

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ (Ι) ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



*Σύνθεση κουμαρινικών παραγώγων και μελέτη  
φυσικοχημικού/ φαρμακοκινητικού προφίλ τους*

---

*Διπλωματική Εργασία*

**Αναστασία Αχιλλέως**

*Υπεύθυνος Καθηγητής*

Τσόπελας Φώτιος, Επίκουρος Καθηγητής Ε.Μ.Π.

**Αθήνα 2021**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα Εργαστήρια Οργανικής και Αναλυτικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου κατά το ακαδημαϊκό έτος 2020-2021, υπό την επίβλεψη της Δρ. Αναστασίας Δέτση, Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Ε.Μ.Π. και του Δρ. Φωτίου Τσόπελα, Επίκουρο Καθηγητή Ε.Μ.Π..

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα τόσο τον Επίκουρο Καθηγητή Ε.Μ.Π. κ. Φώτιο Τσόπελα όσο και την Αναπληρώτρια καθηγήτρια Ε.Μ.Π. κα. Αναστασία Δέτση, για την ευκαιρία που μου έδωσαν να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον και πρωτοπόρο θέμα, αλλά κυρίως για τη πολύτιμη βοήθεια και την καθοδήγηση που μου προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π. Αννίτα Κατωπόδη, για την ανιδιοτελή στήριξή της, την καθοδήγηση της χάριν των γνώσεων και της επιστημονικής της κατάρτισης, την άψογη συνεργασία μας καθώς και την υπομονή και επιμονή της προκειμένου να προσπεραστούν όλα τα εμπόδια και να επιτευχθεί το βέλτιστο αποτέλεσμα.

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

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένεια μου και το κοντινό φιλικό μου περιβάλλον για τη στήριξη, την ενθάρρυνση και την αγάπη τους όλα τα χρόνια των σπουδών μου στο Ε.Μ.Π.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

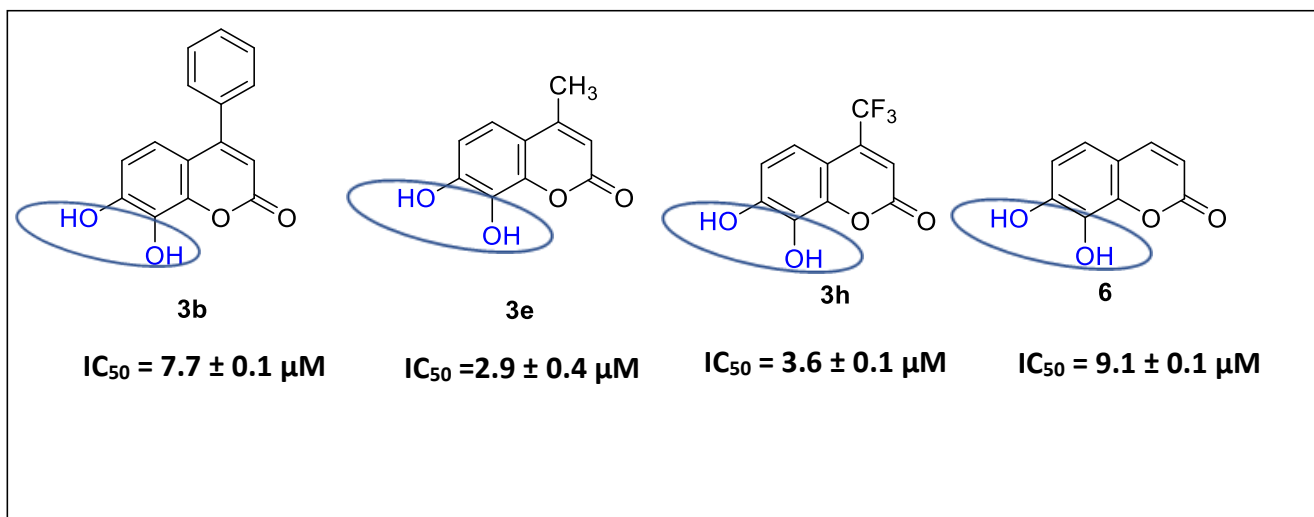
Οι κουμαρίνες είναι ετερόκυκλες οργανικές ενώσεις οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των βενζοπυρονών και απαντώνται σε πολλά είδη φυτών είτε σε ελεύθερη μορφή είτε ως γλυκοζίδες. Τόσο τα φυσικά όσο και τα συνθετικά κουμαρινικά παράγωγα, έχουν ξεχωρίσει για το πλήθος των βιολογικών-φαρμακευτικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν όπως είναι η αντιοξειδωτική, η αντιφλεγμονώδης και η αντικαρκινική δράση.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι ο σχεδιασμός, η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός κουμαρινικών αναλόγων καθώς και η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης *in vitro*, μέσω της μεθόδου DPPH. Επιπρόσθετο σκοπό αποτελεί η εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των συντιθέμενων αναλόγων, όπως το ποσοστό πρόσδεσης στις πρωτεΐνες του πλάσματος (%PPB) και το ποσοστό απορρόφησης εκ της από στόματος πρόσληψης (%HOA), μέσω ποσοτικών σχέσεων δομής-δράσης (QSAR).

Συγκεκριμένα κατά την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας αυτής, συντέθηκαν σε ικανοποιητικές αποδόσεις δέκα κουμαρινικά ανάλογα μέσω του μηχανισμού συμπύκνωσης "Reichmann". Η δομή και η καθαρότητα των ενώσεων μελετήθηκαν μέσω Φασματοσκοπίας Μαγνητικού Πυρηνικού Συντονισμού  $^1\text{H}$  NMR.

Για τον σχεδιασμό και την σύνθεση των συγκεκριμένων κουμαρινικών αναλόγων χρησιμοποιήθηκαν ως ενώσεις-οδηγοί, η 4-μέθυλο-ουμπελιφενόλη (**3d**) και η δαφνετίνη (**6**). Και οι δύο αυτές ενώσεις είναι φυσικά προϊόντα και αποτελούν μέρος της τρέχουσας ερευνητικής δραστηριότητας του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ΕΜΠ λόγω της αξιολογής αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης που έχουν παρουσιάσει.

Στη συνέχεια τα συντιθέμενα κουμαρινικά παράγωγα αξιολογήθηκαν *in vitro* για την αντιοξειδωτική τους δράση σύμφωνα με την δοκιμή δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH. Έπειτα από μελέτη και ανάλυση των αποτελεσμάτων, παρατηρήθηκε ότι οι ενώσεις **3b** ( $\text{IC}_{50} = 7.7 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ), **3e** ( $\text{IC}_{50} = 2.9 \pm 0.4 \mu\text{M}$ ), **3h** ( $\text{IC}_{50} = 3.6 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ) και **6** ( $\text{IC}_{50} = 9.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ) εμφανίζουν εξαιρετική ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH, εξαιτίας του κατεχολικού συστήματος που διαθέτουν.



Εικόνα 1. Χημική Δομή κουμαρινικών αναλόγων που παρουσιάζουν την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση.

Τέλος, τα συντιθέμενα κουμαρινικά παράγωγα αξιολογήθηκαν για την προβλεπόμενη συμπεριφορά τους ως δραστικές ουσίες φαρμακευτικών ενώσεων. Μέσω ποσοτικών σχέσεων δομής-δράσης που αναπτύχθηκαν, εκτιμήθηκε το ποσοστό απορρόφησης της εκ του στόματος πρόσληψής τους (%HOA) και το ποσοστό κατακράτησης από τις πρωτεΐνες του πλάσματος (%PPB) με τα αποτελέσματα και των δύο φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων να κρίνονται ενθαρρυντικά.

## ABSTRACT

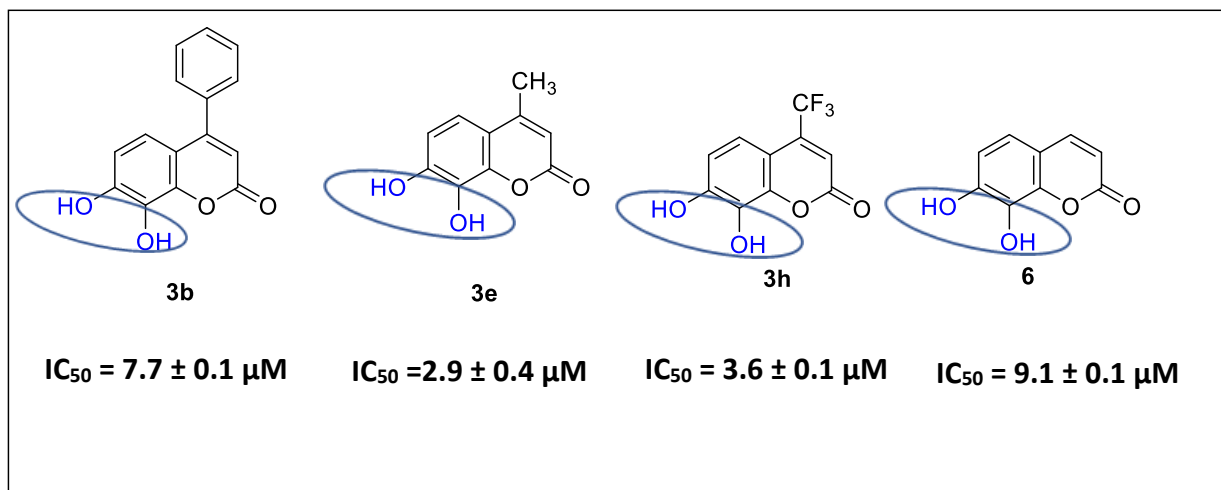
Coumarins are heterocyclic organic compounds, which belong to the family of benzopyrones and are found in many varieties of plants either in free state or as Glucosides. Both natural-derived and synthetic coumarin derivatives exhibit a remarkable variety of biological properties, such as antioxidant, anti-inflammatory and anticancer.

The aim of the present diploma thesis is the design, synthesis and characterization of coumarin analogues as well as evaluation of their antioxidant activity *in vitro*, according to the DPPH free radical scavenging assay. An additional purpose is to predict their pharmacokinetic properties, such as their plasma protein binding rate (%PPB) and human oral absorption (%HOA), using quantitative structure–activity relationship (QSAR) models.

Specifically, in the present diploma thesis, a total of 10 coumarin analogues were synthesized through "Pechmann" condensation mechanism. The structure and purity of the compounds were studied by <sup>1</sup>H NMR Magnetic Resonance Spectroscopy.

The design of the coumarin derivatives, was based on guide molecules such as 4-methylumbelliferone (**3d**) and daphnetin (**6**). Both of these molecules are natural products that have been previously produced by the NTUA Organic Chemistry Research Laboratory team and exhibited remarkable antioxidant and anti-inflammatory activities

The synthesized coumarin analogues were evaluated for their antioxidant activity *in vitro*, according to the DPPH free radical scavenging assay. It was observed that the coumarin derivatives with the best DPPH scavenging ability were compounds **3b** (IC<sub>50</sub> = 7.7 ± 0.1 μM), **3e** (IC<sub>50</sub> = 2.9 ± 0.4 μM), **3h** (IC<sub>50</sub> = 3.6 ± 0.1 μM) and **6** (IC<sub>50</sub> = 9.1 ± 0.1 μM) due to the presence of a catecholic moiety in their structure.



Εικόνα 2. Chemical structure of the coumarin analogues with the highest antioxidant activity.

Finally, the synthesized coumarin analogues were evaluated for their ability to used as active substances in medicines. Quantitative structure–activity relationship (QSAR) models were used to predict their pharmacokinetic properties, such as their plasma protein binding rate (%PPB) and human oral absorption (%HOA), with the results appearing to be promising.

## Περιεχόμενα

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b> .....	<b>2</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>9</b>
1. ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ.....	9
2. ΚΟΥΜΑΡΙΝΕΣ .....	10
2.1. Προέλευση κουμαρινών .....	10
2.2. Χημική δομή και ταξινόμηση κουμαρινών .....	11
2.3. Φαρμακευτικές ιδιότητες κουμαρινών .....	13
2.4. Κυριότεροι μέθοδοι σύνθεσης .....	20
3. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ .....	24
3.1. Φυσικοχημικά μεγέθη .....	25
3.2. Φαρμακοκινητικές παράμετροι.....	27
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>31</b>
1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	31
2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ .....	32
2.1. Σχεδιασμός και σύνθεση των νέων κουμαρινικών αναλόγων.....	32
2.2. Μηχανισμοί αντιδράσεων .....	34
2.3. Ταυτοποίηση ενώσεων .....	36
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	39
3.1. Σύνθεση κουμαρινικών αναλόγων .....	39
3.2. Αξιολόγηση της βιοδραστικότητας των νέων κουμαρινικών αναλόγων.....	45
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>48</b>
1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....	48
2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ .....	51
2.1 Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης (DPPH).....	51
<b>ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΠΟΣΟΤΙΚΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΔΟΜΗΣ-ΔΡΑΣΗΣ (QSAR)</b> .....	<b>55</b>
1. ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ (HUMAN ORAL ABSORTION, %HOA) .....	55
2. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗ (% PLASMA PROTEIN BINDING, %PPB) .....	58
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>66</b>
<b>ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ</b> .....	<b>68</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>69</b>

<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ .....</b>	<b>74</b>
<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ .....</b>	<b>79</b>
<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ .....</b>	<b>80</b>
<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ .....</b>	<b>80</b>
<b>ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ .....</b>	<b>81</b>



## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

Ως φυσικά προϊόντα ορίζονται οι χημικές ενώσεις ή ουσίες οι οποίες παράγονται από φυτικούς ή ζωικούς οργανισμούς. Ο όρος συμπεριλαμβάνει φυτικά εκχυλίσματα, χημικές ουσίες που μπορούν να απομονωθούν από αυτά κ.α. Για χιλιάδες χρόνια, τα φυσικά προϊόντα έχουν παίξει ένα εξαιρετικά σημαντικό ρόλο σε ολόκληρο τον κόσμο σχετικά με τη θεραπεία και πρόληψη ανθρώπινων ασθενειών. Ιδιαίτερα όμως τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μία έντονη προτίμηση στη χρήση φυτικών φαρμάκων έναντι χημικών σκευασμάτων λόγω της ανάπτυξης σοβαρών παρενεργειών αλλά και της μικροβιακής αντοχής που έχουν παρουσιάσει πολλά χημικά σκευάσματα. Ταυτόχρονα τα φυσικά προϊόντα έχουν παρουσιάσει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων όπως η αντικαρκινική, αντιοξειδωτική και η αντιμικροβιακή τους δράση. Σύμφωνα με τον ΟΗΕ, περισσότερο από το 80% του παγκόσμιου πληθυσμού βασίζεται πλέον στις αρχές της παραδοσιακής ιατρικής για τη θεραπεία βασικών προβλημάτων υγείας που αντιμετωπίζει. [1],[2]

Τα ίδια τα φυσικά προϊόντα λοιπόν και οι εξαιρετικές ιδιότητες που εμφανίζουν, μπορούν να αποτελέσουν βάση για την παραγωγή νέων χημικών δομών που αξιοποιούνται στην παραγωγή νέων καινοτόμων φαρμακευτικών σκευασμάτων. Υπολογίζεται ότι γύρω στο 50% των εγκεκριμένων φαρμάκων από το FDA αποτελεί φυσικά προϊόντα ή παράγωγα τους. [3]

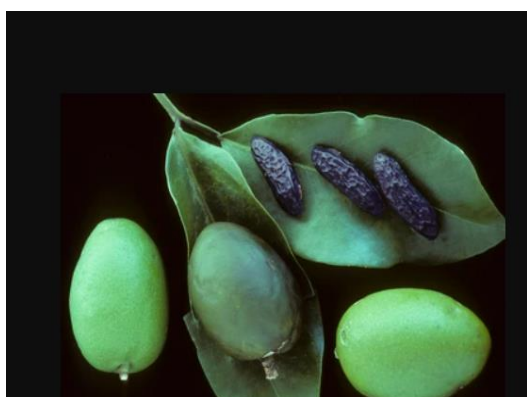
Συγκεκριμένα, από τα φυτά μπορεί να εξαχθεί μια τεράστια ποικιλία οργανικών ενώσεων η πλειοψηφία των οποίων αποτελεί τους δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες σε αντίθεση με τους πρωτογενείς δεν συμμετέχουν άμεσα στην ανάπτυξη ή την παραγωγή του οργανισμού και η απουσία τους δεν προκαλεί άμεσο θάνατο αλλά επιφέρει μακροπρόθεσμη βλάβη. Τα φυτικά προϊόντα μπορούν να ταξινομηθούν στις ακόλουθες τρεις διαφορετικές κατηγορίες με βάση τα βιομόρια τα οποία προέρχονται:

- i. Τερπενοειδή
- ii. Αζωτούχες ενώσεις
- iii. Φαινολικές ενώσεις (στις οποίες συγκαταλέγονται και οι κουμαρίνες) [3]

## 2. ΚΟΥΜΑΡΙΝΕΣ

### 2.1. Προέλευση κουμαρινών

Η πρώτη και απλούστερη ένωση κουμαρίνης απομονώθηκε το 1820 από τους καρπούς (tonka beans) του φυτού *Dipteryx odorata* Wild (ή αλλιώς Coumarou) από τον Vogel ο οποίος αρχικά θεώρησε πως πρόκειται για το βενζοϊκό οξύ. Την ίδια χρονιά ο Guibourt διαπίστωσε ότι δεν πρόκειται για το βενζοϊκό οξύ αλλά για μία νέα ουσία που ονόμασε 'coumarine'. Λόγω της γλυκιάς μυρωδιάς που έχει, ήδη από το 1882 ξεκίνησε να χρησιμοποιείται σε αρώματα. Αργότερα, το 1868 ο William Henry Perkin κατάφερε να συνθέσει την συγκεκριμένη ουσία και την ονόμασε τελικά κουμαρίνη (coumarin). [4] Έκτοτε και μέχρι το 1954, οι κουμαρίνες κυρίως λόγω της χαρακτηριστικής τους μυρωδιάς αξιοποιήθηκαν από την βιομηχανία σε διάφορες εφαρμογές. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρήση τους σαν πρόσθετες αρωματικές ενώσεις σε αρώματα, σαν πρόσθετα τροφίμων μαζί με την βανιλίνη και σαν βελτιωτικά γεύσης στον καπνό. Το 1954, ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ αποφάσισε την απαγόρευση της χρήσης τους ως πρόσθετα τροφίμων κατατάσσοντας τα ως Κατηγορίας 1 καρκινογόνα και ηπατοτοξικά. Πλέον επιτρέπεται η χρήση τους, υπό προϋποθέσεις και εντός επιτρεπτών ορίων, σε αρώματα και καλλυντικά, ενώ ορισμένα παράγωγα τους χρησιμοποιούνται ως ενισχυτικά αρώματος σε καπνούς και αλκοολούχα ποτά. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια, η απλότητα και η ευελιξία της βασικής δομής τους σε συνδυασμό με τις πολυάριθμες βιολογικές δράσεις που παρουσιάζουν, καθιστούν τις συγκεκριμένες ενώσεις πολύ υποσχόμενες στους τομείς της Οργανικής Χημείας και της Φαρμακευτικής Χημείας. [5]



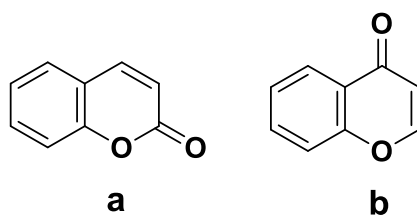
Εικόνα 3. *Dipteryx odorata* (tonka beans)

Κουμαρινικά παράγωγα βρίσκονται ευρύτατα στο φυτικό βασίλειο, τόσο σε ελεύθερη κατάσταση όσο και ως γλυκοζίτες. Έχουν απομονωθεί από εκατοντάδες είδη φυτών, τα οποία ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες όπως για παράδειγμα οι οικογένειες των *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Fabiaceae*, *Rosaceae*, *Rubiaceae*, *Rutaceae*

και Solanaceae. Σημαντική ποσότητα κουμαρίνης έχει εντοπιστεί σε έλαια (όπως το λάδι από φλοιό κανέλας καθώς και το λάδι λεβάντας), σε φρούτα (όπως μύρτιλλο, βερίκοκο) αλλά και σε βότανα όπως το πράσινο τσάι. Αν και η σύνθεση γίνεται κυρίως στα φύλλα των φυτών, οι κουμαρίνες κατανέμονται σε όλα τα μέρη του φυτού όπως τους καρπούς τους φλοιούς και τις ρίζες και όσο αφορά την απομόνωση επιτυγχάνεται κυρίως με εκχύλιση με χρήση κατάλληλων διαλυτών. Οι περισσότερες από τις φυσικές κουμαρίνες που υπάρχουν προέρχονται από διάφορα είδη φυτών όπως αναφέρεται και πιο πάνω, ορισμένες ωστόσο έχουν απομονωθεί από μικροοργανισμούς. Γενικά, μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί γύρω στα χίλια κουμαρινικά παράγωγα μέσω περισσότερων από 800 ειδών φυτών και μικροοργανισμών. Πέρα από τις φυσικές κουμαρίνες που έχουν απομονωθεί από φυτά και οργανισμούς, υπάρχουν και τα κουμαρινικά παράγωγα συνθετικής προέλευσης που αυξάνουν σημαντικά τον αριθμό των συνολικών γνωστών κουμαρινών μέχρι σήμερα. [6],[7]

## 2.2. Χημική δομή και ταξινόμηση κουμαρινών

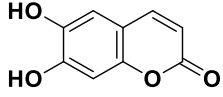
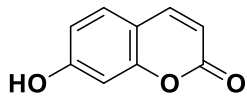
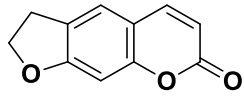
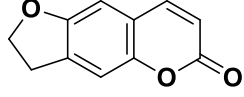
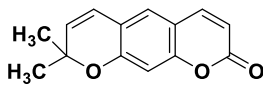
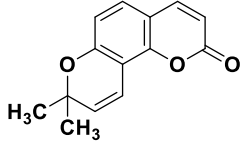
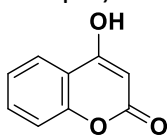
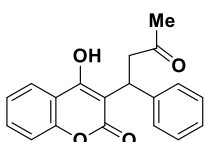
Οι κουμαρίνες ανήκουν στην οικογένεια των βενζοπυρονών, οι οποίες απαρτίζονται από ένα βενζολικό δακτύλιο που είναι συνδεδεμένος με μία ομάδα πυρόνης. Ειδικότερα οι κουμαρίνες συγκαταλέγονται στις βενζο-α-πυρόνες ενώ άλλες κύριες ενώσεις των βενζοπυρονών όπως τα φλαβονοειδή συγκαταλέγονται στις βενζο-γ-πυρόνες. Επομένως η τυπική δομή μια κουμαρίνης είναι αυτή μίας βενζο-α-πυρόνης, όπως φαίνεται στην εικόνα 4α με ονομασία κατά IUPAC 1,2-βενζοπυρόνη. [8]



Εικόνα 4. **a**: βενζο-α-πυρονών και **b**: βενζο-γ-πυρονών

Ένας συχνός τρόπος ταξινόμησης των κουμαρινών είναι σε τέσσερις (4) υποκατηγορίες (πίνακας 1) : [9]

Πίνακας 1. Ταξινόμηση κουμαρινών.

Ομάδες κουμαρινών	Παραδείγματα
<p><b>Απλές κουμαρίνες :</b>                      Προέρχονται από την κεντρική δομή της 1,2- βενζοπυρόνης. Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται οι ενώσεις όπου στον βενζολικό τους δακτύλιο μπορούν να προστεθούν υδροξυ-, αλκοξυ- και αλκυλο- υποκαταστάτες καθώς και οι αντίστοιχοι γλυκοζίτες.</p>	<p><b>Εσκουλετίνη</b>  </p> <p><b>Ουμπελιφερόνη</b>  </p>
<p><b>Φουρανοκουμαρίνες:</b>                      Αποτελούνται από ένα πενταμελή φουρανικό δακτύλιο συνδεδεμένο με την κεντρική δομή της κουμαρίνης είτε στις θέσεις 6,7 δηλαδή γραμμικά είτε στις θέσεις 7,8 δηλαδή υπό γωνία.</p>	<p><b>Ψωραλένιο</b>  </p> <p><b>Αγγελικίνης</b>  </p>
<p><b>Πυρανοκουμαρίνες:</b>                      Αποτελούνται από ένα πυρανικό δακτύλιο συνδεδεμένο με την κεντρική δομή της κουμαρίνης είτε γραμμικά είτε υπό γωνία όπως και στις φουρανοκουμαρίνες.</p>	<p><b>Ξανθυλετίνη</b>  </p> <p><b>Σεσελίνη</b>  </p>
<p><b>Κουμαρίνες υποκατεστημένες στον πυρονικό δακτύλιο:</b>                      Συμπεριλαμβάνονται οι ενώσεις όπου στον πυρονικό δακτύλιο είτε στην θέση 3 είτε στην θέση 4 είτε και στις δύο μπορούν να προστεθούν υποκαταστάτες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η βαρφαρίνη η οποία χρησιμοποιείται ως αντιπηκτική ουσία.</p>	<p><b>4-υδροξυ-κουμαρίνη</b>  </p> <p><b>Βαρφαρίνη</b>  </p>

### 2.3. Φαρμακευτικές ιδιότητες κουμαρινών

Τα τελευταία χρόνια, διεξάγονται πολλές έρευνες ως προς την μελέτη της βιοδραστικότητας των κουμαρινικών παραγώγων και την ενσωμάτωσή τους σε διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα λόγω της χαμηλής τοξικότητάς τους, των μειωμένων παρενεργειών και της μεγάλης βιοδιαθεσιμότητάς τους. Επιπλέον, η ετεροκυκλική δομή της κουμαρίνης που περιέχει οξυγόνο έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον στο πεδίο της Φαρμακευτικής Χημείας και για το λόγο αυτό παρακάτω παρατίθενται οι βασικότερες από τις δράσεις της κουμαρίνης στο εν λόγω πεδίο. [10]

#### 2.3.1. Αντιοξειδωτική δράση

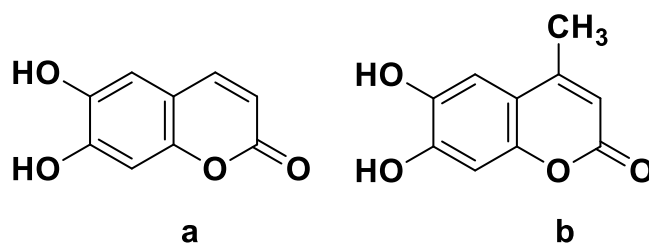
Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις που λαμβάνονται μέσω της διατροφής σύμφωνα με πειραματικές και επιδημιολογικές μελέτες έχει αποδειχτεί ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη θωράκιση του οργανισμού και στην πρόληψη χρόνιων ασθενειών όπως ο καρκίνος και οι καρδιακές παθήσεις. Πρωταρχικές πηγές φυσικών αντιοξειδωτικών αποτελούν τα φρούτα, τα λαχανικά και τα προϊόντα ολικής άλεσης λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας που έχουν σε βιταμίνη C, βιταμίνη E, καροτενοειδή και φαινολικά οξέα. [11]

Ο ρόλος των αντιοξειδωτικών ενώσεων είναι η εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών. Η ελεύθερη ρίζα ορίζεται ως ένα άτομο ή μόριο με δυνατότητα αυτοδύναμης ύπαρξης, το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Λόγω των ασύζευκτων ηλεκτρονίων οι ελεύθερες ρίζες τείνουν να “αποσπάσουν” ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το γειτονικό μόριο που χάνει το ηλεκτρόνιο του να μετατρέπεται σε μια νέα ρίζα όπου με τη σειρά της “αποσπά” ηλεκτρόνιο από άλλο μόριο. Για να είναι λοιπόν αποτελεσματική η δράση ενός αντιοξειδωτικού παράγοντα θα πρέπει να έχει την ικανότητα προνομιακής αντίδρασης με τις ελεύθερες ρίζες σε σχέση με τα άλλα μόρια του συστήματος και η ελεύθερη ρίζα του που θα δημιουργηθεί μετά την αντίδραση να είναι λιγότερο δραστική και επικίνδυνη.

