

**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**  
**Τομέας (I) Χημικών Επιστημών**  
**Εργαστήριο Οργανικής Χημείας**



# **Ανάπτυξη πράσινης μεθοδολογίας για τη σύνθεση νέων δικουμαρινικών αναλόγων και αξιολόγηση της βιοδραστικότητάς τους**

---

*Διπλωματική εργασία*

**Γεωργία Ερεσίου**

Επιβλέπουσα

Αναστασία Δέτση

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

**Αθήνα 2021**



## Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Οργανικής 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.

Πρωτίστως, οφείλω να ευχαριστήσω βαθύτατα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ε.Μ.Π. κα. Αναστασία Δέτση, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον και καινοτόμο θέμα πάνω στη σύνθεση νέων δικουμαρινικών αναλόγων, αλλά κυρίως για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Η καθοδήγηση, οι συμβουλές της και η αμερόληπτη εμπιστοσύνη που επέδειξε προς το πρόσωπο μου αποτέλεσαν καταλυτικό παράγοντα για την ολοκλήρωση και εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας, αλλά κυρίως συντέλεσαν στην προσωπική μου εξέλιξη και ανέλιξη καθώς και στο να αγαπήσω το αντικείμενο της οργανικής σύνθεσης με το οποίο ασχολήθηκα.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στον Δρ. Ευάγγελο Τόπακα, Αναπληρωτή Καθηγητή Ε.Μ.Π. και στον Δρ. Χρήστο Κυρανούδη, Καθηγητή Ε.Μ.Π., για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή και τον χρόνο που διέθεσαν για την κριτική ανάγνωση της εργασίας μου.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω τις ευχαριστίες στην Αννίτα Κατωπόδη, υποψήφια διδάκτορα του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π. για την ανιδιοτελή στήριξή της, την αδιάκοπη βοήθειά της στην επίλυση οποιουδήποτε προβλήματος κι αν προέκυπτε, την καθοδήγηση της χάριν των γνώσεων και της επιστημονικής της κατάρτισης, καθώς και την άψογη συνεργασία μας.

Ακόμη, οφείλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π. για την αρμονική συνεργασία, το πάντα ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε και τη στήριξή τους όπου αυτή ήταν απαραίτητη.

Τέλος, ευχαριστώ βαθύτατα την οικογένεια μου για τη στήριξη, υπομονή και ενθάρρυνση που μου παρείχαν σε όλα τα χρόνια των σπουδών μου στο ΕΜΠ. Ευχαριστώ βαθύτατα την Ε. Αποστολάκη για την άψογη επαγγελματική μας συνεργασία, καθώς και για την στήριξή που μου έδωσε σε όλα τα χρόνια των σπουδών μου. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις ευχαριστίες σε όλο το φιλικό μου περιβάλλον, που ήταν πάντα εκεί για εμένα, και κυρίως ευχαριστώ όλες τις φίλες μου Αλίκη, Βάσια, Δανάη Κ., Δανάη Σ., Δέσποινα, Εύα, Ιωάννα, Μαρία Γ., Μαρία Γρ., Μαρία Χ., Ναυσικά, Νικολέττα, Όλγα και Φωτεινή που έμειναν στο πλευρό μου οποιαδήποτε στιγμή χρειάστηκε.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας προέκυψε:

❖ Ανακοίνωση σε διεθνές συνέδριο με πρακτικά:

A. Katopodi, A. Kalospyros, **G. Eressiou**, P. Panousaki, E. Kritsi, M. Zervou, A. Detsi, Design, synthesis and molecular docking studies of acetylcholinesterase inhibitors based on the coumarin scaffold, European Symposium on Organic Chemistry, Virtual Mini Symposium, July 5-6, 2021 (accepted)

