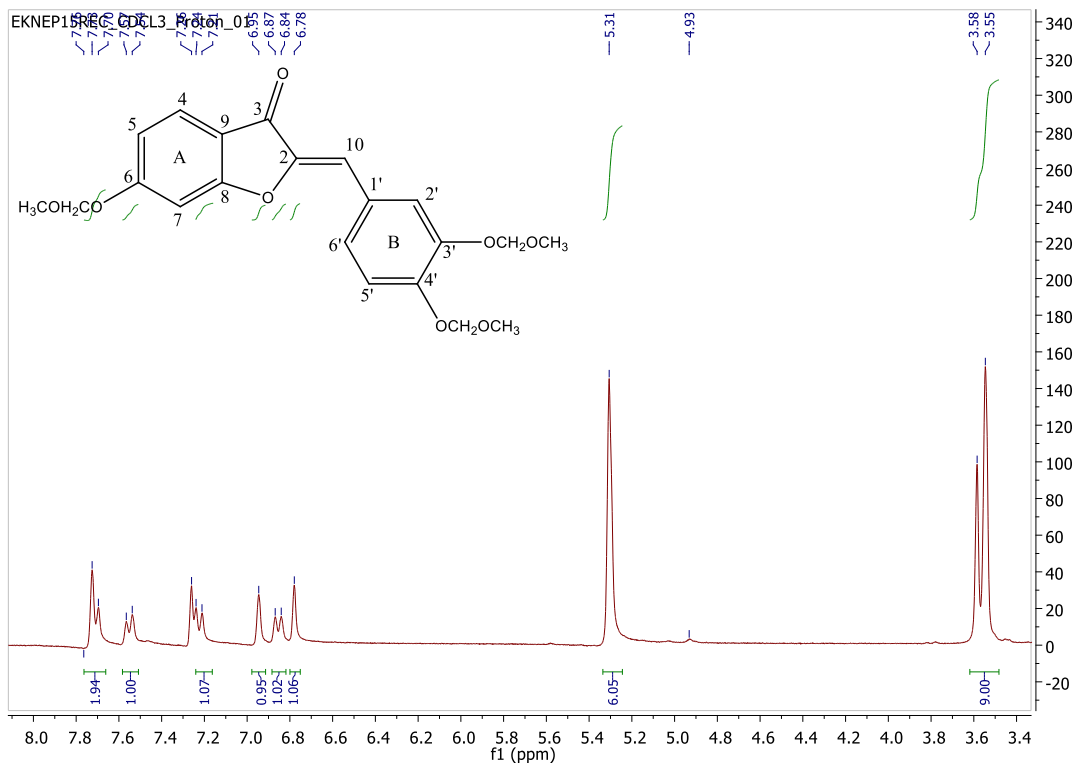
#### 4.1.2 Φάσμα $^1\text{H}$ NMR της (*E*)-3-(3,4-δι(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)-1-(2'-υδροξυ-4'-(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)προπ-2-εν-1-όνης (**3a**)



Εικόνα 5: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της χαλκόνης **3a** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)

Στο παραπάνω φάσμα της (*E*)-3-(3,4-δι(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)-1-(2'-υδροξυ-4'-(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)προπ-2-εν-1-όνης **3a** στα 13.30 ppm εμφανίζεται ως απλή κορυφή το πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 2' του δακτυλίου A λόγω της συμμετοχής του σε δεσμό υδρογόνου με το γειτονικό καρβονύλιο. Οι κορυφές μεταξύ 7.86–6.60 ppm αντιστοιχούν σε αρωματικά πρωτόνια εκτός της κορυφής 7.26 ppm που αντιστοιχεί στο δευτεριωμένο διαλύτη  $\text{CDCl}_3$ . Πιο συγκεκριμένα, το H-6' του δακτυλίου A εμφανίζεται ως διπλή κορυφή στα 7.85 ppm λόγω σύζευξης με το H-5' του ίδιου δακτυλίου με  $J = 8.7$  Hz. Το H-5 του B δακτυλίου παρατηρείται στα 7.48 ppm ως διπλή κορυφή λόγω σύζευξης με το H-6 του δακτυλίου B με  $J = 2.1$  Hz. Το H-2 του B δακτυλίου εμφανίζεται ως διπλή κορυφή στα 7.30 ppm με  $J = 1.7$  Hz λόγω σύζευξης με το H-6. Στα 7.20 ppm εμφανίζεται ως διπλή κορυφή το H-6 του B δακτυλίου με  $J = 8.4$  Hz. Τα βινυλικά πρωτόνια a και b εμφανίζονται στα 7.45 και 7.83 ppm αντίστοιχα με  $J = 15.6$  Hz. Τα 6 πρωτόνια  $-\text{CH}_2-$  των μεθοξυμεθοξυ-ομάδων εμφανίζονται ως τρεις απλές κορυφές στα 5.31, 5.31, 5.24 ppm και αντιστοιχούν σε 2 πρωτόνια η κάθε μία. Τέλος, τα 9 πρωτόνια  $\text{CH}_3-$  των μεθοξυμεθοξυ-ομάδων εμφανίζονται ως τρεις απλές κορυφές στα 3.58, 3.55 και 3.52 ppm και αντιστοιχούν σε 3 πρωτόνια η κάθε μία.

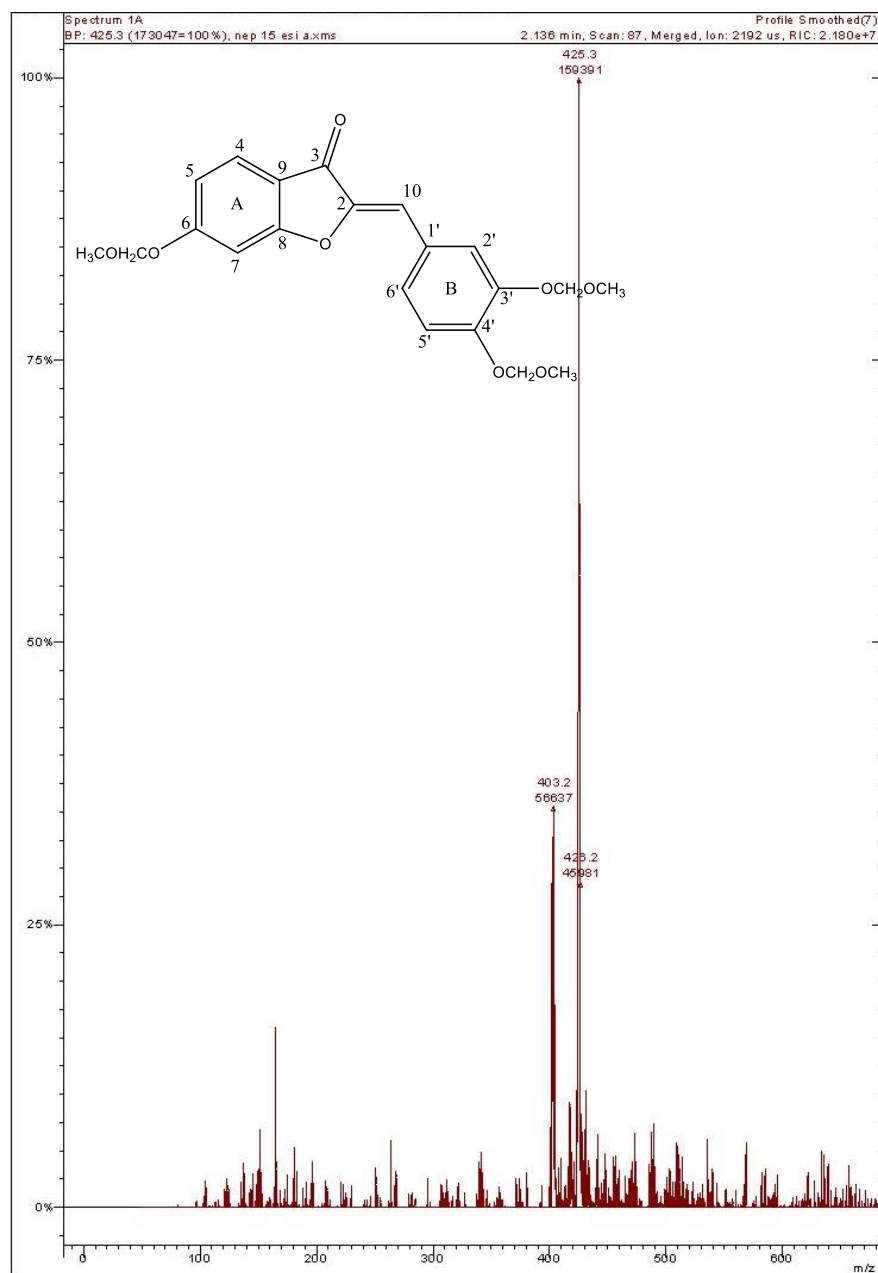
#### 4.1.3 Φάσμα $^1\text{H}$ NMR της (Z)-2-(3',4'-δι(μεθοξυμεθοξυ)βενζυλιδενο)-6-(μεθοξυμεθοξυ)βενζοφουραν-3(2H)-όνης (4a)



Εικόνα 6: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ωρόνης **4a** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)

Στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ωρόνης **4a** ((Z)-2-(3',4'-δι(μεθοξυμεθοξυ)βενζυλιδενο)-6-(μεθοξυμεθοξυ)βενζοφουραν-3(2H)-όνης) τα αρωματικά πρωτόνια εμφανίζονται μεταξύ των κορυφών 6.75 – 7.73 ppm (εκτός της κορυφής 7.26 ppm που αντιστοιχεί στο διαλύτη  $\text{CDCl}_3$ ). Πιο αναλυτικά, τα συζευγμένα H-4 και H-5 εμφανίζονται στα 7.71 ppm ως διπλή κορυφή με  $J = 8.8$  Hz (ολοκληρώνονται για δύο πρωτόνια). Το H-5' αντιστοιχεί στη διπλή κορυφή στα 7.55 ppm με  $J = 8.4$  Hz λόγω σύζευξης με το H-6'. Αντιστοίχως, το H-6' εμφανίζεται στη διπλή κορυφή 6.85 ppm με  $J = 8.5$  Hz λόγω σύζευξης με το H-5'. Το H-7 αποδίδεται στην απλή κορυφή στα 7.21 ppm και το H-2' στην απλή κορυφή στα 6.95 ppm. Το πρωτόνιο διπλού δεσμού στη σύνδεση του βενζοφουρανικού με τον αρωματικό δακτύλιο B εμφανίζεται στην απλή κορυφή στα 6.78 ppm. Τα 6 πρωτόνια  $-\text{CH}_2-$  των μεθοξυμεθοξυ-ομάδων εμφανίζουν σήμα στα 5.31 ppm υπό τη μορφή απλής κορυφής. Τέλος, τα 9 πρωτόνια  $\text{CH}_3-$  των μεθοξυμεθοξυ-ομάδων αποδίδονται στα 3.58 ppm και στα 3.55 ως δύο απλές κορυφές που ολοκληρώνονται για τρία και για έξι πρωτόνια η κάθε μία αντιστοίχως.

## 4.2 Φάσμα ESI-MS της (Z)-2-(3',4'-δι(μεθοξυμεθοξυ)βενζυλιδενο)-6-(μεθοξυμεθοξυ)βενζοφουραν-3(2H)-όνη (**4a**)

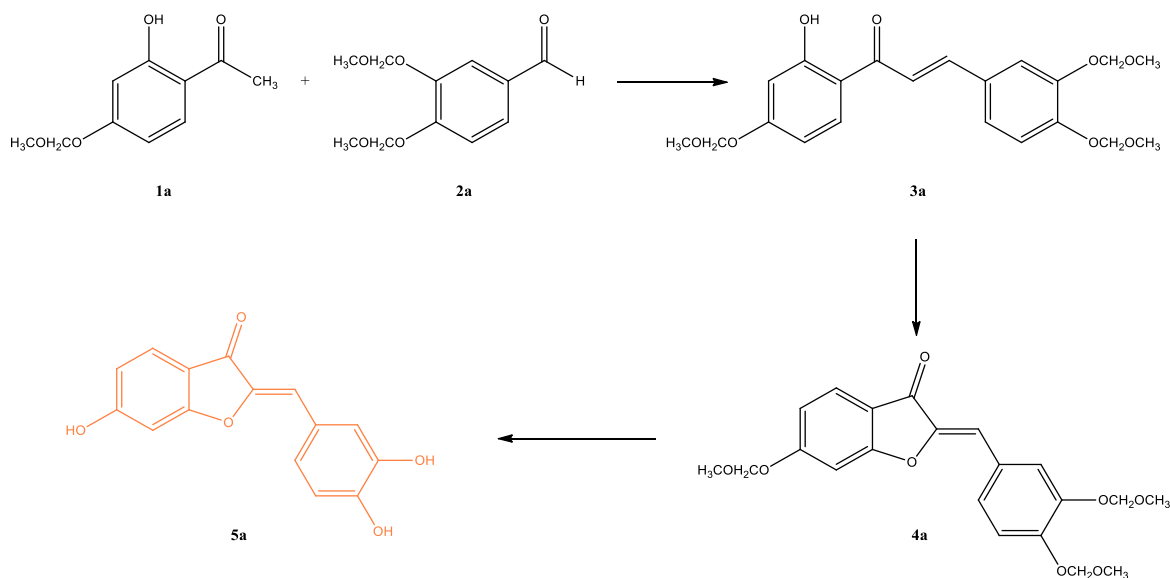


Εικόνα 7: Φάσμα ESI-MS της ωρόνης **4a**

Το ακριβές μοριακό βάρος της ωρόνης **4a** είναι 402.13. Στο παραπάνω φάσμα ESI-MS της ωρόνης **4a** παρατηρείται το ιόν βάσης (100%) να εμφανίζεται σε  $m/z = 425.3$  το οποίο μπορεί να αποδοθεί σε θραύσμα του μοριακού ιόντος μαζί με νάτριο (Na) ( $[M + 23]^+ = [M + Na]^+$ ). Το ιόν βάσης εμφανίζεται σε  $m/z = 403.2$  ( $[M+1]^+$ ) σε ποσοστό 34 %. Οι δύο συγκεκριμένες κορυφές επαληθεύουν την επιτυχημένη σύνθεση της νέας ωρόνης **4a**.

## 5. Αποτελέσματα και συζήτηση αποτελεσμάτων

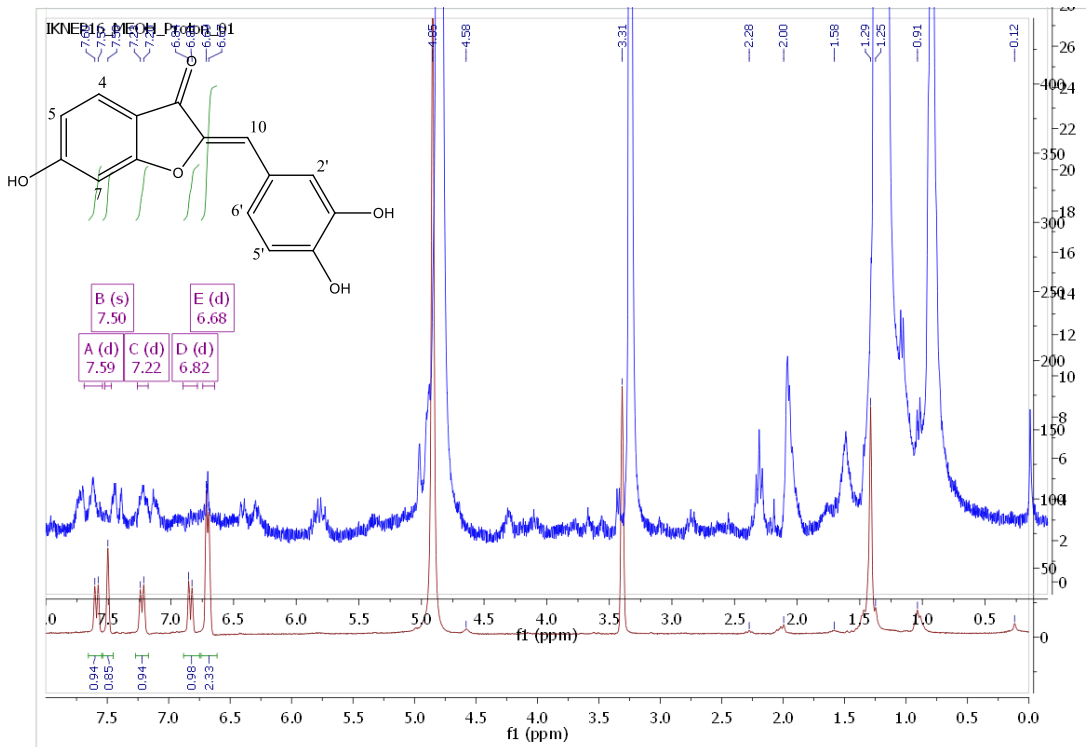
Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση και ο δομικός χαρακτηρισμός εννέα φλαβονοειδών, εκ των οποίων πέντε χαλκόνες (**3a-3e**) και τέσσερις ωρόνες (**4a,4b & 5a,5b**). Επίσης, πραγματοποιήθηκε η ολική σύνθεση της φυσικής ωρόνης σουλφουρετίνης, η οποία δεν έχει αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία. Τα στάδια ολικής σύνθεσης της σουλφουρετίνης είναι τρία σε αριθμό και πιο συγκεκριμένα περιλαμβάνουν την αντίδραση συμπύκνωσης Claisen-Schmidt μεταξύ κατάλληλα προστατευμένης βενζαλδεΐδης (**2a**) και κατάλληλα προστατευμένης ακετοφαινόνης (**1a**) προς σχηματισμό της προστατευμένης χαλκόνης (**3a**). Ακολούθως, μέσω αντίδρασης οξειδωτικής κυκλοποίησης συντίθεται η προστατευμένη ωρόνη (**4a**) και τελικό στάδιο αποτελεί η αποπροστασία των μεθοξυμεθοξυ-ομάδων της ωρόνης **4a** με τελικό προϊόν τη σουλφουρετίνη (**5a**). (Σχήμα 57)