Στα βιολογικά συστήματα τη σπουδαιότερη ομάδα ελεύθερων ριζών αποτελούν οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και γενικότερα οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και ακολούθως αυτές του αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS). Πρέπει να σημειωθεί ότι, οι ελεύθερες ρίζες, αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού και έχουν ένα διπλό ρόλο, αφού άλλοτε είναι ευεργετικές για τα κύτταρα και τους οργανισμούς και άλλοτε επιβλαβείς. Σε χαμηλές/μέτριες συγκεντρώσεις διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο σε μηχανισμούς προς όφελος της φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού όπως στη μεταγωγή σήματος, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στη μεταγραφή γονιδίων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη φλεγμονή και στην απόπτωση. Αντίθετα σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλούν βλάβες (γνωστές ως οξειδωτικό stress και stress αζώτου)

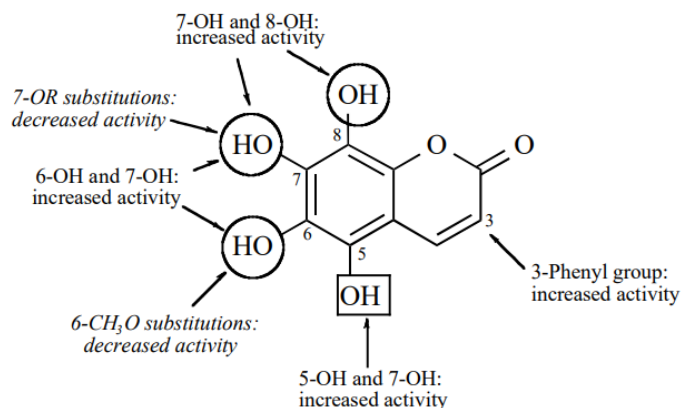
στα κυτταρικά λιπίδια, τις πρωτεΐνες ή το DNA, αναστέλλοντας έτσι τη λειτουργία τους. [12][13]

Σε πολλές αναφορές για τη μείωση του οξειδωτικού stress προτείνεται η χρήση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων. Ωστόσο πολλές αντιοξειδωτικές ενώσεις, που έχουν μελετηθεί, έχουν παρουσιάσει τοξικές ή μεταλλαξιογόνες επιδράσεις και ως εκ τούτου έχει δοθεί περισσότερη προσοχή στα φυσικά αντιοξειδωτικά. [11] Επομένως οι κουμαρίνες αποτελούν ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα πολύ υποσχόμενων αντιοξειδωτικών αφού προέρχονται από φυσικά προϊόντα. Η θέση και ο τύπος του υποκαταστάτη που βρίσκεται στον βενζολικό δακτύλιο των διάφορων κουμαρινικών παραγώγων παίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Η ισχυρότερη δράση φαίνεται ότι σχετίζεται με τον αριθμό των υδροξυλομάδων ως υποκαταστάτες. Δύο πολύ αποτελεσματικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται ως αντιοξειδωτικά είναι η εσκουλετίνη και η 4-μεθυλο-εσκουλετίνη. [13]



Εικόνα 5. Χημική δομή α: εσκουλετίνης b: 4-μεθυλο-εσκουλετίνης

Επιπρόσθετα, όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση των διυδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρινών (DHMC) σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η ακριβής θέση των υδροξυλομάδων. Τα όρθο-υποκατεστημένα έχουν δείξει την ισχυρότερη δράση λόγω της υψηλής σταθερότητας που παρουσιάζει η κατεχολική τους ρίζα και συγκρίνοντας τις όρθο- περιπτώσεις η 7,8-DHMC βρέθηκε πιο αποτελεσματική από την 6,7-DHMC. Αυτή η διαφορά μπορεί να εξηγηθεί λόγω της υψηλότερης ικανότητας της 7,8-DHMC να σχηματίζει ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου, οι οποίοι προστατεύουν την ομάδα OH από το να σχηματίσει διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου με τον διαλύτη του συστήματος. Επίσης είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η ύπαρξη άρυλο υποκαταστάτη στη θέση 3- προκαλεί αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης των κουμαρινικών παραγώγων. Στο σχήμα 1 φαίνεται συνοπτικά η συσχέτιση της δομής των κουμαρινών με την αντιοξειδωτική τους δράση. [14]



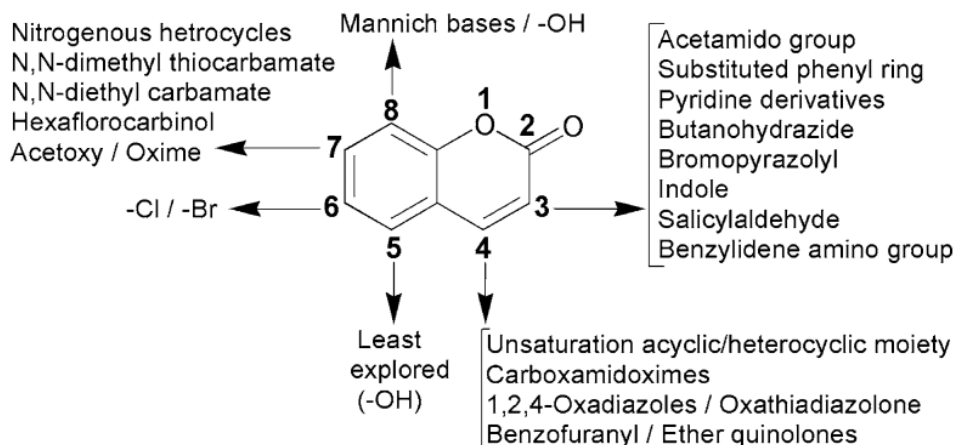
Σχήμα 1. Συσχέτιση της δομής των κουμαρινών με την αντιοξειδωτική τους δράση.

### 2.3.2. Αντιφλεγμονώδης δράση

Η φλεγμονή προκύπτει μέσα από διάφορες χημικές και κυτταρικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στον οργανισμό στην προσπάθεια του να διορθώσει μια βλάβη. Τα πέντε κύρια συμπτώματα που χαρακτηρίζουν τη φλεγμονή είναι πόνος, ερυθρότητα, οίδημα, αύξηση της θερμοκρασίας και λειτουργικές διαταραχές των οστών. Αν και το φαινόμενο αυτό είναι αναγκαίο για την αντιμετώπιση τραυματισμών και παθογόνων μικροοργανισμών πολλές φορές, όταν η αντίδραση είναι συνεχής και σε υπερβολικό βαθμό, τα αποτελέσματα είναι καταστρεπτικά. Χαρακτηριστικές επιβλαβείς επιπτώσεις αποτελούν η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ψωρίαση και η σκλήρυνση κατά πλάκα. Επομένως ο έλεγχος της φλεγμονής αποτελεί ένα πολύ σημαντικό πεδίο έρευνας και κατέχει κύρια θέση σε πολλούς κλάδους της φαρμακολογίας.

Δύο κατηγορίες λιπιδικών μεταβολητών που εμπλέκονται στην έναρξη και την εξέλιξη πολλών φλεγμονοδών ασθενειών είναι οι προσταγλανδίνες (PGs) και τα λευκοτριένια (LTs). Το ένζυμο κλειδί στη βιοσύνθεση τους είναι για την οικογένεια των προσταγλανδών ο PGE<sub>2</sub> και για την οικογένεια των λευκοτριενίων η λιποξυγονάση (LOX). Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν μελετήσει τη σχέση δομής-αντιφλεγμονώδους δράσης των κουμαρινικών αναλόγων. Οι Hadjiravliou-Litina et al.(2007b) έχουν μελετήσει διάφορα παράγωγα υδροξυαρυλο- υποκατεστημένων κουμαρινών και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η χρήση ενός πολικού υποκαταστάτη στη θέση 5-/6-/7- προκαλεί αναστολή της λιποξυγονάσης (LOX) και άρα οι ενώσεις αυτές είναι πολύ υποσχόμενες για περαιτέρω μελέτη και χρήση ως αντιφλεγμονώδη. Στο σχήμα 2 παρουσιάζονται συνοπτικά διάφοροι υποκαταστάτες σε διάφορες θέσεις (C3-C8) που έχουν διερευνηθεί και φαίνεται να αναπτύσσουν ελκυστικά αποτελέσματα ως προς την αντιφλεγμονώδη δράση τους. [15][16]

Τα κουμαρινικά ανάλογα αποτελούν μια πολύ σημαντική και υποσχόμενη ομάδα αντιφλεγμονώδων ουσιών. Λόγω της εμπλοκής των ROS στη φλεγμονή, η ταυτόχρονη ύπαρξη αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης κάνει τις κουμαρίνες ακόμη πιο ελκυστικές. Μερικά παραδείγματα κουμαρινικών παραγώγων που συνδυάζουν υψηλή αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική ικανότητα είναι η εσκουλετίνη, η 4-μεθυλο-εσκουλετίνη και η 4-υδροξυκουμαρίνη.



Σχήμα 2. Συσχέτιση της δομής των κουμαρινών με την αντιφλεγμονώδη τους δράση.

### 2.3.3. Αντικαρκινική δράση

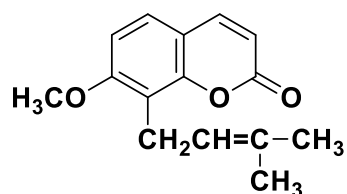
Σήμερα, ο καρκίνος αποτελεί ένα από τα κυριότερα προβλήματα υγείας στον κόσμο. Στις αναπτυγμένες χώρες θεωρείται η δεύτερη αιτία θανάτου, μετά από τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Πρόκειται για μια ομάδα ασθενειών με βασικό κοινό χαρακτηριστικό τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Υπό κανονικές συνθήκες, τα κύτταρα στον ανθρώπινο οργανισμό διαιρούνται, πολλαπλασιάζονται και πεθαίνουν με ένα αυστηρά ελεγχόμενο τρόπο σε αντίθεση με τα καρκινικά κύτταρα τα οποία διαιρούνται ανεξέλεγκτα με αποτέλεσμα την ανάπτυξη μια μάζας κυττάρων (όγκος). Οι επιλογές για τη θεραπεία είναι εξειδικευμένες ανά περίπτωση καρκινικού τύπου και συνήθως ο συνδυασμός χειρουργικής επέμβασης, ακτινοθεραπείας και χημειοθεραπείας αποτελεί την αποτελεσματικότερη μέθοδο ίασης.

Τα τελευταία χρόνια έχει διαπιστωθεί η αντικαρκινική δράση των κουμαρινών ενώ, παράλληλα, φαίνεται ότι μπορούν να δράσουν θετικά έναντι των παρενεργειών που προκαλούνται κατά τη διάρκεια της ακτινοθεραπείας. Οι ασθενείς που υποβάλλονται σε ακτινοθεραπεία της περιοχής του λαιμού και της κεφαλής μια από τις πιο συχνές επιπλοκές που εμφανίζουν είναι αυτή της βλεννογονίτιδας του στόματος ή του



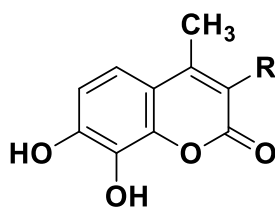
γαστρεντερικού σωλήνα. Αποτελεί εξασθενική επιπλοκή με σοβαρές κλινικές και ψυχικές επιπτώσεις για τον ασθενή και είναι ο πιο κοινός λόγος για την διακοπή της ακτινοθεραπείας. Οι K. A. Grötz et al απέδειξαν ότι η χρήση κουμαρίνης συνδυαστικά με το φλαβονοειδές troxerutin είχε ευνοϊκή επίδραση στην προστασία των σιελογόνων αδένων και του βλεννογόνου σε ασθενής που υποβλήθηκαν σε ακτινοθεραπεία στην περιοχή του λαιμού και της κεφαλής. [17]

Ανάλογα με την δομή των κουμαρινικών παραγώγων η αντικαρκινική τους δράση βασίζεται σε διαφορετικούς μηχανισμούς. Ένα παράδειγμα φυσικού κουμαρινικού παραγώγου που φαίνεται να διαθέτει ελκυστικές ως προς μελέτη αντικαρκινικές ιδιότητες είναι η οσθόλη. Η συγκεκριμένη κουμαρίνη έχει μελετηθεί για την αναστολή της μεταστατικής συμπεριφοράς του καρκίνου του μαστού. Αυτό αποδίδεται στην παρεμποδιστική δράση που εμφανίζει η οσθόλη έναντι των μεταλλοπρωτεασών του εξωκυττάρου χώρου (MMP-2). [18]



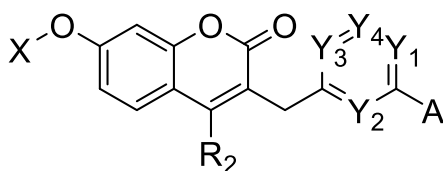
Εικόνα 6. Χημική Δομή Οσθόλης

Επιπλέον ανάμεσα στα διάφορα κουμαρινικά παράγωγα που έχουν μελετηθεί, η 4-μέθυλοκουμαρίνη παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για ακόμη εκτενέστερη μελέτη λόγω της κυτταροτοξικής δράσης της έναντι καρκινικών κυττάρων. Οι Ramin Miri et al εξέτασαν την κυτταροτοξική επίδραση διαφόρων κουμαρινικών παραγώγων (κυρίως 4-μέθυλο κουμαρινικών παραγώγων) σε τρεις ανθρώπινες καρκινικές σειρές LS180, K562 και MCF-7. Διαπίστωσαν ότι τα καλύτερα αποτελέσματα είχαν τα 7,8 διυδροξυ-4-μεθυλο κουμαρινικά παράγωγα που διαθέτουν αλκυλομάδες στην 3-θέση (με ισχυρότερη την ένωση με R=n-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>). [19]



Εικόνα 7. Χημική δομή των 7,8 διυδροξυ-4-μεθυλο κουμαρινικών παραγώγων που εξετάστηκαν από τους Ramin Miri et al.

Τέλος οι Iikya et al. έχουν παρουσιάσει μια νέα σειρά κουμαρινικών παραγώγων με υψηλή αντικαρκινική δράση η γενική δομή των οποίων δίνεται στο σχήμα 3. (20)



X : heteroaryl substituents (thiazol-2-yl group, a pyramidi-2-yl group or (H3C)<sub>2</sub>NCOO-)

Y<sub>1</sub> : -CH= or -CF=

Y<sub>2</sub> : -CH= or -N=

Y<sub>3</sub> and Y<sub>4</sub> : -CH=

A : sulfonamide, -NHSO<sub>2</sub>NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub> or -NHSO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONCH<sub>3</sub>R<sub>5</sub> (where R<sub>3</sub> and R<sub>5</sub> are each independently a hydrogen atom or a methyl group and R<sub>4</sub> is hydrogen atom, a methyl group or an ethyl group (where the ethyl group may optionally be substituted with a substituent from ethoxy and cyano))

R<sub>1</sub> : H, F, Cl, I, CH<sub>3</sub>

R<sub>2</sub> : -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>F, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, C<sub>1-6</sub>alkyl

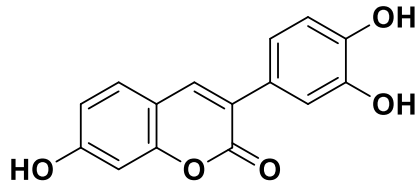
Σχήμα 3. Σειρά κουμαρινικών παραγώγων με υψηλή αντικαρκινική δράση. [20]

### 2.3.5 Δράση ως αναστολείς της τυροσινάσης

Η τυροσινάση είναι μια οξειδάση που περιέχει χαλκό, η οποία αποτελεί το καθοριστικό ένζυμο για την παραγωγή μελανίνης και συναντάται ευρέως στη βίοςφαιρα. Συμμετέχει ουσιαστικά σε δύο διαφορετικά στάδια, αρχικά χρησιμοποιεί μοριακό οξυγόνο για την κατάλυση της οξειδωσης μονοφαινολών στις αντίστοιχες ο-διφαινόλες τους. Ακολούθως μετατρέπει τις παραγόμενες ο-διφαινόλες στις αντίστοιχες ο-κινόνες καταλήγοντας έτσι στον σχηματισμό της μελανίνης. Η τυροσινάση είναι υπεύθυνη για την ενζυμική αμαύρωση που παρατηρείται σε διάφορα φρούτα και λαχανικά κατά τη μηχανική επεξεργασία τους, ενώ παράλληλα διαδραματίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στη μελανογένεση των θηλαστικών. Η μελανογένεση ορίζεται ως το σύνολο των διαδικασιών που έχουν ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της μελανίνης. Αν και η μελανίνη αποτελεί ένα πολύ σημαντικό παράγοντα προστασίας του ανθρώπινου δέρματος από τις επιβλαβείς συνέπειες της υπεριώδους ακτινοβολίας του ήλιου, η συσσώρευση της σε διάφορα σημεία του δέρματος έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πιο σκούρων κηλίδων - πανάδων, το οποίο δημιουργεί αισθητικό πρόβλημα. Επιπλέον, η τυροσινάση σχετίζεται με νευροεκφυλιστικές ασθένειες όπως η νόσος Parkinson. Τα φαινόμενα αυτά έχουν ανοίξει ένα μεγάλο πεδίο ενδιαφέροντος ως προς την αναζήτηση νέων ισχυρών αναστολέων της τυροσινάσης για χρήση σε τρόφιμα, καλλυντικά και φάρμακα. [21],[22]

Οι Antonella Fais et al. μελέτησαν την ανασταλτική δράση διαφόρων κουμαρινικών ενώσεων έναντι της τυροσινάσης μανιταριών. Τα αποτελέσματα έδειξαν την ικανότητα δράσης των συγκεκριμένων ενώσεων ως αναστολείς της τυροσινάσης με ισχυρότερη την ένωση 3-(3',4',5'-τριυδροξυφαινολ)-6,8-διυδροξυκουμαρίνη (IC<sub>50</sub>=0.27 mM) (εικόνα 8) η οποία παρουσίασε καλύτερα αποτελέσματα ακόμη και από την ουμπελιφερόνη (IC<sub>50</sub>=0.42 mM) που

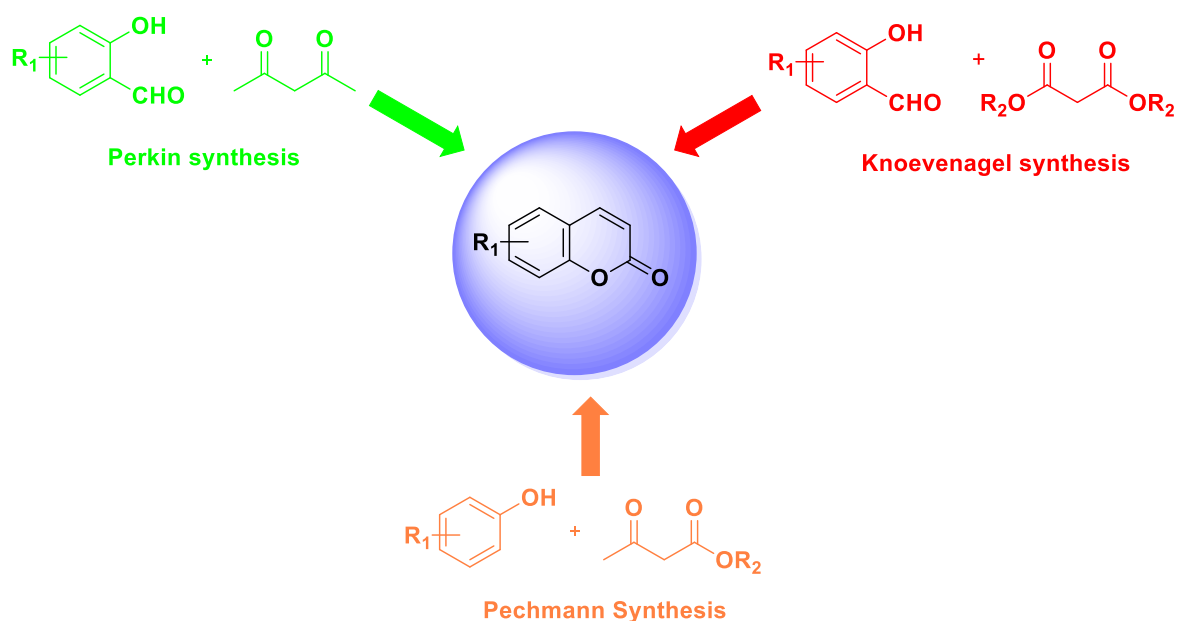
χρησιμοποιήθηκε ως ένωση αναφοράς. Μετά από κινητικές μελέτες αποδείχθηκε ότι η ένωση αυτή δρα ως μη ανταγωνιστικός αναστολέας της τυροσινάσης και η θέση των ελεύθερων ομάδων -OH της παίζουν σημαντικό ρόλο. [21]



Εικόνα 8. Χημική δομή 3-(4,5-διυδροξυφαιτυλο)-7-υδροξυκουμαρίνη.

## 2.4. Κυριότεροι μέθοδοι σύνθεσης

Οι βασικότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση κουμαρινικών αναλόγων και θα αναλυθούν σε αυτό το κεφάλαιο είναι η αντίδραση Pechmann, η αντίδραση Perkin και η αντίδραση Knoevenagel. Οι μέθοδοι αυτοί που προέρχονται από μελέτες πολλών χρόνων, αποσκοπούν στην αποτελεσματική και ακριβή παραγωγή των κουμαρινών και με κατάλληλες τροποποιήσεις οδηγούν σε ένα μεγάλο εύρος παραγώγων με ποικίλες ιδιότητες και εφαρμογές. Ωστόσο είναι σημαντικό να σημειωθούν οι προσπάθειες των τελευταίων δεκαετιών ως προς την τροποποίηση ή ακόμα και την αντικατάσταση των συμβατικών αυτών μεθόδων σύνθεσης με άλλες πιο πράσινες. Αυτή η στροφή προς τις πράσινες μεθόδους σύνθεσης έχει ως κύριο στόχο να μειωθεί η παραγωγή και η χρήση τοξικών πτητικών οργανικών διαλυτών, καταλυτών ή άλλων τοξικών χημικών, για την πραγματοποίηση αντιδράσεων υπό ήπιες συνθήκες, με υψηλότερες αποδόσεις και μεγαλύτερη καθαρότητα τελικών προϊόντων. Τέτοια παραδείγματα είναι η χρήση διαλυτών με «πράσινο» χαρακτήρα όπως τα ιοντικά υγρά αλλά και η σύνθεση με μικροκυματική ακτινοβολία. [23]



Εικόνα 9. Οι βασικότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση κουμαρινικών αναλόγων.

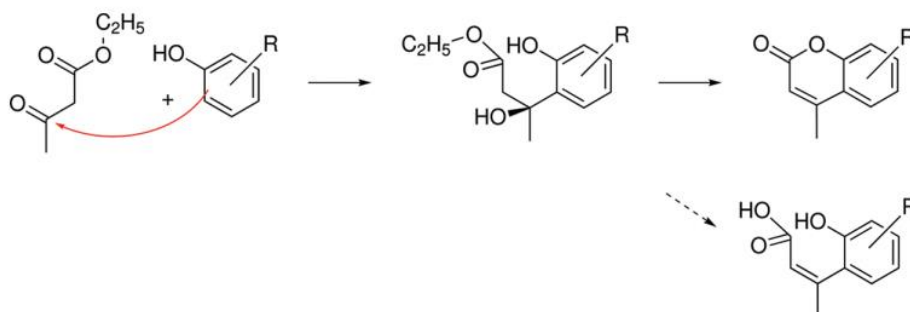
### 2.4.1 Αντίδραση Pechmann

Τα κύρια πλεονεκτήματα της αντίδρασης Pechmann είναι η χρήση απλών και χαμηλού κόστους αντιδραστηρίων καθώς και οι υψηλές της αποδόσεις. Η συγκεκριμένη αντίδραση αναφέρθηκε πρώτη φορά το 1883 από τον Γερμανό χημικό Hans von Pechmann και πρόκειται για συμπύκνωση φαινολών με ένα καρβοξυλικό οξύ ή εστέρα που περιέχει μία ομάδα με  $\beta$ -καρβονύλιο. Η αντίδραση Pechmann συνήθως πραγματοποιείται υπό όξινες συνθήκες. Οι υποκατεστημένες κουμαρίνες

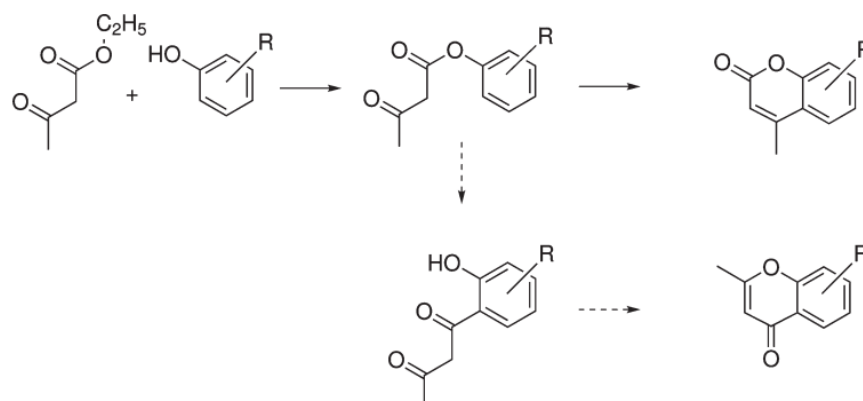
που μπορούν να προκύψουν είναι οι 4-υποκατεστημένες ή οι 3,4-διυποκατεστημένες.

Όσο αφορά τον μηχανισμό της αντίδρασης Pechmann βιβλιογραφικά φαίνεται να επικρατούν κυρίως δύο διαφορετικές προσεγγίσεις. Στο σχήμα 4 παρουσιάζεται ο μηχανισμός σύνθεσης όπως προτείνεται από τους Robertson et al. Ξεκινάει με μια ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση στη φαινόλη και συγκεκριμένα σε ο-θέση ως προς το υδροξύλιο, από τον άνθρακα της καρβονυλικής ομάδας του β-κετοεστέρα. Έπειτα ακολουθεί λακτονοποίηση με απόσπαση νερού και αιθανόλης, για τον σχηματισμό του κουμαρινικού προϊόντος. Στο σχήμα 5 παρουσιάζεται ο μηχανισμός σύνθεσης όπως προτείνεται από τους Ahmed και Desai. Πρώτο στάδιο εδώ, αποτελεί η μετεστεροποίηση όπου πραγματοποιείται ο σχηματισμός του β-κετοεστέρα της φαινόλης. Ακολουθεί ενδομοριακή υδροξυλίωση με αποτέλεσμα το κλείσιμο του δακτυλίου και το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται μετά από αφυδάτωση. [24]

Η πορεία της αντίδρασης και για τους δύο μηχανισμούς, εξαρτάται τόσο από τον καταλύτη που χρησιμοποιείται όσο και από τους υποκαταστάτες της φαινόλης. Συγκεκριμένα, η συμπύκνωση των φαινολών με υποκαταστάτες δότες ηλεκτρονίων σε m-θέση ως προς το -OH ευνοείται, ενώ όταν βρίσκονται σε ο- και p-θέσεις δεν επηρεάζουν τη δραστηριότητα των φαινολών. Αντίθετα η συμπύκνωση φαινολών με υποκαταστάτες δέκτες ηλεκτρονίων δεν ευνοείται. [25]



Σχήμα 5. Μηχανισμός αντίδρασης Pechmann όπως προτείνεται από τους Robertson et al.



Σχήμα 4. Μηχανισμός αντίδρασης Pechmann όπως προτείνεται από τους Ahmed και Desai

Όσον αφορά τους καταλύτες, έχουν χρησιμοποιηθεί πολλοί όξινοι καταλύτες με πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα το θειικό οξύ. Βέβαια αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή παραπροϊόντων, την διάβρωση του εξοπλισμού ενώ παράλληλα ο χρόνος αντίδρασης είναι πολύ μεγάλος. Για αυτούς τους λόγους έχουν γίνει προσπάθειες εύρεσης εναλλακτικών, ευνοικών προς το περιβάλλον συνθετικών οδών όπως η χρήση ετερογενών καταλυτικών οξέων. Τα πλεονεκτήματα της όξινης ετερογενούς κατάλυσης πέρα από την μείωση της διάβρωσης του εξοπλισμού και των πολύ καλών αποδόσεων είναι η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του καταλύτη. Παραδείγματα στερεών οξέων που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι τα Nafion H, zeolite H-BEA, Amberlyst15. [26]

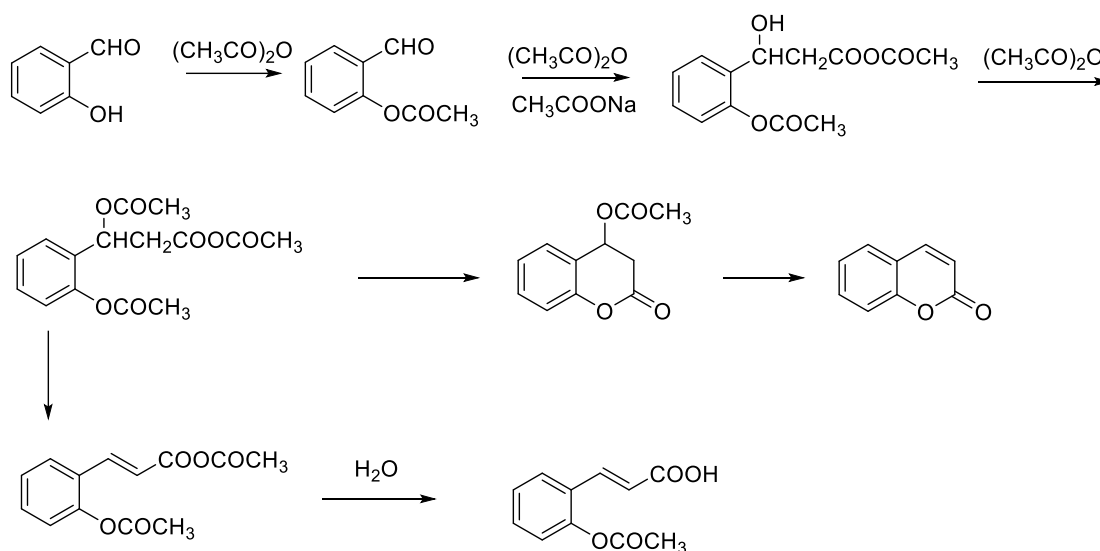
Μία άλλη πράσινη προσέγγιση ως προς την αντίδραση Pechmann είναι η χρήση ιοντικών υγρών (ILs). Τα ιοντικά υγρά χρησιμοποιούνται πλέον τόσο ως εναλλακτικοί διαλύτες αλλά και καταλύτες. Είναι υγρά που αποτελούνται εξ ολοκλήρου από ιόντα και προσελκύουν αυξανόμενο ενδιαφέρον ως πιθανή εναλλακτική λύση σε πολλές πτητικές οργανικές ενώσεις (VOCs). Λόγω της σχεδόν αμελητέας τάσης ατμών τους δεν συμβάλλουν στην εκπομπή πτητικών οργανικών ενώσεων και άρα οδηγούν στην μείωση της ατμοσφαιρικής ρύπανσης. Για την σύνθεση της 5,7- διϋδροξυ-4-μέθυλο κουμαρίνης με την μέθοδο Pechmann χρησιμοποιήθηκαν όξινα κατά Bronsted ιοντικά υγρά ως καταλύτες ([Hnmp][HSO<sub>4</sub>], [NMP][HSO<sub>4</sub>], [NMP][H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>], (4-sulfobutyl)tris(4-sulfophenyl)phosphonium hydrogen sulfate και triphenyl(propyl-3-sulfonyl)phosphonium toluenesulfonate). Οι αποδόσεις όλων των αντιδράσεων υπολογίστηκαν γύρω στο 90%. Όπως φαίνεται και εκ του αποτελέσματος η μέθοδος αυτή αποτελεί μια πολύ καλή εναλλακτική λύση έναντι της συμβατικής μεθόδου λόγω του συνδυασμού των εξαιρετικά υψηλών αποδόσεων με τον «πράσινο» της χαρακτήρα. [23][27]

#### 2.4.2 Αντίδραση Perkin

Το 1868 ο William Henry Perkin κατάφερε να συνθέσει για πρώτη φορά εργαστηριακά την απλή κουμαρίνη. Εκ τότε η αντίδραση αυτή έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τη χημική σύνθεση πολλών φυσικών κουμαρινών. Πρόκειται για μια θερμική αντίδραση σαλικυλικής αλδεΐδης με οξικό ανυδρίτη παρουσία άνυδρου οξικού νατρίου. Ουσιαστικά η αντίδραση ξεκινά με τη σαλικυλική αλδεΐδη να σχηματίζει ο-υδροξυκινναμικό οξύ υπό αλκαλικές συνθήκες και στην συνέχεια να σχηματίζει την κουμαρίνη σε κλειστό βρόγχο. [28]

Μετά από πολλά χρόνια έρευνας η συγκεκριμένη μέθοδος σύνθεσης έχει βελτιωθεί αρκετά. Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου Perkin είναι η αποφυγή

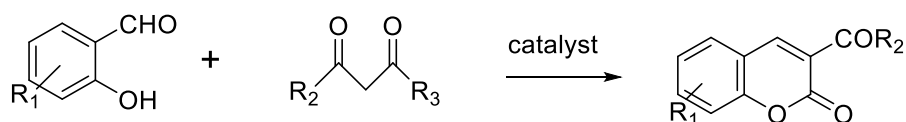
σχηματισμού ισομερών προϊόντων σε αντίθεση με τη μέθοδο Pechmann. Ωστόσο ακόμη παρουσιάζονται προβλήματα ως προς την ευκολία λειτουργίας της, αφού το παραγόμενο οξύ πρέπει να απομακρύνεται. Επιπρόσθετα οι αποδόσεις της είναι σχετικά χαμηλές λόγω των δραστικών συνθηκών που απαιτούνται (παρατεταμένη θέρμανση στους 150-200° C) οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό ρητινωδών προϊόντων και προκαλούν αύξηση του ιξώδους. [29]



Σχήμα 6. Αντίδραση Perkin για σύνθεση κουμαρινών.