## Περίληψη

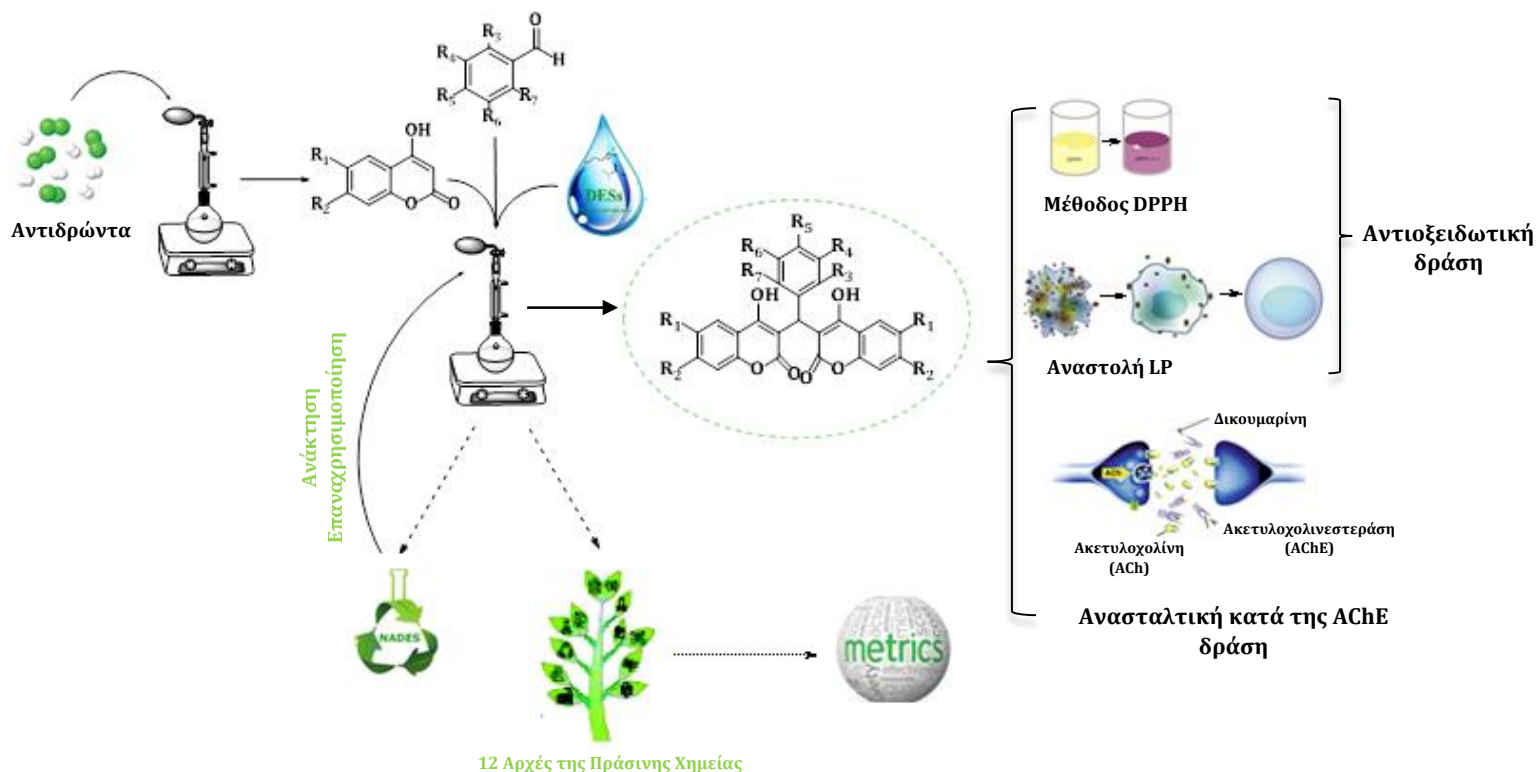


Figure 1. Γραφική περίληψη

Οι κουμαρίνες είναι ετεροκυκλικές οργανικές ενώσεις, οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των βενζοπυρονών και συναντώνται σε πολλά είδη φυτών, είτε σε ελεύθερη μορφή είτε σε μορφή γλυκοζιτών. Παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων, όπως είναι η αντιοξειδωτική, η αντιφλεγμονώδης, η αντιμικροβιακή και η αντικαρκινική δράση.