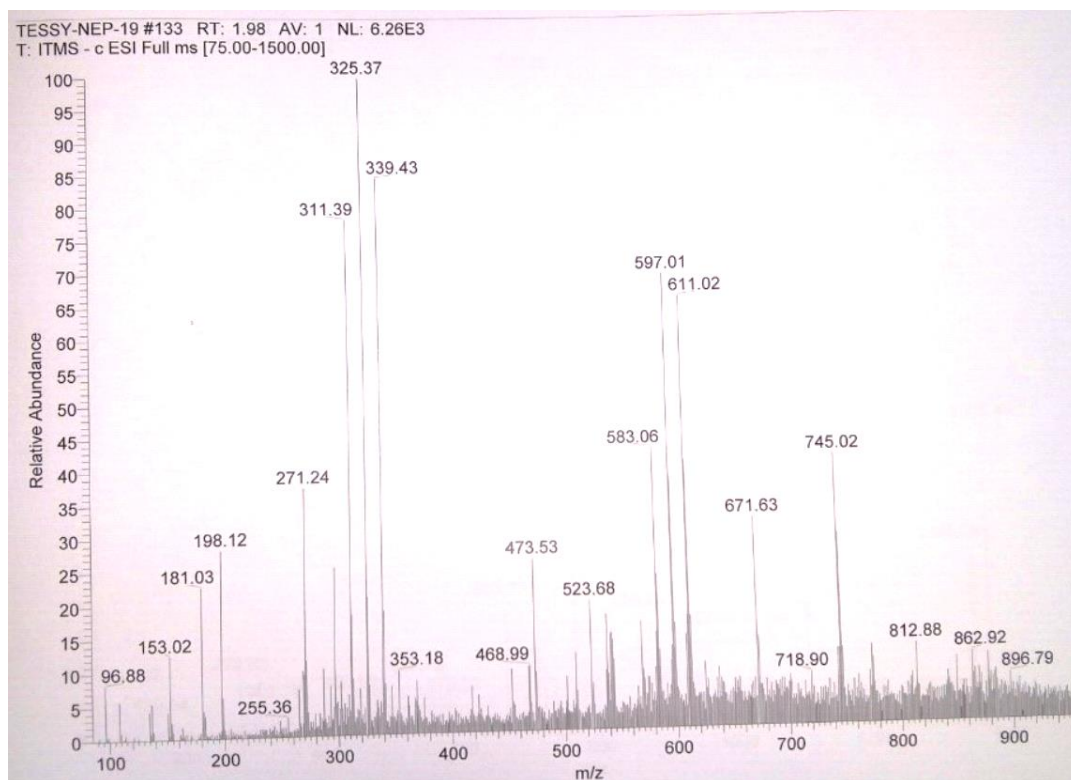
Σχήμα 57: Στάδια ολικής σύνθεσης της φυσικής ωρόνης σουλφουρετίνης **5a**

Επιπλέον, επιχειρήθηκε η βιοσύνθεση της ωρόνης σουλφουρετίνης με χρήση του οξειδωτικού ενζύμου λακκάση. Συγκρίνοντας το φάσμα του προκύπτοντος μίγματος με το φάσμα της σουλφουρετίνης **5a** σε μεθανόλη (Εικόνα 8) παρατηρούνται πιθανές κοινές κορυφές, γεγονός που καθιστά την προηγουμένως περιγραφείσα βιοσύνθεση ελπιδοφόρο προκαταρκτικό πείραμα, το οποίο θα πρέπει να επαναληφθεί και να μελετηθεί περαιτέρω. Παράλληλα, η λήψη φάσματος ESI-MS είναι δυνατόν να αποδείξει την ενδεχόμενη επιτυχία ή αποτυχία της βιοσύνθεσης της σουλφουρετίνης. Το φάσμα ESI-MS (Εικόνα 9) αποκάλυψε την ύπαρξη της αρχικά αντιδρούσας χαλκόνης **3a**, γεγονός που αποδεικνύει

την πιθανή αποτυχία βιοσύνθεσης της σουλφουρετίνης. Παρόλα αυτά, η σύγκριση των φασμάτων ESI-MS της σουλφουρετίνης προερχόμενη από χημική σύνθεση και του φάσματος βιοσυντιθέμενου μίγματος επέδειξε κοινές κορυφές, οι οποίες δεν εμφανίζονται στο αντίστοιχο φάσμα της χαλκόνης **3a**. Επομένως, είναι πιθανή η ύπαρξη της σουλφουρετίνης στο μίγμα της βιοσύνθεσης. Παράλληλα, επειδή τα μοριακά βάρη της χαλκόνης **3a** και της σουλφουρετίνης **5a** διαφέρουν μόλις 2 μονάδες, δεν είναι εύκολη η ξεκάθαρη παρατήρηση ξεχωριστής κορυφής για την ωρόνη στο φάσμα ESI-MS του μίγματος βιοσύνθεσης. Συνεπώς, το πείραμα της βιοσύνθεσης μπορεί να χαρακτηριστεί ελπιδοφόρο προκαταρκτικό πείραμα και προτείνεται η περαιτέρω έρευνά του.



Εικόνα 8: Σύγκριση φάσματος NMR (MeOD, 300 MHz) σουλφουρετίνης **5a** σε μεθανόλη με το φάσμα του προϊόντος βιοσύνθεσης σε μεθανόλη



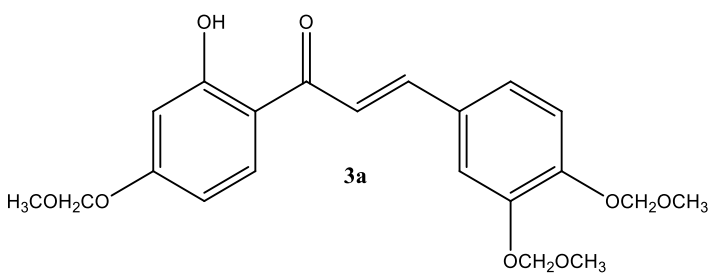
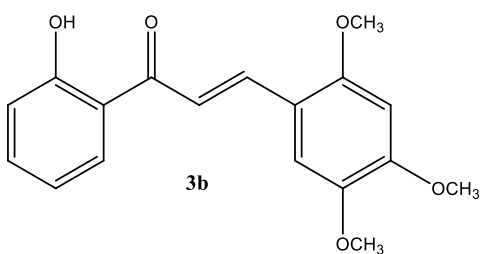
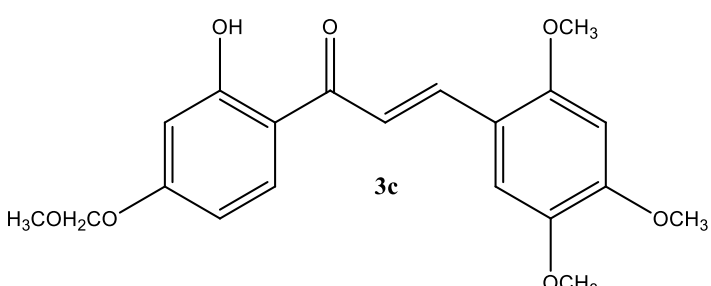
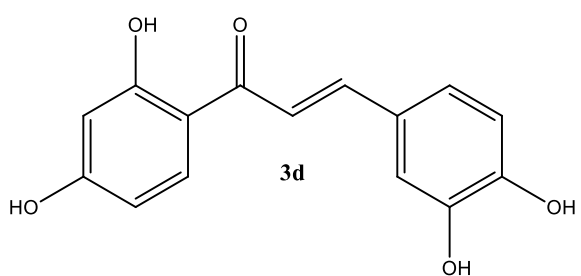
Εικόνα 9: Φάσμα ESI-MS προϊόντος βιοσύνθεσης

Από τις ενώσεις που συντέθηκαν, αξιολογήθηκαν για την αντιοξειδωτική και την αντιφλεγμονώδη δράση τους οι χαλκόνες **3a-3d** και οι ωρόνες **4a, 4b & 5a, 5b**. Ειδικότερα, όσον αφορά στην αντιοξειδωτική δράση, προσδιορίστηκε η ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH και η ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης, μέσω μέτρησης της δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας AAPH. Αναφορικά με την αντιφλεγμονώδη δράση, μετρήθηκε η ικανότητα αναστολής του ενζύμου της λιποξυγονάσης σόγιας (LOX). Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, παρουσιάζονται στους πίνακες 1 και 3 για τις χαλκόνες και τις ωρόνες αντίστοιχα. Στους πίνακες 2 και 4 παρατίθενται σχετικά αποτελέσματα προηγούμενης έρευνας που πραγματοποιήθηκε από την ερευνητικά ομάδα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας.

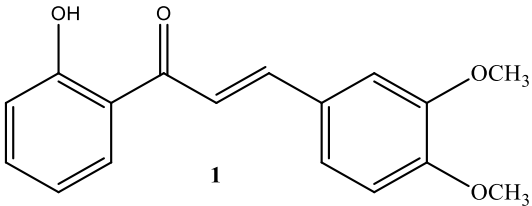
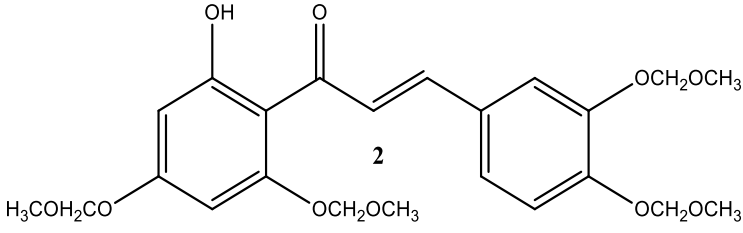
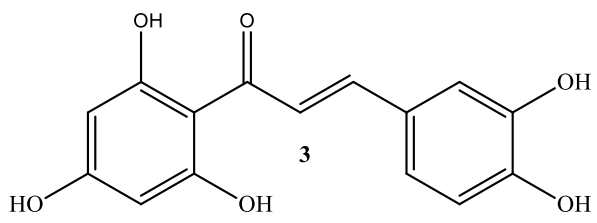


## 5.1 Αξιολόγηση βιολογικής δράσης χαλκονών

Πίνακας 1: Αποτελέσματα βιολογικής δραστηριότητας χαλκονών 3a-3d

| Δομή  | % δέσμευση DPPH, 20 min | % δέσμευση DPPH, 60 min | % αναστολή ενζύμου λιποξυγονάσης σόγιας (0.1 mM)-% | % Αναστολή λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH) |
|---|-------------------------|-------------------------|--|---|
|  <p>3a</p>    | 18.9                    | 21.6                    | 40.2   | 11.4                                      |
|  <p>3b</p>  | Ανενεργό                | Ανενεργό                | IC <sub>50</sub> = 75 μM                           | 67.3                                      |
|  <p>3c</p>  | Ανενεργό                | 2.3                     | IC <sub>50</sub> = 45 μM                           | 39.4                                      |
|  <p>3d</p> | 95.7                    | 95.3                    | 39.3   | 24.4                                      |
| NDGA  | 87                      | 93                      | IC <sub>50</sub> = 5.5 μM                          |   |
| Trolox  |                         |                         |  | 88  |

Πίνακας 2: Βιβλιογραφικά δεδομένα βιολογικών δράσεων χαλκονών<sup>1</sup>

| Δομή   | % δέσμευση DPPH, 20 min | % δέσμευση DPPH, 60 min | % αναστολή ενζύμου λιποξυγονάσης σόγιας (0.1 mM)-% | % Αναστολή λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH) |
|--|-------------------------|-------------------------|--|---|
|  <p>1</p>   | 6.3                     | 28.5                    | IC <sub>50</sub> = 67.5                            | 64.6                                      |
|  <p>2</p>   | 42.6                    | 65.5                    | 14.1 %   | 77.1                                      |
|  <p>3</p> | 100.0                   | 94.9                    | 0.0 %  | 0.0                                       |

### 5.1.1 Δραστικότητα χαλκονών εναντίον της ελεύθερης ρίζας DPPH

Η δράση των εξετασθέντων χαλκονών και ωρονών κατά της ελεύθερης ρίζας DPPH είναι εξαρτώμενη του χρόνου και της συγκέντρωσης των ενώσεων. Μεταξύ των χαλκονών που μελετήθηκαν, τα καλύτερα αποτελέσματα δέσμευσης της ρίζας DPPH επέδειξε η (*E*)-1-(2,4-διϋδροξυφαινυλ)-3-(3,4-διϋδροξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη (**3d**), η οποία παράλληλα εμφανίζει υψηλότερη δραστικότητα από την ένωση αναφοράς, το νορδιϋδρογουαϊαρετικό οξύ (NDGA). Η χαλκόνη **3a** που φέρει μεθοξυμεθοξυ-ομάδες (OMOM) εμφανίζει χαμηλή δραστικότητα έναντι της δέσμευσης της ρίζας DPPH. Η χαλκόνη **3c**, η οποία φέρει μεθοξυ-ομάδες (-OCH<sub>3</sub>) και μία μεθοξυμεθοξυ-ομάδα (OMOM) εμφανίζει ελάχιστη δράση στη δέσμευση της ρίζας μετά από μία ώρα αντίδρασης με το DPPH. Τέλος, η **3b** που φέρει μεθοξυ-ομάδες στο Β δακτύλιο και κανέναν υποκαταστάτη στον Α δακτύλιο δεν εμφανίζει δεσμευτική δραστικότητα.

Σε σύγκριση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που παρουσιάζονται στον πίνακα 2, η χαλκόνη με τις δύο μεθοξυ-ομάδες (-OCH<sub>3</sub>) στο Β δακτύλιο εμφανίζει πολύ καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τη χαλκόνη **3b** που είναι ανενεργή. Επομένως, η προσθήκη μιας επιπλέον μεθοξυ-ομάδας (-OCH<sub>3</sub>) στο δακτύλιο Β είναι δυνατόν να καθιστά τη χαλκόνη αντιοξειδωτικά λιγότερο ενεργή έως ανενεργή. Επιπλέον, όσον αφορά στις χαλκόνες **3a** και **2**, οι οποίες φέρουν μεθοξυμεθοξυ-ομάδες (OMOM) παρατηρείται ότι η χαλκόνη **2** εμφανίζει υψηλότερη δραστικότητα πιθανότατα λόγω της ύπαρξης μίας μεθοξυμεθοξυ-ομάδας (OMOM) παραπάνω στο δακτύλιο Α. Τέλος, οι υδροξυλιωμένες χαλκόνες **3d** και **3** εμφανίζουν παραπλήσια αποτελέσματα και συγκεκριμένα η **3** έχει καλύτερη δραστικότητα από την **3d** λόγω της ύπαρξης μιας παραπάνω υδροξυλομάδας.

Κατά συνέπεια, είναι δυνατόν να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι υδροξυλιωμένες χαλκόνες έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Ακολουθούν οι μεθοξυμεθοξυ-χαλκόνες, ενώ οι μεθοξυ-χαλκόνες δεν εμφανίζουν ισχυρή δραστικότητα έναντι της ρίζας DPPH.