#### 2.4.3 Αντίδραση Knoevenagel

Η αντίδραση Knoevenagel μπορεί να θεωρηθεί μια βελτιωμένη μορφή της αντίδρασης Perkin. Η αντίδραση ξεκινάει πάλι από τη σαλικυλική αλδεΐδη, η οποία δίνει αντιδράσεις συμπύκνωσης με ενώσεις που διαθέτουν ενεργή μεθυλενική ομάδα και συνήθως καταλύεται υπό την επίδραση αδύναμων βάσεων ή οξέων κατά Lewis. Η συγκεκριμένη μέθοδος προτιμάται συγκριτικά με τη μέθοδο Perkin επειδή ότι πραγματοποιείται κάτω από πιο ήπιες συνθήκες. [23][28]



Σχήμα 7. Αντίδραση Knoevenagel για την σύνθεση κουμαρινών.

### 3. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Τα φάρμακα, ήδη από την αρχαιότητα, παίζουν ένα εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στην πρόληψη και αντιμετώπιση ασθενειών που απειλούν τον άνθρωπο κατά την διάρκεια της ζωής του. Αρχικά τα μόνα θεραπευτικά μέσα που χρησιμοποιούνταν ήταν τα φυτικά προϊόντα, με μάλιστα την πρώτη αναφορά στα βότανα και τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες να γίνεται το 2700 π.Χ. από τον Κινέζο αυτοκράτορα Shenung. Από την άλλη, η ανάπτυξη νέων φαρμάκων στη σύγχρονη εποχή χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλές απαιτήσεις λόγω των ολοένα αυξανόμενων γνώσεων τόσο σχετικά με την πορεία του φαρμάκου όσο και με την επίδραση του οργανισμού στο φάρμακο. Πλέον, η τελική έγκριση ενός νέου φαρμάκου προέρχεται μέσω ενός αυστηρού πλέγματος κανονιστικών διατάξεων, που εξασφαλίζουν την τήρηση των απαιτούμενων προδιαγραφών και ως εκ τούτου τόσο το κόστος και ο χρόνος ανάπτυξης είναι πολύ μεγάλα. Στην εικόνα παρουσιάζονται οι φάσεις που απαιτούνται για την ανάπτυξη ενός νέου φαρμάκου. Η διαδικασία αυτή διαρκεί πολλά χρόνια (πάνω από 13 χρόνια) και απαιτεί σημαντικούς οικονομικούς πόρους (γύρω στα 6 δισεκατομμύρια δολάρια). Παράλληλα είναι μια διαδικασία με υψηλό κίνδυνο αποτυχίας αφού ανάμεσα σε περίπου 10.000 υποψήφια φάρμακα που μελετώνται, 1 μόνο εγκρίνεται τελικά. Ειδικότερα η φάση των κλινικών δοκιμών αποτελεί την πιο ακριβή και πολύπλοκη φάση. Επομένως θα πρέπει οι ακατάλληλες ενώσεις να εντοπίζονται και να απορρίπτονται νωρίς πριν τις κλινικές δοκιμές ούτως ώστε το κόστος να είναι σημαντικά μικρότερο (fail fast, fail cheap).



Εικόνα 10. Διαδικασία ανάπτυξης νέων φαρμάκων.

Ο μεγαλύτερος λόγος αποκλεισμού των υποψήφιων φαρμάκων είναι οι ελλείψεις/ανεπιθύμητες φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες. Η φαρμακοκινητική μελέτη τον τρόπο που ένας οργανισμός χειρίζεται ένα φάρμακο από τη στιγμή που του χορηγείται μέχρι να βρει το βιολογικό του στόχο. Ουσιαστικά μελετά τέσσερα



χαρακτηριστικά που συχνά αναφέρονται ως ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination) δηλαδή την απορρόφηση από το σημείο χορήγησης, την κατανομή στα επιμέρους διαμερίσματα του βιολογικού οργανισμού, τον μεταβολισμό και την απέκκριση. Όσον αφορά τη χορήγηση ενός φαρμάκου δύναται να πραγματοποιηθεί με ποικίλους τρόπους όπως από το στόμα (per os), ενδοφλέβια ενδομυϊκά, υποδόρια, διαδερμικά, υπογλώσσια, εισπνεόμενα κ.α. Ο κάθε τρόπος χορήγησης διαθέτει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, ωστόσο η χορήγηση από το στόμα αποτελεί τη δημοφιλέστερη και πιο αποδεκτή από τους ασθενείς οδό. [31],[32]

### 3.1. Φυσικοχημικά μεγέθη

#### 3.1.1. Μνημονικός κανόνας των 5 (Rule of 5, Ro5)

Οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες των φαρμάκων που λαμβάνονται από το στόμα επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των μορίων. Ο Lipiniski το 1997, συνοψίζοντας όλες τις θεωρίες που είχαν αναπτυχθεί μέχρι τότε κατέληξε στον μνημονικό κανόνα των 5 (Rule of 5). Σύμφωνα με τον κανόνα των 5 του Lipinski οι ενώσεις που χορηγούνται από το στόμα για να είναι δραστικές θα πρέπει:

- Να έχουν μοριακό βάρος μικρότερο του 500.
- Να μην διαθέτουν περισσότερες από 5 θέσεις δοτών πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου υπολογισμένες ως το άθροισμα όλων των ομάδων OH και NH στο μόριο.
- Να μην διαθέτουν περισσότερες από 10 θέσεις δεκτών πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου υπολογισμένες ως το άθροισμα όλων των ατόμων O και N στο μόριο.
- Η τιμή του συντελεστή μερισμού logP να είναι μικρότερη από 5.

Αν λοιπόν μια ένωση δεν ακολουθεί δύο ή περισσότερα εκ των τεσσάρων παραπάνω χαρακτηριστικών, σύμφωνα με τον κανόνα του Lipinski αναμένεται να εμφανίσει προβλήματα στην απορρόφησης της per os, στη διαλυτότητά της και γενικά στη βιοδιαθεσιμότητά της. [31],[32]

#### 3.1.2. Λιποφιλία

Η λιποφιλία αποτελεί μια υψίστης σημασίας φυσικοχημική ιδιότητα, η οποία βάση του ορισμού της κατά IUPAC εκφράζει τη συγγένεια ενός μορίου ή τμήματος μορίου ως προς ένα λιπόφιλο περιβάλλον. Ουσιαστικά πρόκειται για μια ιδιότητα με διττό χαρακτήρα αφού αποτελείται από δύο συνιστώσες την υδροφοβία και την πολικότητα (Λιποφιλία= Υδροφοβία- Πολικότητα). Η υδροφοβία αναφέρεται στα συσσωματώματα που δημιουργούν μη πολικές ομάδες ή μόρια σε υδατικό περιβάλλον για να αποφύγουν την επαφή με αυτό και μπορεί να εκτιμηθεί με παραμέτρους που εκφράζουν όγκο, όπως ο μοριακός όγκος, το μοριακό βάρος και η μοριακή διαθλασιμότητα. Από την άλλη η πολικότητα εκφράζεται με τη διπολική

ροπή, την ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου καθώς και με ηλεκτρονιακές παραμέτρους. [31]

Η λιποφιλία αποτελεί φυσικοχημική ιδιότητα καθοριστικής σημασίας για τη φαρμακοκινητική και τη φαρμακοδυναμική συμπεριφορά των φαρμάκων. Έχει αποδειχτεί επίσης η θετική επίδραση της λιποφιλίας στην αλληλεπίδραση του φαρμακομορίου με υποδοχείς και ένζυμα. Αυτό ίσως αρχικά να οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η τιμή της λιποφιλίας μιας ένωσης θα πρέπει να είναι υψηλή, κάτι το οποίο δεν ισχύει όπως φαίνεται και από τον κανόνα των 5 του Lipinski. Η υψηλή λιποφιλία οδηγεί συνήθως στα πιο κάτω ανεπιθύμητα φαινόμενα:

- Ενισχύει την παρατεταμένη παραμονή του φαρμάκου στον οργανισμό και ως εκ τούτου παρατηρούνται αθροιστικά φαινόμενα
- Σχετίζεται με την αύξηση της τοξικότητας
- Προκαλεί μείωση στη βιοδραστικότητα
- Προκαλεί προβλήματα στη διαμόρφωση του τελικού προϊόντος
- Οδηγεί σε επαγωγή των μικροσωμικών ενζύμων λόγω της τάσης του οργανισμού για άμυνα έναντι λιπόφιλων ουσιών . [33]

### 3.1.3. Συντελεστής Μερισμού P

Το μέτρο έκφρασης της λιποφιλίας είναι ο συντελεστής μερισμού, P (partition coefficient). Ουσιαστικά ο συντελεστής μερισμού ορίζεται ως η σταθερά ισορροπίας που εκφράζει την κατανομή του φαρμάκου μεταξύ των δύο μη αναμιξιμων φάσεων (λιποειδικής και υδατικής φάσης). Υπολογίζεται με το πηλίκο της συγκέντρωσης της ουδέτερης (μη ιονισμένης) μορφής του φαρμάκου στη λιποειδική φάση ως προς τη συγκέντρωσή του στην υδατική φάση. Οι λιποειδικές φάσεις του οργανισμού (μεμβράνες, υδρόφοβα τμήματα πρωτεϊνών) προσομοιώνονται με κατάλληλους οργανικούς διαλύτες όπως το εξάνιο, το διχλωρομεθάνιο, το χλωροφόρμιο και ο τετραχλωράνθρακας οπότε σχηματίζεται η πιο κάτω σχέση:

$$P = \frac{C_{org}}{C_{ud}}$$

Ο συντελεστής μερισμού χαρακτηρίζεται ως μια θερμοδυναμική σταθερά η οποία εξαρτάται από τους εκάστοτε διαλύτες και τη θερμοκρασία. Το σύστημα αναφοράς που χρησιμοποιείται στις πλείστες των περιπτώσεων είναι το σύστημα οκτανόλης-νερού. Η επιλογή της n-οκτανόλης βασίζεται κυρίως στην ιδιότητά της να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου ως δέκτης και ως δότης με αποτέλεσμα να προσομοιάζει ικανοποιητικά τις λιποειδικές φάσεις (βιολογικές μεμβράνες, υδρόφοβα τμήματα πρωτεϊνών). Επιπλέον ελκυστικά της χαρακτηριστικά είναι ότι αποτελεί ένα φτηνό και μη τοξικό διαλύτη. Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η πλέον καθιερωμένη

μορφή του συντελεστή μερισμού είναι η λογαριθμική του μορφή ( $\log P$ ) η οποία προτιμάται ούτως ώστε να υπάρχει γραμμική συσχέτιση με την ελεύθερη ενέργεια ( $\Delta G$ ). [31],[32]

#### 3.1.4. Συντελεστής κατανομής $D$

Ο συντελεστής μερισμού  $P$  όπως αναλύθηκε πιο πάνω, αναφέρεται στις συγκεντρώσεις της ουδέτερης (μη ιονισμένης) μορφής μιας ουσίας. Ωστόσο οι πλείστες φαρμακευτικές ενώσεις περιέχουν ιονιζόμενες ομάδες, όπως καρβοξυλομάδες, αμινοομάδες και φαινολικά υδροξύλια και ο βαθμός ιονισμού εξαρτάται από το pH του διαλύματος που βρίσκονται. Επομένως εισάγεται μια νέα θερμοδυναμική σταθερά ο συντελεστής κατανομής  $D$  ο οποίος ορίζεται ως το άθροισμα των συγκεντρώσεων των επιμέρους μορφών της ένωσης δηλαδή ουδέτερης και ιονισμένης(ων) σε κάθε φάση:

$$D = \frac{\sum C_{org}}{\sum C_{ad}}$$

Όπως και ο συντελεστής μερισμού έτσι και ο συντελεστής κατανομής χρησιμοποιείται με τη λογαριθμική μορφή  $\log D$ . Επιπλέον με βάση την εξίσωση Henderson-Hasselbach η οποία δίνει σε δεδομένο pH την αναλογία ιονισμένης/μη ιονισμένης μορφής μιας ένωσης που έχει σταθερά  $pK_a$ , λαμβάνονται οι εξισώσεις:

**Για οξέα:**  $\log P = \log D + \log (10^{pH-pK_a} + 1)$

**Για βάσεις:**  $\log P = \log D + \log (10^{pK_a-pH} + 1)$

[32]

### 3.2. Φαρμακοκινητικές παράμετροι

#### 3.2.1. Απορρόφηση από το στόμα (% HOA)

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα η χορήγηση φαρμάκων από το στόμα είναι μια από τις σημαντικότερες φαρμακοκινητικές παραμέτρους που μελετώνται, αφού αποτελεί τον πιο συχνό και αποδεκτό από τους ασθενείς τρόπο λήψης φαρμάκων, ενώ παράλληλα παρουσιάζει πολύ καλή σχέση αποτελεσματικότητας-κόστους. Η απορρόφηση ενός *per os* φαρμάκου γίνεται κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα. Συγκεκριμένα η απορρόφηση πραγματοποιείται στο στομάχι και το λεπτό έντερο, και μέσω της πυλαίας φλέβας καταλήγει αρχικά στο ήπαρ και ακολούθως εισέρχεται στη γενική κυκλοφορία. [31]

Η κακή απορρόφηση και κατ' επέκταση η κακή βιοδιαθεσιμότητα είναι ένας από τους κύριους λόγους απόρριψης των υποψήφιων *per os* φαρμάκων. Επομένως ήδη από τα αρχικά στάδια ανάπτυξης νέων φαρμάκων, η μεταφορά διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών και η εντερική απορρόφησή τους είναι υψίστης σημασίας και χρήζουν επιτακτικής μελέτης. Μερικοί παράμετροι που επηρεάζουν την απορρόφηση

από το στόμα είναι η διαλυτότητα, η λιποφιλία, το μέγεθος του μορίου, η χημική μορφή και διάφορα άλλα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου. Όσον αφορά τον τρόπο αξιολόγησης της απορρόφησης ενός *per os* φαρμάκου, τα τελευταία χρόνια λόγω ηθικών επιφυλάξεων σε σχέση με *in vivo* πειράματα σε ανθρώπους και ζώα, έχουν αναπτυχθεί πειράματα τα οποία πραγματοποιούνται σε κυτταρικές σειρές ή σε ακινητοποιημένες μεμβράνες. Μεταξύ άλλων οι κυτταρικές σειρές Caco-2 και MDCK (Madin Darby Canine Kidney) είναι ευρέως διαδεδομένες και χρησιμοποιούνται εκτενώς σε φαρμακευτικές μελέτες. [34],[35]

### *3.2.2. Πρωτεϊνική Σύνδεση*

Η σύνδεση των φαρμάκων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος επηρεάζει σημαντικά την απορρόφηση, την κατανομή, το μεταβολισμό και την απέκκρισή τους. Για να δράσει συστηματικά ένα φάρμακο πρέπει αρχικά να εισέλθει στο αίμα ούτως ώστε αργότερα να φτάσει στους ιστούς κατά τη διαδικασία της κατανομής του φαρμάκου. Αρχικά η σύνδεση με τις πρωτεΐνες μπορεί να διευκολύνει την απορρόφηση των φαρμάκων που απορροφώνται με διάχυση. Ωστόσο, όσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός της σύνδεσης με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, τόσο μικρότερο είναι το κλάσμα του ελεύθερου φαρμάκου που μπορεί να διαχυθεί τελικά στους ιστούς και να φτάσει στα επιθυμητά σημεία δράσης του. Επιπρόσθετα επηρεάζεται η απομάκρυνση του φαρμάκου από το οργανισμό, αφού επιβραδύνεται ο μεταβολισμός και η νεφρική του απέκκριση. Οι σημαντικότερες πρωτεΐνες του πλάσματος είναι η λευκωματίνη και η  $\alpha_1$ -όξινη γλυκοπρωτεΐνη. Η λευκωματίνη αποτελεί το 60% του συνόλου των πρωτεϊνών του πλάσματος και δεσμεύει όξινα και ουδέτερα φάρμακα ενώ η  $\alpha_1$ -όξινη γλυκοπρωτεΐνη αποτελεί μόλις το 1-2% των πρωτεϊνών του πλάσματος και δεσμεύει βασικά και ουδέτερα φάρμακα. Τέλος είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η υψηλή λιποφιλία ενός φαρμάκου σχετίζεται σημαντικά με την υψηλή σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. [36],[37]

## 4. MONTELA QSAR

Η ολοένα και μεγαλύτερη εξέλιξη της Συνθετικής Χημείας έχει οδηγήσει στην δυνατότητα ανάπτυξης ενός πολύ μεγάλου αριθμού νέων υποψήφιων φαρμακευτικών ενώσεων. Έτσι, με την βοήθεια της Υπολογιστικής Χημείας έχουν αναπτυχθεί Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Δράσης (Quantitative Structure Activity Relationships-QSAR) με σκοπό την παροχή κατευθύνσεων για την σύνθεση των κατάλληλων ενώσεων και αποφυγή σύνθεσης ακατάλληλων ενώσεων. Επιπρόσθετα οι Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Δράσης βοηθούν στην κατανόηση του μηχανισμού δράσης των φαρμακομορίων ενώ παράλληλα επιτυγχάνεται ελαχιστοποίηση των πειραμάτων. Ουσιαστικά τα μοντέλα QSAR χρησιμοποιούνται για την συσχέτιση των δομικών ή φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των μορίων με τη βιολογική τους δράση.

### 4.1. Ιστορική Αναδρομή

Η αρχική διατύπωση της άποψης ότι η βιολογική δράση είναι συνάρτηση με την δομή των χημικών ενώσεων έγινε από τους Crum-Brown και Frazer στα τέλη του 19ου αιώνα. Επίσης στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα οι Meyer και Overton διατύπωσαν πρώτοι την συσχέτιση της λιποφιλίας (στο σύστημα ελαίου- νερό) με την γενική αναισθητική δράση. Αργότερα, την δεκαετία του 1930 ο Hammett εισήγαγε τις ηλεκτρονιακές σταθερές  $\sigma$ , οι οποίες περιγράφουν την επίδραση των υποκαταστατών των οργανικών μορίων στον ρυθμό μιας αντίδρασης. Είκοσι χρόνια μετά, ο Taft τροποποίησε την εξίσωση Hammett εισάγοντας την στερική σταθερά υποκαταστάτη  $E_s$ , η οποία λαμβάνει υπ' όψιν τα στερικά φαινόμενα, τα οποία προκαλούνται από τους υποκαταστάτες και επηρεάζουν το ρυθμό μιας αντίδρασης. Όλα αυτά οδήγησαν στην ανάπτυξη του πρώτου μοντέλου QSAR το 1962 από τους Hansch και Fujita για μια σειρά φαινοξυ-οξικών οξέων με δράση στους ρυθμιστές ανάπτυξης των φυτών. Ωστόσο πολύ σημαντική θεωρείται η δημοσίευση των ίδιων ερευνητών το 1964 με τίτλο "ρ-σ-π analysis". Εκεί αναπτύχθηκε η γνωστή και ως Ανάλυση Hansch, η οποία υποστηρίζει ότι η βιολογική δράση είναι συνάρτηση τριών κατηγοριών ιδιοτήτων: της λιποφιλίας, των ηλεκτρονιακών ιδιοτήτων και των στερικών ιδιοτήτων.

Βιολογική Δράση = f(λιποφιλία + ηλεκτρονιακές ιδιότητες + στερικές ιδιότητες)

Και πιο συγκεκριμένα:

$$\log BR = -a(\log P)^2 + b \log P + \rho \sigma + \delta E_s + c$$

Όπου:

$\log BR$ : γενική έκφραση του λογαρίθμου της βιολογικής απόκρισης

$\log P$ : συντελεστής μερισμού ως μέτρο λιποφιλίας

$\sigma$ : ηλεκτρονιακή σταθερά του Hammett

$E_s$ : στερική σταθερά του Taft

$a, b, \rho, \delta$ : συντελεστές που προκύπτουν από πολλαπλή γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης

$c$ : σταθερός όρος που προκύπτει από πολλαπλή γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης

Από τότε μέχρι σήμερα, λόγω της ολοένα και αυξανόμενης τεχνολογικής εξέλιξης οι Ποσοτικές-Σχέσεις Δομής-Δράσης έχουν βελτιωθεί σημαντικά. Πλέον, από την διερεύνηση μικρών σειρών δομικώς συγγενών ενώσεων έχουν καταλήξει στην ανάλυση μεγάλων σειρών δεδομένων και στην εξεύρεση πληροφοριών από ένα πλήθος περιγραφικών μεταβλητών. [31]

#### *4.2. Βήματα δημιουργίας μοντέλων QSAR*

Παρακάτω παρουσιάζονται τα σημαντικότερα βήματα που απαιτούνται για μια αξιόπιστη μελέτη QSAR:

- I. Επιλογή των ως προς μελέτη ενώσεων οι οποίες κατέχουν επαναλήψιμες και καλά κατανοημένες τιμές βιολογικής δράσης ως προς συγκεκριμένο υποδοχέα-στόχο. Ακολούθως γίνεται ο διαχωρισμός τους σε δυο αντιπροσωπευτικές ομάδες, στην ομάδα εκμάθησης που αξιοποιείται για την εκπαίδευση του μοντέλου και την ομάδα ελέγχου που αξιοποιείται στην επαλήθευση του μοντέλου.
- II. Επιλογή των παραμέτρων είτε πειραματικών είτε υπολογιστικών, οι οποίοι φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά την ως προς μελέτη βιολογική δράση.
- III. Επιλογή της καταλληλότερης στατιστικής μεθόδου.
- IV. Έλεγχος αξιοπιστίας και ερμηνεία του μοντέλου όσον αφορά τη συμβολή του σε περαιτέρω σύνθεση καινοτόμων αναλόγων. [31]

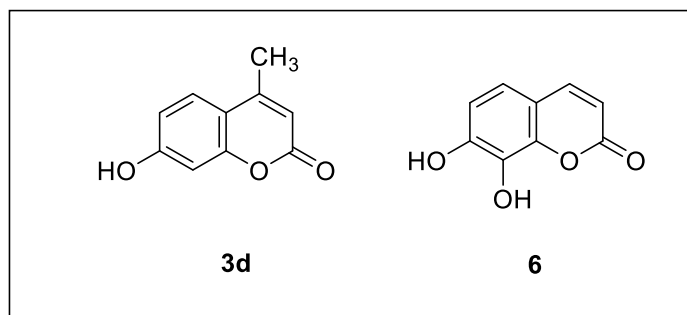
## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε με σκοπό:

- Τον σχεδιασμό, την σύνθεση και τον χαρακτηρισμό νέων κουμαρινικών αναλόγων.
- Την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης σε ειδικές *in vitro* δοκιμές.
- Την εκτίμηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων τους, όπως είναι το ποσοστό πρόσδεσης στις πρωτεΐνες του πλάσματος και το ποσοστό απορρόφησης εκ της από στόματος πρόσληψης μέσω υπολογιστικών μοντέλων πρόβλεψης.

Για τον σχεδιασμό και την σύνθεση των συγκεκριμένων κουμαρινικών αναλόγων χρησιμοποιήθηκαν ως ενώσεις-οδηγοί, η δαφνετίνη (7,8-διυδροξυκουμαρίνη) (**6**) και η 4-μεθυλο-ουμπελιφενόλη (7-υδροξυ-4-μεθυλοκουμαρίνη) (**3d**). Και οι δύο αυτές ενώσεις είναι φυσικά προϊόντα και αποτελούν μέρος της τρέχουσας ερευνητικής δραστηριότητας του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας ΕΜΠ λόγω της αξιολογής αντιοξειδωτικής και αντιφλεγμονώδους δράσης που έχουν παρουσιάσει.



Εικόνα 11. Χημική δομή μορίων οδηγών με αξιολογημένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση.

Ειδικότερα εκτός από την εκ νέου σύνθεση των ενώσεων-οδηγών, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των 7-υδροξυ ή 7,8-διυδροξυ ή 5,7-διυδροξυ κουμαρινικών αναλόγων που περιέχουν στην 4- θέση φαινυλο- ή μεθυλο- ή τριφθορομεθυλο- υποκαταστάτες.

Ακολούθως τα συντιθέμενα κουμαρινικά ανάλογα αξιολογήθηκαν *in vitro* για την αντιοξειδωτική τους δράση σύμφωνα με την δοκιμή δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH.

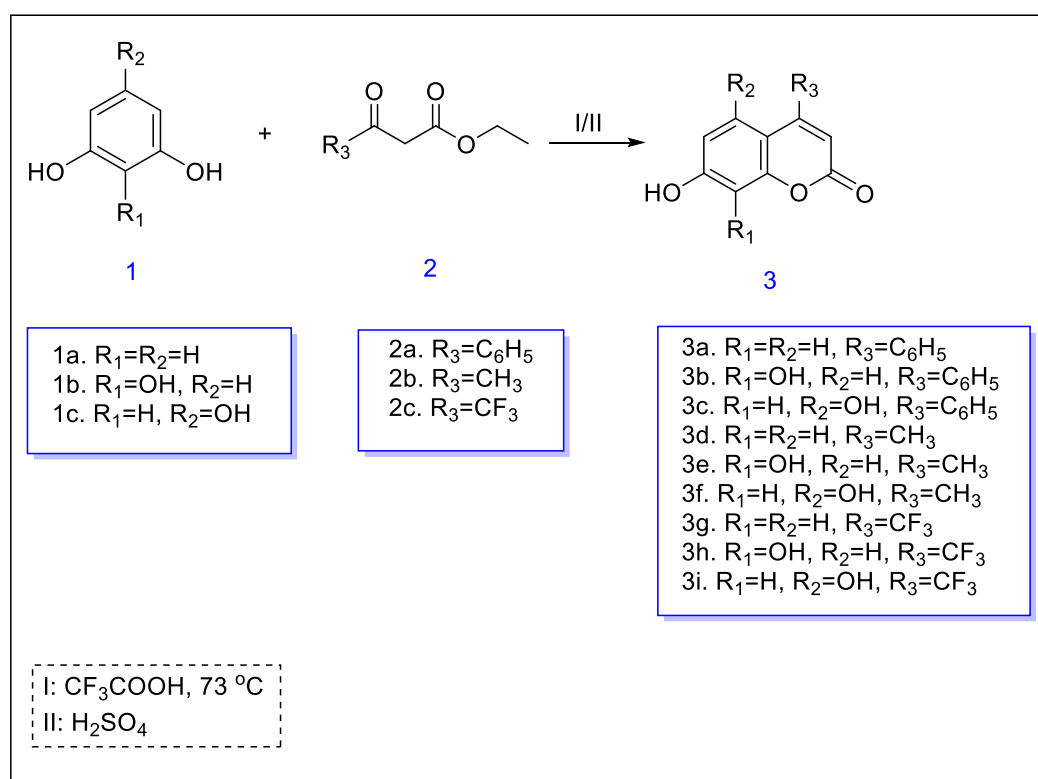
Τέλος, τα μόρια αυτά αξιολογήθηκαν για την προβλεπόμενη συμπεριφορά τους ως δραστικές ουσίες φαρμακευτικών ενώσεων. Μέσω ποσοτικών σχέσεων δομής-δράσης εκτιμήθηκε το ποσοστό απορρόφησης της εκ του στόματος πρόσληψής τους και το ποσοστό σύνδεσης τους με τις πρωτεΐνες του πλάσματος.

## 2. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ, ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΝΕΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

### 2.1. Σχεδιασμός και σύνθεση των νέων κουμαρινικών αναλόγων

#### 2.1.1 Σύνθεση των 4-υποκατεστημένων κουμαρινικών αναλόγων

Η σύνθεση των 7-υδροξυ, 7,8-διυδροξυ και 5,7-διυδροξυ κουμαρινικών αναλόγων που περιέχουν στην θέση 4 του κουμαρινικού σκελετού, φαινυλο- μεθυλο- και τριφθορομεθυλο- υποκαταστάτες πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον μηχανισμό συμπύκνωσης "Pechmann". Το προϊόν παράχθηκε με την προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων πρόδρομων ενώσεων χρησιμοποιώντας διαφορετικό καταλύτη και συνθήκες αντίδρασης ανάλογα με την τελική ένωση. Για την σύνθεση των τελικών ενώσεων **3a**, **3b** και **3c** χρησιμοποιήθηκε ως καταλύτης τριφθορο-οξικό οξύ ( $\text{CF}_3\text{COOH}$ ) και η αντίδραση αφέθηκε σε θερμοκρασία  $T=75^\circ\text{C}$ , παρουσία αδρανούς αερίου  $\text{N}_2$ , υπό ανάδευση για περίπου 24 ώρες. Για την σύνθεση των τελικών ενώσεων **3d**, **3e**, **3f**, **3g**, **3h**, και **3i** χρησιμοποιήθηκε ως καταλύτης θειικό οξύ και η αντίδραση αφέθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος παρουσία πάλι αδρανούς αερίου  $\text{N}_2$ , υπό ανάδευση για περίπου 24 ώρες.