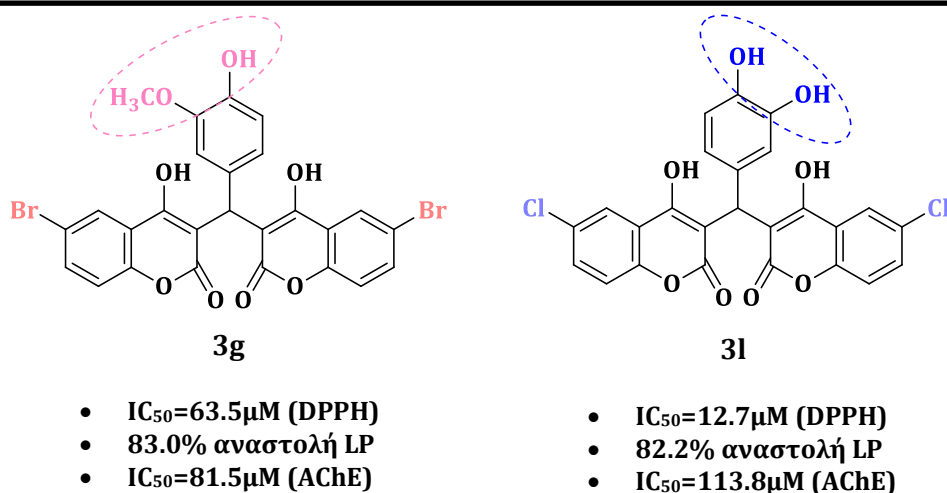
Οι δικουμαρίνες είναι βιοδραστικές δομές, οι οποίες μελετώνται εκτενέστερα το τελευταίο χρονικό διάστημα στην επιστημονική κοινότητα, επιδεικνύοντας πλήθος βιολογικών δράσεων όπως είναι η αντιπηκτική, η αντιοξειδωτική καθώς και η αντιδιαβητική δράση.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός νέων κουμαρινικών και δικουμαρινικών αναλόγων μέσω της ανάπτυξης κατάλληλης πράσινης μεθοδολογίας και της χρήσης φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών, οι οποίοι αξιολογούνται για την ανακυκλωσιμότητα και επαναχρησιμοποίησή τους. Επιπρόσθετο σκοπό αποτελεί η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των συντιθέμενων αναλόγων (ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH και ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης, όπως αυτή επάγεται από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH) καθώς και η αξιολόγηση της ανασταλτικής τους δράσης στο ένζυμο Ακετυλοχολινεστεράση (AChE).

Συγκεκριμένα, στην παρούσα διπλωματική εργασία συντέθηκαν 4 κουμαρινικά και 15 δικουμαρινικά ανάλογα, σύνολο 19 νέα μόρια, τα οποία ταυτοποιήθηκαν μέσω Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού  $^1\text{H}$  NMR. Οι αποδόσεις των κουμαρινικών αναλόγων είναι ικανοποιητικές, ενώ οι αποδόσεις της πλειονότητας των δικουμαρινικών αναλόγων είναι εξαιρετικές. Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η ανακυκλωσιμότητα και η επαναχρησιμοποίηση του φυσικού Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη μετά από τρεις επαναλήψεις και βρέθηκε ότι η απόδοση της αντίδρασης παραμένει πρακτικά σταθερή.

Για την αξιολόγηση της αναπτυσσόμενης πράσινης μεθοδολογίας, εκτός από τη μελέτη ανάκτησης του φυσικού Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη, υπολογίστηκαν και αξιολογήθηκαν ορισμένοι πράσινοι δείκτες, οι οποίοι βασίζονται στις 12 Αρχές της Πράσινης Χημείας.

Τέλος, όλα τα κουμαρινικά και δικουμαρινικά ανάλογα αξιολογήθηκαν *in vitro* για την αντιοξειδωτική τους δράση, δηλαδή τόσο για την ικανότητα αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH όσο και για την ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH). Για την περαιτέρω αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των νέων κουμαρινικών και δικουμαρινικών αναλόγων, προσδιορίστηκαν πιθανοί πρωτεϊνικοί στόχοι μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας «PharmMapper», και έτσι όλα τα συντιθέμενα μόρια εξετάστηκαν για την ικανότητα αναστολής του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση, ως ένδειξη δράσης κατά του Αλτσχάιμερ. Δύο από τα συντιθέμενα μόρια επέδειξαν συνδυασμένη βιολογική δράση τόσο αντιοξειδωτική όσο και ανασταλτική δράση κατά της ακετυλοχολινεστεράσης (**3g** & **3l**), ενώ άλλα τρία (**3b**, **3k** & **3n**) επέδειξαν συνδυασμένη βιολογική δράση σε δύο από τις τρεις δράσεις που εξετάστηκαν.