### 5.1.2 In vitro αναστολή του ενζύμου λιποξυγονάσης σόγιας (LOX) (Χαλκόνες)

Με βάση τα αποτελέσματα των πινάκων 1 και 3 οι χαλκόνες αναστέλλουν πιο αποτελεσματικά τη λιποξυγονάση (LOX) σε σύγκριση με τις ωρόνες. Η χαλκόνη **3c**, η οποία φέρει τρεις μεθοξυ-ομάδες στο Β δακτύλιο και μια μεθοξυμεθοξυ-ομάδα στον Α δακτύλιο, εμφανίζει την καλύτερη αναστολή του ενζύμου συγκριτικά με τις υπόλοιπες ενώσεις που μελετήθηκαν (συμπεριλαμβανομένων και των ωρονών), έχοντας τιμή IC<sub>50</sub> = 45 μΜ. Ακολουθεί η χαλκόνη **3b** με τρεις μεθοξυ-ομάδες στο Β δακτύλιο με τιμή IC<sub>50</sub> = 75 μΜ. Οι χαλκόνες **3a** και **3d**, με μεθοξυμεθοξυ-υποκαταστάτες και υδροξυ-υποκαταστάτες αντίστοιχα, δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ικανοί αναστολείς της λιποξυγονάσης καθώς εμφανίζουν τιμές % αναστολής του ενζύμου 40.2 % και 39.3 % αντίστοιχα.

Εξετάζοντας τα δεδομένα της βιβλιογραφίας η χαλκόνη **1** με δύο μεθοξυ-υποκαταστάτες στο Β δακτύλιο και κανέναν υποκαταστάτη στον Α δακτύλιο εμφανίζει την καλύτερη αναστολή της λιποξυγονάσης με τιμή  $IC_{50} = 67.5 \mu M$ . Οι υπόλοιπες χαλκόνες με MOM-υποκαταστάτες και υδροξυ-υποκαταστάτες δεν αναστέλλουν επιτυχώς το ένζυμο.

Αρχικά είναι εύκολο να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η υποκατάσταση του Β δακτυλίου των χαλκονών με μεθοξυ-ομάδες έχει σημαντικά ενθαρρυντικά αποτελέσματα όσον αφορά στην αντιφλεγμονώδη δράση τους. Η παράλληλη υποκατάσταση του Α δακτυλίου στη θέση 4' με μεθοξυμεθοξυ-ομάδα εμφανίζει ακόμα πιο ελπιδοφόρα αποτελέσματα γεγονός που συνιστά περαιτέρω μελέτη υποκατάστασης στον Α δακτύλιο με διάφορους υποκαταστάτες (π.χ. μεθοξυ-ομάδα) με σκοπό την αύξηση της αναστολής του ενζύμου LOX. Τέλος, παρατηρείται συνολικά ότι οι υδροξυ-υποκαταστάτες και μεθοξυμεθοξυ-υποκαταστάτες δεν ενισχύουν την αντιφλεγμονώδη δράση των χαλκονών.

### 5.1.3 Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Χαλκόνες)

Η αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης προσδιορίζεται μελετώντας την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας AAPH από τις εξεταζόμενες ενώσεις. Μεταξύ των χαλκονών, καλύτερος δεσμευτής της AAPH μπορεί να χαρακτηριστεί η **3b**, η οποία μάλιστα παρουσιάζει την καλύτερη δράση από όλες τις ενώσεις που εξετάστηκαν με τιμή 67.3% δέσμευση της AAPH. Η **3b** φέρει τρεις μεθοξυ-ομάδες στο Β δακτύλιο και κανέναν υποκαταστάτη στον Α δακτύλιο. Παρατηρείται ότι με την εισαγωγή ενός μεθοξυμεθοξυ-υποκαταστάτη στη θέση 4' του Α δακτυλίου (χαλκόνη **3d**) η ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας υποβαθμίζεται αισθητά (39.4 % αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης). Οι χαλκόνες **3a** και **3c** με OMOM-υποκαταστάτες και υδροξυ-υποκαταστάτες αντιστοίχως δεν εμφανίζουν ικανοποιητική δέσμευση της ρίζας AAPH.

Συγκρίνοντας τα εξαγόμενα αποτελέσματα του πίνακα 1 με βιβλιογραφικά (πίνακας 2) παρατηρείται η σύγκλιση των θετικών αποτελεσμάτων όσον αφορά στις χαλκόνες με τους μεθοξυ-υποκαταστάτες **3b** (67.3 %) και **1** (64.6 %). Παράλληλα, η προσθήκη μίας παραπάνω μεθοξυ-ομάδας στο δακτύλιο Β (**3b** σε σύγκριση με **1**) φαίνεται να μην αναβαθμίζει αισθητά την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας. Επιπλέον, παρατηρείται ότι ενώ η **3b** εμφανίζει θετικά αποτελέσματα στην αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης, η ικανότητα της στη δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH είναι υποβαθμισμένη. Η μεθοξυμεθοξυ-χαλκόνη **2** εμφανίζει πολύ ικανοποιητική αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (77.1 %), αποτέλεσμα συγκρινόμενο με το αντίστοιχο της χαλκόνης **3c** καταδεικνύει τη σημασία του αριθμού υποκαταστατών και των θέσεων υποκατάστασης στους δακτυλίους Α και Β. Επιπλέον, η υδροξυ-χαλκόνη **3** όπως και η **3d** δεν αναστέλλει αποτελεσματικά τη λιπιδική υπεροξειδωση.

Συνεπώς, οι υδροξυ-χαλκόνες έχουν υποβαθμισμένη ικανότητα δέσμευσης της ρίζας AAPH. Οι μεθοξυμεθοξυ-χαλκόνες εμφανίζουν ελπιδοφόρα αποτελέσματα και η μελέτη του αριθμού υποκαταστατών και των θέσεων υποκατάστασης επιδεικνύουν ερευνητικό

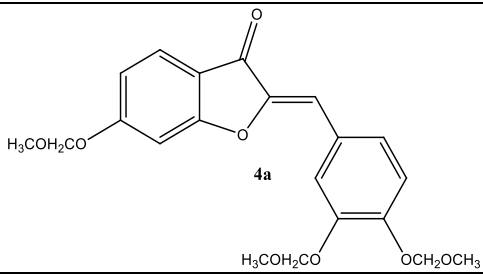
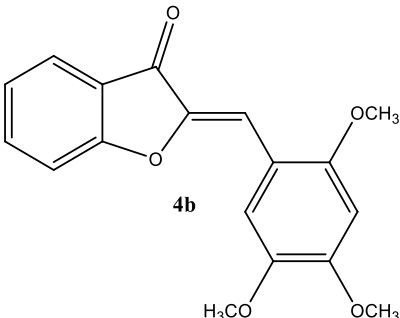
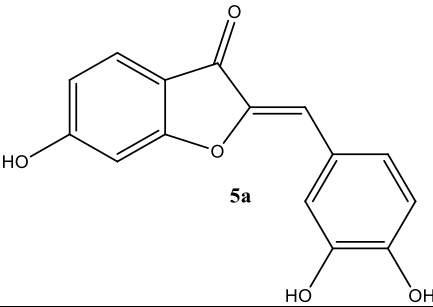
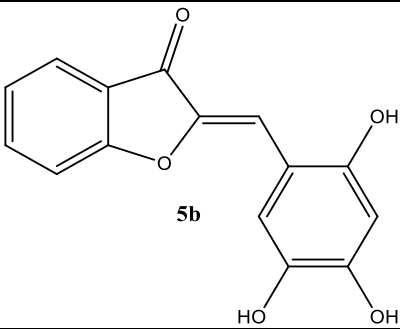
ενδιαφέρον. Τέλος, οι μεθοξυ-χαλκόνες φαίνεται να αποτελούν ικανούς αναστολείς της λιπιδικής υπεροξειδωσης.

#### 5.1.4 Συνδυαστική βιολογική δράση χαλκονών

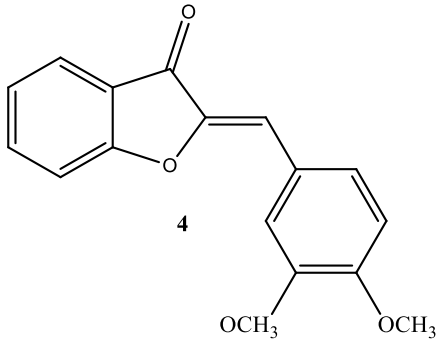
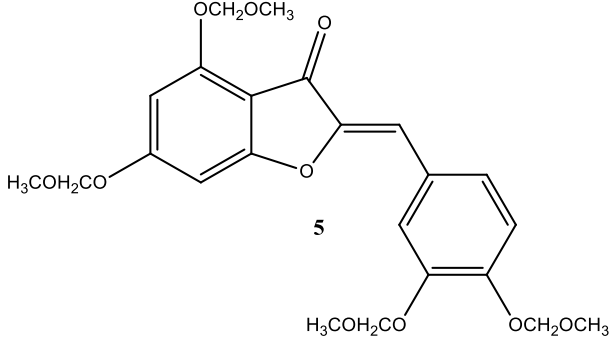
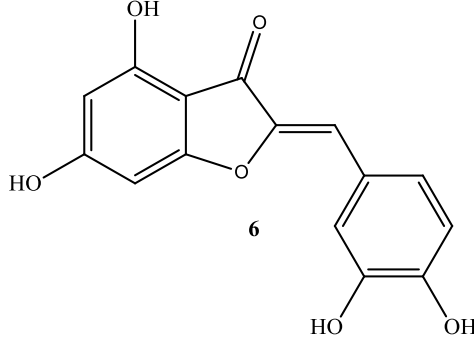
Από τις χαλκόνες που μελετήθηκαν, καμία δεν παρουσιάζει ταυτόχρονα αξιόλογα αποτελέσματα και στις τρεις δοκιμασίες. Η χαλκόνη **3c** παρουσιάζει καλή αντιφλεγμονώδη δράση και παράλληλα αναστέλλει ικανοποιητικά την ελεύθερη ρίζα AAPH. Στο ίδιο μήκος κύματος βρίσκεται κι η χαλκόνη **3b** η οποία εμφανίζει την πιο αποτελεσματική δέσμευση της ελεύθερης ρίζας AAPH με ταυτόχρονη ικανοποιητική αναστολή της λιποξυγονάσης. Και οι δύο προαναφερθείσες χαλκόνες δεν είναι ικανές να δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH. Η χαλκόνη **3a** παρουσιάζει μέτρια αποτελέσματα σε όλες τις δοκιμασίες, ενώ η **3d** δεσμεύει άκρως ικανοποιητικά τη ρίζα DPPH αλλά στις υπόλοιπες δοκιμασίες δεν εμφανίζει ελπιδοφόρα αποτελέσματα.

## 5.2 Αξιολόγηση βιολογικής δράσης ωρονών

Πίνακας 3: Αποτελέσματα βιολογικής δραστηριότητας ωρονών 4a-b & 5a-b

| Δομή  | % δέσμευση DPPH, 20 min | % δέσμευση DPPH, 60 min | % αναστολή ενζύμου λιποξυγονάσης σόγιας (0.1 mM)-% | % αντιλιπιδική υπεροξειδωση (AAPH) |
|---|-------------------------|-------------------------|--|------------------------------------|
|  <p>4a</p>   | Ανενεργό                | Ανενεργό                | 24.4   | 18.5                               |
|  <p>4b</p>  | Ανενεργό                | Ανενεργό                | 13.0   | 29.4                               |
|  <p>5a</p> | 89.0                    | 91.2                    | 24.5   | 53.2                               |
|  <p>5b</p> | 100                     | 100                     | Ανενεργό   | 13.4                               |
| NDGA  | 87                      | 93                      | IC <sub>50</sub> = 5.5 μM                          |                                    |
| Trolox  |                         |                         |  | 88                                 |

Πίνακας 4: Βιβλιογραφικά δεδομένα βιολογικών δράσεων ωρονών<sup>1</sup>

| Δομή   | % δέσμευση DPPH, 20 min | % δέσμευση DPPH, 60 min | % αναστολή ενζύμου λιποξυγονάσης σόγιας (0.1 mM)-% | % αντιλιπιδική υπεροξειδωση (AAPH) |
|--|-------------------------|-------------------------|--|------------------------------------|
|  <p>4</p>   | Δεν εξετάστηκε          | Δεν εξετάστηκε          | Δεν εξετάστηκε                                     | 53.3                               |
|  <p>5</p>  | Δεν εξετάστηκε          | Δεν εξετάστηκε          | 0.0 %  | Δεν εξετάστηκε                     |
|  <p>6</p> | 84.9                    | 97.7                    | 0.0 %  | 77.8                               |

### 5.2.1 Δραστικότητα ωρονών εναντίον της ελεύθερης ρίζας DPPH

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πίνακα 3 οι ωρόνες **5a** και **5b** εμφανίζουν πολύ ισχυρή ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH. Ειδικότερα, η ένωση **5a** επέδειξε ισάξια και η **5b** καλύτερα αποτελέσματα από την ένωση αναφοράς (νορδιϋδρογουαϊαρετικό οξύ (NDGA)). Οι ωρόνες **4a** και **4b** αποδείχτηκαν ανίκανες να δεσμεύσουν την ρίζα DPPH.

Από τα βιβλιογραφικά δεδομένα που εμφανίζονται στον πίνακα 4 επαληθεύεται η ισχυρή δράση των υδροξυλιωμένων ωρονών έναντι της ρίζας DPPH. Η ωρεοσιδίνη (ωρόνη **6**), η οποία φέρει από δύο υδροξυλ-ομάδες στον κάθε της δακτύλιο εμφανίζει παρόμοια δραστικότητα με τη σουλφουρετίνη (**5a**), που φέρει ένα υδροξύλιο στον Α δακτύλιο και δύο υδροξύλια στο Β δακτύλιο.

Συνολικά συμπεραίνεται ότι οι μεθοξυμεθοξυ-ωρόνες κι οι μεθοξυ-ωρόνες που συντέθηκαν δεν εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση ενώ οι υδροξυλιωμένες ωρόνες επιδεικνύουν πολύ ισχυρή δραστικότητα. Παράλληλα, από τις υδροξυ-ωρόνες, η ωρόνη **5b**, η οποία φέρει τρία υδροξύλια στο Β δακτύλιο και κανέναν υποκαταστάτη στον Α δακτύλιο εμφανίζει την πιο αποτελεσματική δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH σε σύγκριση με όλα τα μόρια που εξετάστηκαν (συμπεριλαμβανομένων των χαλκονών).

### 5.2.2 In vitro αναστολή του ενζύμου λιποξυγονάσης σόγιας (LOX) (Ωρόνες)

Βάσει του πίνακα 3 οι ωρόνες που μελετήθηκαν δεν παρουσιάζουν ικανοποιητική αναστολή της λιποξυγονάσης με τιμές % αναστολής του ενζύμου μεταξύ 0 – 24.5 %.

Άξιο σχολιασμού αποτελεί το γεγονός ότι η ωρόνη **4b** δεν αναστέλλει επιτυχώς το ένζυμο, ενώ η πρόδρομή της χαλκόνη **3b** εμφανίζει την καλύτερη αναστολή της λιποξυγονάσης σε σχέση με τις υπόλοιπες εξετασθείσες ενώσεις. Συνεπώς, υπάρχει μια πιθανή ένδειξη ότι οι μεθοξυ-υποκαταστάτες στο Β δακτύλιο των ωρονών δεν ενισχύουν την αντιφλεγμονώδη δράση τους.

### 5.2.3 Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Ωρόνες)

Παρατηρώντας τον πίνακα 3 γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι από τις εξετασθείσες ωρόνες, η σουλφουρετίνη (**5a**) εμφανίζει την καλύτερη αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Οι υπόλοιπες ωρόνες δεν παρουσιάζουν ικανοποιητικά αποτελέσματα ως δεσμευτές της AAPH. Συγκρίνοντας τη σουλφουρετίνη (**5a**) με την ωρόνη **5b** συμπεραίνεται ότι η θέση υποκατάστασης και οι διαφορετικά υποκατεστημένοι δακτύλιοι επηρεάζουν σημαντικά τη δραστικότητα των ωρονών. Πιο συγκεκριμένα, η σουλφουρετίνη φέρει ένα υδροξύλιο στον Α δακτύλιο ενώ η **5b** δεν έχει υποκατεστημένο Α δακτύλιο και η **5b** φέρει ένα παραπάνω υδροξύλιο στη θέση 2 του Β δακτυλίου. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα ενισχύουν



το παραπάνω συμπέρασμα καθώς η ωρεοσιδίνη (**6**), η οποία φέρει ένα παραπάνω υδροξύλιο στη θέση 2' του δακτυλίου A σε σχέση με τη σουλφουρετίνη (**5a**), δεσμεύει καλύτερα τη λιπιδική υπεροξειδωση από τη σουλφουρετίνη. Παράλληλα, αξίζει να επισημανθεί ότι ενώ η πρόδρομη χαλκόνη **3b** εμφανίζει ικανοποιητικά αποτελέσματα δέσμευσης της AAPH, η ωρόνη **4b** που φέρει τους ίδιους υποκαταστάτες δεν δεσμεύει επιτυχώς την AAPH. Παρομοίως, η χαλκόνη **3d**, πρόδρομη της σουλφουρετίνης (**5a**), εμφανίζει πολύ χειρότερα αποτελέσματα αναστολής σε σχέση με τα αντίστοιχα της σουλφουρετίνης (24.4 % έναντι 53.2 % αναστολή).