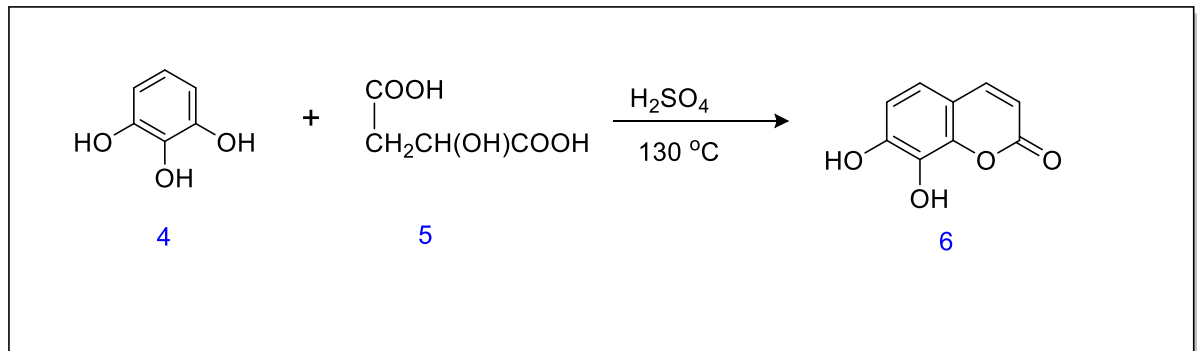
Σχήμα 8: Συνθετική πορεία των 4-υποκατεστημένων κουμαρινικών αναλόγων

#### 2.1.2 Σύνθεση της δαφνετίνης

Η σύνθεση της δαφνετίνης έγινε σύμφωνα με τον μηχανισμό συμπύκνωσης "Pechmann" κατά τον οποίο πυρογαλλόλη αντιδρά με μηλικό οξύ, σε στοιχειομετρία 1:1. Ως καταλύτης χρησιμοποιήθηκε θειικό οξύ και η αντίδραση αφέθηκε σε



Θερμοκρασία T= 130 °C παρουσία αδρανούς αερίου N<sub>2</sub>, υπό ανάδευση για περίπου 1,5 ώρα.



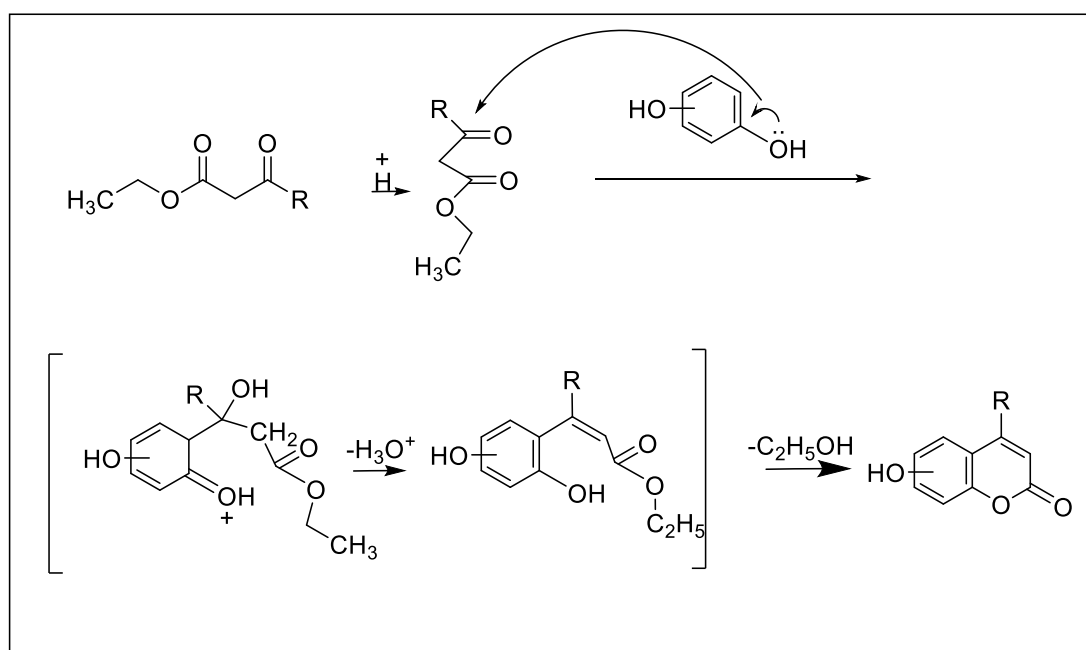
Σχήμα 9: Συνθετική πορεία της δαφνετίνης

## 2.2. Μηχανισμοί αντιδράσεων

### 2.2.1 Μηχανισμός σύνθεσης των 4-υποκατεστημένων κουμαρινικών αναλόγων

Η σύνθεση των 4-υποκατεστημένων κουμαρινικών αναλόγων μέσω της αντίδρασης Pechmann πραγματοποιείται παρουσία όξινου καταλύτη (τριφθο-οξικού οξέος ή θεικού οξέος). Στο σχήμα 3 παρουσιάζεται μια από τις επικρατέστερες προσεγγίσεις του μηχανισμού σύνθεσης. Αναλυτικότερα, τα στάδια της αντίδρασης είναι τα εξής:

1. Ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση στην φαινόλη από τον άνθρακα της καρβονυλικής ομάδας του β-κετοεστέρα.
2. Παραλαβή του τελικού κουμαρινικού προϊόντος με απόσπαση νερού και αιθανόλης.



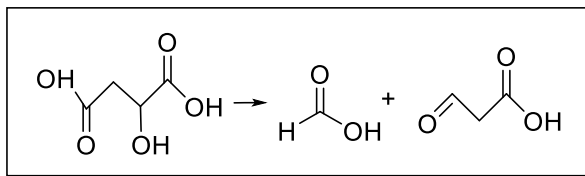
Σχήμα 10: Αντίδραση Pechmann

### 2.2.2 Μηχανισμός σύνθεσης της δαφνετίνης

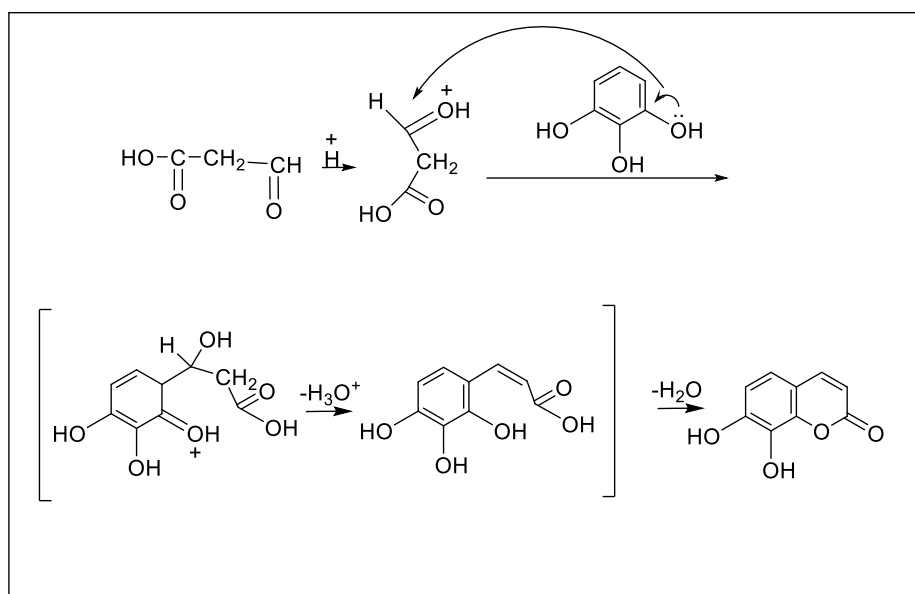
Η σύνθεση της δαφνετίνης μέσω της αντίδρασης Pechmann πραγματοποιείται παρουσία όξινου καταλύτη (θεικού οξέος). Στα σχήματα 4 και 5 παρουσιάζεται και πάλι μια από τις επικρατέστερες προσεγγίσεις του μηχανισμού σύνθεσης. Αναλυτικότερα τα στάδια της αντίδρασης είναι τα εξής:

1. Μετατροπή του μηλικού οξέος σε μεθανικό οξύ και 3-οξοπροπανοϊκό οξύ.
2. Ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση στην πυρογαλλόλη από τον άνθρακα της καρβονυλικής ομάδας του 3-οξοπροπανοϊκού οξέος, προς σχηματισμό ενδιάμεσου προϊόντος.

3. Αφυδάτωση για την παραλαβή του τελικού προϊόντος.



Σχήμα 11: Μετατροπή Μηλικού οξέος



Σχήμα 12: Αντίδραση Pechmann

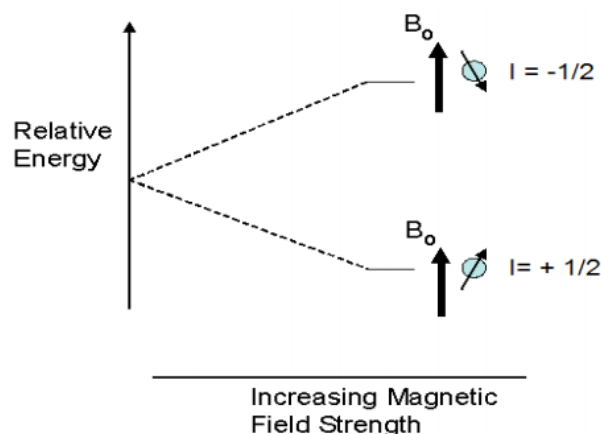
## 2.3. Ταυτοποίηση ενώσεων

### 2.3.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance, NMR) βασίζεται στην μέτρηση της απορρόφησης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων και παρέχει σημαντικές πληροφορίες για το χημικό περιβάλλον των πυρήνων των ατόμων στα μόρια των χημικών ενώσεων. Το φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού εμφανίζεται μόνο σε πυρήνες ατόμων που παρουσιάζουν μαγνητικές ιδιότητες αφού αυτές σχετίζονται με το πυρηνικό spin (ολική στροφορμή του πυρήνα). Μαγνητικές ιδιότητες εκδηλώνουν όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό πρωτονίων (π.χ  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ) και όλοι οι πυρήνες με περιττό αριθμό νετρονίων όπως ο  $^{13}\text{C}$ . Ουσιαστικά οι μόνοι πυρήνες που δεν προξενούν μαγνητικά φαινόμενα είναι αυτοί με άρτιο αριθμό πρωτονίων και νετρονίων ( $^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$ ).

Τα πυρηνικά spin ( $I$ ) των μαγνητικών πυρήνων προσανατολίζονται τυχαία όταν δεν υπάρχει εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Με την εφαρμογή όμως ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου οι πυρήνες αποκτούν συγκεκριμένους προσανατολισμούς. Πιο συγκεκριμένα ένας πυρήνας με πυρηνικό μαγνητικό spin  $I$  μπορεί να λάβει  $(2I+1)$  προσανατολισμούς ίσης ενέργειας. Όσον αφορά την φασματοσκοπία πρωτονίου ( $^1\text{H}$  NMR) η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για την ταυτοποίηση των ενώσεων που συντέθηκαν, ο πυρήνας διαθέτει  $I = \frac{1}{2}$  και άρα έχει 2 δυνατούς προσανατολισμούς, παράλληλα ( $I = +\frac{1}{2}$ ) και αντιπαράλληλα ( $I = -\frac{1}{2}$ ) προς την διεύθυνση του πεδίου. Ο παράλληλος προσανατολισμός είναι χαμηλότερης ενέργειας με αποτέλεσμα να ευνοείται αυτή η κατάσταση του spin έναντι του αντιπαράλληλου προσανατολισμού.

Όταν όμως οι προσανατολισμένοι πυρήνες ακτινοβοληθούν με κατάλληλης συχνότητας ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, λαμβάνει χώρα απορρόφηση ενέργειας και η κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας αλλάζει φορά προς την κατάσταση υψηλότερης ενέργειας (αναστροφή spin). Με την πραγματοποίηση αυτής της αναστροφής, λέγεται ότι οι πυρήνες έχουν συντονιστεί με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία, εξ ου και ο όρος πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός. Επομένως τα φάσματα NMR προκύπτουν από διεγέρσεις από τη βασική κατάσταση στη διεγερμένη κατά την επίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ικανής να προκαλέσει συντονισμό. [38][39]



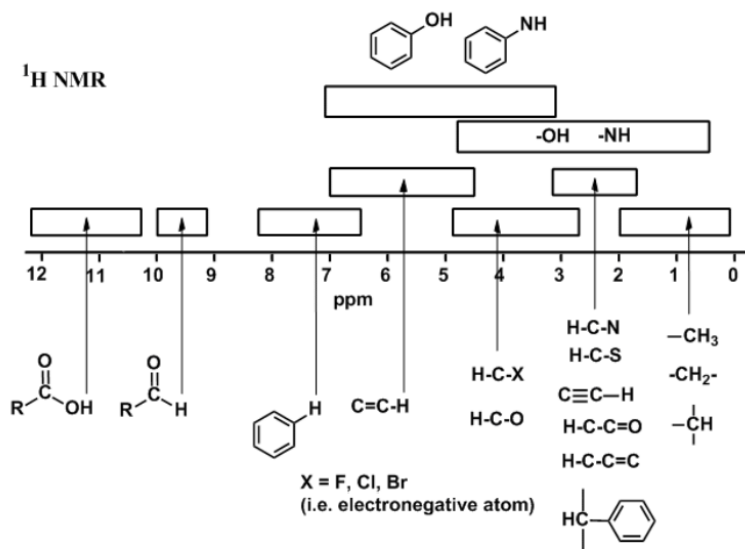
Εικόνα 12. Ενεργειακή Διαφορά  $\Delta E$  μεταξύ πυρήνων με παράλληλο και αντιπαράλληλο spin σε σχέση με το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο ( $B_0$ ).

### 2.3.2 Χαρακτηριστικά φάσματα NMR

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειωθεί ότι η συχνότητα συντονισμού του πυρήνα ενός στοιχείου μέσα σε ένα μόριο εξαρτάται από το χημικό του περιβάλλον, δηλαδή από την ηλεκτρονιακή πυκνότητα που το περιβάλλει και το είδος των υπόλοιπων ατόμων που είναι συνδεδεμένο. Πιο αναλυτικά τα ηλεκτρόνια σε τροχιά γύρω από τον πυρήνα, μεταβάλλουν ελαφρώς το μαγνητικό πεδίο που “αισθάνεται” ο πυρήνας, με αποτέλεσμα να διαφοροποιείται ελαφρώς το ενεργειακό χάσμα μεταξύ της βασικής και διεγερμένης κατάστασης (μικραίνει η απόσταση  $\Delta E$ ). Ουσιαστικά οι πυρήνες προστατεύονται από την πλήρη επίδραση του εφαρμοζόμενου πεδίου λόγω των ηλεκτρονίων που τους περιβάλλουν και το φαινόμενο αυτό αναφέρεται ως θωράκιση του πυρήνα.

Τα φάσματα NMR αποτυπώνονται σε γραφήματα που εμφανίζουν την ισχύ του εφαρμοζόμενου πεδίου να αυξάνεται από τα αριστερά προς τα δεξιά. Για την βαθμολόγηση του γραφήματος NMR χρησιμοποιείται μια ένωση αναφοράς (όπως το τετραμεθυλοσιλάνιο, TMS). Το TMS χρησιμοποιείται ως απορρόφηση αναφοράς λόγω του ότι εμφανίζει μόνο μια κορυφή η οποία βρίσκεται σε υψηλότερο πεδίο από τις απορροφήσεις των περισσότερων οργανικών ενώσεων. Τα γραφήματα NMR λοιπόν, βαθμολογούνται χρησιμοποιώντας μια σχετική κλίμακα, την κλίμακα  $\delta$ . Οι τιμές σε αυτή την κλίμακα υπολογίζονται μετρώντας την διαφορά  $\Delta\nu$  μεταξύ της συχνότητας συντονισμού μια ομάδας πρωτονίων σε σχέση με την συχνότητα συντονισμού της ομάδας αναφοράς. Με την χρήση της κλίμακας  $\delta$ , η χημική μετατόπιση μιας απορρόφησης NMR είναι σταθερή και ανεξάρτητη από την συχνότητα λειτουργίας του φασματομέτρου.

$$\delta \text{ (σε ppm)} = \frac{\Delta\nu \text{ (σε Hz)}}{\text{συχνότητα λειτουργίας του οργάνου (σε MHz)}} \cdot 10^6$$



Εικόνα 13. Χημικές μετατοπίσεις των κυριότερων χαρακτηριστικών ομάδων στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR.

Συνοπτικά τα κυριότερα σημεία που μας ενδιαφέρουν στην αποτίμηση ενός φάσματος  $^1\text{H}$  NMR είναι:

- Ο αριθμός των σημάτων. Αναπαριστά τα μη ισοδύναμα πρωτόνια που υπάρχουν στο μόριο.
- Οι χημικές μετατοπίσεις. Είναι ενδεικτικές του χημικού περιβάλλοντος που βρίσκονται τα πρωτόνια. Στην εικόνα 5, παρουσιάζονται οι χημικές μετατοπίσεις των κυριότερων χαρακτηριστικών ομάδων στο φάσμα  $^1\text{H}$  NMR.
- Η ολοκλήρωση. Το εμβαδόν που περικλείει κάθε κορυφή είναι ανάλογο προς τον αριθμό των πρωτονίων που προκαλούν την κορυφή.
- Η διάσχιση των σημάτων σε συμμετρικές πολλαπλές ομάδες κορυφών (διπλές, τριπλές κ.λπ.). Το φαινόμενο των πολλαπλών απορροφήσεων αποκαλείται σχάση σπιν-σπιν και προκαλείται από την αλληλεπίδραση ή σύζευξη των πυρηνικών σπιν γειτονικών ατόμων. Η απόσταση μεταξύ των επιμέρους κορυφών σε μια πολλαπλή κορυφή ονομάζεται σταθερά σύζευξης,  $J$  με μονάδα μέτρησης τα Hz. Η ακριβής τιμή της σταθεράς σύζευξης μεταξύ δύο γειτονικών πρωτονίων εξαρτάται από την γεωμετρία του μορίου. Επιπλέον είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το σήμα ενός πρωτονίου με  $n$  ισοδύναμα γειτονικά πρωτόνια σχάζεται σε πολλαπλό, με  $n+1$  κορυφές και σταθερά σύζευξης  $J$ .

### 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

#### 3.1. Σύνθεση κουμαρινικών αναλόγων

##### 3.1.1 Όργανα και συσκευές

Στο παρόν υποκεφάλαιο παρουσιάζονται τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων, τον χαρακτηρισμό των τελικών προϊόντων αλλά και τον προσδιορισμό συγκεκριμένων ιδιοτήτων τους. Όλα τα αντιδραστήρια αγοράστηκαν από τις εταιρίες Sigma-Aldrich, Fluka, Alfa Aesar και Acros και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.

Η παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, TLC, (Thin Liquid Chromatography) σε πλάκες αλουμινίου, επιστρωμένες με Silica gel F254 της εταιρίας Merck. Ανάλογα με την κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές αναλογίες συστήματος διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα (PE) / οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc). Για την εμφάνιση των κηλίδων των χρωματογραφημάτων TLC χρησιμοποιήθηκε λάμπα υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας στα 254 nm και έπειτα ακολούθησε εμποτισμός σε διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος (PMA) (αιθανολικό διάλυμα PMA 7%).

Τόσο ο χαρακτηρισμός όσο και ο έλεγχος της καθαρότητας των τελικών προϊόντων επιτεύχθηκε μέσω φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Τα φάσματα <sup>1</sup>HNMR καταγράφηκαν με τα όργανα Varian V300 και V600 MHz του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων δίνονται σε ppm ενώ οι σταθερές συζεύξεως J, δίνονται σε Hz. Η πολλαπλότητα των σημάτων στα φάσματα αναφέρεται ως: s (singlet, απλή), d (doublet, διπλή), m (multiplet, πολλαπλή), br (broad, ευρεία) και dd (doublet of doublets, διπλή διπλών).

Επιπλέον, για τον προσδιορισμό των σημείων τήξεως χρησιμοποιήθηκαν ανοικτοί τριχοδιαμετρικοί σωλήνες και η συσκευή Gallenkamp. Τέλος όλες οι ζυγίσεις πραγματοποιήθηκαν σε ζυγό ακριβείας KERN (εώς 210 g).

### 3.1.2 Συνθετική πορεία κουμαρινών

#### Γενική μέθοδος παρασκευής υδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρινών

Κατάλληλη ποσότητα φαινόλης (1 eq) προστίθεται σε σφαιρική φιάλη μαζί με κατάλληλη ποσότητα εστέρα (1 eq) παρουσία όξινου καταλύτη (τριφθο-οξικού οξέος ή θεικού οξέος). Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση για περίπου 24 ώρες, παρουσία κάθετου ψυκτήρα και αδρανούς αερίου N<sub>2</sub>.

Οι φαινόλες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

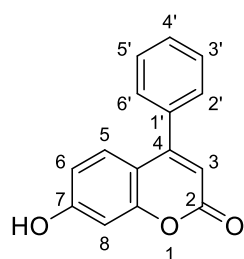
- Ρεσορκινόλη
- Πυρογαλόλη
- Φλωρογλυκινόλη

Οι εστέρες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

- Βενζοϊλοξικός αιθυλεστέρας
- Ακετοξικός αιθυλεστέρας
- Τριφθορικός αιθυλεστέρας

Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE)/ 30% (EtOAc) ή 60% (PE)/ 40% (EtOAc) ανάλογα με το εκάστοτε προϊόν. Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθεται νερό στο μίγμα υπό ψύξη και παρατηρείται δημιουργία στερεού. Ακολούθως, στο στερεό που έχει καταβυθιστεί πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό με μικρή ποσότητα παγωμένου νερού και το τελικό στερεό συλλέγεται και ξηραίνεται. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H NMR.

#### 7-υδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη



Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 4.57 mmol (502.9 mg) ρεσορκινόλης και 4.57 mmol (877.0 mg) βενζοϊλοξικού αιθυλεστέρα μαζί με 1.1 mL τριφθορο-οξικού οξέος. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται υπό ανάδευση σε ελαιόλουτρο στους 75°C για 24 ώρες. Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE)/ 30% (EtOAc). Το προϊόν λαμβάνεται υπό την μορφή κίτρινου στερεού.

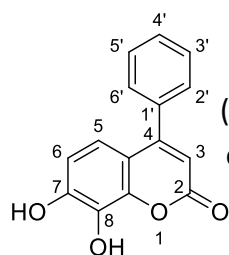
**Απόδοση:** 65%

**Σημείο Τήξης:** 238-239 °C (Σ.Τ βιβλιογραφίας 232-234 °C) [40]

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ (ppm) 10.66 (br, 1H, OH-7), 7.53 (m, 5H, H-2' & H-3' & H-4' & H-5' & H-6'), 7.27 (d, J = 9 Hz, 1H, H-5), 6.81 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H-8), 6.78 (dd, J = 9 Hz, J=1.8, 1H, H-6), 6.15 (s, 1H, H-3)



### 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη



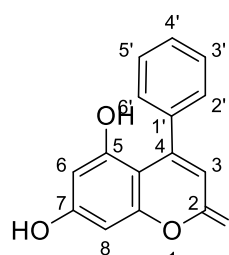
Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 4.02 mmol (506.7 mg) πυρογαλλόλης και 4.02 mmol (772.3 mg) βενζοϊλοξικού αιθυλεστέρα μαζί με 1.0 mL τριφθο-οξικού οξέος. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται υπό ανάδευση σε ελαιόλουτρο στους 75°C για 24 ώρες. Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 60% (PE)/ 40% (EtOAc). Το προϊόν λαμβάνεται υπό την μορφή καφέ στερεού.

**Απόδοση:** 53%

**Σημείο Τήξης:** 188-189 °C (Σ.Τ. βιβλιογραφίας 194-197 °C) [41]

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ(ppm) 10.19 (s, 1H, OH-8), 9.42 (s, 1H, OH-7), 7.52 (m, 5H, H-2' & H-3' & H-4' & H-5' & H-6'), 6.79 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 6.76 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-6), 6.13 (s, 1H, H-3)

### 5,7-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνη



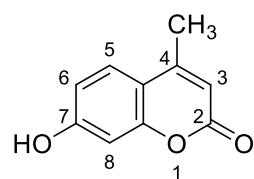
Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 3.97 mmol (500.6 mg) πυρογαλλόλης και 3.97 mmol (763.1 mg) βενζοϊλοξικού αιθυλεστέρα μαζί με 1.0 mL τριφθο-οξικού οξέος. Το μίγμα της αντίδρασης θερμαίνεται υπό ανάδευση σε ελαιόλουτρο στους 75°C για 24 ώρες. Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 60% (PE)/ 40% (EtOAc). Το προϊόν λαμβάνεται υπό την μορφή καφέ στερεού.

**Απόδοση:** 35%

**Σημείο Τήξης:** 224.8-226 °C (Σ.Τ. βιβλιογραφίας 227-229 °C) [40]

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ(ppm) 10.41 (br, 1H, OH-7), 10.12 (s, 1H, OH-5), 7.35 (m, 5H, H-2' - H-6'), 6.27 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.16 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, H-8), 5.74 (s, 1H, H-3)

### 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη



Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 90.82 mmol (10.0 g) ρεσορκινόλης και 92.10 mmol (12.0 mL) ακετοξικού αιθυλεστέρα μαζί με 100 mL θεικού οξέος. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η εξέλιξη της αντίδρασης

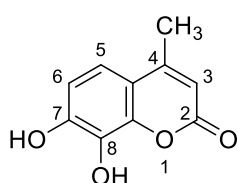
παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 70% (PE)/ 30% (EtOAc). Το προϊόν λαμβάνεται ύστερα από ανακρυστάλλωση από διαλύτη μεθανόλη υπό την μορφή υποκίτρινου στερεού.

**Απόδοση:** 70%

**Σημείο Τήξης:** 186-187 °C (Σ.Τ. βιβλιογραφίας 185-187 °C) [42]

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ(ppm) 10.50 (s, 1H, OH-7), 7.58 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 6.79 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.70 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-8), 6.12 (s, 1H, H-3), 2.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>)

#### 7,8-διυδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη



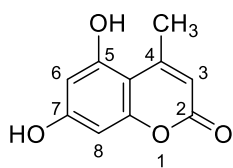
Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 1.59 mmol (200.2 mg) πυρογαλλόλης και 1.59 mmol (206.6 mg) ακετοξικού αιθυλεστέρα μαζί με 1.7 mL θεικού οξέος. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 60% (PE)/ 40% (EtOAc). Το προϊόν λαμβάνεται υπό την μορφή κίτρινου στερεού.

**Απόδοση:** 61%

**Σημείο Τήξης:** 231-232 °C (Σ.Τ. βιβλιογραφίας 228-230 °C) [43]

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ(ppm) 10.03 (br, 1H, OH-8), 9.27 (br, 1H, OH-7), 7.09 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-5), 6.81 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-6), 6.12 (s, 1H, H-3), 2.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>)

#### 5,7-διυδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη



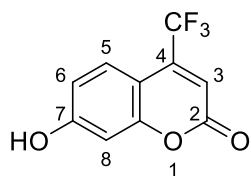
Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 1.60 mmol (201.3 mg) φλωρογλυκινόλης και 1.60 mmol (207.7 mg) ακετοξικού αιθυλεστέρα μαζί με 1,8 mL θεικού οξέος. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 60% (PE)/ 40% (EtOAc). Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται ύστερα από ανακρυστάλλωση από σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο/μεθανόλης υπό την μορφή λευκού στερεού.

**Απόδοση:** 20%

**Σημείο Τήξης:** 230-231 °C ( Σ.Τ. βιβλιογραφίας 231-232 °C) [43]

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ(ppm) 10.51 (br, 1H, OH-7), 10.30 (br, 1H, OH-5), 6.25 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-6), 6.16 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-8), 5.84 (s, 1H, H-3), 2.48 (s, 3H, CH<sub>3</sub>)

#### 7-υδροξυ-4-τριφθορομεθυλο-κουμαρίνη (AA9)



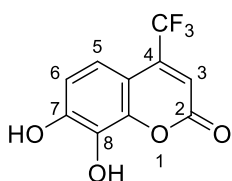
Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 1.83 mmol (201.1 mg) ρεσορκινόλης και 1.83 mmol (336.3 mg) τριφθορικού αιθυλεστέρα μαζί με 2.0 mL θειικού οξέος. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 60% (PE)/ 40% (EtOAc). Το προϊόν λαμβάνεται υπό την μορφή ροζ στερεού.

**Απόδοση:** 30%

**Σημείο Τήξης:** 178.1-179.3 °C (Σ.Τ. βιβλιογραφίας 178-179 °C) [44]

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ(ppm) 10.95 (br, 1H, OH), 7.55 (d, *J* = 9 Hz, 1H, H-5), 6.91 (dd, *J* = 9 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-6), 6.83 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H-8), 6.75 (s, 1H, H-3)

#### 7,8-διυδροξυ-4-τριφθορομεθυλο-κουμαρίνη (AA7)



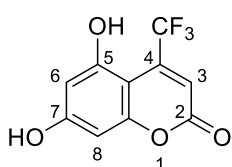
Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 1.59 mmol (200.8 mg) πυρογαλλόλης και 1.59 mmol (293.2 mg) τριφθορικού αιθυλεστέρα μαζί με 1.7 mL θειικού οξέος. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 60% (PE)/ 40% (EtOAc). Το προϊόν λαμβάνεται υπό μορφή κίτρινου στερεού.