Εικόνα 1. Χημική δομή δικουμαρινικών αναλόγων **3g** και **3l** με συνδυασμένη βιολογική δράση

**Επιστημονική Περιοχή:** Οργανική σύνθεση, αξιολόγηση βιοδραστικότητας, Πράσινη Χημεία

**Λέξεις-κλειδιά:** κουμαρίνες, δικουμαρινικά ανάλογα, ανακυκλωσιμότητα και επαναχρησιμοποίηση βαθέως ευτηκτικού διαλύτη, πράσινοι δείκτες, αντιοξειδωτική δράση, ανασταλτική δράση κατά του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση

## Abstract

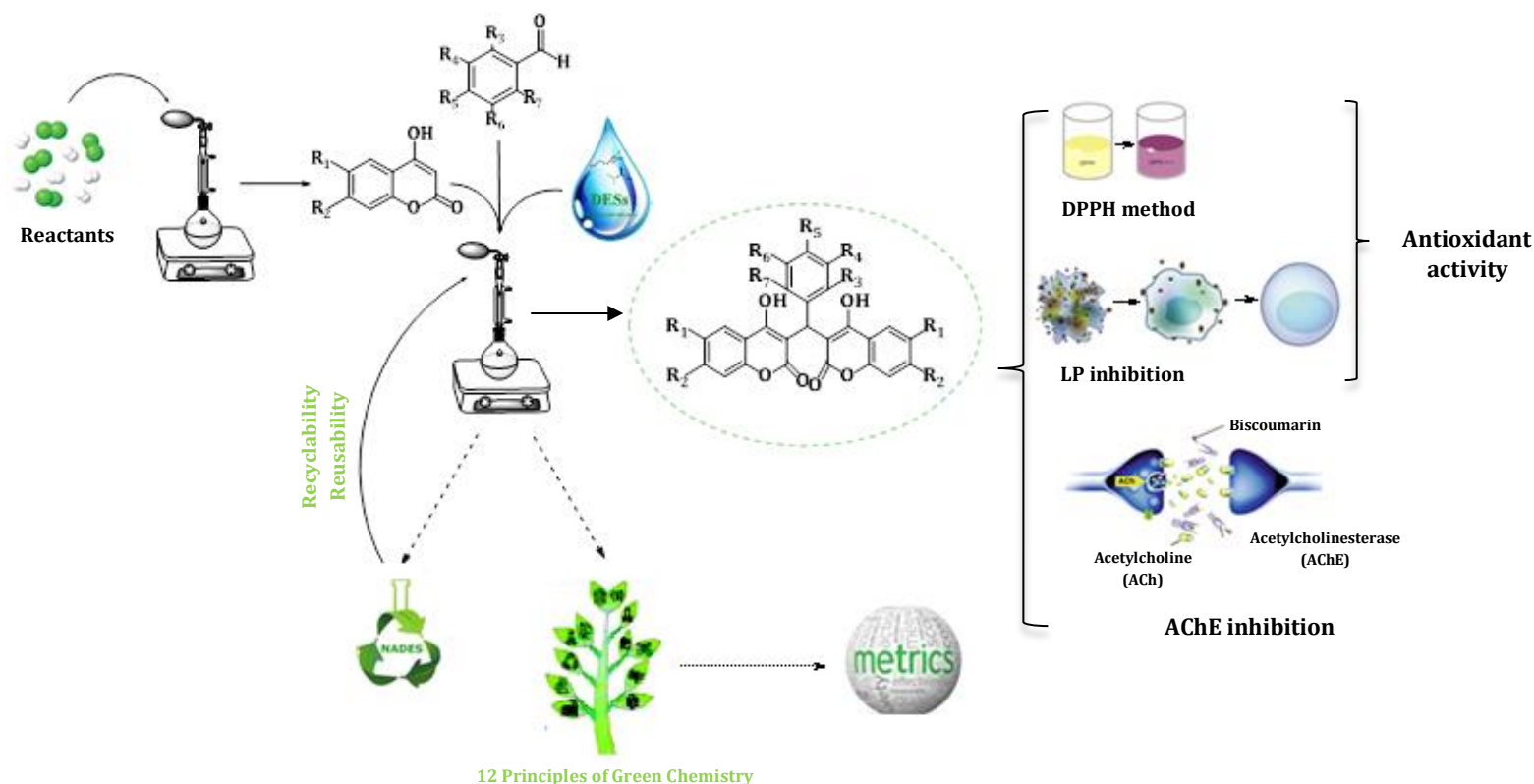


Figure 2. Graphical abstract

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. Coumarins possess an extraordinary range of biological activities, such as antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and anticancer.