Συγκρίνοντας με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, η προσθήκη μίας μεθοξυ-ομάδας στη θέση 2' του B δακτυλίου υποβαθμίζει σημαντικά την αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Πιο συγκεκριμένα, η διμεθοξυ-ωρόνη **4**, που φέρει δύο μεθοξυ-ομάδες στο B δακτύλιο, παρουσιάζει πολύ ικανοποιητική δέσμευση της AAPH, ενώ η τριμεθοξυ-ωρόνη **4b** (με μία παραπάνω μεθοξυ-ομάδα στη θέση 2') φαίνεται να έχει υποβαθμισμένη δραστηριότητα.

#### 5.2.4 Συνδυαστική βιολογική δράση ωρονών

Από τις εξετασθείσες ωρόνες καμία δεν παρουσιάζει ταυτόχρονα ενθαρρυντικά αποτελέσματα και στις τρεις δοκιμασίες. Σημειώνεται ότι καμία ωρόνη δεν αναστέλλει ικανοποιητικά το ένζυμο της λιποξυγονάσης. Η σουλφουρετίνη (**5a**) δεσμεύει πολύ αποτελεσματικά την ελεύθερη ρίζα DPPH και ικανοποιητικά τη ρίζα AAPH, γεγονός που την καθιστά ισχυρό αντιοξειδωτικό. Η ωρόνη **5b** αν και εμφανίζει την καλύτερη δέσμευση της DPPH από όλες τις ενώσεις που μελετήθηκαν δεν αποτελεί ικανό αναστολέα της λιπιδικής υπεροξειδωσης (και της LOX).

## 6. Συμπεράσματα

Στην παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός δομής και η μελέτη της βιολογικής δράσης δύο κατηγοριών χημικών ενώσεων που ανήκουν στην οικογένεια των φλαβονοειδών. Πιο συγκεκριμένα, συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν δομικά εννέα ενώσεις εκ των οποίων πέντε χαλκόνες (**3a-3e**) και τέσσερις ωρόνες (**4a,4b & 5a,5b**). Επίσης, πραγματοποιήθηκε η ολική σύνθεση της φυσικής ωρόνης σουλφουρετίνης, η οποία δεν έχει αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία. Στη συνέχεια μελετήθηκε η αντιοξειδωτική και η αντιφλεγμονώδης δράση των χαλκονών και ωρονών. Επιπλέον, επιχειρήθηκε η βιοσύνθεση της ωρόνης σουλφουρετίνης με χρήση του οξειδωτικού ενζύμου λακκάσης.

Οι μέθοδοι σύνθεσης των εν λόγω ενώσεων συνιστούν απλές και με ικανοποιητικές αποδόσεις αντιδράσεις. Οι πρώτες ύλες που απαιτούνται για την παρασκευή των συγκεκριμένων φλαβονοειδών είναι εμπορικά διαθέσιμες εκτός από τις **1a** και **1b** που συντέθηκαν στο εργαστήριο.

Κατά τη διεξαγωγή των αρχικών πειραμάτων σύνθεσης χαλκονών, παρατηρήθηκε ότι αναλόγως με τις συνθήκες της αντίδρασης υπάρχουν διαφορές στην καθαρότητα των προϊόντων. Ειδικότερα, η παρασκευή χαλκονών με χρήση υδριδίου του νατρίου (NaH) σε ξηρό διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) επέδειξε καλύτερα αποτελέσματα αναφορικά με την καθαρότητα των προϊόντων της εκάστοτε αντίδρασης σε σύγκριση με τη χρήση υδροξειδίου του καλίου (KOH) σε αιθανόλη. Κατά συνέπεια, έπειτα από τη διερεύνηση της βέλτιστης διαδικασίας σύνθεσης των χαλκονών, οι χαλκόνες **3a** και **3c** συντέθηκαν με NaH σε DMF.

Η ολική σύνθεση της σουλφουρετίνης πραγματοποιήθηκε μέσω αντίδρασης συμπύκνωσης Claisen-Schmidt μεταξύ βενζαλδεΐδης και ακετοφαινόνης των οποίων τα φαινολικά υδροξύλια είναι προστατευμένα με τη μεθοξυμεθοξυ-ομάδα. Η επιλογή της συγκεκριμένης προστατευτικής ομάδας έγινε με βάση το γεγονός ότι η εισαγωγή της είναι απλή (αντίδραση αλκυλίωσης σε βασικό περιβάλλον) ενώ η απομάκρυνσή της επιτυγχάνεται σε ήπιες συνθήκες και μικρό χρονικό διάστημα ώστε να μην υπάρχουν παραπροϊόντα ή επίδραση στην στερεοχημεία της τελικής ωρόνης. Συνολικά, η μέθοδος που αναπτύχθηκε παρέχει τη σουλφουρετίνη σε ικανοποιητική απόδοση (35 - 40% για τα τρία στάδια) με υψηλή καθαρότητα και τη στερεοχημεία Z- που υπάρχει στο φυσικό προϊόν.

Η προσπάθεια βιοσύνθεσης της ωρόνης σουλφουρετίνης μέσω λακκάσης μπορεί να χαρακτηριστεί ως ελπιδοφόρο προκαταρκτικό πείραμα, το οποίο θα πρέπει να επαναληφθεί και να μελετηθεί περαιτέρω. Συγκρίνοντας το φάσμα <sup>1</sup>H NMR του προκύπτοντος μίγματος (Εικόνα 22) με το φάσμα της σουλφουρετίνης **5a** σε μεθανόλη παρατηρούνται πιθανές κοινές κορυφές, γεγονός που συνιστά την περαιτέρω έρευνα. Το φάσμα ESI-MS (Εικόνα 32) αποκάλυψε την ύπαρξη της αρχικά αντιδρούσας χαλκόνης **3a**, γεγονός που αποδεικνύει την πιθανή αποτυχία βιοσύνθεσης της σουλφουρετίνης. Παρόλα αυτά, η σύγκριση των φασμάτων ESI-MS της σουλφουρετίνης προερχόμενη από χημική

σύνθεση και του φάσματος βιοσυντιθέμενου μίγματος επέδειξε κοινές κορυφές, οι οποίες δεν εμφανίζονται στο αντίστοιχο φάσμα της χαλκόνης **3a**. Επομένως, είναι πιθανή η ύπαρξη της σουλφουρετίνης στο μίγμα της βιοσύνθεσης. Παράλληλα, επειδή τα μοριακά βάρη της χαλκόνης **3a** και της σουλφουρετίνης **5a** διαφέρουν μόλις 2 μονάδες, δεν είναι εύκολη η ξεκάθαρη παρατήρηση ξεχωριστής κορυφής για την ωρόνη στο φάσμα ESI-MS του μίγματος βιοσύνθεσης. Κατά συνέπεια, συμπεραίνεται ότι η περαιτέρω μελέτη της βιοσύνθεσης είναι δυνατόν να αποφέρει ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Δεδομένου ότι οι χαλκόνες κι οι ωρόνες έχουν τη δυνατότητα να φέρουν πολλούς και διαφορετικούς υποκαταστάτες, είναι προφανές ότι αναλόγως τους υποκαταστάτες και τη θέση τους στην εκάστοτε ένωση θα διαφέρουν κι οι βιολογικές τους δράσεις. Συνεπώς, είναι δυνατόν να εξαχθούν συμπεράσματα όσον αφορά στη σχέση δομής και βιολογικής δράσης.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά στη δέσμευση της ελεύθερης ρίζας DPPH συμπεραίνεται ότι οι υδροξυ-υποκατεστημένες χαλκόνες κι ωρόνες (**3d**, **5a** και **5b**) εμφανίζουν πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα, ενώ οι χαλκόνες κι οι ωρόνες που φέρουν μεθοξυμεθοξυ και μεθοξυ υποκαταστάτες (**3a-3c** και **4a**, **4b**) δεσμεύουν την ελεύθερη ρίζα DPPH σε μηδενικό βαθμό. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να θεωρηθεί αναμενόμενο, δεδομένου ότι η αντίδραση με το DPPH είναι μια αντίδραση μεταφοράς πρωτονίου και πραγματοποιείται στην περίπτωση που στο εξεταζόμενο μόριο υπάρχουν ευκίνητα άτομα υδρογόνου (όπως π.χ. υδρογόνο σε φαινολικό υδροξύλιο).

Όσον αφορά στην αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης, παρατηρείται ότι οι χαλκόνες κι οι ωρόνες (**3b**, **3c** και **4b**) με μεθοξυ-ομάδες επιδεικνύουν ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Άξιο σχολιασμού είναι το γεγονός ότι ενώ η σουλφουρετίνη (**5a**) αναστέλλει πολύ ικανοποιητικά τη λιπιδική υπεροξειδωση, η πρόδρομη χαλκόνη (**3d**) δεν εμφανίζει παρόμοια δράση. Επιπλέον, η προσθήκη μεθοξυμεθοξυ-ομάδας στη θέση 4' του A δακτυλίου, υποβαθμίζει την αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (**3b** > **3c**).

Αναφορικά με την αναστολή της δράσης του ενζύμου της λιποξυγονάσης, οι χαλκόνες **3b** και **3c** που φέρουν μεθοξυ- και μεθοξυμεθοξυ- υποκαταστάτες εμφανίζουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Ειδικότερα, παρατηρείται ενίσχυση της αναστολής της λιποξυγονάσης με την προσθήκη μεθοξυμεθοξυ-ομάδας στη θέση 4' του A δακτυλίου (**3c** > **3b**). Από τις ωρόνες καμία δεν επέδειξε ικανοποιητική δράση γεγονός που είναι δυνατόν να σηματοδοτεί τη μείωση της αντιφλεγμονώδους δράσης λόγω ύπαρξης βενζοφουρανικού δακτυλίου.

Συνολικά, η χαλκόνη **3b** επέδειξε την καλύτερη συνδυαστική αντιοξειδωτική κι αντιφλεγμονώδη δράση, δεσμεύοντας ικανοποιητικά την ελεύθερη ρίζα AAPH και αναστέλλοντας αποτελεσματικά τη δράση της λιποξυγονάσης σόγιας. Η σουλφουρετίνη (**5a**) παρουσιάζει την καλύτερη συνδυαστική αντιοξειδωτική δράση δεσμεύοντας ικανοποιητικά τη ρίζα DPPH και αναστέλλοντας εξίσου ικανοποιητικά τη λιπιδική υπεροξειδωση, γεγονός που την καθιστά ισχυρό αντιοξειδωτικό.

## 7. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Αξιολογώντας τη σύνθεση (βιολογική και χημική) και τα *in vitro* αποτελέσματα βιολογικής δράσης που παρουσιάστηκαν στην παρούσα ερευνητική εργασία προκύπτει ένα ευρύ πεδίο προτάσεων για μελλοντική έρευνα.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι συνθήκες των αντιδράσεων σύνθεσης επηρεάζουν την καθαρότητα και την απόδοση της εκάστοτε αντίδρασης. Συνεπώς, προτείνεται η αναζήτηση εναλλακτικών αντιδράσεων σύνθεσης χαλκονών ή η τροποποίηση των συνθηκών αντιδράσεων συμπύκνωσης Claisen-Schmidt με σκοπό την αύξηση της καθαρότητας και της απόδοσης της σύνθεσης χαλκονών.

Όσον αφορά στη βιοσύνθεση της σουλφουρετίνης (**5a**) προτείνεται η επανάληψη των προκαταρκτικών πειραμάτων κι η ενδεχόμενη αλλαγή στις συνθήκες αντίδρασης, όπως για παράδειγμα η αύξηση της θερμοκρασίας έτσι ώστε να επιτευχθούν συνθήκες πιο κοντά στις αντίστοιχες της βέλτιστης ενεργότητας του ενζύμου. Παράλληλα, η χρήση οξειδωτικών ενζύμων εκτός της λακκάσης θα έδινε τη δυνατότητα περαιτέρω έρευνας της βιοσύνθεσης της σουλφουρετίνης. Επιπλέον, ενδιαφέρουσα φαίνεται η βιοσύνθεση της ωρόνης **5b** η οποία εμφανίζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση.

Όσον αφορά στην έρευνα της σχέσης δομής-βιολογικής δράσης, προτείνεται η σύνθεση νέων χαλκονών κι ωρονών με την προσθήκη δότες ή δέκτες ηλεκτρονίων ως υποκαταστάτες σε διάφορες θέσεις των αρωματικών δακτυλίων A και B. Οι τροποποιήσεις στο είδος, τον αριθμό και τη θέση των υποκαταστατών στους αρωματικούς δακτυλίους A και B των χαλκονών και των ωρονών είναι πιθανόν να οδηγήσει στη σύνθεση νέων βιοδραστικών μορίων με βελτιωμένη βιολογική δράση.

Τέλος, προτείνεται ο εγκλεισμός των βιοενεργών χαλκονών και ωρονών με σκοπό την προστασία και διαφύλαξη των ευεργετικών τους ιδιοτήτων. Ο εγκλεισμός των συγκεκριμένων ενώσεων θα διασφαλίσει την αποφυγή οξείδωσης κι επίδρασης εξωτερικών περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως για παράδειγμα το φως, με αποτέλεσμα τη διατήρηση της βιοδραστικότητας τους.

## 8. Βιβλιογραφία

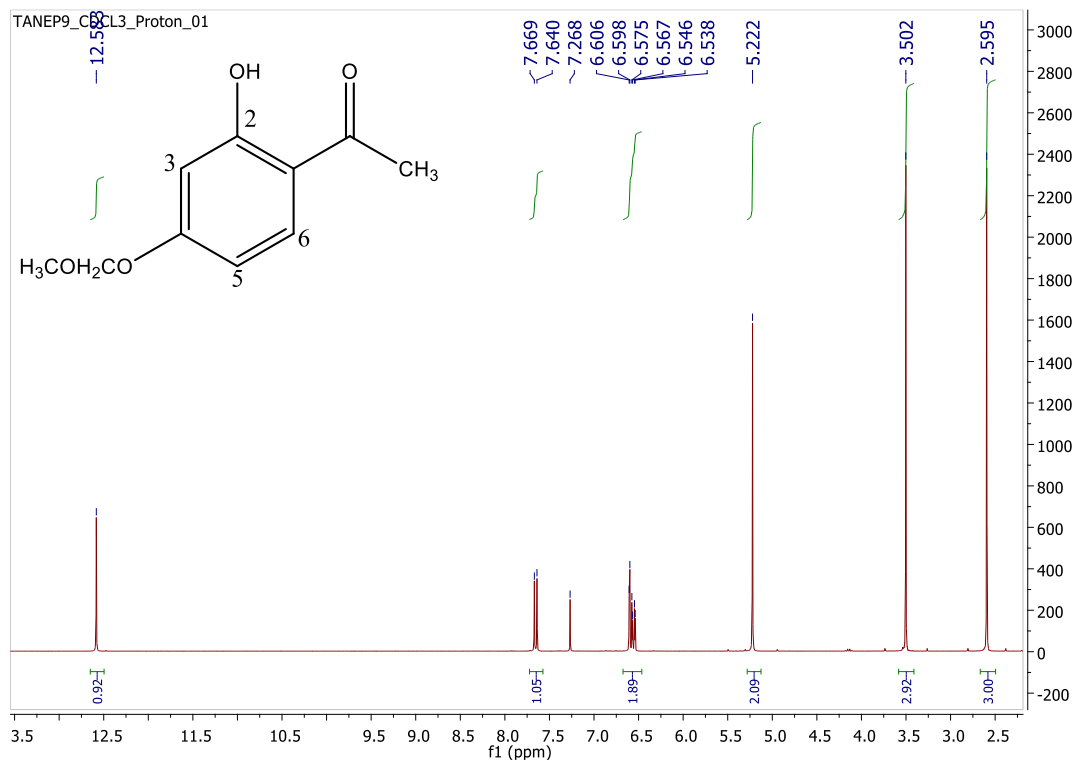
1. Detsi, A., Majdalani, M., Kontogiorgis, C. A., Hadjipavlou-Litina, D. & Kefalas, P. Natural and synthetic 2'-hydroxy-chalcones and aurones: Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant and soybean lipoxygenase inhibitory activity. *Bioorganic Med. Chem.* **17**, 8073–8085 (2009).
2. Harborne, J. B. *The Flavonoids : advances in research since 1986*. (Boca Raton: Chapman & Hall/CRC).
3. Grotewold, E. *The Science of Flavonoids*. (Springer, 2006).
4. Singh, P., Anand, A. & Kumar, V. Recent developments in biological activities of chalcones : A mini review. *Eur. J. Med. Chem.* **85**, 758–777 (2014).
5. Sashidhara, K. V, Kumar, A., Kumar, M., Sarkar, J. & Sinha, S. Synthesis and in vitro evaluation of novel coumarin-chalcone hybrids as potential anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 7205–11 (2010).
6. Salum, L. B. *et al.* Cytotoxic 3,4,5-trimethoxychalcones as mitotic arresters and cell migration inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **63**, 501–10 (2013).
7. Ratković, Z. *et al.* Synthesis, characterization, electrochemical studies and antitumor activity of some new chalcone analogues containing ferrocenyl pyrazole moiety. *Bioorg. Chem.* **38**, 26–32 (2010).
8. Kolundžija, B. *et al.* Novel anthraquinone based chalcone analogues containing an imine fragment: synthesis, cytotoxicity and anti-angiogenic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 65–71 (2014).
9. Murthy, Y. L. N., Suhasini, K. P., Pathania, A. S., Bhushan, S. & Nagendra Sastry, Y. Synthesis, structure activity relationship and mode of action of 3-substitutedphenyl-1-(2,2,8,8-tetramethyl-3,4,9,10-tetrahydro-2H,8H-pyrano[2,3-f]chromen-6-yl)-propenones as novel anticancer agents in human leukaemia HL-60 cells. *Eur. J. Med. Chem.* **62**, 545–55 (2013).
10. Chen, M. *et al.* Licochalcone A, a new antimalarial agent, inhibits in vitro growth of the human malaria parasite Plasmodium falciparum and protects mice from P. yoelii infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1470–1475 (1994).
11. Yadav, N. *et al.* Antimalarial Activity of Newly Synthesized Chalcone Derivatives In Vitro. *Chem. Biol. Drug Des.* **80**, 340–347 (2012).
12. Sharma, N. *et al.* Design, economical synthesis and antiplasmodial evaluation of vanillin derived allylated chalcones and their marked synergism with artemisinin against chloroquine resistant strains of Plasmodium falciparum. *Eur. J. Med. Chem.* **79**, 350–68 (2014).
13. Smit, F. J. & N'da, D. D. Synthesis, in vitro antimalarial activity and cytotoxicity of novel 4-aminoquinoliny-chalcone amides. *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 1128–38