**Απόδοση:** 25%

**Σημείο Τήξης:** 214-215.2 °C (Σ.Τ. βιβλιογραφίας 222-223 °C) [45]

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ(ppm) 10.52 (br, 1H, OH-8), 9.60 (br, 1H, OH-7), 7.06 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-5), 6.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-6), 6.73 (s, 1H, H-3)

#### 5,7-διυδροξυ-4-τριφθορομεθυλο-κουμαρίνη (AA8)



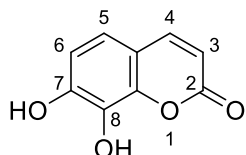
Σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης, σε σφαιρική φιάλη προστίθενται 1.59 mmol (200.5 mg) φλωρογλυκινόλης και 1.59 mmol (292.71 mg) τριφθορικού αιθυλεστέρα μαζί με 1.75 mL θειικού οξέος. Το μίγμα της αντίδρασης αφήνεται υπό ανάδευση για 24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 60% (PE)/ 40% (EtOAc). Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται ύστερα από ανακρυστάλλωση από σύστημα διαλυτών διχλωρομεθάνιο/μεθανόλης υπό την μορφή κίτρινου στερεού.

**Απόδοση:** 25%

**Σημείο Τήξης:** 277,1-278,9 °C (Σ.Τ βιβλιογραφίας 197-198) [45]

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ(ppm) 7.01 (s, 1H, H-6), 6.94 (s, 1H, H-8), 6.79(s, 1H, H-3)

Μέθοδος παρασκευής της δαφνετίνης



Σε 3,7 mL θεικού οξέος, προστίθενται 18,86 mmol (2 g) πυρογαλόλης και 12,16 mmol (1,6 g) μηλικού οξέος. Το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση στους 130 °C για περίπου 1,5 ώρα, παρουσία κάθετου ψυκτήρα και αδρανούς αερίου N<sub>2</sub>. Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 60% (PE)/ 40% (EtOAc). Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθεται νερό στο μίγμα και πραγματοποιείται εκχύλιση της υδατικής στιβάδας με διάλυμα διαιθυλαιθέρα. Στη συνέχεια, το οργανικό εκχύλισμα ξηραίνεται με Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> κι έπειτα εξατμίζεται υπό ελαττωμένη πίεση έως την παραλαβή στερεού. Το τελικό προϊόν παραλαμβάνεται, αφού έχει προηγηθεί εν ψυχρώ επεξεργασία με διαλύτη μεθανόλη, με διήθηση. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H NMR. Το τελικό προϊόν λαμβάνεται υπό την μορφή ροζ στερεού.

**Απόδοση:** 30%

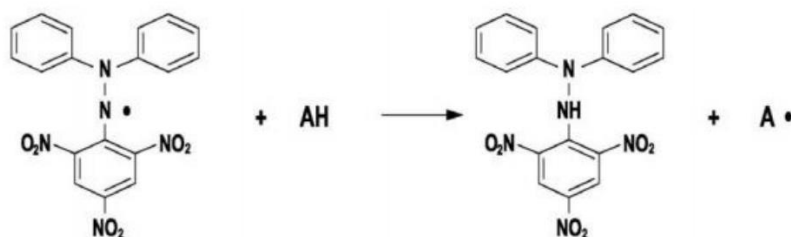
**Σημείο Τήξης:** >250 °C (Σ.Τ. βιβλιογραφίας 253 °C) [46]

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 10.01 (s, 1H, 8-OH), 9.34 (s, 1H, 7-OH), 7.89 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H-4), 7.01 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5), 6.79 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-6), 6.18 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, H-3)

### 3.2. Αξιολόγηση της βιοδραστικότητας των νέων κουμαρινικών αναλόγων

#### 3.2.1. Μέτρηση αντιοξειδωτικής δράσης με την μέθοδο DPPH

Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας των νέων ενώσεων επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας την ρίζα DPPH<sup>•</sup> (2,2- διφαινυλ-1-πικρυλυδραζίλης). Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της σταθερής ρίζας DPPH με τα εξεταζόμενα μόρια τα οποία δρουν ως δότες υδρογόνου και ως εκ τούτου επιτυγχάνεται η αδρανοποίηση (αναγωγή) της. (εικόνα 7) Τα κύρια χαρακτηριστικά της ρίζας DPPH είναι η ισχυρή απορρόφηση που εμφανίζει στα 515 nm και το ιώδες χρώμα που διαθέτει. Μετά την αντίδραση αναγωγής, παρατηρείται μεταβολή του αρχικού χρώματος από ιώδες (λόγω της ρίζας DPPH<sup>•</sup>) σε κίτρινο (DPPH-H). Επομένως μπορεί εύκολα να αξιολογηθεί ποιοτικά η ικανότητα αντίδρασης μια ένωσης με τις ελεύθερες ρίζες και άρα κατ' επέκταση η αντιοξειδωτική της δράση. Επιπλέον για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των εξεταζόμενων μορίων, λαμβάνεται η τιμή απορρόφησης στα 515 nm. [47]



Εικόνα 14. Αντίδραση αναγωγής ρίζας DPPH από μια αντιοξειδωτική ουσία.

#### Όργανα και Αντιδραστήρια

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα όργανα, οι συσκευές και τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία μέτρησης της αντιοξειδωτικής δράσης των κουμαρινικών αναλόγων.

Πίνακας 2. Εργαστηριακά όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της σταθερής ρίζας DPPH.

Εργαστηριακό όργανο /συσκευή και μοντέλο
Ζυγός Ακριβείας
Αναδευτήρας τύπου Vortex, VELP SCIENTIFICA ZX3 Advanced Vortex Mixer
Plate reader, SPECTRA MAX 250 Molecular Devices

Πίνακας 3. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της σταθερής ρίζας DPPH.

Αντιδραστήρια	Μοριακός Τύπος
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>
Αιθανόλη	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O
Διμεθυλοσουλφοξειδίο (DMSO)	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS

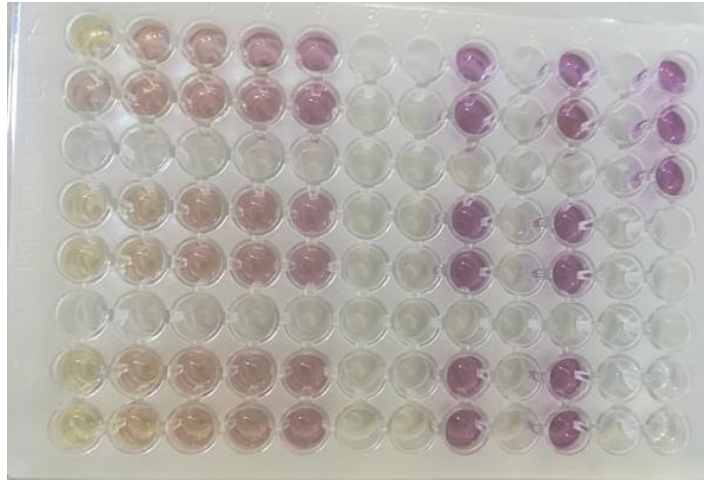
### Πειραματική Διαδικασία

- 1.25 mg DPPH διαλύονται σε 50 mL αιθανόλης και το διάλυμα αφήνεται υπό μαγνητική ανάδευση για 20 min, απουσία φωτός.
- Ζυγίζονται κατάλληλες ποσότητες των υπό εξέταση ενώσεων και διαλύονται στο διάλυμα DMSO έτσι ώστε να προκύπτουν διαλύματα συγκέντρωσης 10 mM (stock) και πραγματοποιούνται κατάλληλες αραιώσεις.
- Σε κάθε κυψελίδα ενός πλακιδίου 96 θέσεων προστίθενται 195 μL DPPH και 5 μL από κάθε μια από τις stock συγκεντρώσεις για την παραλαβή τελικών συγκεντρώσεων 100 μM, 60 μM, 30 μM, 10μM και 5μM.
- Παράλληλα παρασκευάζονται δείγματα αναφοράς (control), τα οποία περιέχουν 195μL DPPH και 5μL DMSO.
- Το plate αναδεύεται ελαφρώς και αφήνεται σε σκοτάδι για 30min και 60min.
- Τέλος με την χρήση reader λαμβάνεται η τιμή της απορρόφησης στα 515nm, στα δύο χρονικά διαστήματα (30 και 60 min) και εξετάζεται ως προς την απορρόφηση των control.

Ως αποτελέσματα λαμβάνονται η επί τοις εκατό δέσμευση της ρίζας DPPH σε συγκέντρωση 100 μM καθώς και η τιμή IC<sub>50</sub> (Inhibitory Concentration at 50%) για τα 30 και 60 min. Για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο του DPPH χρησιμοποιήθηκε ως ένωση αναφοράς το Trolox.

Στην εικόνα 15 παρουσιάζεται το πλακίδιο των 96 θέσεων που χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση της αντιοξειδωτικής δράσης των υπό μελέτη ενώσεων μετά από το πρώτο χρονικό διάστημα των 30 λεπτών. Τα δείγματα που εμφανίζονται με ιώδες χρώμα αποτελούν τις συγκεντρώσεις που δεν εμφανίζουν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση. Αντιθέτως, τα δείγματα που εμφανίζουν κίτρινο και υποκίτρινο χρώμα

αποτελούν συγκεντρώσεις όπου επιτυγχάνεται αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση, καθώς το κίτρινο χρώμα υποδεικνύει την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH.

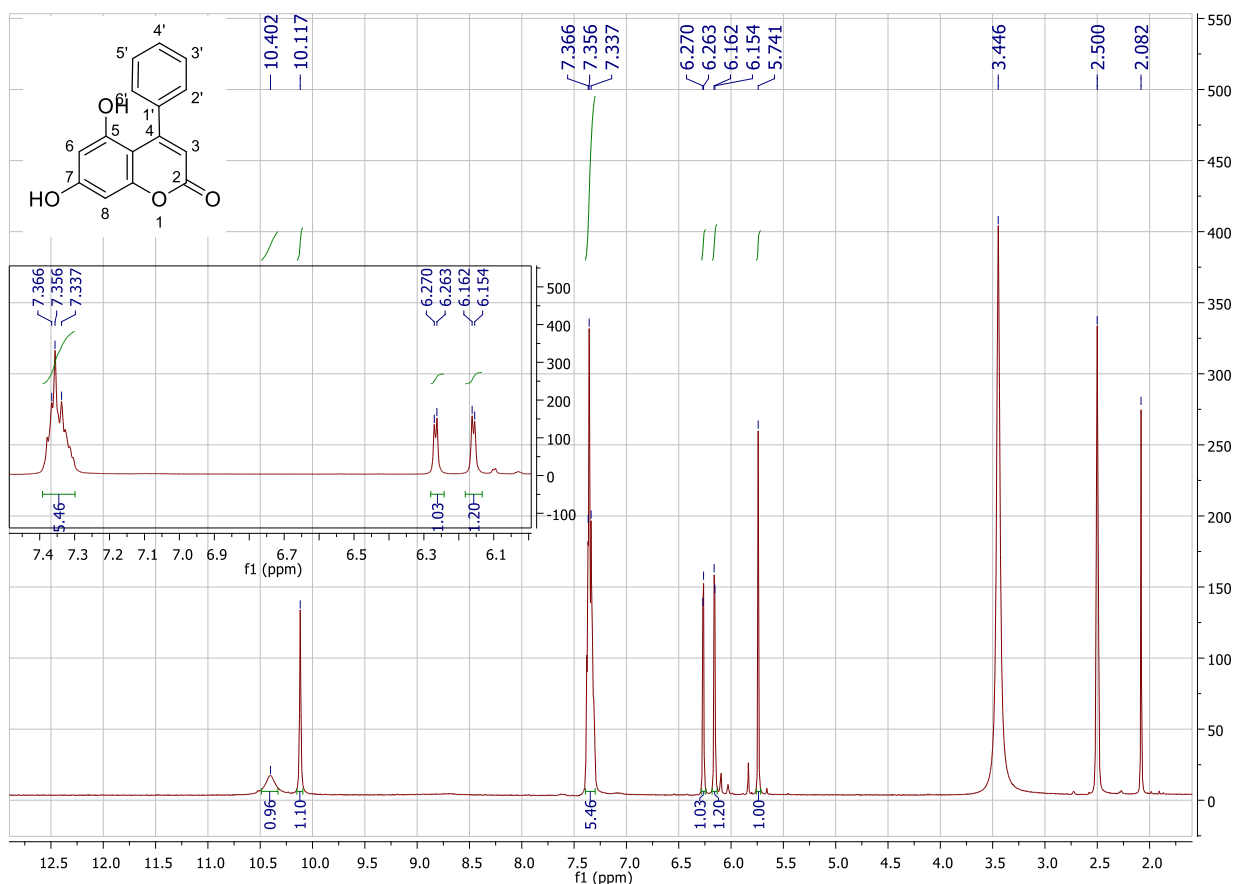


*Εικόνα 15: Πλακίδιο 96 θέσεων (96 well plate)*

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

## 1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία συντέθηκαν δέκα νέα κουμαρινικά παράγωγα και ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας  $^1\text{H}$  NMR. Όλες οι κουμαρίνες συντέθηκαν σε ικανοποιητικές αποδόσεις, με τις 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη, 5,7-διυδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνη και 5,7-διυδροξυ-4-τριφθορομεθυλο-κουμαρίνη να απαιτούν περαιτέρω διεργασία καθαρισμού η οποία πραγματοποιήθηκε μέσω ανακρυστάλλωσης. Παρακάτω ακολουθεί φασματοσκοπική μελέτη τριών χαρακτηριστικών μορίων από όσα αναφέρθηκαν παραπάνω. Συγκεκριμένα, θα αναλυθούν τα φάσματα  $^1\text{H}$ NMR των ενώσεων **3c**, **3e** και **3g**.

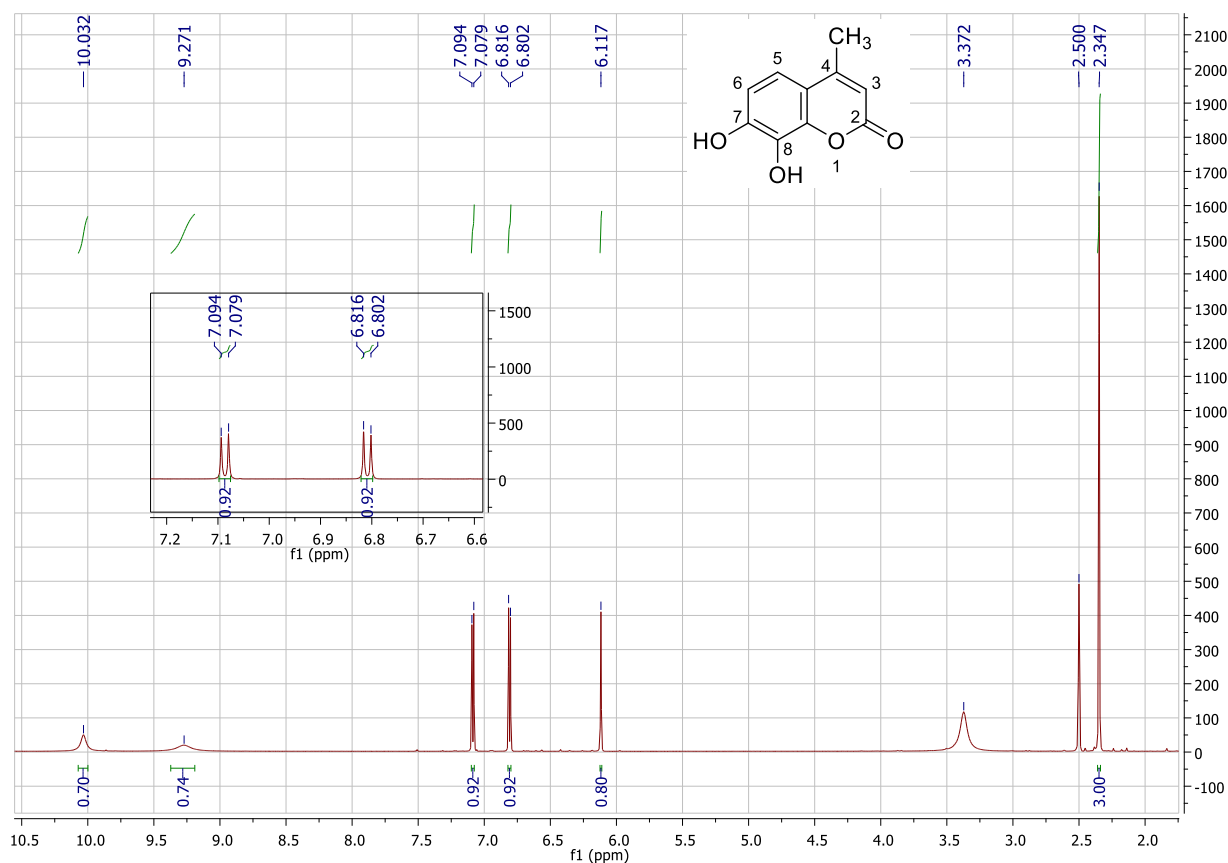


Εικόνα 16.  $^1\text{H}$ NMR της 5,7-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης (**3c**).

Στο παραπάνω φάσμα εμφανίζονται αρχικά μια ευρεία και μια απλή κορυφή στα 10.40 και 10.12 ppm οι οποίες οφείλονται στα πρωτόνια των υδροξυλίων των θέσεων

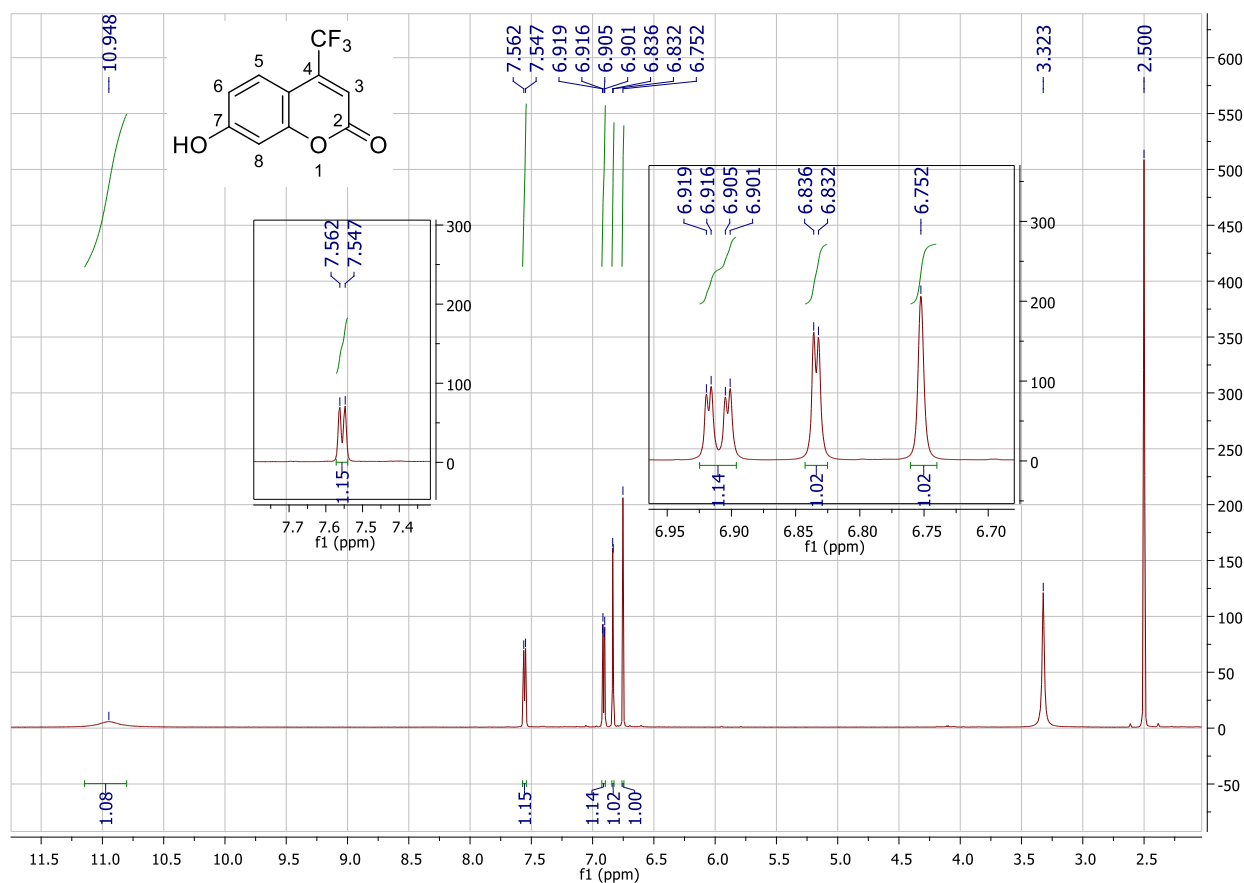


7 και 5 αντίστοιχα. Στα 7.35 ppm παρατηρείται μια πολλαπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνεται για 5 πρωτόνια και αποδίδεται στα πρωτόνια του φαινολικού δακτυλίου (H-2'-H-6'). Ακολουθεί μια διπλή κορυφή στα 6.27 ppm η οποία αντιστοιχεί στο H-6 λόγω της μετα αλληλεπίδρασης του με το H-8. Αντίστοιχα, στα 6.16 ppm εντοπίζεται ακόμη μια διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο H-8. Τέλος στα 5.75 ppm παρατηρείται μια απλή κορυφή η οποία αντιστοιχεί στο H-3.



Εικόνα 17. <sup>1</sup>H NMR της 7,8-διυδροxy-4-μεθυλο-κουμαρίνης (3e).

Στο παραπάνω φάσμα εμφανίζονται αρχικά δύο ευρείες κορυφές στα 10.03 και 9.27 ppm οι οποίες οφείλονται στα πρωτόνια των υδροξυλίων των θέσεων 7 και 8 αντίστοιχα. Στα 7.09 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή η οποία αντιστοιχεί στο H-5 το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό μη ισοδύναμο πρωτόνιο (H-6). Αντίστοιχα, στα 6.81 ppm εντοπίζεται μια διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο H-6. Ακολουθεί μια απλή κορυφή στα 6.12 ppm η οποία αντιστοιχεί στο H-3. Τέλος στα 2.35 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή η οποία ολοκληρώνεται για 3 πρωτόνια και αποδίδεται στην μεθυλο-ομάδα της θέσης 4.



Εικόνα 18. <sup>1</sup>H NMR της 7-υδροξυ-4-τριφθορομεθυλο-κουμαρίνης (**3g**).

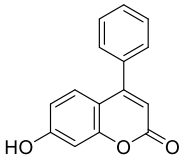
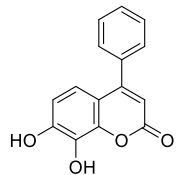
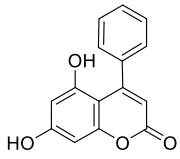
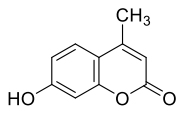
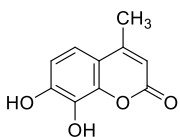
Στο παραπάνω φάσμα εμφανίζεται αρχικά μια ευρεία κορυφή στα 10.95 ppm η οποία οφείλεται στο πρωτόνιο του υδροξυλίου της θέσης 7. Στα 7.55 ppm εμφανίζεται μία διπλή κορυφή η οποία αντιστοιχεί στο H-5 το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό, μη ισοδύναμο πρωτόνιο (H-6). Στα 6.91 ppm εμφανίζεται μία διπλή διπλών κορυφή η οποία αντιστοιχεί στο H-6 το οποίο διαθέτει ένα γειτονικό, μη ισοδύναμο πρωτόνιο ενώ επιπρόσθετα αλληλεπιδρά με το H-8. Ακολουθεί μία διπλή κορυφή στα 6,83 ppm η οποία αντιστοιχεί στο H-8 λόγω της meta αλληλεπίδρασης του με το H-6. Τέλος στα 6.75 ppm εντοπίζεται μία απλή κορυφή η οποία αντιστοιχεί στο H-3.

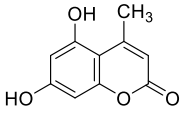
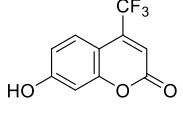
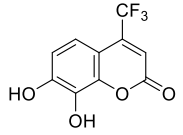
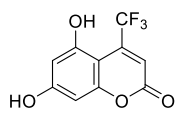
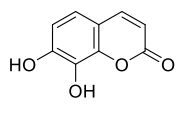
## 2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

### 2.1 Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης (DPPH)

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των *in vitro* βιοδοκιμών αντιοξειδωτικής δράσης (DPPH) των νέων κουμαρινικών αναλόγων.

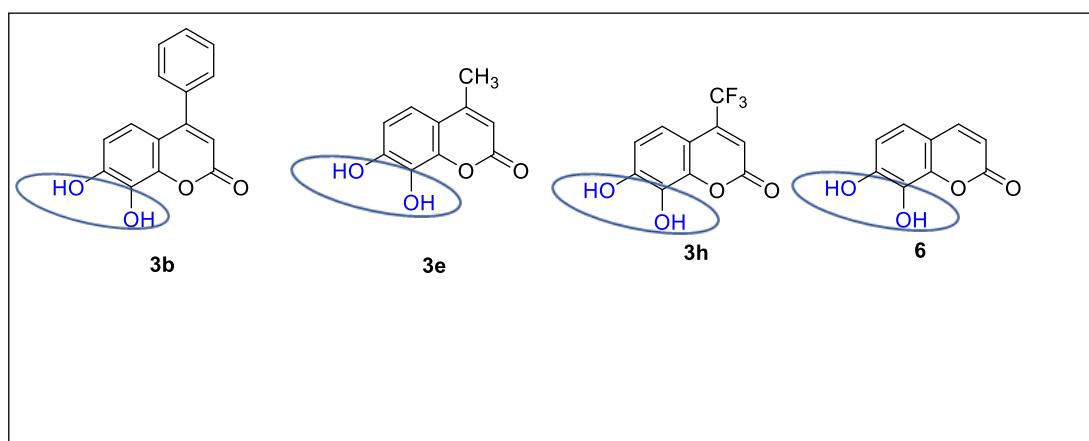
Πίνακας 4. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των νέων κουμαρινικών αναλόγων (n=3).

A/A	Δομή	Ικανότητα αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH 30 min %100μM	Ικανότητα αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH 60 min %100μM	Ικανότητα αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH 30 min IC50(μM)	Ικανότητα αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH 60 min IC50(μM)
3a		10.4 ± 6.4	13.1 ± 6.9	-	-
3b		84.9 ± 1.8	87.4 ± 0.9	13.5 ± 0.3	7.7 ± 0.1
3c		9.0 ± 1.1	10.8 ± 1.1	-	-
3d		1.8 ± 0.7	2.8 ± 0.7	-	-
3e		87.2 ± 0.4	87.8 ± 0.4	5.0 ± 0.6	2.9 ± 0.4

3f		16.7 ± 1.1	29.9 ± 1.5	-	-
3g		6.2 ± 1.1	11.2 ± 1.6	-	-
3h		87.6 ± 0.2	88.1 ± 0.2	5.6 ± 0.1	3.6 ± 0.1
3i		5.1 ± 2.5	6.2 ± 3.6	-	-
6		82.4 ± 2.2	87.0 ± 1.4	18.3 ± 3	9.1 ± 0.1
-	Trolox	82.8 ± 1.0	92.3 ± 0.8	17.1 ± 0.5	9.6 ± 0.7

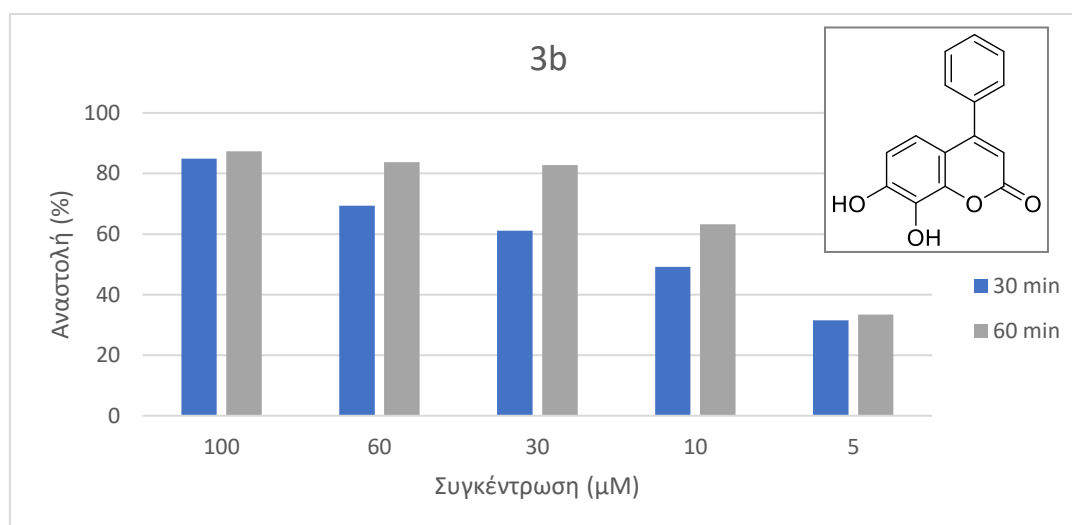
Έπειτα από μελέτη και ανάλυση των αποτελεσμάτων, παρατηρείται ότι τα 7,8-διυδροξυ-κουμαρινικά ανάλογα που συντέθηκαν παρουσιάζουν σημαντική αντιοξειδωτική δράση από τα πρώτα 30 min η οποία ενισχύεται ακόμη περισσότερο μετά τα 60 min. Πιο συγκεκριμένα οι ενώσεις **7,8-διυδροξυ-4-φαιnyλο-κουμαρίνη (3b) (IC<sub>50</sub> =7.7 μM)**, **7,8-διυδροξυ-4-φαιnyλο-κουμαρίνη (3e) (IC<sub>50</sub> =2.9 μM)** και **7,8-διυδροξυ-4-τριφθορομεθυλο-κουμαρίνη (3h) (IC<sub>50</sub> =3.6 μM)** εμφανίζουν ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση τόσο από όλες τις υπόλοιπες ενώσεις που συντέθηκαν όσο και από την ένωση αναφοράς, Trolox (IC<sub>50</sub> = 9.6 μM). Υψηλή ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH παρουσίασε επίσης η φυσική κουμαρίνη δαφνετίνη (**6**) με IC<sub>50</sub> **9.1 μM**. Η ισχυρή αντιοξειδωτική δράση που παρουσιάζουν οι συγκεκριμένες ενώσεις οφείλεται στην παρουσία κατεχολικού συστήματος στην δομή τους, δηλαδή

στην παρουσία της ορθο-διυδροξυ-υποκατάστασης στο φαινολικό δακτύλιο. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία το κατεχολικό σύστημα αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής δράσης των υπό εξέταση μορίων κάτι το οποίο αποτέλεσε εξ αρχής κριτήριο για τον σχεδιασμό και την σύνθεση των συγκεκριμένων ενώσεων. Επιπλέον παρατηρείται ότι η υποκατάσταση στην θέση 4 ευνοεί την αντιοξειδωτική δράση των κουμαρινικών αναλόγων καθώς τα κουμαρινικά ανάλογα **3b**, **3e**, **3h** τα οποία διαθέτουν φαινυλο, μεθυλο και τριφθορομεθυλο υποκοταστάτες στην θέση 4 αντίστοιχα εμφανίζουν ισχυρότερη δράση από το φυσικό προϊόν δαφνετίνη (**6**).