- (2014).
14. Bhale, P. S., Dongare, S. B. & Chanshetti, U. B. Synthesis and Antimicrobial screening of Chalcones containing imidazo [1,2-a] pyridine nucleus. *Res. J. Chem. Sci. Res. J. Chem. Sci* **3**, 2231–606 (2013).
  15. Yin, B.-T. *et al.* Synthesis and biological evaluation of  $\alpha$ -triazolyl chalcones as a new type of potential antimicrobial agents and their interaction with calf thymus DNA and human serum albumin. *Eur. J. Med. Chem.* **71**, 148–59 (2014).
  16. Roussaki, M. *et al.* Synthesis and anti-parasitic activity of a novel quinolinone – chalcone series. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 6436–6441 (2013).
  17. Nazarian, Z. *et al.* Novel antileishmanial chalconoids: Synthesis and biological activity of 1- or 3-(6-chloro-2H-chromen-3-yl)propen-1-ones. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 1424–1429 (2010).
  18. Sharma, H. *et al.* Synthesis, biological evaluation and 3D-QSAR studies of 3-keto salicylic acid chalcones and related amides as novel HIV-1 integrase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **19**, 2030–45 (2011).
  19. Doan, T. N. Synthesis, Antioxidant and Antimicrobial Activities of a Novel Series of Chalcones, Pyrazolic Chalcones, and Allylic Chalcones. *Pharmacol. & Pharm.* **2**, 282–288 (2011).
  20. Sivakumar, P. M., Prabhakar, P. K. & Doble, M. Synthesis, antioxidant evaluation, and quantitative structure-activity relationship studies of chalcones. *Med. Chem. Res.* **20**, 482–492 (2011).
  21. Qian, Y.-P. *et al.* Hydroxychalcones as potent antioxidants: Structure–activity relationship analysis and mechanism considerations. *Food Chem.* **126**, 241–248 (2011).
  22. Bano, S. *et al.* Synthesis of some novel chalcones, flavanones and flavones and evaluation of their anti-inflammatory activity. *Eur. J. Med. Chem.* **65**, 51–9 (2013).
  23. Kotra, V., Ganapaty, S. & Adapa, S. R. Synthesis of a new series of quinolinyl chalcones as anticancer and antiinflammatory agents. *Indian J. Chem. - Sect. B Org. Med. Chem.* **49**, 1109–1116 (2010).
  24. Haudecoeur, R. & Boumendjel, A. Recent Advances in the Medicinal Chemistry of Aurones. 2861–2875 (2012).
  25. Boumendjel, A. *et al.* 4-Hydroxy-6-methoxyaurones with high-affinity binding to cytosolic domain of P-glycoprotein. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* **50**, 854–856 (2002).
  26. Okombi, S. *et al.* Discovery of benzylidenebenzofuran-3(2H)-one (aurones) as inhibitors of tyrosinase derived from human melanocytes. *J. Med. Chem.* **49**, 329–333 (2006).
  27. Liu, A.-L., Wang, H.-D., Lee, S. M., Wang, Y.-T. & Du, G.-H. Structure–activity

- relationship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their in vitro anti-viral activities. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 7141–7147 (2008).
28. Roussaki, M. *et al.* Aurones: A Promising Heterocyclic Scaffold for the Development of Potent Antileishmanial Agents. **2012**, (2012).
  29. Shin, J.-S. *et al.* Sulfuretin isolated from heartwood of *Rhus verniciflua* inhibits LPS-induced inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and pro-inflammatory cytokines expression via the down-regulation of NF- $\kappa$ B in RAW 264.7 murine macrophage cells. *Int. Immunopharmacol.* **10**, 943–950 (2010).
  30. Sheng, R. *et al.* Design, synthesis and AChE inhibitory activity of indanone and aurone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **44**, 7–17 (2009).
  31. Lee, E. H. *et al.* Inhibitory effect of the compounds isolated from *Rhus verniciflua* on aldose reductase and advanced glycation endproducts. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 1626–30 (2008).
  32. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, R. K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* **3**, 183–198 (2002).
  33. Τσιμογιάννης, Δ. Αντιοξειδωτική δράση φλαβονοειδών ενώσεων και εκχυλισμάτων αρωματικών φυτών: Αναγωγή Ελευθέρων Ριζών και Προστασία Φυτικών Ελαίων. (Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2008).
  34. Mandal, S., Yadav, S., Yadav, S. & Nema, R. K. Antioxidants : A Review. **1**, 102–104 (2009).
  35. Μ., D. T. *Βιοχημεία: Κλινικοί συσχετισμοί.* (Π. X. Πασχαλίδης, 2007).
  36. Θ., K. Δ. *Καρδιολογία.* (Π. X. Πασχαλίδης, 2009).
  37. Zerva, A., Manos, N., Vouyiouka, S., Christakopoulos, P. & Topakas, E. Bioconversion of Biomass-Derived Phenols Catalyzed by *Myceliophthora thermophila* Laccase. *Molecules* **21**, 550 (2016).
  38. Giardina, P. *et al.* Laccases: A never-ending story. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 369–385 (2010).
  39. Randy M Berka, Igor V Grigoriev, Robert Otilar, A saf S a la m o v , Jane G rim w o o d, I. *et al.* Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi. *Nat. Biotechnol.* **29**, 992–927 (2011).
  40. Kontogiorgis, C. & Hadjipavlou-Litina, D. Biological evaluation of several coumarin derivatives designed as possible anti-inflammatory/antioxidant agents. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **18**, 63–69 (2003).
  41. Catherine Liégeois , Guillaume Lermusieau, and S. C. Measuring Antioxidant Efficiency of Wort, Malt, and Hops against the 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride-Induced Oxidation of an Aqueous Dispersion of Linoleic Acid. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1129–1134 (2000).

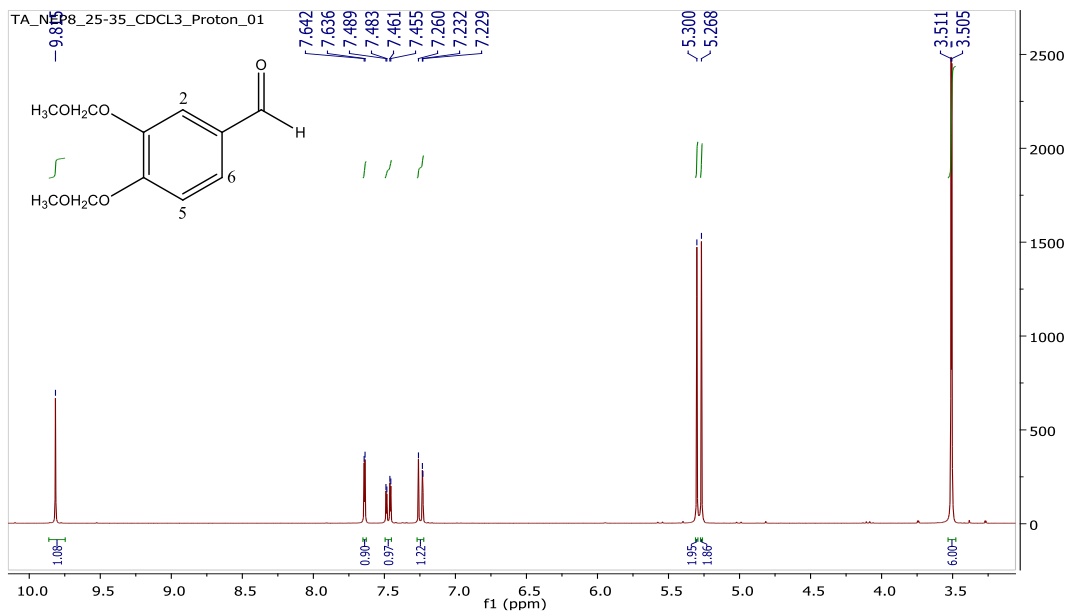
## 9. Παράρτημα

### 2-υδροξυ-4-(μεθοξυμεθοξυ)-ακετοφαινόνη (**1a**)



Εικόνα 10: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ακετοφαινόνης **1a** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)

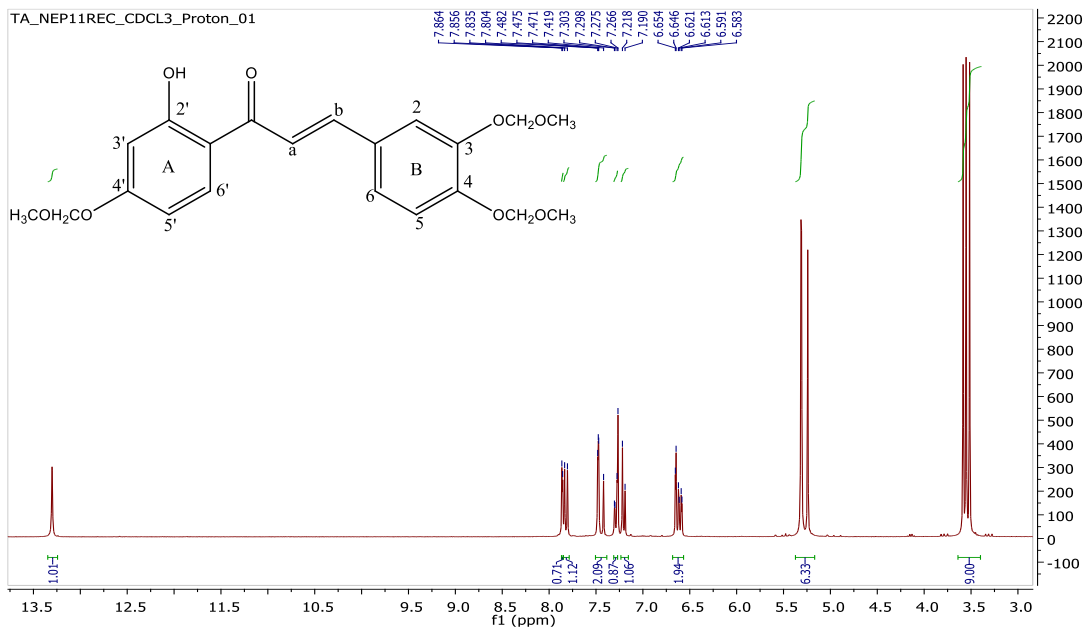
### 3,4-δι(μεθοξυμεθοξυ)βενζαλδεΰδη (**2a**)



Εικόνα 11: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της βενζαλδεΰδης **2a** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)

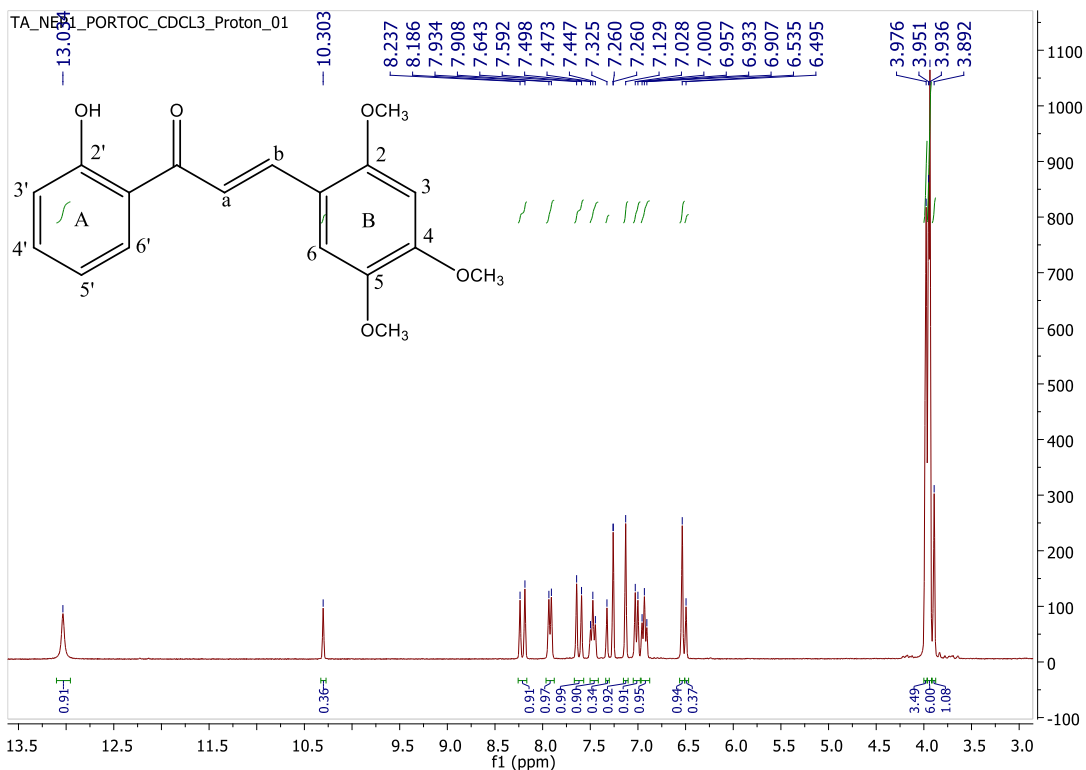


(E)-3-(3, 4-δι(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)-1-(2'-υδροξυ-4'-(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη (**3a**)



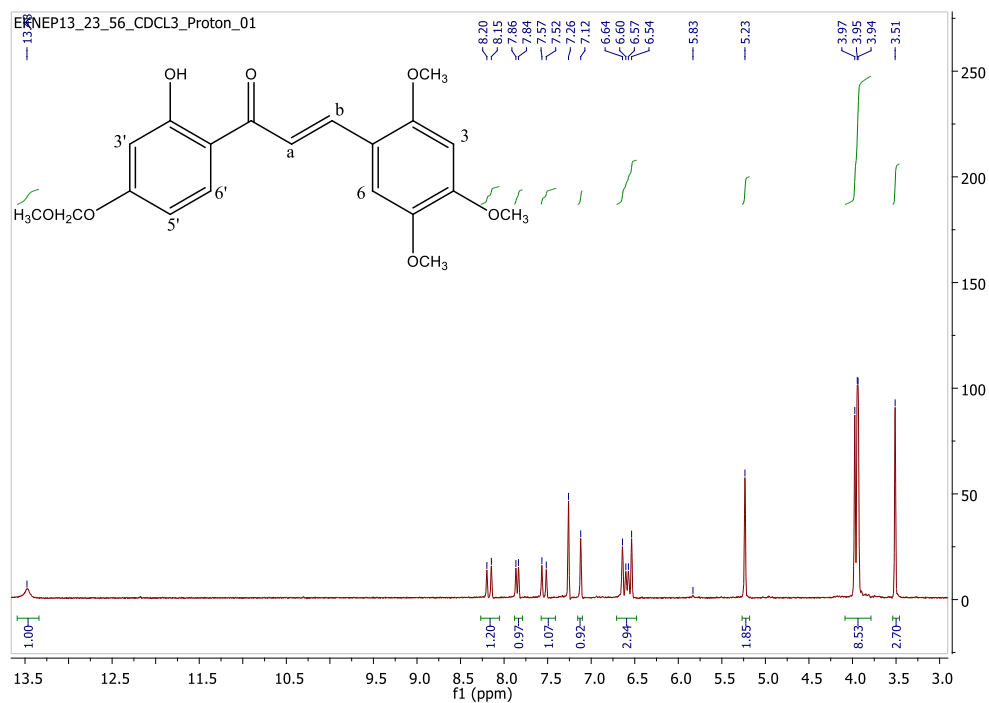
Εικόνα 12: Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της χαλκόνης **3a** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)

(E)-1-(2'-υδροξυφαινυλο)-3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλο)προπ-2-εν-όνη (**3b**)



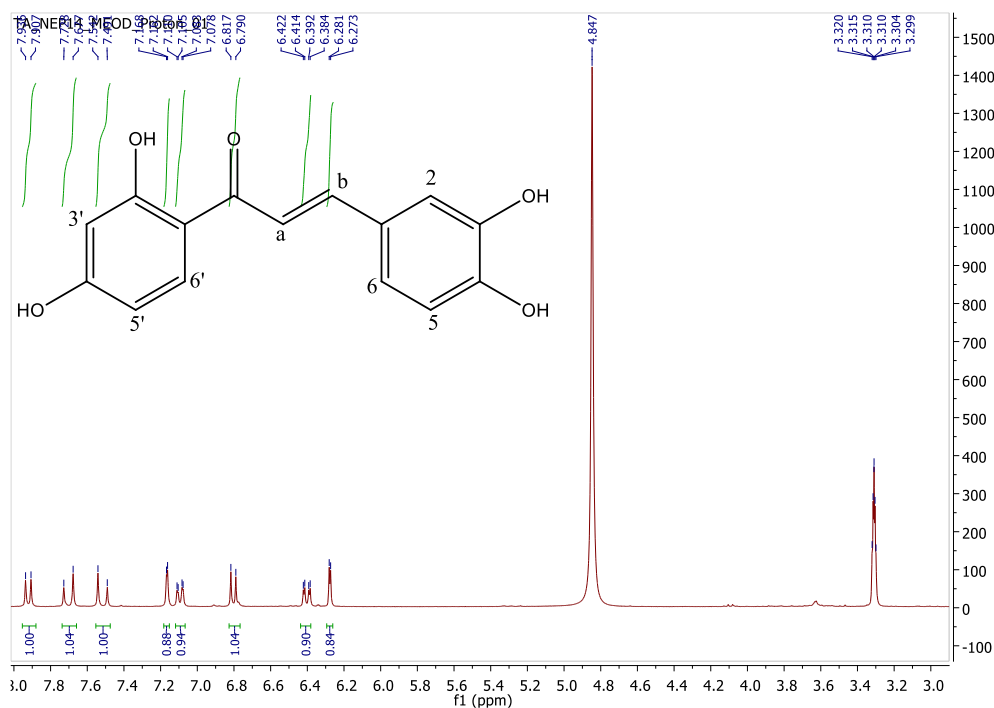
Εικόνα 13: Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της χαλκόνης **3b** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)

(*E*)-1-(2'-υδροξυ-4'-(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)-3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη  
(**3c**)



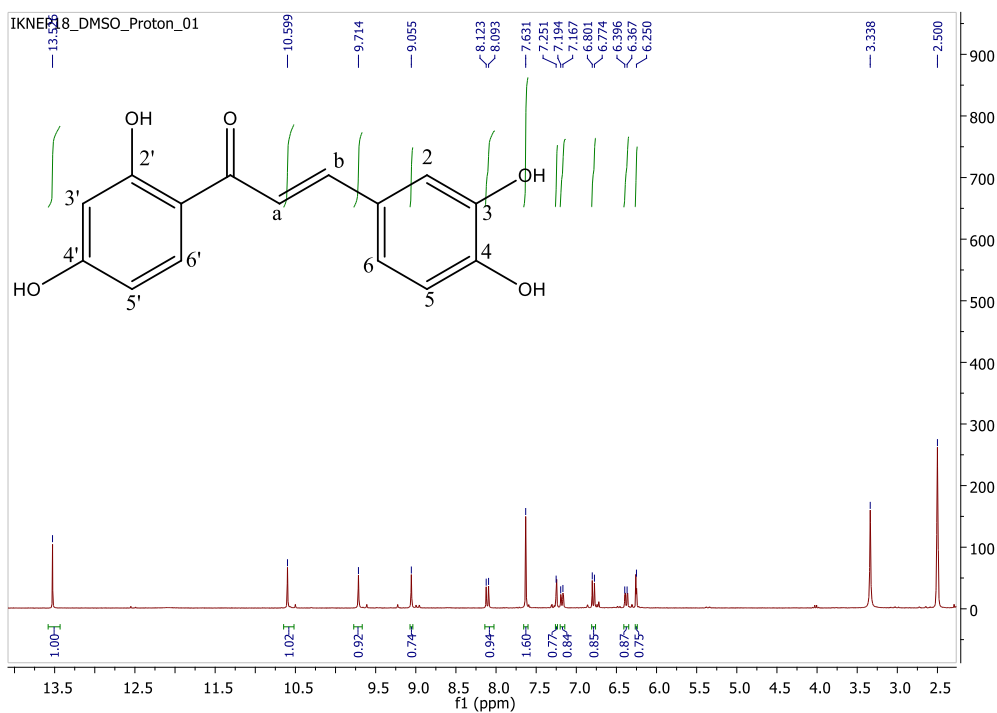
Εικόνα 14: Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της χαλκόνης **3c** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)

(*E*)-1-(2', 4'-διυδροξυφαινυλ)-3-(3, 4-διυδροξυφαινυλ) προπ-2-εν-1-όνη (**3d**) (CDCl<sub>3</sub>)



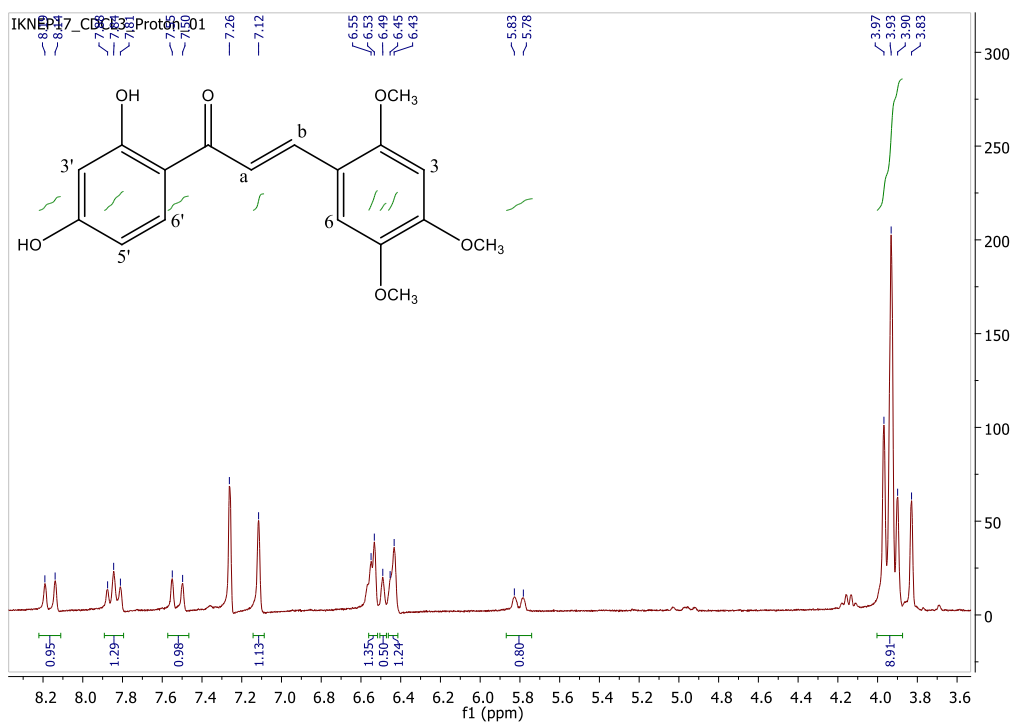
Εικόνα 15: Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της χαλκόνης **3d** σε μεθανόλη (MeOD, 300 MHz)

(E)-1-(2',4'-διυδροξυφαινυλ)-3-(3,4-διυδροξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη (**3d**) (DMSO)



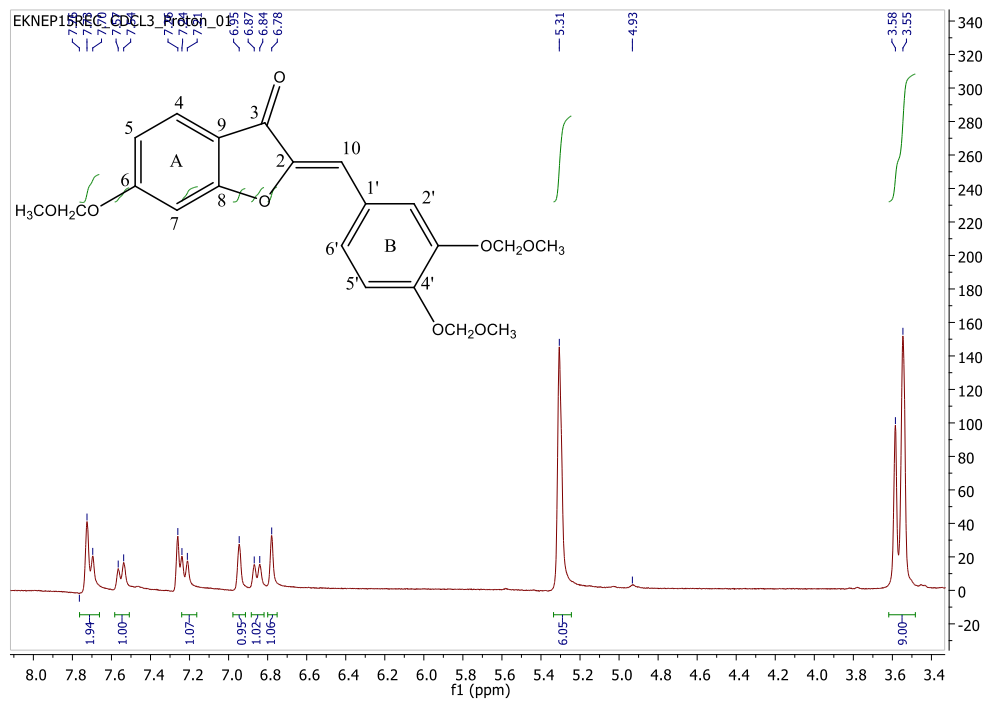
Εικόνα 16: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της χαλκόνης **3d** (DMSO, 300 MHz)

(E)-1-(2',4'-διυδροξυφαινυλ)-3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη (**3e**)



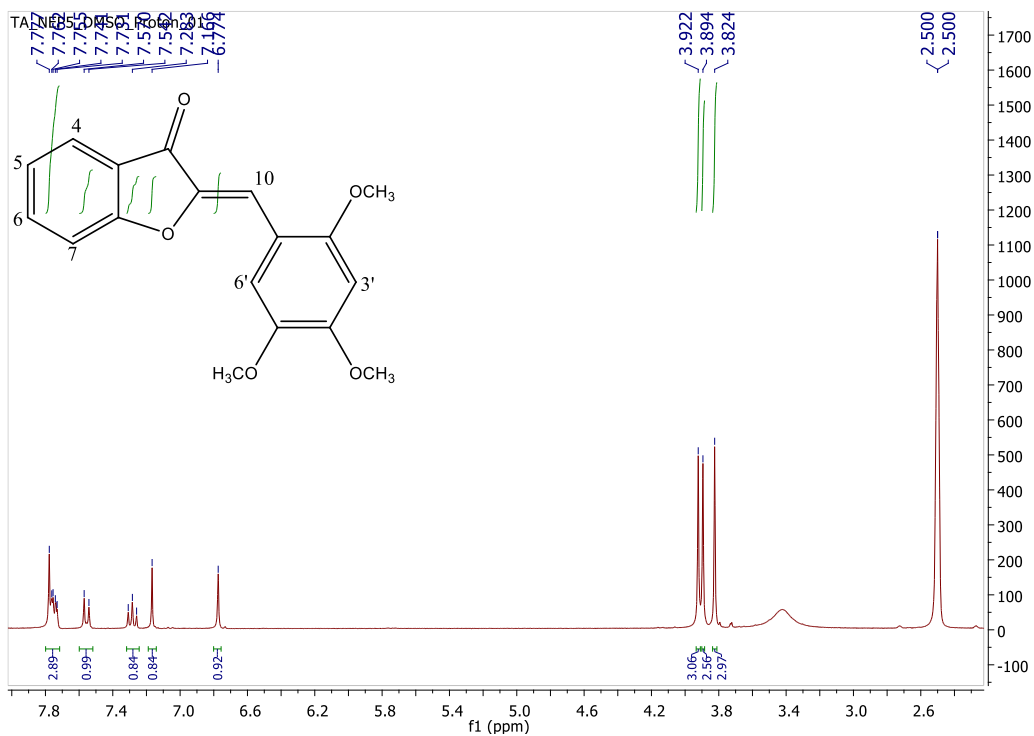
Εικόνα 17: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της χαλκόνης **3e** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)

(Z)-2-(3',4'-δι(μεθοξυμεθοξυ)βενζυλιδενο)-6-(μεθοξυμεθοξυ)βενζοφουραν-3(2H)-όνη  
(4a)



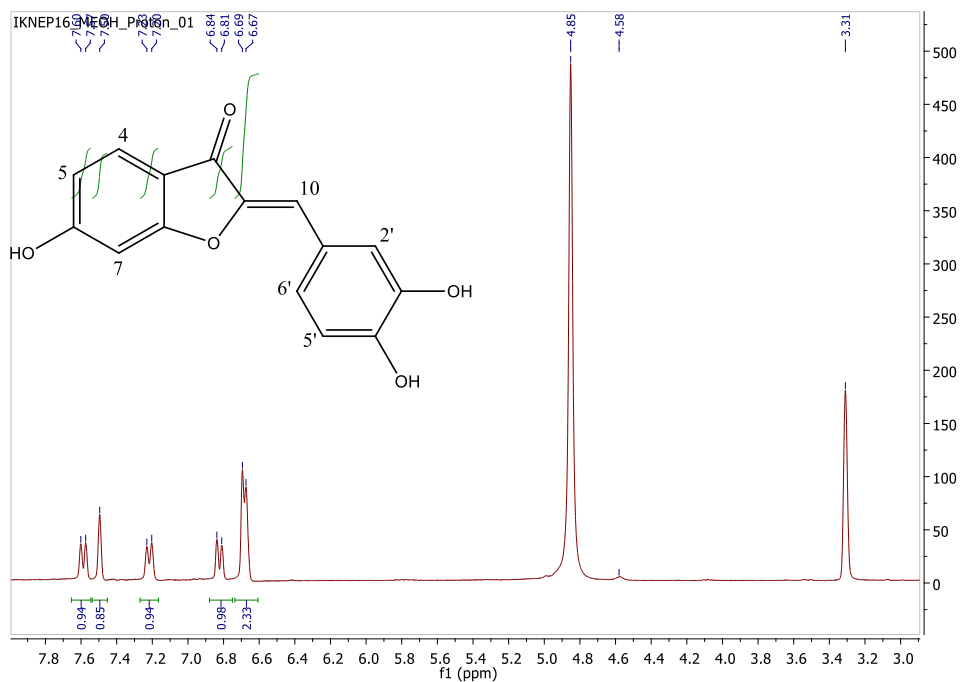
Εικόνα 18: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ωρόνης **4a** ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)

(Z)-2-(2',4',5'-τριμεθοξυβενζυλιδενο)βενζοφουραν-2(2H)-όνη (4b)



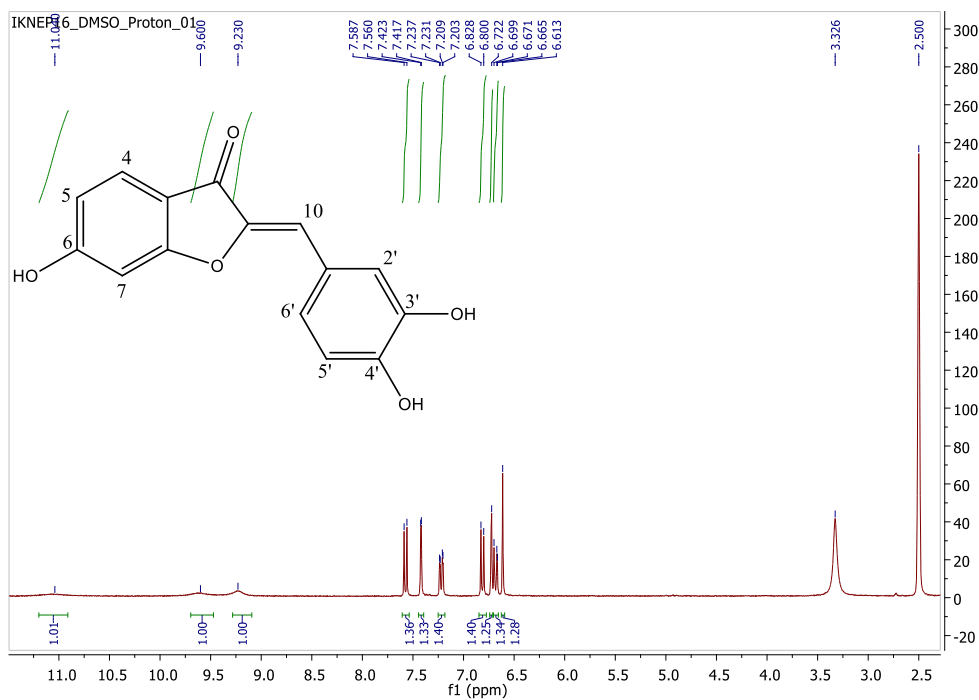
Εικόνα 19: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ωρόνης **4b** ( $\text{DMSO}$ , 300 MHz)