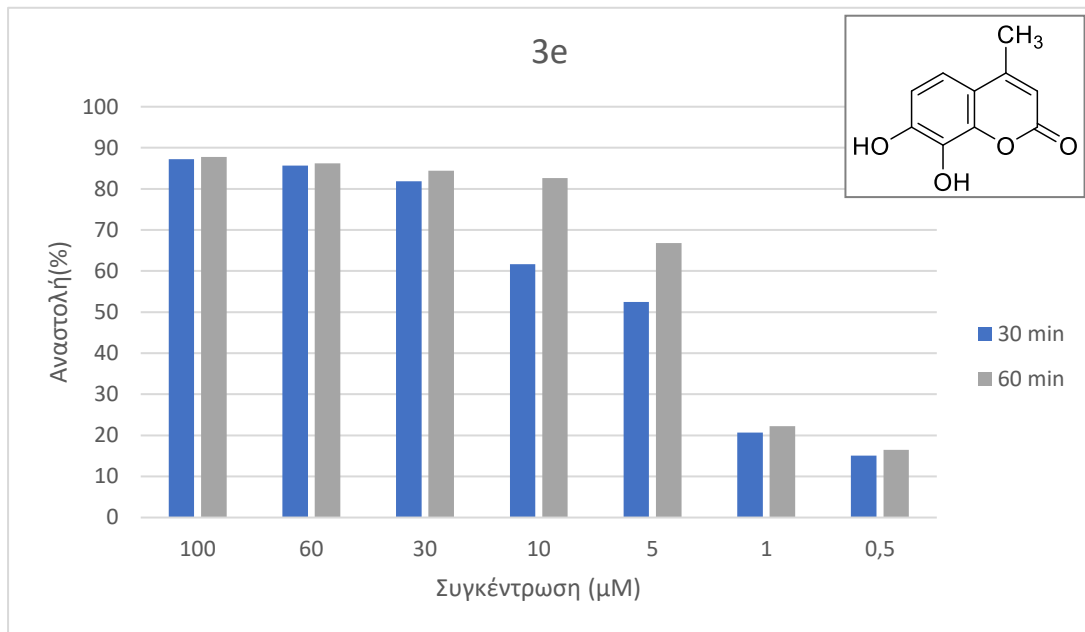


Εικόνα 19. Χημική δομή των κουμαρινικών αναλόγων που διαθέτουν κατεχολικό σύστημα στην δομή τους.

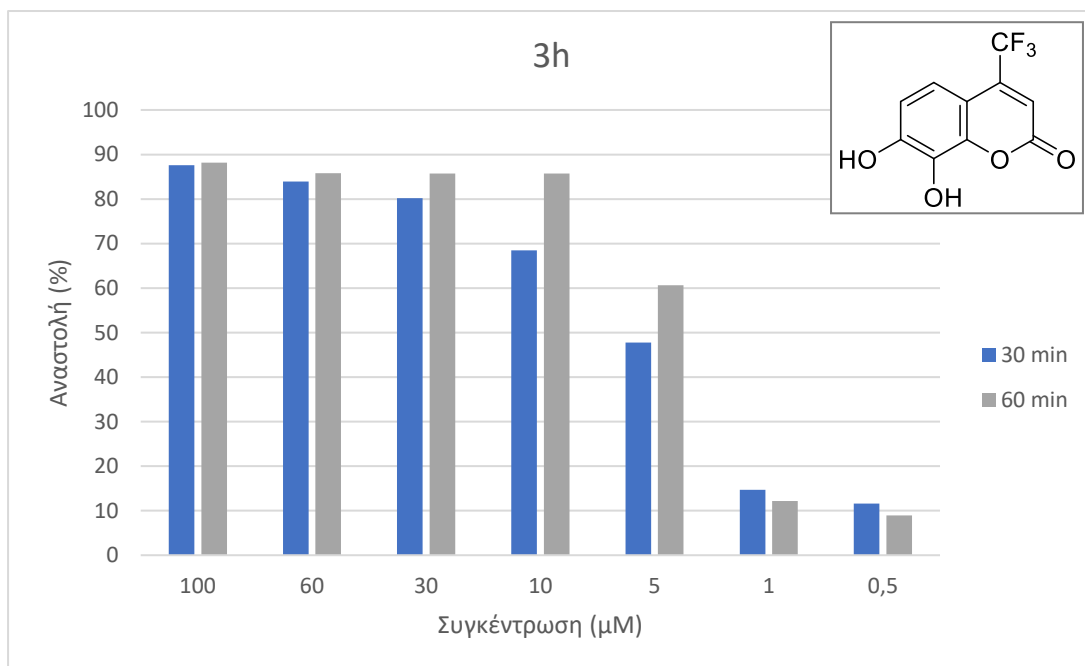
Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται η αναστολή της σταθερής ρίζας DPPH (%) στα 30 min και 60 min των ενώσεων **3b**, **3e** και **3h** για κάθε συγκέντρωση που μελετήθηκε (100, 60, 30, 10, 5, και 0.5  $\mu\text{M}$ ).



Διάγραμμα 1. %Αναστολή της **3b** στα 30 και 60 min



Διάγραμμα 2. %Αναστολή της **3e** στα 30 και 60 min



Διάγραμμα 3. %Αναστολή της **3h** στα 30 και 60 min

## ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΠΟΣΟΤΙΚΩΝ ΣΧΕΣΕΩΝ ΔΟΜΗΣ-ΔΡΑΣΗΣ (QSAR)

### 1. ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ (HUMAN ORAL ABSORPTION, %HOA)

Η επί τοις εκατό απορρόφηση από το στόμα αποτελεί μια από τις σημαντικότερες φαρμακοκινητικές παραμέτρους που μελετώνται αφού αποτελεί τον πιο συχνό και αποδεκτό από τους ασθενείς τρόπο λήψης φαρμάκων ενώ παράλληλα παρουσιάζει πολύ καλή σχέση αποτελεσματικότητας-κόστους. Η απορρόφηση ενός per os φαρμάκου γίνεται κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα ο οποίος παρουσιάζει διαβάθμιση στο pH (πολύ όξινο στο στομάχι, περίπου 5.5 στο λεπτό έντερο και περίπου 7 στο παχύ έντερο). Η γαστρεντερική απορρόφηση ευνοείται σε συγκεκριμένα σημεία στα οποία το φάρμακο βρίσκεται στη μη ιονισμένη του μορφή επομένως για τον προσδιορισμό της λαμβάνονται οι τιμές που αντιστοιχούν στην μέγιστη λιποφιλία. Συγκεκριμένα, τα συντιθέμενα κουμαρινικά παράγωγα που εξετάζονται είναι οξέα, επομένως έχουν μειωμένο ιονισμό σε pH=5.5.

Αρχικά για τον προσδιορισμό της %HOA απαιτείται ο υπολογισμός των φυσικοχημικών ιδιοτήτων που φαίνονται στον πίνακα. Οι παράμετροι logP, logD, MW, TPSA προσδιορίστηκαν με την βοήθεια του προγράμματος MedChem designer ενώ τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου (F<sup>+</sup>, F<sup>-</sup>) τα οποία δηλώνουν το ποσοστό ιονισμού των ενώσεων, προσδιορίστηκαν με την βοήθεια του προγράμματος ADME boxes 3.0.

Πίνακας 5. Φυσικοχημικές Ιδιότητες των κουμαρινικών αναλόγων, σε pH=5,5.

A/A	logP	logD	MW	TPSA	F <sup>+</sup>	F <sup>-</sup>
3a	3.291	3.29	238.244	50.44	0	0.002
3b	3.038	3.037	254,244	70.67	0	0.003
3c	2.903	2.892	254.244	70.67	0	0.006
3d	1.995	1.994	176.173	50.44	0	0.002
3e	1.525	1.525	192.172	70.67	0	0.003
3f	1.561	1.536	192.172	70.67	0	0.006
3g	1.777	1.775	230.144	50.44	0	0.002
3h	1.484	1.48	246.144	70.67	0	0.003
3i	1.399	1.316	246.144	70.67	0	0.006

6	1.2	1.2	178.145	70.67	0	0.003
---	-----	-----	---------	-------	---	-------

Η %HOA υπολογίζεται με εφαρμογή του ακόλουθου τύπου και με αριθμητική αντικατάσταση των δεδομένων του πίνακα 3. [34] Τα αποτελέσματα που προκύπτουν παρουσιάζονται στον πίνακα 6.

$$\%HOA = \frac{100}{1 + 10^{-(\alpha_0 + \alpha_1 \cdot \log D^{best} + \alpha_2 \cdot MW + \alpha_4 \cdot F^+ + \alpha_5 \cdot F^-)}}$$

Όπου:  $\alpha_0 = 1.85 \pm 0.33$ ,  $\alpha_1 = 0.63 \pm 0.07$ ,  $\alpha_2 = -0.006 \pm 0.001$ ,  $\alpha_4 = 0.60 \pm 0.13$ ,  $\alpha_5 = 1.06 \pm 0.2$  και  $N=74$ ,  $R^2=0.755$ ,  $s=11.74$

Πίνακας 6. Ποσοστό απορρόφησης από το στόμα, %HOA, για την εκάστοτε ένωση.

A/A	%HOA
3a	99.7
3b	99.4
3c	99.3
3d	99.1
3e	97.9
3f	97.9
3g	97.5
3h	95.3
3i	94.2
6	97.2

Όπως φαίνεται στον πίνακα 6, όλες οι ενώσεις παρουσιάζουν μεγάλα ποσοστά απορρόφησης από το στόμα. Εξάλλου και οι 10 ενώσεις είναι εντός ορίων στα κριτήρια του Lipinski αφού διαθέτουν μοριακό βάρος μικρότερο του 500, δεν διαθέτουν περισσότερες από 5 θέσεις δοτών δεσμού υδρογόνου, δεν διαθέτουν περισσότερες από 10 θέσεις δεκτών δεσμού υδρογόνου και η θεωρητική τιμή του συντελεστή μερισμού  $\log P$  είναι μικρότερη από 5. Επομένως και τα δέκα κουμαρινικά ανάλογα που εξετάστηκαν μπορούν να θεωρηθούν κατάλληλα για χρήση σε φαρμακευτικά σκευάσματα τα οποία προορίζονται για λήψη εκ της στοματικής κοιλότητας.



Πίνακας 7. Εξέταση των κουμαρινικών αναλόγων με βάση τον κανόνα των 5 του Lipinski.

A/A	logP	MWt	N <sup>o</sup> O,N <sup>a</sup>	N <sup>o</sup> OH,NH <sup>b</sup>
3a	3.29	238.24	3	1
3b	3.04	254.24	4	2
3c	2.90	254.24	4	2
3d	2.00	176.17	3	1
3e	1.53	192.17	4	2
3f	1.56	192.17	4	2
3g	1.78	230.14	3	1
3h	1.48	246.14	4	2
3i	1.40	246.14	4	2
6	1.20	178.15	4	2

<sup>a</sup> αριθμός δεκτών δεσμών υδρογόνου, <sup>b</sup> αριθμός δοτών δεσμών υδρογόνου.

## 2. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗ (% PLASMA PROTEIN BINDING, %PPB)

Για την εξαγωγή του μοντέλου της πρωτεϊνικής σύνδεσης επιλέχθηκε να μελετηθούν 98 φάρμακα ποικίλης δομής (οξέα, βάσεις, ουδέτερα και αμφολυτικά) και ποικίλης φαρμακολογικής δράσης (αντιβιοτικά, αντιφλεγμονώδη κ.α.) τα οποία χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, σε δεδομένα εκμάθησης/training set (για την ανάπτυξη του μοντέλου) και σε δεδομένα ελέγχου/ test set (για την επικύρωση του μοντέλου). Τα δεδομένα εκμάθησης αποτελούν 75 εκ των 98 αρχικών φαρμάκων και παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 8. Αντίστοιχα, τα δεδομένα ελέγχου αποτελούν οι υπόλοιπες 22 ενώσεις οι οποίες μάλιστα έχουν χρησιμοποιηθεί ως ενώσεις ελέγχου και σε παλαιότερες δημοσιεύσεις και επομένως μπορεί να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων.[34],[48] Γενικά ως δεδομένα ελέγχου είναι σημαντικό να επιλέγονται φάρμακα από όλες τις ομάδες και με διαφορετικές φαρμακευτικές ιδιότητες .

Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης χρησιμοποιείται ο λογάριθμος της φαινόμενης σταθεράς συγγένειας (logarithm of the apparent affinity constant),  $\log K$ , η οποία έχει προταθεί από την Klara Valko και τους συνεργάτες της και εκφράζεται από την παρακάτω εξίσωση : [49]

$$\log K = \log \left( \frac{\%PPB}{101 - \%PPB} \right)$$

Όπου, %PPB το ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης του φαρμάκου στο πλάσμα. Επιπλέον ο αριθμός 101 στον παρονομαστή δικαιολογείται από το γεγονός πως η εξίσωση θα πρέπει να μπορεί να χρησιμοποιείται ακόμα και για φάρμακα που παρουσιάζουν 100% πρωτεϊνική σύνδεση.

Πίνακας 8. Training set

Φάρμακο	Κατηγορία <sup>a</sup>	$\log P$	$F^+$	$F^-$	TPSA	$\text{loggitPPBtrain}$
<i>Acetylsalicylic acid</i>	A	1.19	0.000	1000	63.60	-0.026
<i>Albendazole</i>	N	3.29	0.004	0.002	92.31	0.354
<i>Allopurinol</i>	N	-0.55	0.000	0.010	70.14	-1.283
<i>Amitriptyline</i>	B	5.04	0.982	0.000	3.24	1.184
<i>Amoxicillin</i>	A	-1.71	0.000	0.531	158.26	-0.629
<i>Ampicillin</i>	A	-1.13	0.000	0.530	138.03	-0.607
<i>Caffeine</i>	N	-0.07	0.000	0.000	58.44	-0.183
<i>Chlordiazepoxide</i>	N	2.44	0.002	0.000	44.47	1.128
<i>Chlorpheniramine</i>	B	3.39	0.986	0.000	16.13	0.344

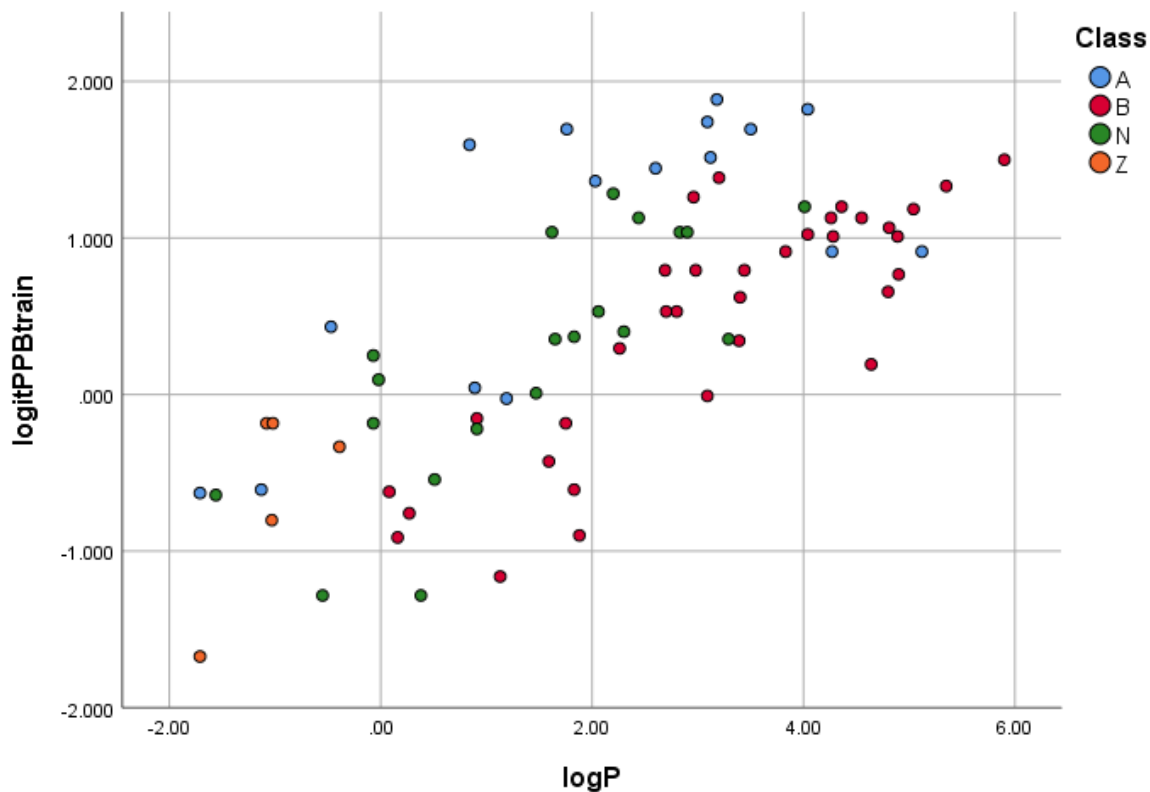
<i>Chlorpromazine</i>	B	5.35	0.991	0.000	31.78	1.331
<i>Ciprofloxacin</i>	Z	-1.08	0.050	0.033	72.88	-0.183
<i>Diphenhydramine</i>	B	3.40	0.965	0.000	12.47	0.621
<i>Diltiazem</i>	B	2.80	0.875	0.000	84.38	0.530
<i>Enoxacin</i>	Z	-1.02	0.051	0.033	85.77	-0.183
<i>Estradiol</i>	N	4.01	0.000	0.001	40.46	1.200
<i>Flunitrazepam</i>	N	2.06	0.000	0.000	81.50	0.530
<i>Fluoxetine</i>	B	4.26	0.997	0.000	21.26	1.128
<i>Haloperidol</i>	B	4.28	0.933	0.000	40.54	1.010
<i>Ibuprofen</i>	A	3.50	0.000	0.999	37.30	1.695
<i>Indomethacin</i>	A	4.27	0.000	0.998	68.53	0.913
<i>Ketoprofen</i>	A	3.12	0.000	0.999	54.37	1.514
<i>Lidocaine</i>	B	2.26	0.779	0.000	32.34	0.295
<i>Losartan</i>	A	3.09	0.000	0.933	92.51	1.741
<i>Mebendazole</i>	N	2.83	0.004	0.002	84.08	1.037
<i>Mefenamic acid</i>	A	5.12	0.000	0.999	49.33	0.913
<i>Nifedipine</i>	N	2.20	0.000	0.000	113.46	1.283
<i>Nortriptyline</i>	B	4.04	0.998	0.000	12.03	1.023
<i>Ofloxacin</i>	Z	-0.39	0.047	0.096	73.32	-0.334
<i>Paracetamol</i>	N	0.51	0.000	0.000	49.33	-0.543
<i>Pentazocine</i>	B	4.64	0.778	0.000	23.47	0.192
<i>Phenobarbital</i>	N	1.47	0.000	0.416	75.27	0.009
<i>Pindolol</i>	B	1.75	0.994	0.000	57.28	-0.183
<i>Piroxicam</i>	A	1.76	0.000	1.000	107.98	1.695
<i>Promethazine</i>	B	4.81	0.989	0.000	31.78	1.065
<i>Propafenone</i>	B	3.20	0.992	0.000	58.56	1.385
<i>Propranolol</i>	B	2.98	0.994	0.000	41.49	0.793
<i>Protriptyline</i>	B	4.89	0.875	0.000	12.03	1.010
<i>Pyrimethamine</i>	B	2.69	0.584	0.000	77.82	0.793
<i>Quinidine</i>	B	3.44	0.946	0.000	45.59	0.793
<i>Sulfamethoxazole</i>	A	0.89	0.000	0.978	106.60	0.043
<i>Tenoxicam</i>	A	0.84	0.000	1.000	136.22	1.595
<i>Terbutaline</i>	B	0.08	0.980	0.000	72.72	-0.621
<i>Theophylline</i>	N	-0.02	0.000	0.000	69.30	0.095
<i>Thioridazine</i>	B	5.90	0.991	0.000	57.08	1.499
<i>Trazodone</i>	N	2.90	0.218	0.000	42.39	1.037
<i>Acyclovir</i>	N	-1.56	0.000	0.009	114.76	-0.642
<i>Amlodipine</i>	B	2.96	0.994	0.000	99.88	1.261
<i>Atenolol</i>	B	0.16	0.994	0.000	84.58	-0.913
<i>Bromazepam</i>	N	1.65	0.000	0.000	54.35	0.354

<i>Naproxen</i>	A	3.18	0.000	0.999	46.53	1.885
<i>Nimesulide</i>	A	2.60	0.000	0.966	112.61	1.445
<i>Norfloxacin</i>	Z	-1.03	0.050	0.033	72.88	-0.802
<i>Trimethoprim</i>	B	0.91	0.469	0.000	105.51	-0.153
<i>Verapamil</i>	B	3.83	0.982	0.000	63.95	0.913
<i>Carbamazepine</i>	N	2.30	0.000	0.000	46.33	0.401
<i>Dexamethazone</i>	N	1.83	0.000	0.000	94.83	0.369
<i>Diclofenac</i>	A	4.04	0.000	0.999	49.33	1.822
<i>Furosemide</i>	A	2.03	0.000	1.000	131.01	1.363
<i>Hydrochlorothiazide</i>	N	-0.07	0.000	0.028	135.12	0.249
<i>Lisinopril</i>	Z	-1.71	0.000	0.001	132.96	-1.673
<i>Metoprolol</i>	B	1.88	0.994	0.000	50.72	-0.900
<i>Ranitidine</i>	B	0.27	0.933	0.000	114.57	-0.758
<i>Labetalol</i>	B	3.09	0.552	0.022	95.58	-0.009
<i>Prednisolone</i>	N	1.62	0.000	0.000	94.83	1.037
<i>Antipyrine</i>	N	0.38	0.000	0.000	23.55	-1.283
<i>Atropine</i>	B	1.83	0.996	0.000	49.77	-0.607
<i>Clonidine</i>	B	1.59	0.779	0.000	36.42	-0.427
<i>Desipramine</i>	B	4.90	0.999	0.000	15.27	0.767
<i>Fluphenazine</i>	B	4.36	0.737	0.000	55.25	1.200
<i>Imipramine</i>	B	4.80	0.991	0.000	6.48	0.657
<i>Nicotine</i>	B	1.13	0.875	0.000	16.13	-1.163
<i>Nitrofurantoin</i>	A	-0.47	0.000	0.473	123.74	0.432
<i>Primidone</i>	N	0.91	0.000	0.000	58.20	-0.220
<i>Promazine</i>	B	4.55	0.991	0.000	31.78	1.128
<i>Rifampicin</i>	B	2.70	0.635	0.041	220.15	0.530

<sup>a</sup> κατηγορία φαρμάκων: οι βάσεις συμβολίζονται με B (base), τα οξέα με A (acid), τα ουδέτερα με N (Neutral) και οι αμφολύτες με Z (Zwitterion).

Για την στατιστική ανάλυση των παραπάνω δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SPSS Statistics 26.0. Η τελική εξίσωση συσχέτισης συνοδεύεται από τον αριθμό των δεδομένων (n), τον συντελεστή συσχέτισης ( $R^2$ ), την τυπική απόκλιση (s), και το F-test για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%.

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η συσχέτιση του  $\log K_{PPB,training}$  με το  $\log P$ .



Διάγραμμα 4. Συσχέτιση του  $\log K_{PPB, training}$  με το  $\log P$

Η εξίσωση συσχέτισης προκύπτει μέσω Γραμμικής Παλινδρόμησης (Linear Regression) και δίνεται από την σχέση:

$$\log K = 0.417(\pm 0.039) \cdot \log P + 0.439(\pm 0.138) \cdot F^- + 0.005(\pm 0.002) \cdot TPSA - 0.437(\pm 0.170) \cdot F^+ - 0.683(\pm 0.185)$$

$$(N=75, R^2=0.706, s=0.481, F=42.0)$$

Για την επικύρωση του μοντέλου χρησιμοποιούνται τα 22 φάρμακα του test set. Αρχικά υπολογίζεται η %PPB του κάθε φαρμάκου από την εξίσωση και ακολούθως συγκρίνεται με την πειραματική τιμή που υπάρχει ως δεδομένο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9. Δεδομένα ελέγχου (test set).

A/A	Φάρμακο	Πειραματική τιμή (%)	Τιμή που προβλέπει το μοντέλο (%)
1.	Ceftriaxone	95.0	77.6
2.	Chloramphenicol	54.0	68.7
3.	Cimetidine	18.5	44.9
4.	Cinoxacin	66.5	83.8
5.	Hydrocortisone	95.0	72.8
6.	Isoxicam	96.0	97.8
7.	Levofloxacin	32.3	27.1
8.	Lornoxicam	99.0	97.6
9.	Meloxicam	99.3	98.7
10.	Methylprednisolone	77.3	79.2
11.	Metoclopramide	33.3	66.9
12.	Minoxidil	0.0	65.0
13.	Nadolol	30.0	28.4
14.	Nalidixic acid	93.0	82.2
15.	Niflumic acid	90.0	100.0
16.	Omeprazole	95.0	85.3
17.	Pipemidic acid	30.0	6.8
18.	Piperacillin	19.0	86.8
19.	Salicylic acid	95.0	91.0
20.	Sulpiride	14.0	30.8
21.	Vancomycin	43.3	100.0
22.	Warfarin	98.8	94.0

Θεωρώντας βάση επιτυχίας μια διαφορά μέχρι 20% μεταξύ των δυο ποσοστών οι σκιασμένες τιμές του πίνακα 9 αποτελούν τις αποτυχημένες προβλέψεις. Επομένως,

από τα 22 φάρμακα, τα 15 έδειξαν αποδεκτές τιμές %PPB και άρα το ποσοστό επιτυχίας του μοντέλου είναι 68.18%.

Για την εφαρμογή του παραπάνω μοντέλου και τον υπολογισμό της %PPB των νέων κουμαρινικών αναλόγων όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 11, χρειάστηκε αρχικά ο υπολογισμός των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του πίνακα 10. Σε αυτή την περίπτωση οι φυσικοχημικές ιδιότητες υπολογίστηκαν για pH=7.40 (pH του πλάσματος). Όπως αναφέρεται και πιο πάνω οι παράμετροι logP, logD, MW, TPSA προσδιορίστηκαν με την βοήθεια του προγράμματος MedChem designer ενώ τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου (F<sup>+</sup>, F<sup>-</sup>) προσδιορίστηκαν με την βοήθεια του προγράμματος ADME boxes 3.0.

Πίνακας 10. Φυσικοχημικές Ιδιότητες των κουμαρινικών αναλόγων, σε pH=7,4.

A/A	logP	logD	MW	TPSA	F <sup>+</sup>	F <sup>-</sup>
3a	3.291	3.252	238.244	50.44	0	0.125
3b	3.038	3.008	254.244	70.67	0	0.184
3c	2.903	2.413	254.244	70.67	0	0.311
3d	1.995	1.928	176.173	50.44	0	0.125
3e	1.525	1.486	192.172	70.67	0	0.184
3f	1.561	0.807	192.172	70.67	0	0.311
3g	1.777	1.628	230.144	50.44	0	0.125
3h	1.484	1.259	246.144	70.67	0	0.184
3i	1.399	0.236	246.144	70.67	0	0.311
6	1.2	1.159	178.145	70.67	0	0.184

Πίνακας 11. Ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης (% PPB) για την εκάστοτε ένωση.

A/A	%PPB
3a	91.7
3b	92.2
3c	92.1
3d	74.8
3e	71.6
3f	74.9
3g	70.6
3h	70.8

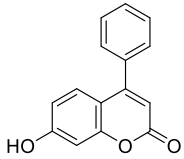
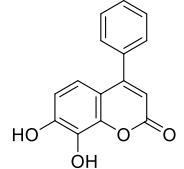
3i	71.8
6	64.7

Όπως φαίνεται στον πίνακα 11 όλα τα κουμαρινικά ανάλογα που εξετάστηκαν παρουσιάζουν σχετικά μεγάλα ποσοστά πρωτεϊνική σύνδεσης (%PPB). Τα μεγαλύτερα ποσοστά πρωτεϊνικής σύνδεσης φαίνεται να αναπτύσσουν τα 4-φαινυλο-κουμαρινικά παράγωγα (**3a**, **3b**, **3c**), οι ενώσεις δηλαδή με την μεγαλύτερη λιποφιλία ενώ η δαφνετίνη (**6**), η ένωση με την μικρότερη λιποφιλία παρουσιάζει αντίστοιχα και το μικρότερο ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης. Εξ άλλου είναι γνωστό από την θεωρία ότι η υψηλή λιποφιλία ενός φαρμάκου σχετίζεται σημαντικά με την υψηλή σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Για τα φάρμακα με υψηλή πρωτεϊνική σύνδεση όπως οι ενώσεις που εξετάζουμε, ισχύουν τα ακόλουθα:

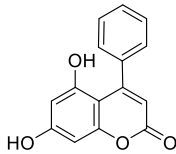
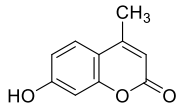
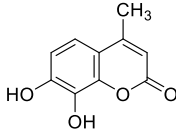
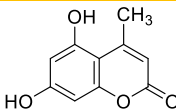
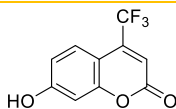
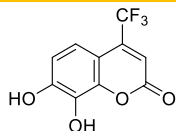
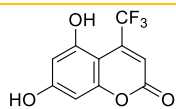
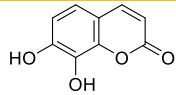
- i. Διευκολύνεται η απορρόφηση όσων φαρμάκων απορροφούνται με διάχυση.
- i. Μειώνεται το κλάσμα του ελεύθερου φαρμάκου που μπορεί να διαχυθεί τελικά στους ιστούς και έτσι μειώνεται η φαρμακολογική αποτελεσματικότητα μιας συγκεκριμένης δόσης.
- ii. Επηρεάζεται η απομάκρυνση του φαρμάκου από το οργανισμό αφού επιβραδύνεται ο μεταβολισμός και η νεφρική του απέκκριση κάτι το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε κίνδυνο άθροισης του φαρμάκου και εμφάνιση τοξικότητας

Με βάση όλα τα παραπάνω προκύπτει ο συγκεντρωτικός πίνακας (Πίνακας 11) με τα αποτελέσματα για τα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά όλων των ενώσεων που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία:

Πίνακας 12. Φαρμακοκινητικές ιδιότητες των μελετώμενων κουμαρινικών αναλόγων.