(Z)-2-(3',4'-διϋδροξυβενζυλιδενο)-6-υδροξυβενζοφουραν-3(2H)-όνη (σουλφουρετίνη) (5a) (MeOD)



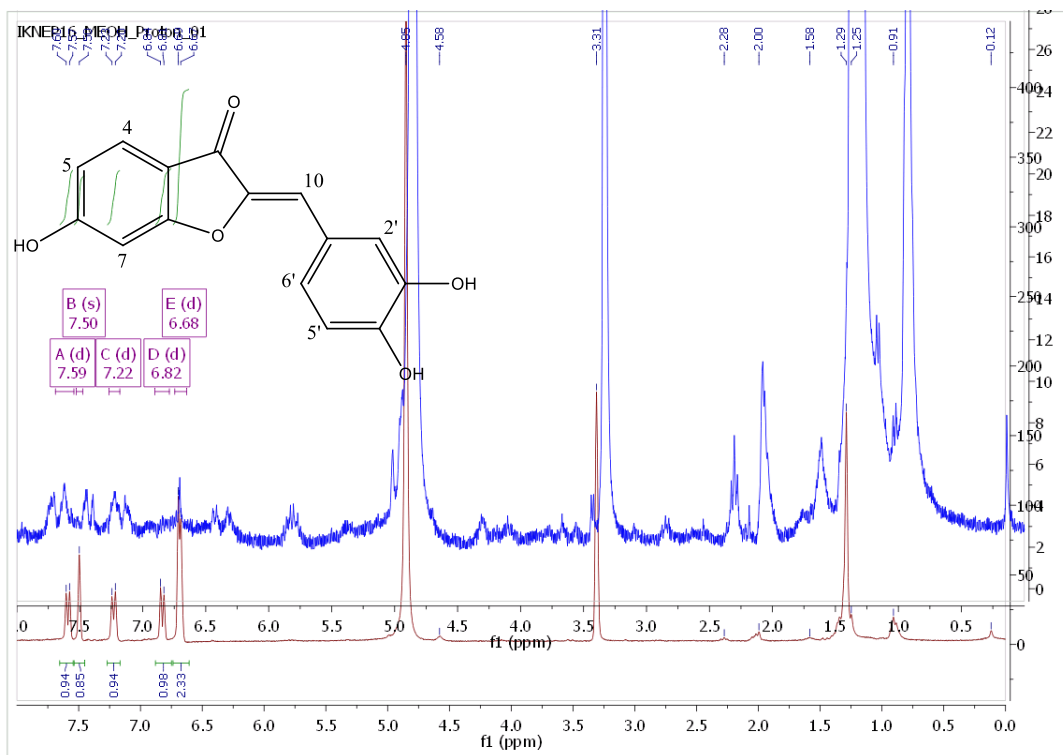
Εικόνα 20: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της σουλφουρετίνης 5a (MeOD, 300 MHz)

(Z)-2-(3,4-διϋδροξυβενζυλιδενο)-6-υδροξυβενζοφουραν-3(2H)-όνη (σουλφουρετίνη) (5a) (DMSO)



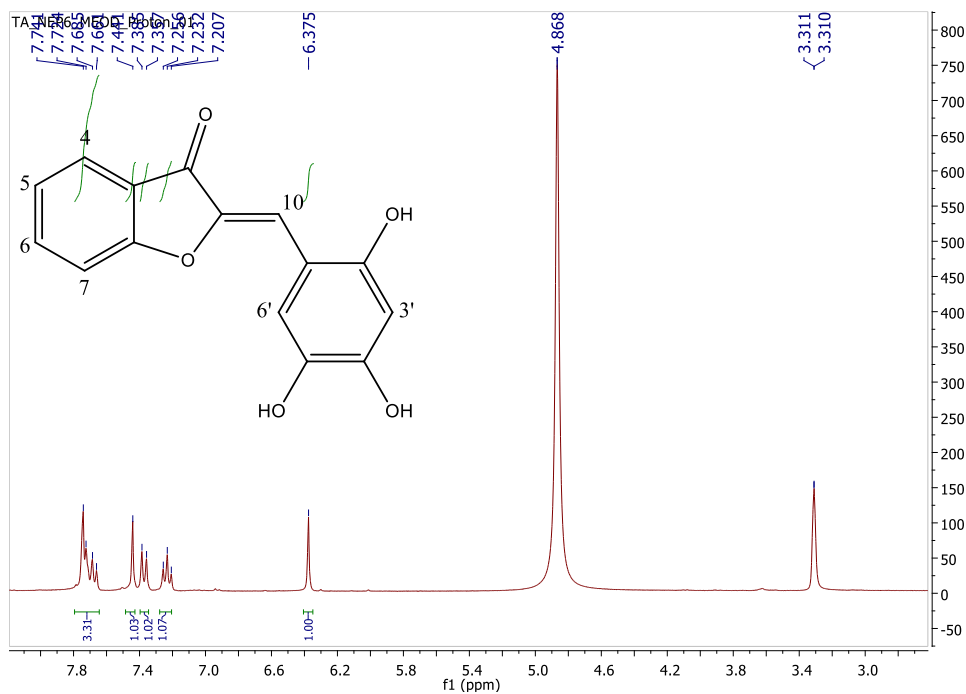
Εικόνα 21: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της σουλφουρετίνης 5a (DMSO, 300 MHz)

(Z)-2-(3,4-διυδροξυβενζυλιδENO)-6-υδροξυβενζοφουραν-3(2H)-όνη (σουλφουρετίνη) (**5a**) (MeOD) με χρήση λακκάσης



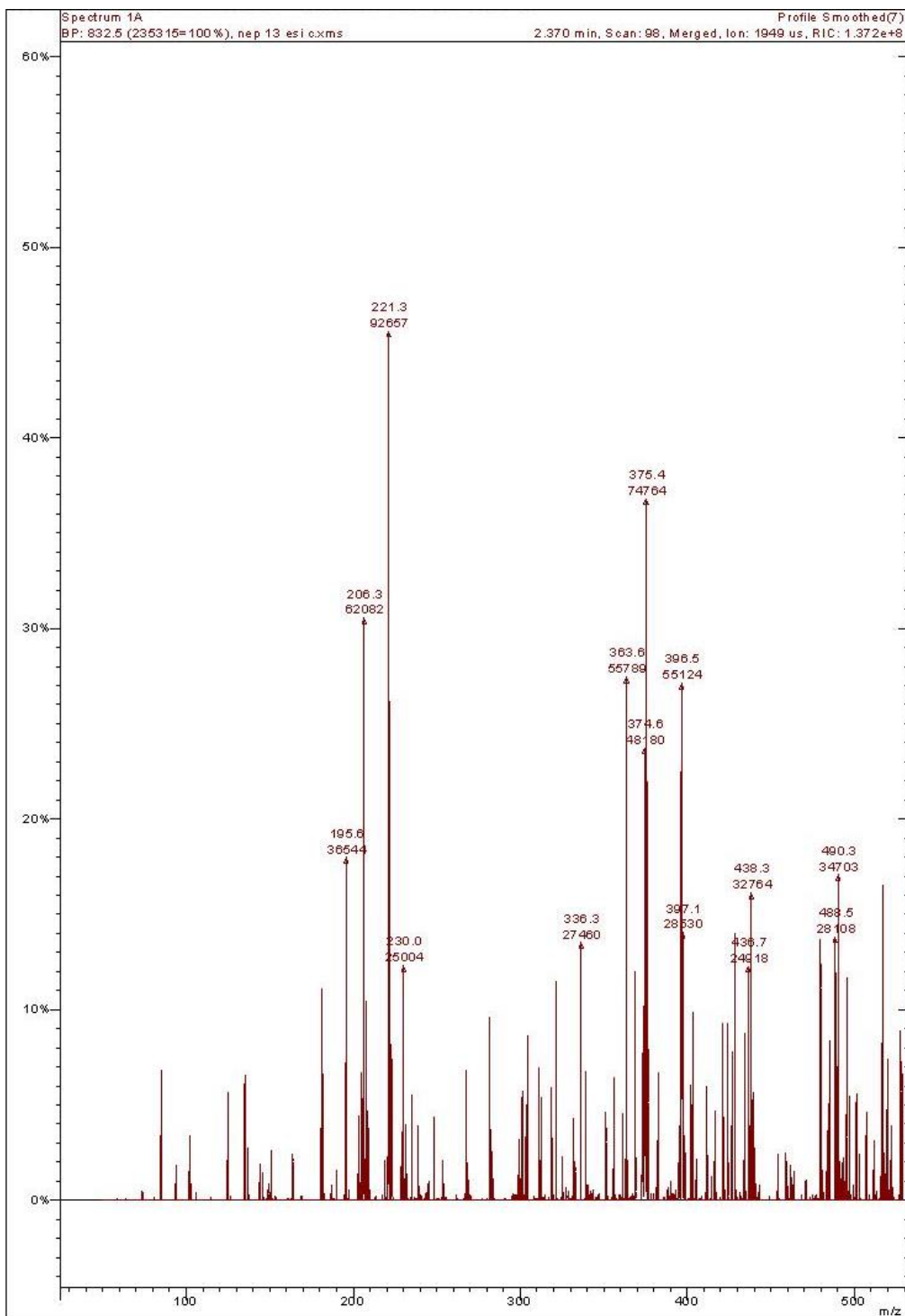
Εικόνα 22: Σύγκριση φάσματος  $^1\text{H}$  NMR (MeOD, 300 MHz) σουλφουρετίνης **5a** με το φάσμα του προϊόντος βιοσύνθεσης

(Z)-2-(2,4,5-τριυδροξυβενζυλιδENO)βενζοφουραν-3(2H)-όνη (**5b**)



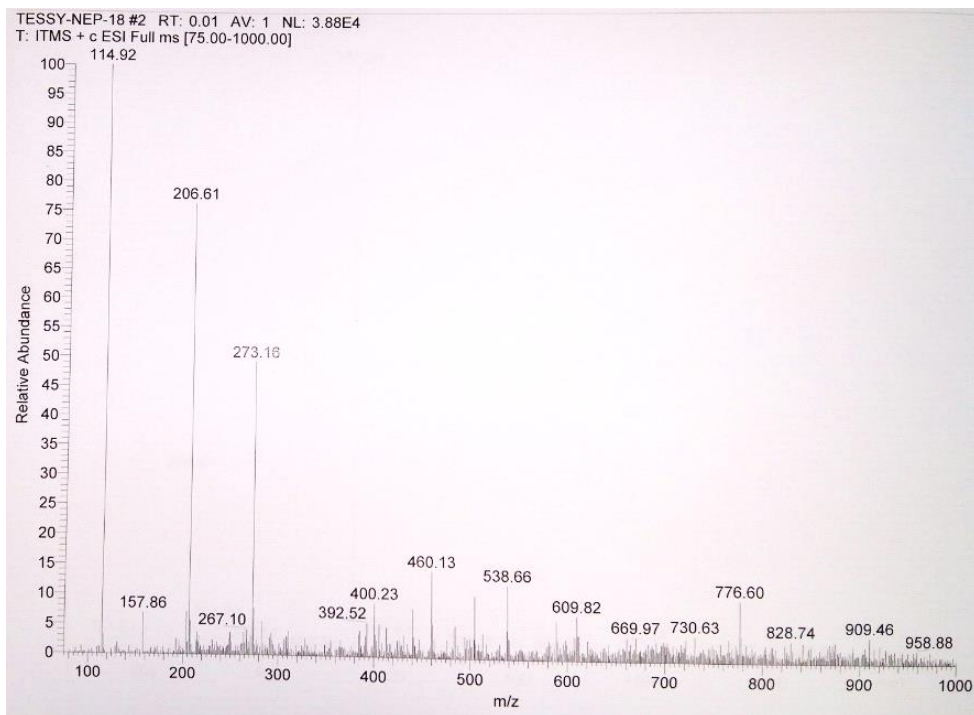
Εικόνα 23: Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της ωρόνης **5b** (MeOD, 300 MHz)

(E)-1-(2'-υδροξυ-4'-(μεθοξυμεθοξυ)φαινυλ)-3-(2,4,5-τριμεθοξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη  
(3c) (Exact Mass: 374.14)

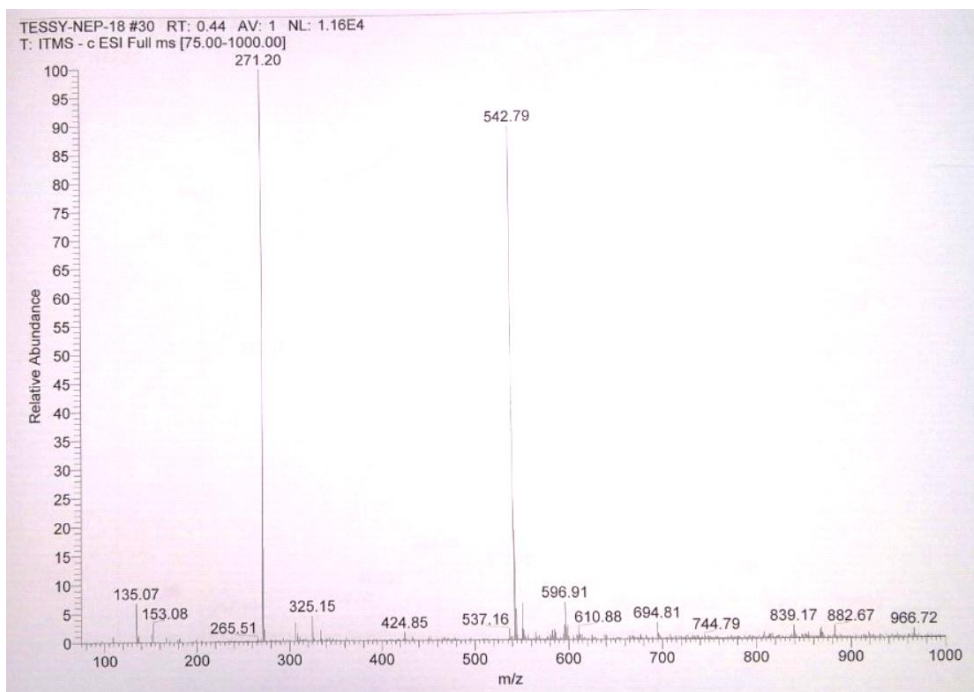


Εικόνα 24: Φάσμα ESI-MS της χαλκόνης 3c

(*E*)-1-(2',4'-διϋδροξυφαινυλ)-3-(3,4-διϋδροξυφαινυλ)προπ-2-εν-1-όνη (**3d**) (Exact Mass: 272.07)