Ενώσεις	Δομή	%HOA	%PPB
3a		99.7	91.7
3b		99.4	92.2

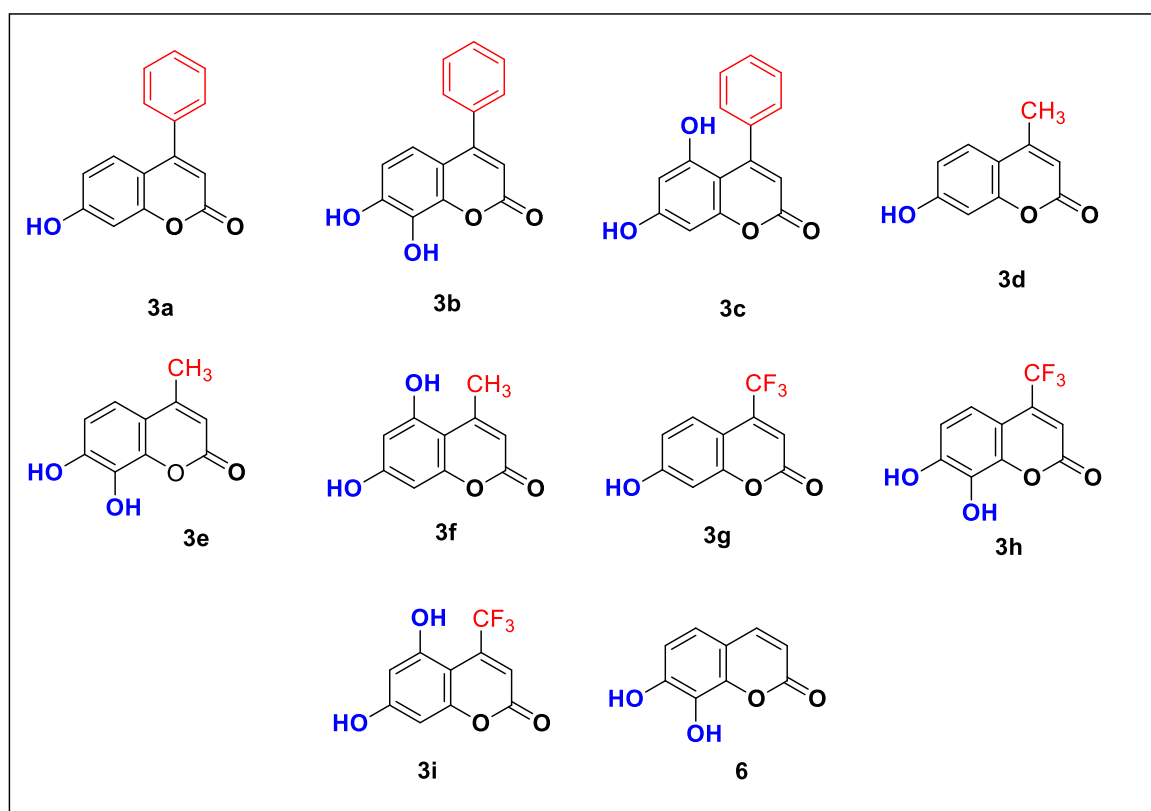


<b>3c</b>		99.3	92.1
<b>3d</b>		99.1	74.8
<b>3e</b>		97.9	71.6
<b>3f</b>		97.9	74.9
<b>3g</b>		97.5	70.6
<b>3h</b>		95.3	70.8
<b>3i</b>		94.2	71.8
<b>6</b>		97.2	64.7

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα κουμαρινικά παράγωγα είναι ευρέως διαδεδομένα στην φύση ως δευτερογενείς μεταβλητές που προέρχονται κυρίως από φυτά και τα τελευταία χρόνια έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας λόγω των ποικίλων βιολογικών-φαρμακευτικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν όπως είναι η αντιοξειδωτική, η αντιφλεγμονώδης και η αντικαρκινική δράση. Για το λόγο αυτό η δομική τροποποίηση του κουμαρινικού σκελετού τους με σκοπό την ενίσχυση των βιολογικών τους δράσεων αποτελεί πολύ σημαντικό τμήμα του κλάδου της Χημείας Φυσικών Προϊόντων.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός, η σύνθεση, ο χαρακτηρισμός και η χρωματογραφική μελέτη δέκα κατάλληλα δομικά τροποποιημένων κουμαρινικών παραγώγων, τα οποία ταυτοποιήθηκαν και ελέγχθηκαν ως προς την καθαρότητά τους μέσω Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού  $^1\text{H}$  NMR. Και τα δέκα συντιθέμενα κουμαρινικά παράγωγα, που αποτελούν ανάλογα φυσικών προϊόντων, συντέθηκαν σε ικανοποιητικές αποδόσεις από 20% έως 70%, μέσω του μηχανισμό "Pechmann".

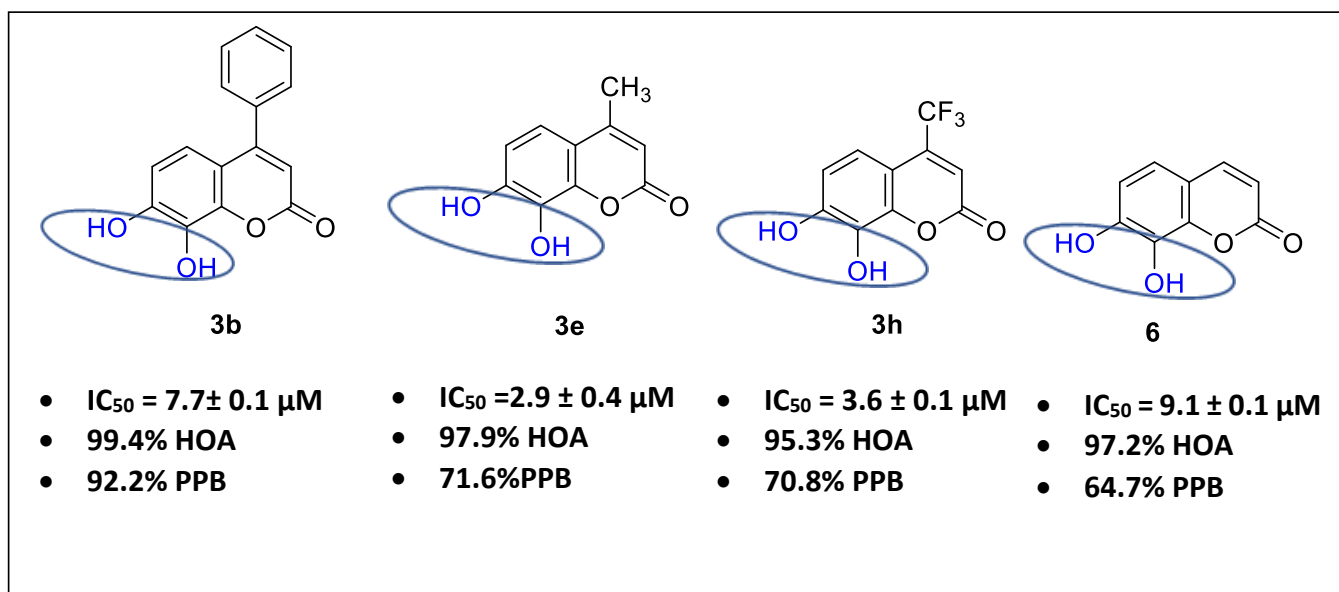


Εικόνα 20. Δομικά τροποποιημένα κουμαρινικά ανάλογα που συντέθηκαν.

Στη συνέχεια τα κουμαρινικά παράγωγα αξιολογήθηκαν *in vitro* για την αντιοξειδωτική τους δράση σύμφωνα με την τεχνική δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH. Έπειτα από μελέτη και ανάλυση των αποτελεσμάτων, παρατηρήθηκε ότι οι ενώσεις **3b** ( $IC_{50} = 7.7 \mu M$ ), **3e** ( $IC_{50} = 2.9 \pm 0.4 \mu M$ ) και **3h** ( $IC_{50} = 3.6 \pm 0.1 \mu M$ ) εμφανίζουν εξαιρετική ικανότητα δέσμευσης της ρίζας DPPH, εξαιτίας του κατεχολικού συστήματος που διαθέτουν.

Ακολούθως, τα συντιθέμενα κουμαρινικά παράγωγα αξιολογήθηκαν για την προβλεπόμενη συμπεριφορά τους ως δραστικές ουσίες φαρμακευτικών ενώσεων. Μέσω ποσοτικών σχέσεων δομής-δράσης που αναπτύχθηκαν, εκτιμήθηκε το ποσοστό απορρόφησης της εκ του στόματος πρόσληψής τους (%HOA) και το ποσοστό κατακράτησης από τις πρωτεΐνες του πλάσματος (%PPB). Και τα δέκα κουμαρινικά παράγωγα παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό όσο αφορά την σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος (64.7% - 92.2%). Επιπλέον, όλες οι ενώσεις που εξετάστηκαν παρουσιάζουν πολύ μεγάλα ποσοστά απορρόφησης από το στόμα (94.2% - 99.7%) και επομένως θεωρούνται κατάλληλες για χρήση σε φαρμακευτικά σκευάσματα τα οποία προορίζονται για λήψη εκ της στοματικής κοιλότητας.

Συμπερασματικά, οι ενώσεις που πιθανόν θα παρουσιάζουν την καλύτερη συμπεριφορά για τη χρήση τους ως δραστικές ουσίες σε φαρμακευτικά σκευάσματα, φαίνεται να είναι οι **3b**, **3e**, **3h** και **6** καθώς εμφανίζουν αρκετά ικανοποιητικές φαρμακοκινητικές ιδιότητες σε συνδυασμό με την εξαιρετική αντιοξειδωτική τους δράση.



## ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μελέτη των νέων κουμαρινικών αναλόγων που συντέθηκαν κατά την διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι πολύ ενθαρρυντικά και οδηγούν στην περαιτέρω μελέτη των μορίων αυτών. Μελλοντικοί πειραματικοί στόχοι που θα μπορούσαν να αποτελέσουν συνέχεια της παρούσας εργασίας είναι οι εξής:

- Η αξιολόγηση της βιολογικής δράσης με περισσότερες *in vitro* μεθόδους, π.χ. αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης ως ένδειξη αντιοξειδωτικής δράσης, του ενζύμου της λιποξυγονάσης ως ένδειξη αντιφλεγμονώδους δράσης καθώς και του ενζύμου τυροσινάσης, η οποία σχετίζεται με την ανάπτυξη μελανών κηλίδων στο δέρμα.
- Η διερεύνηση εναλλακτικών συνθετικών πορειών, πιο φιλικών προς το περιβάλλον, οι οποίες θα εξασφαλίσουν ταυτόχρονα και μεγαλύτερες αποδόσεις σύνθεσης. Τέτοια παραδείγματα είναι η χρήση διαλυτών με «πράσινο» χαρακτήρα όπως τα ιοντικά υγρά αλλά και η σύνθεση με μικροκυματική ακτινοβολία.
- Η διερεύνηση για περαιτέρω δομική τροποποίηση σε διάφορες θέσεις του κουμαρινικού σκελετού κάτι το οποίο θα μπορούσε να οδηγήσει σε χρήσιμα συμπεράσματα ως προς την σχέση δομής-βιολογικής δράσης των κουμαρινικών παραγώγων.
- Η μελέτη του εγκλεισμού των κουμαρινικών αναλόγων με το καλύτερο προφίλ βιοδραστικότητας, με στόχο την ελεγχόμενη απελευθέρωση τους και πιθανή βελτίωση της βιολογικής τους δράσης.
- Η αξιοποίηση της Βιομημητικής Χρωματογραφίας Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane, IAM), για τον πειραματικό προσδιορισμό του παράγοντα συγκράτησης  $\log k_w$ , και κατ' επέκταση χρήση του αντίστοιχου μοντέλου πρόβλεψης για το προσδιορισμό του %HOA.
- Η αξιοποίηση της Βιομημητικής Χρωματογραφίας Ακίνητοποιημένων Πρωτεϊνών (Immobilized Protein Chromatography, IPC), για τον πειραματικό προσδιορισμό του παράγοντα συγκράτησης  $\log k_{10}$ , και κατ' επέκταση χρήση του αντίστοιχου μοντέλου πρόβλεψης για τον προσδιορισμό του %PPB.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Chin, Y. W., Balunas, M. J., Chai, H. B., & Kinghorn, A. D. (2006). Drug discovery from natural sources. *The AAPS journal*, 8(2), E239-E253.
2. Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Latha, L. Y. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African journal of traditional, complementary and alternative medicines*, 8(1).
3. Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.
4. Srikrishna, D., Godugu, C., & Dubey, P. K. (2018). A review on pharmacological properties of coumarins. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 18(2), 113-141.
5. Egan, D., O'kenney, R., Moran, E., Cox, D., Prosser, E., & Thornes, R. D. (1990). The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug metabolism reviews*, 22(5), 503-529.
6. Smyth, T., Ramachandran, V. N., & Smyth, W. F. (2009). A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *International journal of antimicrobial agents*, 33(5), 421-426.
7. Rao, V., & Rao, L. (Eds.). (2015). *Phytochemicals: isolation, characterisation and role in human health*. BoD—Books on Demand.
8. Asif, M. (2015). Pharmacological activities and phytochemistry of various plant containing coumarin derivatives. *Current Science Perspectives*, 1(3), 77-90.
9. Venugopala, K. N., Rashmi, V., & Odhav, B. (2013). Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *BioMed research international*, 2013.
10. Detsi, A., Kontogiorgis, C., & Hadjipavlou-Litina, D. (2017). Coumarin derivatives: an updated patent review (2015-2016). *Expert opinion on therapeutic patents*, 27(11), 1201-1226.
11. Kadhum, A. A. H., Al-Amiery, A. A., Musa, A. Y., & Mohamad, A. B. (2011). The antioxidant activity of new coumarin derivatives. *International journal of molecular sciences*, 12(9), 5747-5761.

12. Γιαννακοπούλου, Ε. (2009). Οξειδωτικό stress–αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί. *Αρχαία Ελληνικής Ιατρικής*, 26(1), 23-35.
13. Παπαγαλάνης, Ν. (2014). Οξειδωτικό στρες και ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα Ι. Δραστικές ρίζες οξυγόνου-Oxidative stress and the endogenous antioxidant system. I. Reactive oxygen species. *Ελληνική Νεφρολογία-Hellenic Nephrology*, 26(3).
14. Borges Bubols, G., da Rocha Vianna, D., Medina-Remon, A., von Poser, G., Maria Lamuela-Raventos, R., Lucia Eifler-Lima, V., & Cristina Garcia, S. (2013). The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 13(3), 318-334.
15. Bansal, Y., Sethi, P., & Bansal, G. (2013). Coumarin: a potential nucleus for anti-inflammatory molecules. *Medicinal Chemistry Research*, 22(7), 3049-3060.
16. Hadjipavlou-Litina, D. J., Litinas, K. E., & Kontogiorgis, C. (2007). The anti-inflammatory effect of coumarin and its derivatives. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents)*, 6(4), 293-306.
17. Grötz, K. A., Wüstenberg, P., Kohnen, R., Al-Nawas, B., Henneicke-von Zepelin, H. H., Bockisch, A., ... & Wagner, W. (2001). Prophylaxis of radiogenic sialadenitis and mucositis by coumarin/troxerutine in patients with head and neck cancer—a prospective, randomized, placebo-controlled, double-blind study. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 39(1), 34-39.
18. Yang, D., Gu, T., Wang, T., Tang, Q., & Ma, C. (2010). Effects of osthole on migration and invasion in breast cancer cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 74(7), 1430-1434.
19. Miri, R., Nejati, M., Saso, L., Khakdan, F., Parshad, B., Mathur, D., ... & Firuzi, O. (2016). Structure–activity relationship studies of 4-methylcoumarin derivatives as anticancer agents. *Pharmaceutical biology*, 54(1), 105-110.
20. Ikura, H., Hyoudoh, I., Aoki, T., Furuichi, N., Matsushita, M., Watanabe, F., ... & Harada, N. (2011). U.S. Patent No. 7,897,792. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

21. Fais, A., Corda, M., Era, B., Fadda, M. B., Matos, M. J., Santana, L., ... & Delogu, G. (2009). Tyrosinase inhibitor activity of coumarin-resveratrol hybrids. *Molecules*, *14*(7), 2514-2520.
22. Chang, T. S. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *International journal of molecular sciences*, *10*(6), 2440-2475.
23. Molnar, M., Lončarić, M., & Kovač, M. (2020). Green chemistry approaches to the synthesis of coumarin derivatives. *Current Organic Chemistry*, *24*(1), 4-43.
24. Daru, J., & Stirling, A. (2011). Mechanism of the Pechmann reaction: a theoretical study. *The Journal of organic chemistry*, *76*(21), 8749-8755.
25. Heravi, M. M., Khaghaninejad, S., & Mostofi, M. (2014). Pechmann reaction in the synthesis of coumarin derivatives. *Advances in heterocyclic chemistry*, *112*, 1-50.
26. Laufer, M. C., Hausmann, H., & Hölderich, W. F. (2003). Synthesis of 7-hydroxycoumarins by Pechmann reaction using Nafion resin/silica nanocomposites as catalysts. *Journal of Catalysis*, *218*(2), 315-320.
27. Shaterian, H. R., & Aghakhanizadeh, M. (2013). Ionic-liquid-catalyzed green synthesis of coumarin derivatives under solvent-free conditions. *Chinese Journal of Catalysis*, *34*(9), 1690-1696.
28. Tian, G., Zhang, Z., Li, H., Li, D., Wang, X., & Qin, C. (2020). Design, synthesis and application in analytical chemistry of photo-sensitive probes based on coumarin. *Critical reviews in analytical chemistry*, 1-17.
29. Li, X., Chen, A., Zhou, Y., Huang, L., Fang, Z., Gan, H., & Guo, K. (2015). Two-stage flow synthesis of coumarin via O-acetylation of salicylaldehyde. *Journal of Flow Chemistry*, *5*(2), 82-86.
30. <https://www.pfizer.gr/>
31. Βασίλης Δημόπουλος, Άννα Τσαντίλη-Κακουλίδου. (2015). Βασικές Αρχές Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Φαρμάκων.
32. Φώτης Τσόπελας. 2019. Φαρμακευτική Χημεία και Τεχνολογία [Εργαστηριακός Οδηγός].

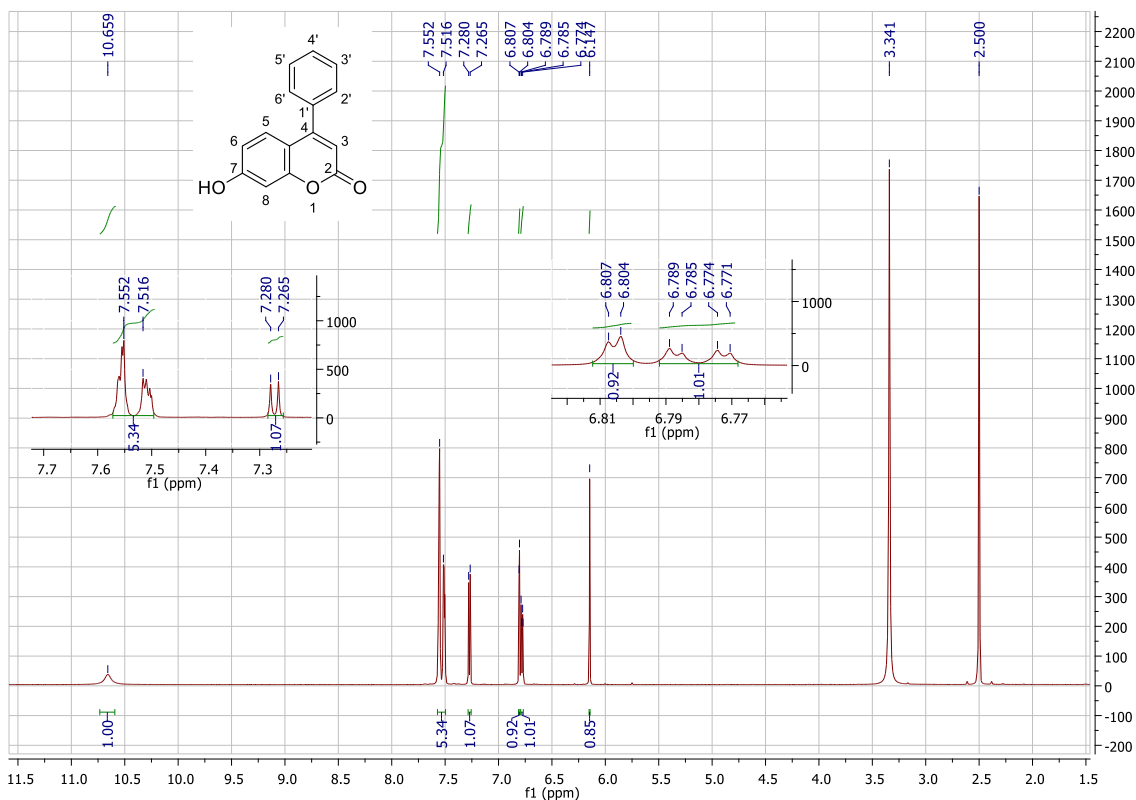
33. Βασίλης Δημόπουλος, **2013**. Επισημάνσεις Χημικής Βιολογίας στην Φαρμακοχημεία.
34. Tsopelas, F., Vallianatou, T., & Tsantili-Kakoulidou, A. (**2016**). The potential of immobilized artificial membrane chromatography to predict human oral absorption. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *81*, 82-93.
35. Čudina, O., Marković, B., Karljiković-Rajić, K., & Vladimirov, S. (**2012**). Biopartitioning micellar chromatography-partition coefficient micelle/water as a potential descriptor for hydrophobicity in prediction of oral drug absorption. *Analytical letters*, *45*(7), 677-688.
36. Μ.Μαρσέλος, (**2015**). ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ, Μηχανισμοί δράσης των φαρμάκων.
37. Ghafourian, T., & Amin, Z. (**2013**). QSAR models for the prediction of plasma protein binding. *BioImpacts: BI*, *3*(1), 21.
38. John McMurry. (**2015**). “Οργανική Χημεία” Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
39. Παππά Α. “Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης, Χρωματογραφικές, Θερμικές, Ηλεκτρομετρικές, Φασματομετρίας Μάζας.” Εκδόσεις ΕΜΠ; 2004.
40. Olmedo, D. A., López-Pérez, J. L., Del Olmo, E., Bedoya, L. M., Sancho, R., Alcamí, J., ... & Gupta, M. P. (2017). Neoflavonoids as inhibitors of HIV-1 replication by targeting the tat and NF-κB pathways. *Molecules*, *22*(2), 321.
41. Bahramnezhad, B., Ghazanfari, D., Sheikhsosseini, E., Akhgar, M. R., & Ahmadi, S. A. (2020). MnSb<sub>2</sub>O<sub>6</sub>-chitosan nanocomposite: An efficient catalyst for the synthesis of coumarins via Pechmann reaction. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, *57*(1), 173-181.
42. Kissin, Y. V., Brandolini, A. J., & Garlick, J. L. (**2008**). Kinetics of ethylene polymerization reactions with chromium oxide catalysts. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, *46*(16), 5315-5329.
43. Guerrero, T., Vázquez-Ortega, F., Lagunes, I., Ortiz-Blanco, E., Sosa-Ortiz, G., Tovar-Miranda, R., ... & Trigos, Á. (2021). Antagonistic activity of



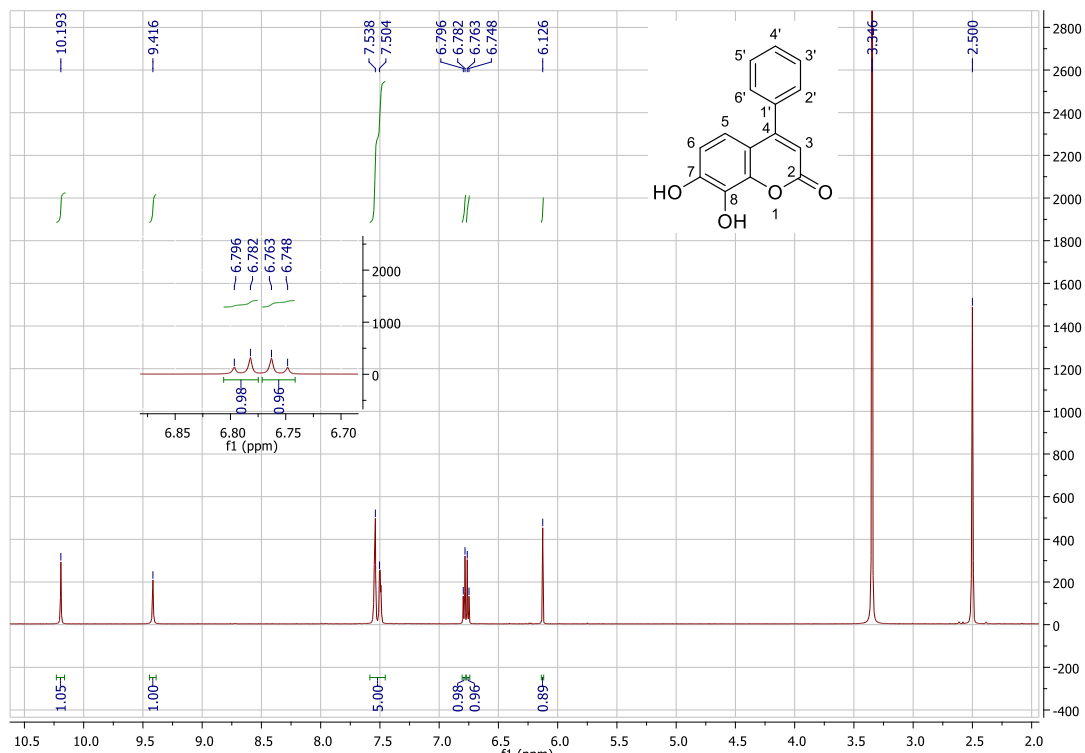
hydroxycoumarin-based antioxidants as possible singlet oxygen precursor photosensitizers. *Dyes and Pigments*, 192, 109447.

44. Wang, H. (2013). Magnesium bis (trifluoromethane) sulfonimide: An efficient catalyst for the synthesis of coumarins under solvent-free conditions. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 144(3), 411-414.
45. Bayer, V., Pastor, R., & Cambon, A. (1982). Synthèse et étude spectrale de F-alkyl-4 coumarines. *Journal of Fluorine Chemistry*, 20(2), 187-202.
46. Shimomura, H., SASHIDA, Y., & OHSHIMA, Y. (1980). The chemical components of *Artemisia apiacea* Hance. II. More coumarins from the flower heads. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 28(1), 347-348.
47. Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*, 48(4), 412-422.
48. Tsopelas, F., Danias, P., Pappa, A., & Tsantili-Kakoulidou, A. (2020). Biopartitioning micellar chromatography under different conditions: Insight into the retention mechanism and the potential to model biological processes. *Journal of Chromatography A*, 1621, 461027.
49. Valko, K., Nunhuck, S., Bevan, C., Abraham, M. H., & Reynolds, D. P. (2003). Fast gradient HPLC method to determine compounds binding to human serum albumin. Relationships with octanol/water and immobilized artificial membrane lipophilicity. *Journal of pharmaceutical sciences*, 92(11), 2236-2248.

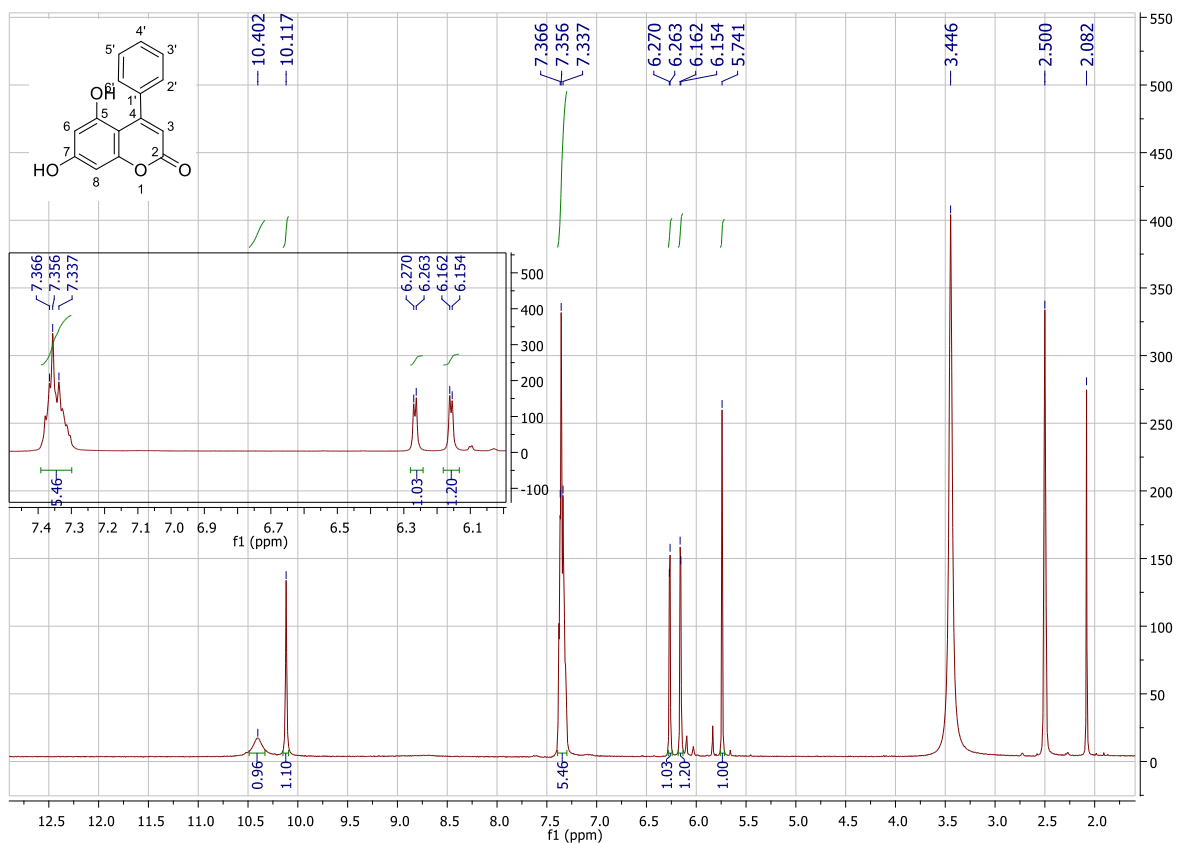
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ



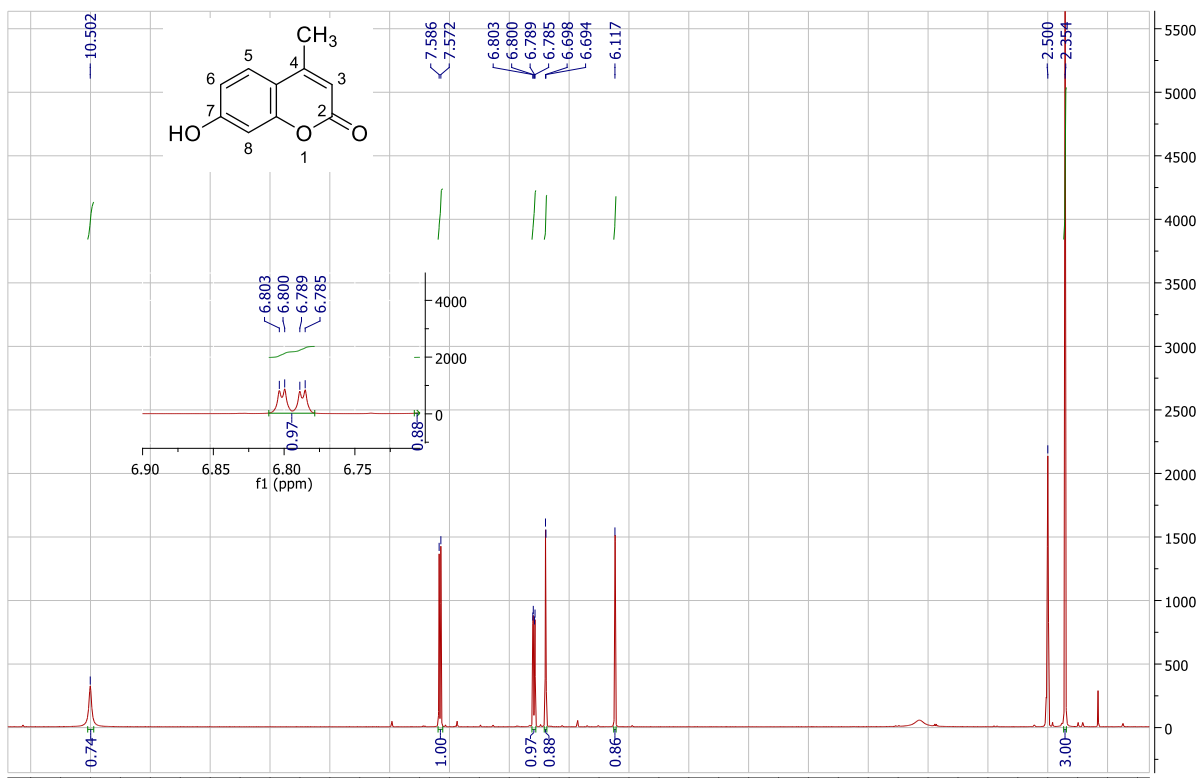
Εικόνα 21. Φάσμα  $^1\text{H NMR}$  της 7-υδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης (3a).



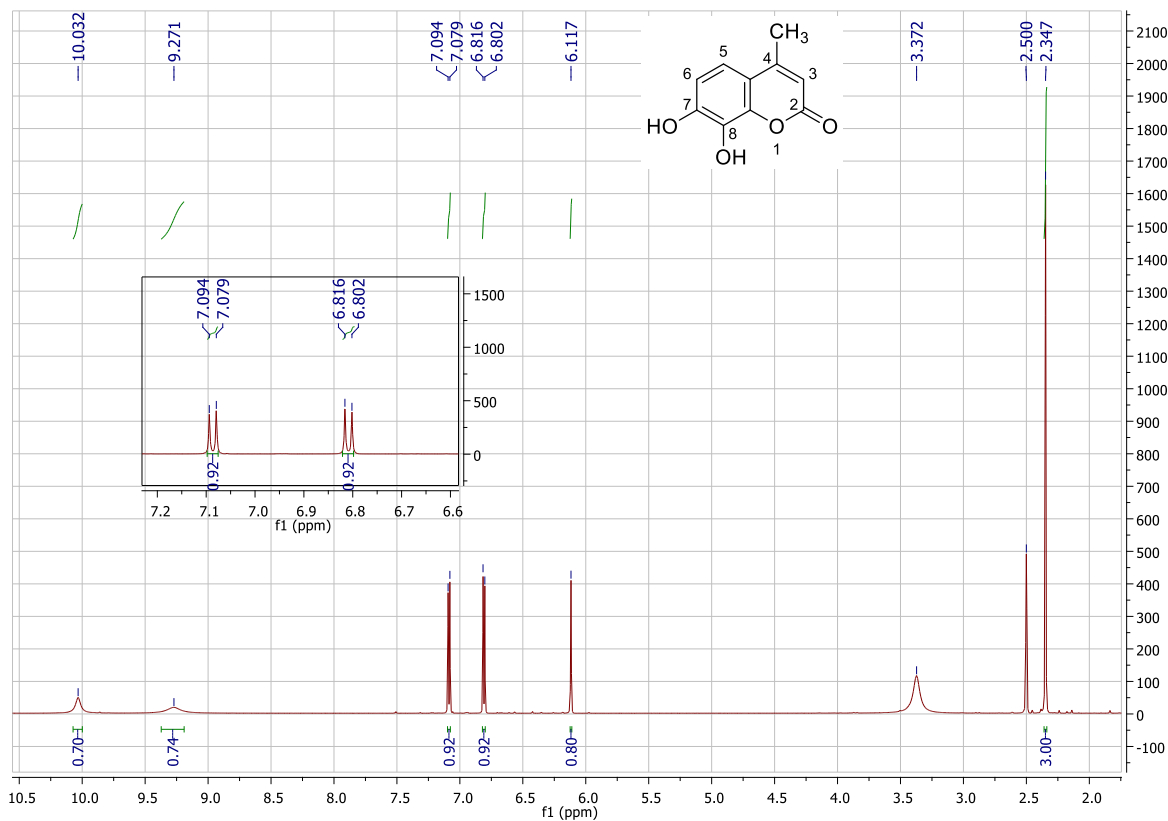
Εικόνα 22. Φάσμα  $^1\text{H NMR}$  της 7,8-διυδροξυ-4-φαινυλο-κουμαρίνης (3b).



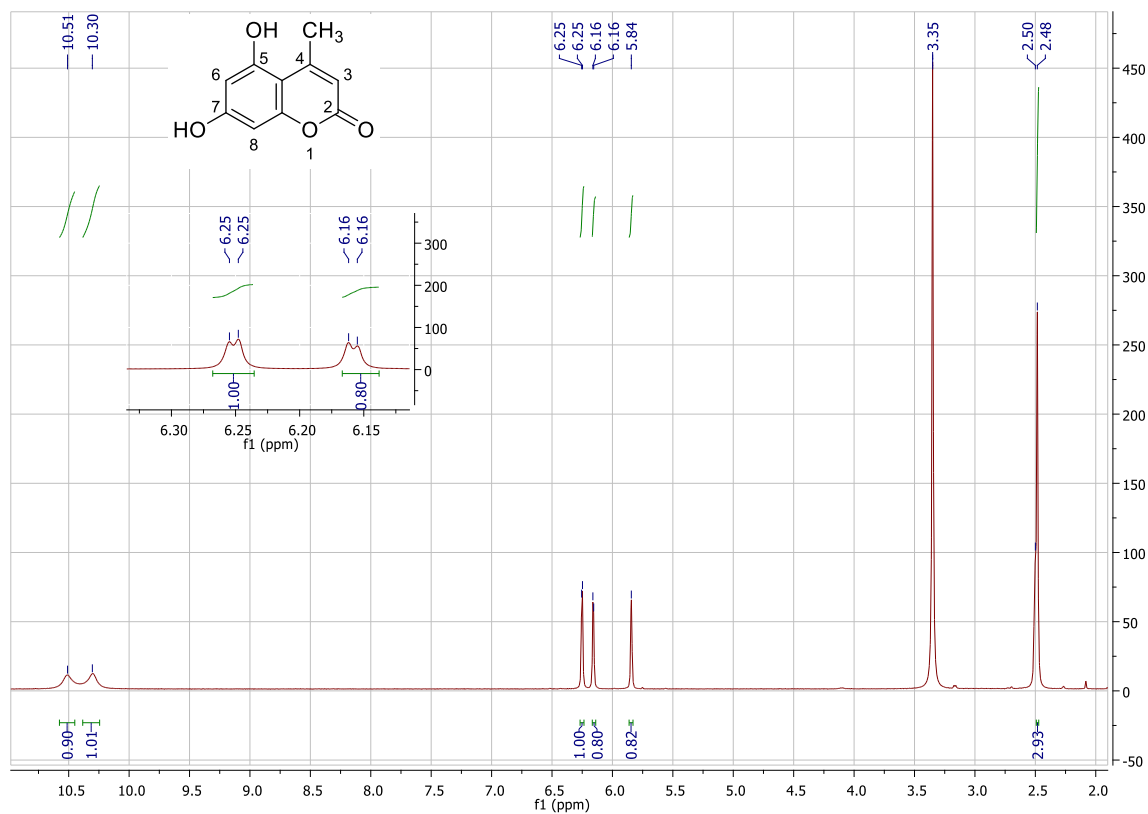
Εικόνα 23. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της 7,8-διυδροxy-4-φαιnyλο-κουμαρίνης (3c).



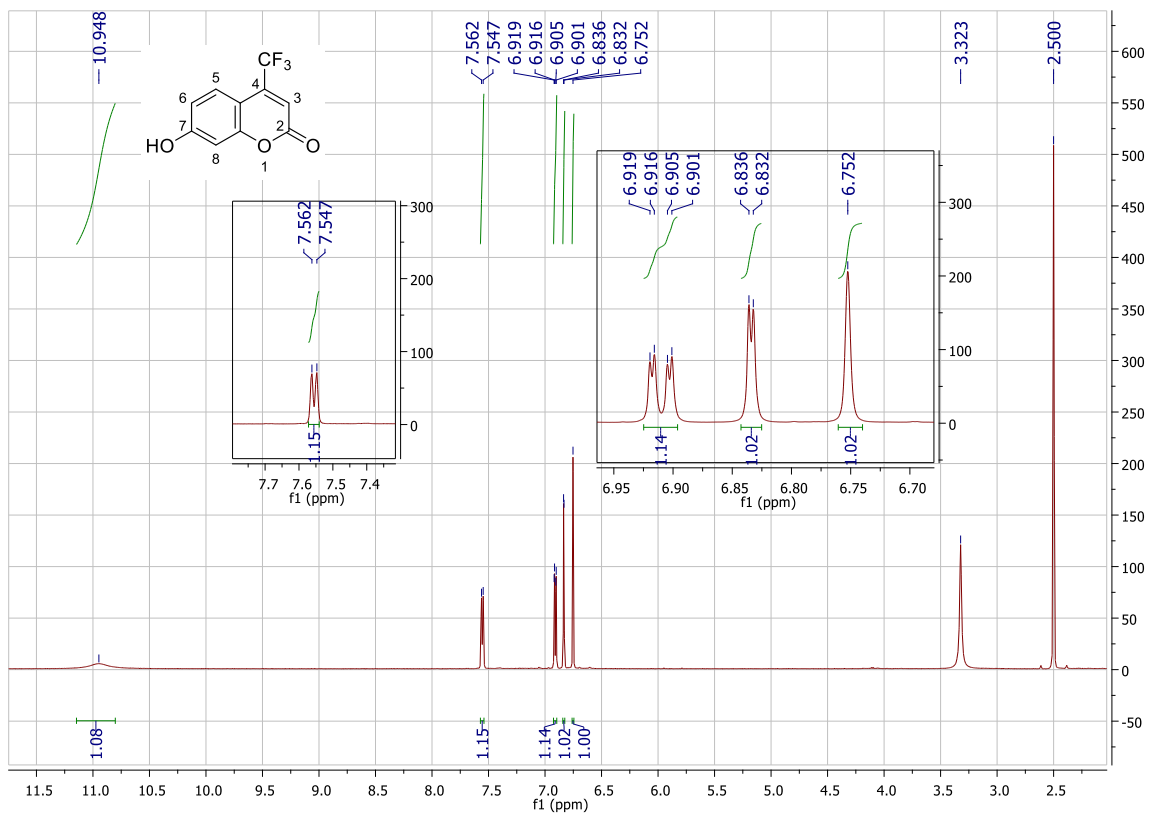
Εικόνα 24. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της 7-υδροxy-4-μεθυλο-κουμαρίνης (3d).



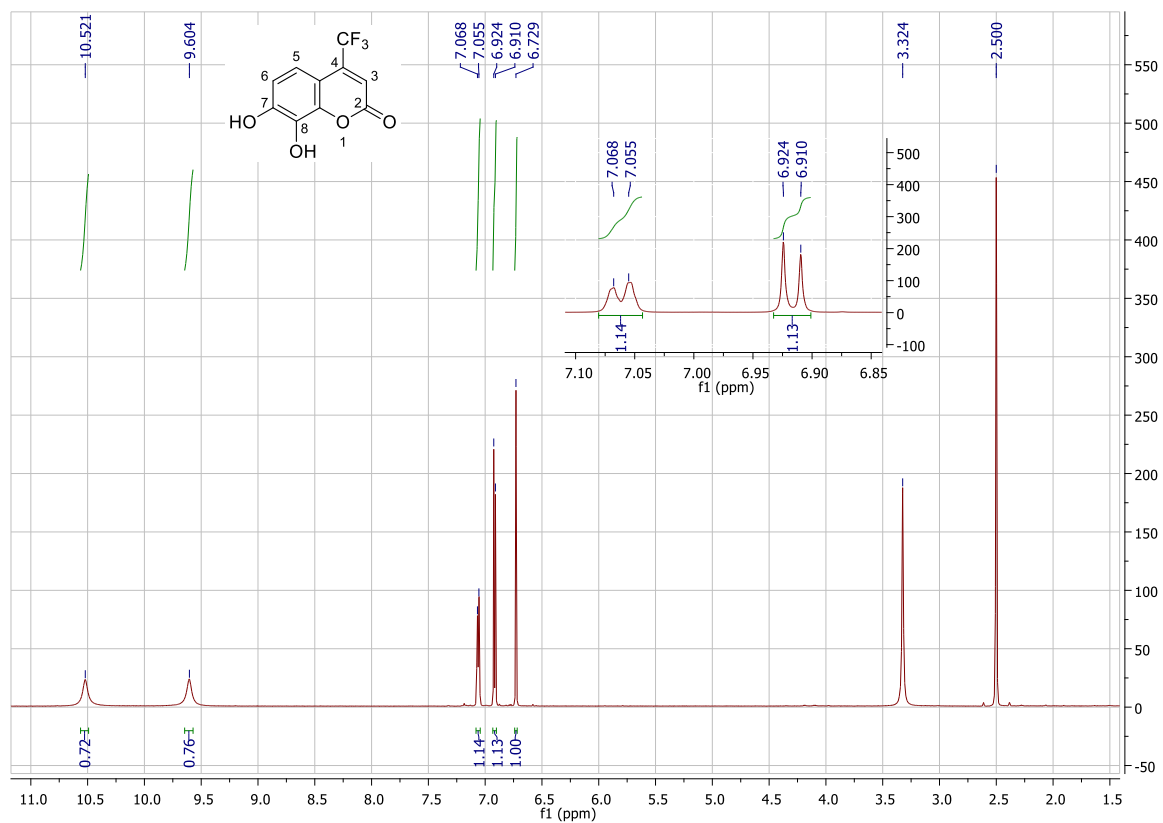
Εικόνα 26. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της 7,8-διυδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης (3e).



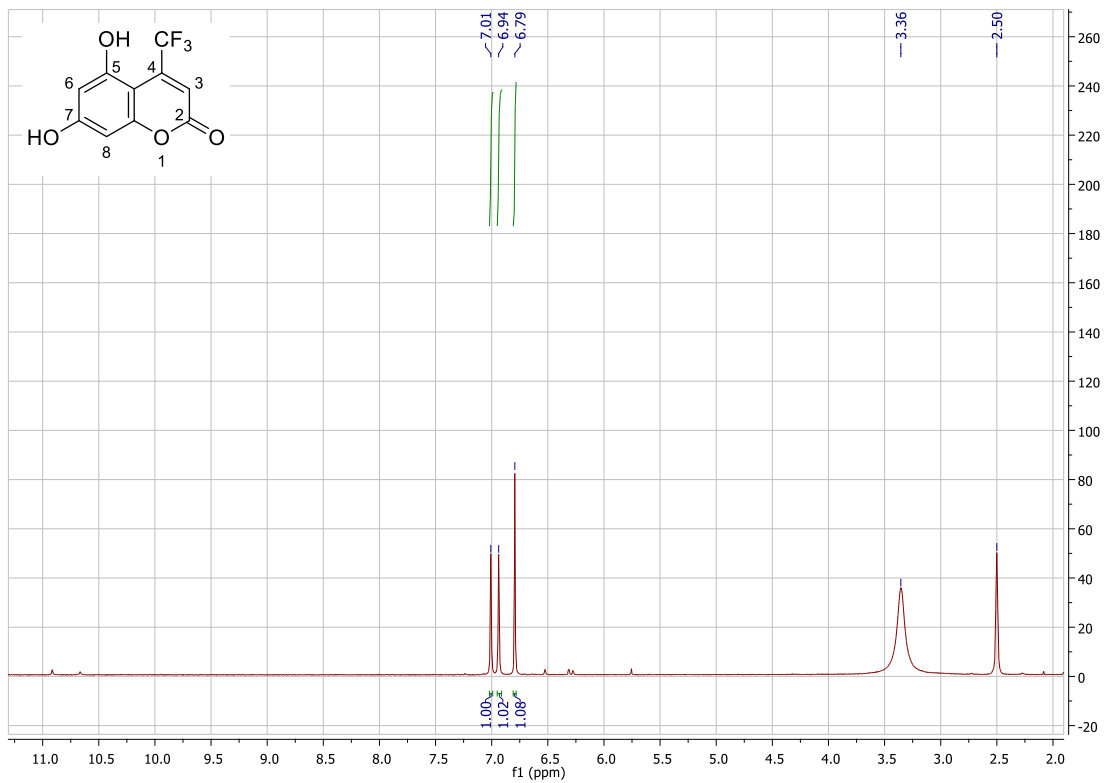
Εικόνα 25. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της 5,7-διυδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης (3f).



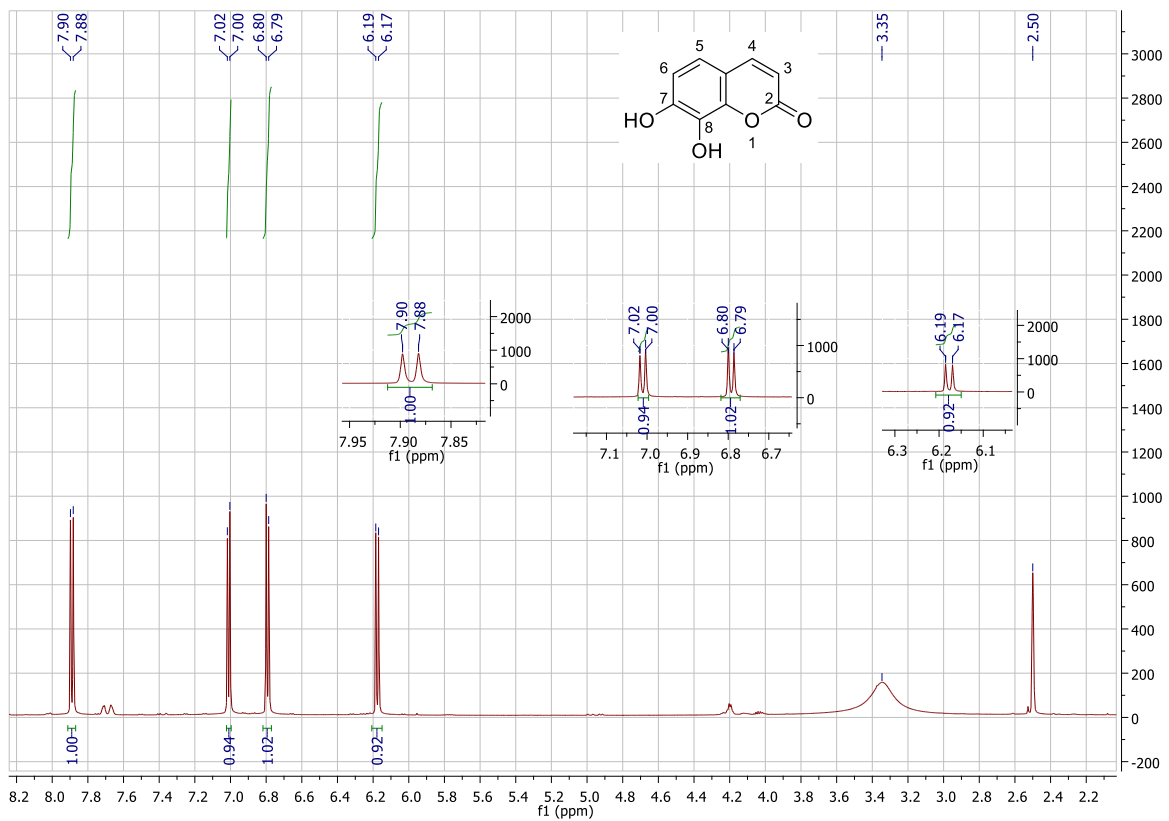
Εικόνα 27. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της 7-υδροξυ-4-τριφθορομεθυλο-κουμαρίνης (**3g**).



Εικόνα 28. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της 7,8-διυδροξυ-4-τριφθορομεθυλο-κουμαρίνης (**3h**).



Εικόνα 29. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της 5,7-διυδροξυ-4-τριφθορομεθυλο-κουμαρίνης (3i).



Εικόνα 30. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της Δαφνετίνης (6).

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Χημική Δομή κουμαρινικών αναλόγων που παρουσιάζουν την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση. ....	4
Εικόνα 2. Chemical structure of the coumarin analogues with the highest antioxidant activity. ....	6
Εικόνα 3. <i>Dipteryx odorata</i> (tonka beans).....	10
Εικόνα 4. <b>a</b> : βενζο-α-πυρονών και <b>b</b> : βενζο-γ-πυρονών .....	11
Εικόνα 5. Χημική δομή <b>a</b> : εσκουλετίνης <b>b</b> : 4-μεθυλο-εσκουλετίνης.....	14
Εικόνα 6. Χημική Δομή Οσθόλης.....	17
Εικόνα 7. Χημική δομή των 7,8 διυδροξυ-4-μεθυλο κουμαρινικών παραγώγων που εξετάστηκαν από τους Ramin Miri et al. ....	17
Εικόνα 8. Χημική δομή 3-(4,5-διυδροξυφαιτυλο)-7-υδροξυκουμαρίνη. ....	19
Εικόνα 9. Οι βασικότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση κουμαρινικών αναλόγων.....	20
Εικόνα 10. Διαδικασία ανάπτυξης νέων φαρμάκων. ....	24
Εικόνα 11. Χημική δομή μορίων οδηγών με αξιολογημένη αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση. ....	31
Εικόνα 12. Ενεργειακή Διαφορά ΔΕ μεταξύ πυρήνων με παράλληλο και αντιπαράλληλο spin σε σχέση με το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο (B <sub>0</sub> ).....	37
Εικόνα 13. Χημικές μετατοπίσεις των κυριότερων χαρακτηριστικών ομάδων στο φάσμα 1H NMR.....	38
Εικόνα 14. Αντίδραση αναγωγής ρίζας DPPH από μια αντιοξειδωτική ουσία. ....	45
Εικόνα 15: Πλακίδιο 96 θέσεων (96 well plate) .....	47
Εικόνα 16. 1HNMR της 5,7-διυδροξυ-4-φαιτυλο-κουμαρίνης ( <b>3c</b> ). ....	48
Εικόνα 17. 1HNMR της 7,8-διυδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης ( <b>3e</b> ).....	49
Εικόνα 18. 1HNMR της 7-υδροξυ-4-τριφθορομεθυλο-κουμαρίνης ( <b>3g</b> ). ....	50
Εικόνα 19. Χημική δομή των κουμαρινικών αναλόγων που διαθέτουν κατεχολικό σύστημα στην δομή τους.....	53
Εικόνα 20. Δομικά τροποποιημένα κουμαρινικά ανάλογα που συντέθηκαν. ....	66
Εικόνα 21. Φάσμα 1HNMR της 7-υδροξυ-4-φαιτυλο-κουμαρίνης ( <b>3a</b> ). ....	74
Εικόνα 22. Φάσμα 1H NMR της 7,8-διυδροξυ-4-φαιτυλο-κουμαρίνης ( <b>3b</b> ).....	74
Εικόνα 23. Φάσμα 1H NMR της 7,8-διυδροξυ-4-φαιτυλο-κουμαρίνης ( <b>3c</b> ). ....	75
Εικόνα 24. Φάσμα 1H NMR της 7-υδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης ( <b>3d</b> ).....	75
Εικόνα 25. Φάσμα 1H NMR της 5,7-διυδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης ( <b>3f</b> ). ....	76
Εικόνα 26. Φάσμα 1H NMR της 7,8-διυδροξυ-4-μεθυλο-κουμαρίνης ( <b>3e</b> ).....	76
Εικόνα 27. Φάσμα 1H NMR της 7-υδροξυ-4-τριφθορομεθυλο-κουμαρίνης ( <b>3g</b> ). ....	77
Εικόνα 28. Φάσμα 1H NMR της 7,8-διυδροξυ-4-τριφθορομεθυλο-κουμαρίνης ( <b>3h</b> ). ....	77
Εικόνα 29. Φάσμα 1H NMR της 5,7-διυδροξυ-4-τριφθορομεθυλο-κουμαρίνης ( <b>3i</b> )..	78
Εικόνα 30. Φάσμα 1H NMR της Δαφνετίνης ( <b>6</b> ).....	78

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Συσχέτιση της δομής των κουμαρινών με την αντιοξειδωτική τους δράση. ....	15
Σχήμα 2. Συσχέτιση της δομής των κουμαρινών με την αντιφλεγμονώδη τους δράση. ....	16
Σχήμα 3. Σειρά κουμαρινικών παραγώγων με υψηλή αντικαρκινική δράση. [20] ....	18
Σχήμα 4. Μηχανισμός αντίδρασης Pechmann όπως προτείνεται από τους Ahmed και Desai.....	21
Σχήμα 5. Μηχανισμός αντίδρασης Pechmann όπως προτείνεται από τους Robertson et al. ....	21
Σχήμα 6. Αντίδραση Perkin για σύνθεση κουμαρινών.....	23
Σχήμα 7. Αντίδραση Knoevenagel για την σύνθεση κουμαρινών.....	23
Σχήμα 8: Συνθετική πορεία των 4-υποκατεστημένων κουμαρινικών αναλόγων.....	32
Σχήμα 9: Συνθετική πορεία της δαφνετίνης.....	33
Σχήμα 10: Αντίδραση Pechmann.....	34
Σχήμα 11: Μετατροπή Μηλικού οξέος.....	35
Σχήμα 12: Αντίδραση Pechmann.....	35

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Ταξινόμηση κουμαρινών.....	12
Πίνακας 2. Εργαστηριακά όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της σταθερής ρίζας DPPH. ....	45
Πίνακας 3. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της σταθερής ρίζας DPPH. ....	46
Πίνακας 4. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των νέων κουμαρινικών αναλόγων (n=3). ....	51
Πίνακας 5. Φυσικοχημικές Ιδιότητες των κουμαρινικών αναλόγων, σε pH=5,5.....	55
Πίνακας 6. Ποσοστό απορρόφησης από το στόμα, %HOA, για την εκάστοτε ένωση. ....	56
Πίνακας 7. Εξέταση των κουμαρινικών αναλόγων με βάση τον κανόνα των 5 του Lipinski. ....	57
Πίνακας 8. Training set.....	58
Πίνακας 9. Δεδομένα ελέγχου (test set). ....	62



Πίνακας 10. Φυσικοχημικές Ιδιότητες των κουμαρινικών αναλόγων, σε pH=7,4.....	63
Πίνακας 11. Ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης (% PPB) για την εκάστοτε ένωση.....	63
Πίνακας 12. Φαρμακοκινητικές ιδιότητες των μελετώμενων κουμαρινικών αναλόγων. .....	64

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. %Αναστολή της <b>3b</b> στα 30 και 60 min .....	53
Διάγραμμα 2. %Αναστολή της <b>3e</b> στα 30 και 60 min .....	54
Διάγραμμα 3. %Αναστολή της <b>3h</b> στα 30 και 60 min .....	54
Διάγραμμα 4. Συσχέτιση του logKPPB,training με το logP .....	61