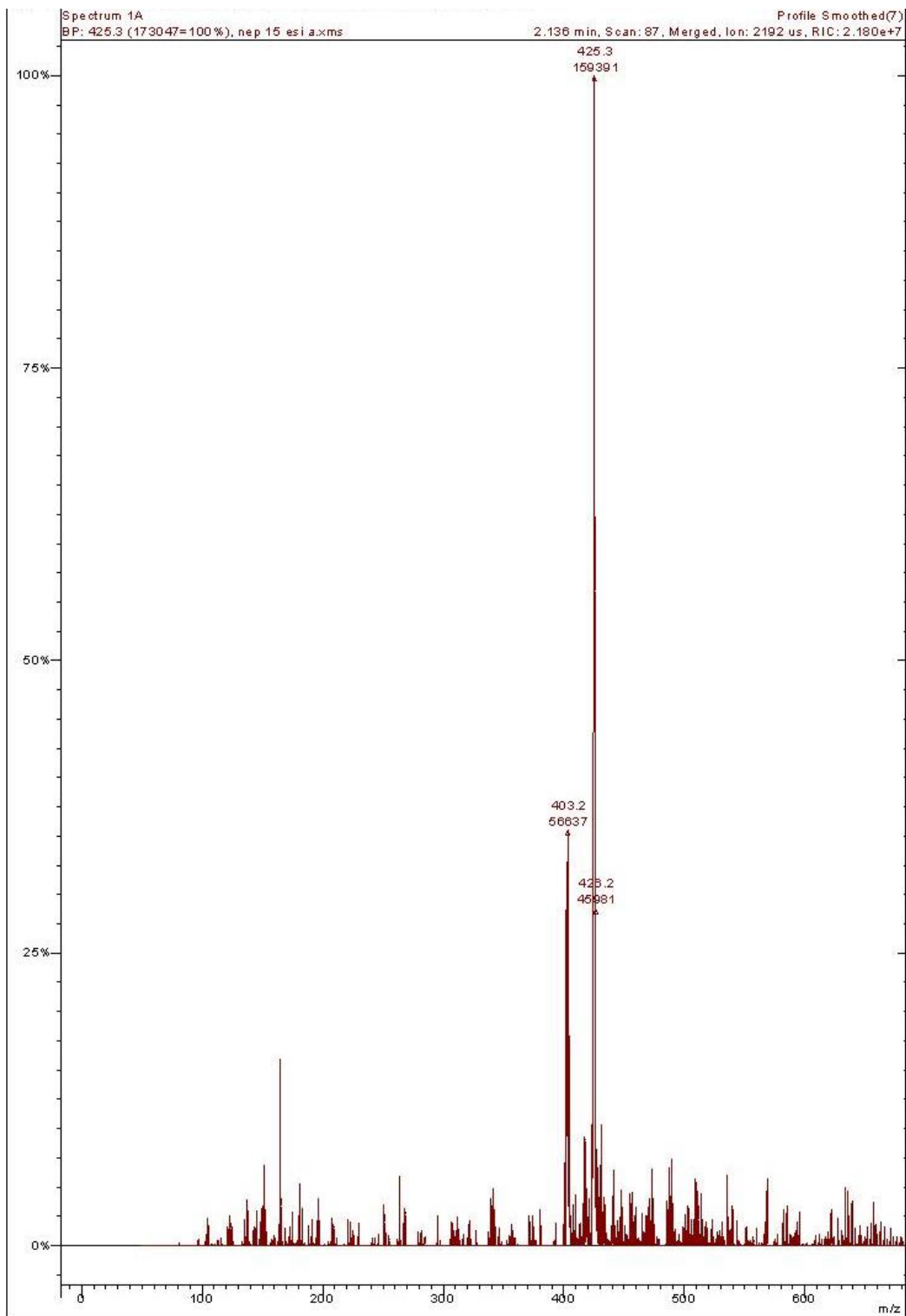
Εικόνα 25: Φάσμα ESI-MS της χαλκόνης **3d** (θετικό)



Εικόνα 26: Φάσμα ESI-MS της χαλκόνης **3d** (αρνητικό)

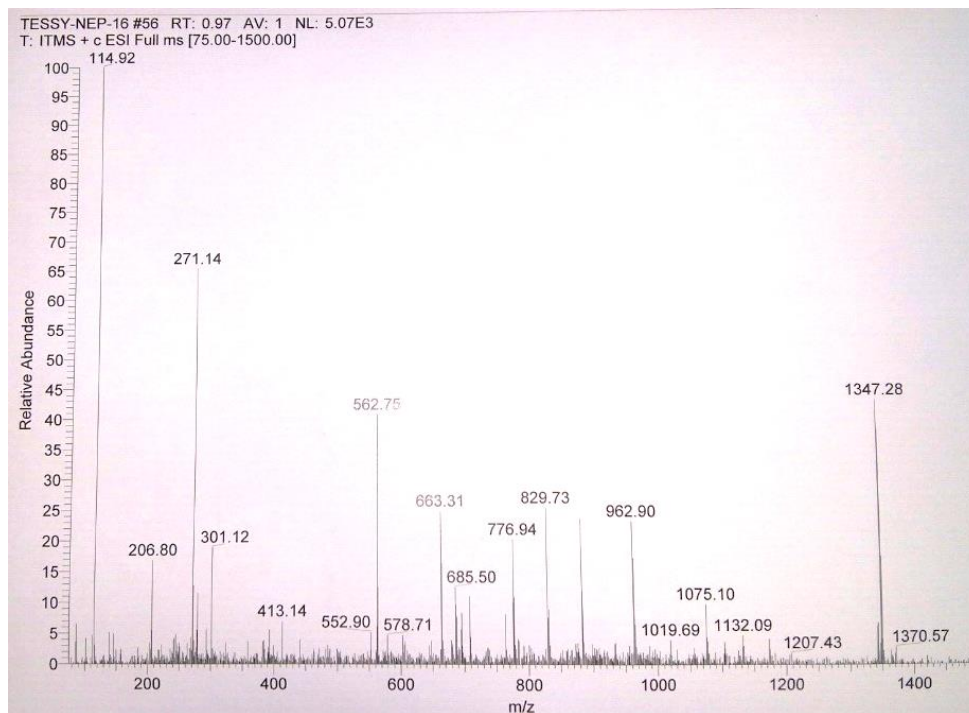


(Z)-2-(3',4'-δι(μεθοξυμεθοξυ)βενζυλιδενο)-6-(μεθοξυμεθοξυ)βενζοφουραν-3(2H)-όνη  
(4a) (Exact Mass: 402.13)

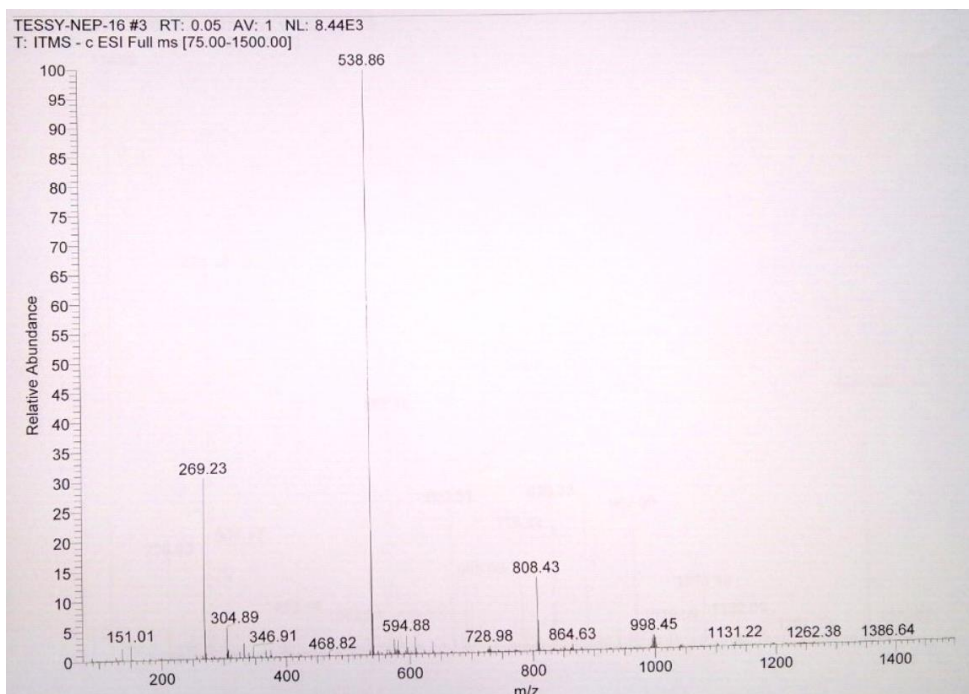


Εικόνα 27: Φάσμα ESI-MS της ωρόνης 4a

(Z)-2-(3,4-διϋδροξυβενζυλιδενο)-6-υδροξυβενζοφουραν-3(2H)-όνη (σουλφουρετίνη) (5a) (Exact Mass: 270.05)

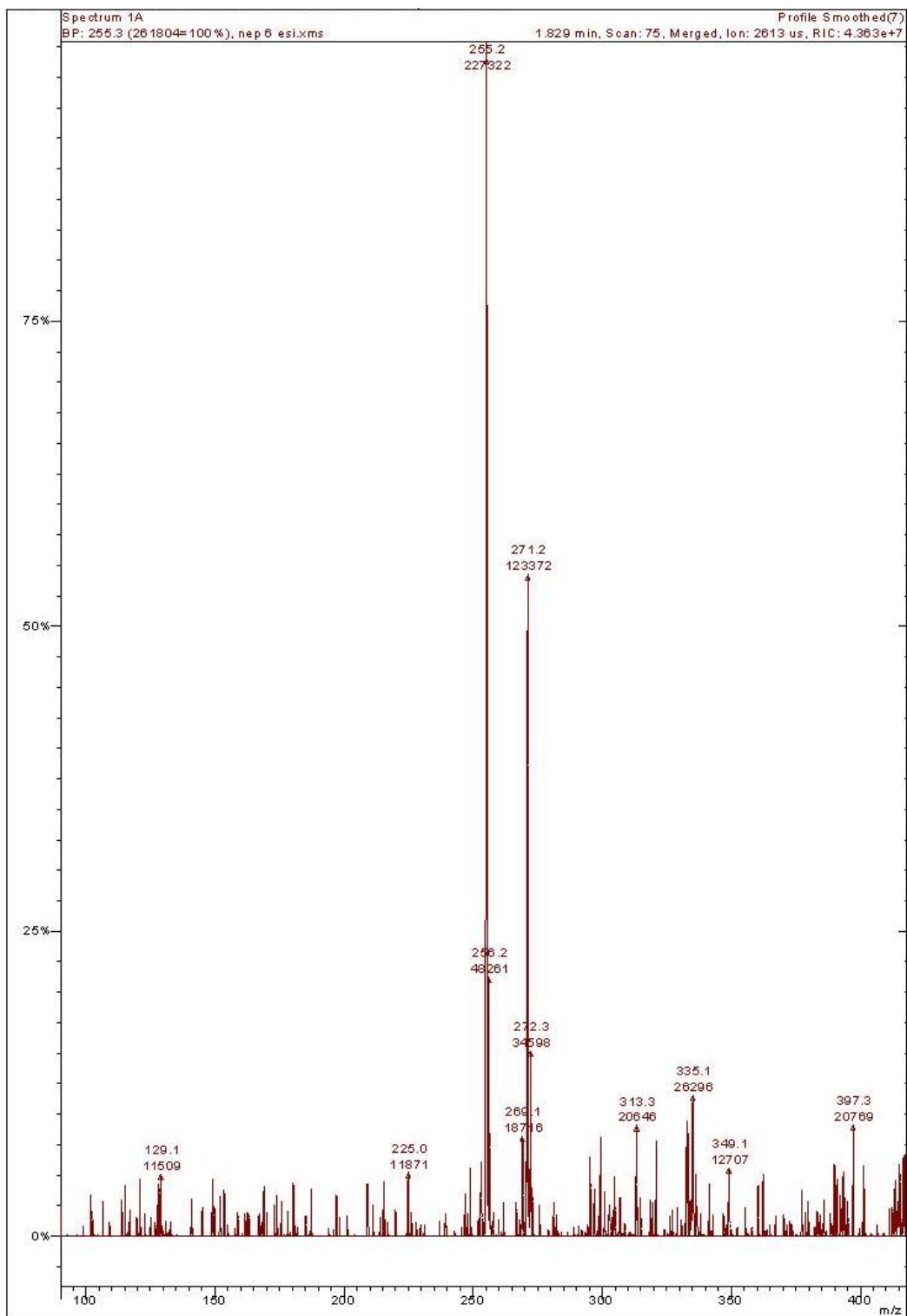


Εικόνα 28: Φάσμα ESI-MS της σουλφουρετίνης (5a) (θετικό)



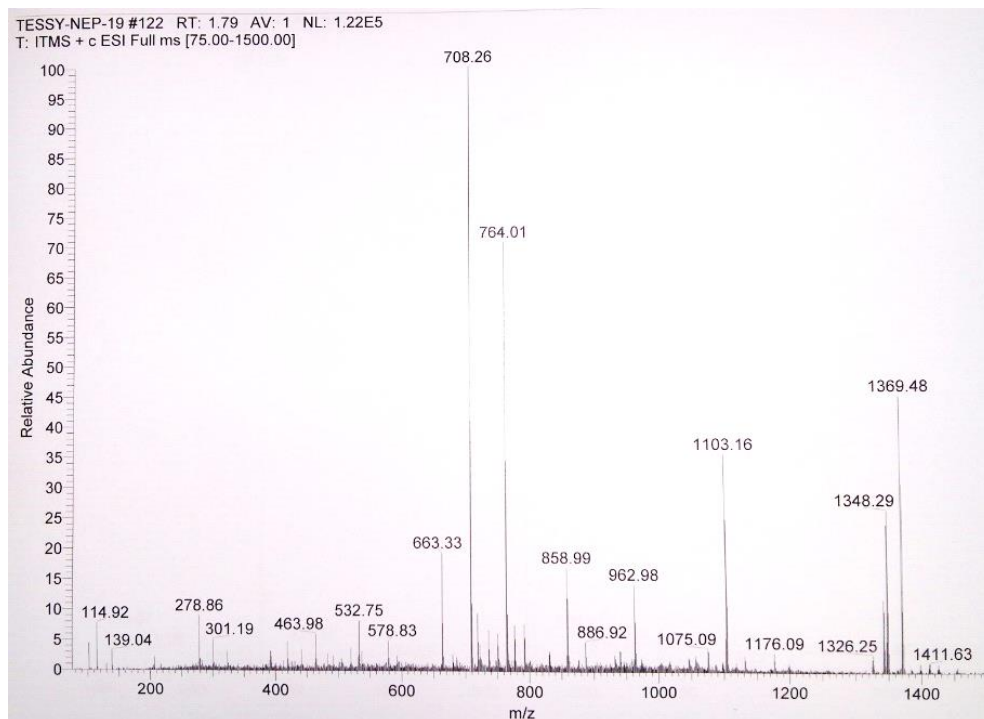
Εικόνα 29: Φάσμα ESI-MS της σουλφουρετίνης (5a) (αρνητικό)

(Z)-2-(2,4,5-τριϋδροξυβενζυλιδενο)βενζοφουραν-3(2H)-όνη (**5b**) (Exact Mass: 270.05)

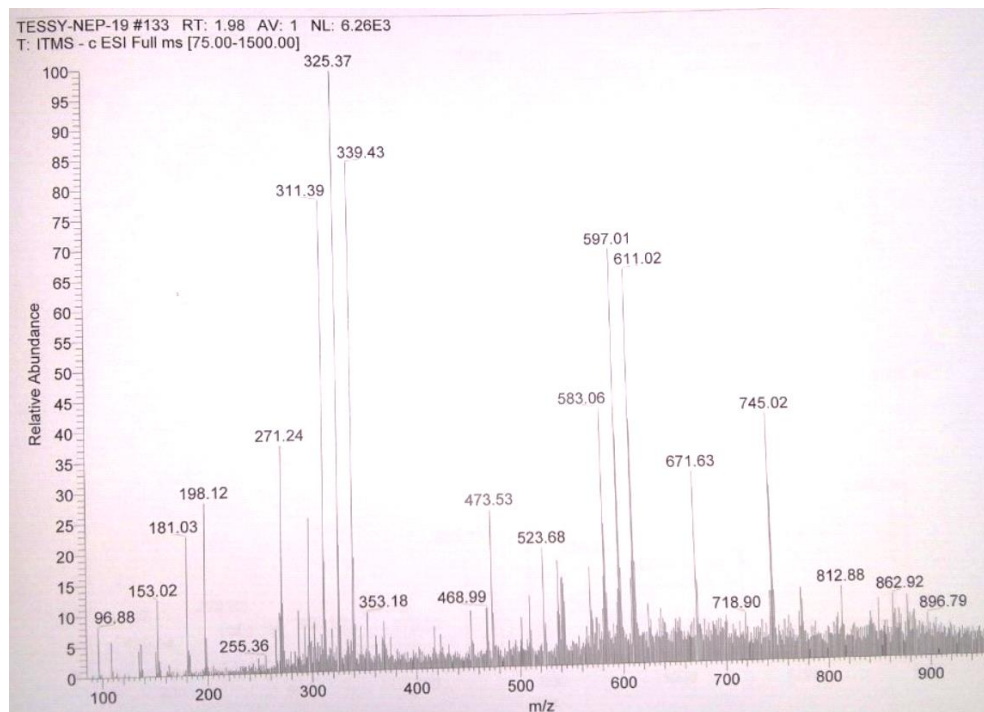


Εικόνα 30: Φάσμα ESI-MS της ωρόνης **5b**

(Z)-2-(3,4-διϋδροξυβενζυλιδενο)-6-υδροξυβενζοφουραν-3(2H)-όνη (σουλφουρετίνη) (5a) με χρήση λακκάσης



Εικόνα 31: Φάσμα ESI-MS προϊόντος βιοσύνθεσης (θετικό)



Εικόνα 32: Φάσμα ESI-MS προϊόντος βιοσύνθεσης (αρνητικό)