Biscoumarins are bioactive compounds, which have been extensively studied during the last years in the scientific research field, exhibiting numerous biological activities, such as anti-coagulant and anti-diabetic.

The aim of the present diploma thesis is the synthesis and characterization of novel coumarin and biscoumarin analogues through the development of an appropriate green methodology and the use of natural deep eutectic solvents (NaDES), which are evaluated for their recyclability and reusability. An additional purpose is the evaluation of the antioxidant activity of the synthesized analogues (DPPH free radical scavenging ability and lipid peroxidation inhibitory ability, as induced by the free radical scavenger AAPH) as well as their ability to inhibit the enzyme Acetylcholinesterase (AChE).

Specifically, in the present diploma thesis, 4 coumarin and 15 biscoumarin analogues were synthesized, a total of 19 new molecules, which were structurally identified by  $^1\text{H}$  NMR Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. The yields of coumarin analogues are



satisfactory, while the yields of most biscoumarin analogues are excellent. In addition, the recyclability and reusability of the natural Deep Eutectic Solvent after three repetitions was studied and it was found that the reaction yield remained practically the same.

For the evaluation of the developed green methodology, in addition to the recyclability study of the natural Deep Eutectic Solvent, several green metrics were calculated and evaluated, which are based on the “12 Principles of Green Chemistry”.

Finally, all coumarin and biscoumarin analogues were evaluated *in vitro* for their antioxidant activity, through their ability to scavenge the stable free radical DPPH and to inhibit lipid peroxidation (induced by the radical initiator AAPH). For further evaluation of the biological activity of the new coumarin and biscoumarin analogues, potential protein targets were identified through the online PharmMapper platform, and as a result all synthesized molecules were tested for their ability to inhibit the enzyme Acetylcholinesterase. Two of the synthesized molecules showed combined antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity (**3g** & **3l**), while three others (**3b**, **3k** & **3n**) showed combined biological activity in two of the three activities tested.

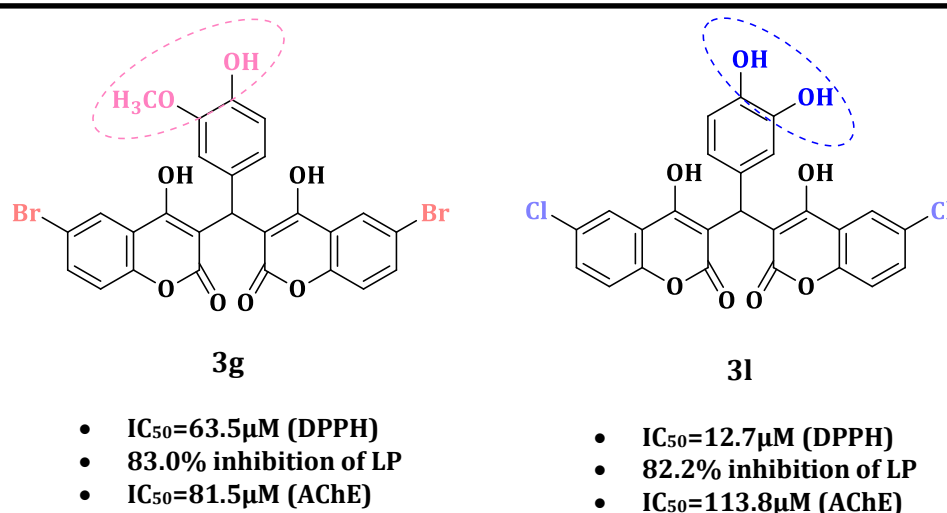


Figure 3. Chemical structure of biscoumarin analogues **3g** and **3l** with combined biological activities

**Scientific Area:** Organic synthesis, bioactivity evaluation, Green Chemistry

**Keywords:** coumarins, biscoumarin analogues, recyclability and reusability of deep eutectic solvent, green metrics, antioxidant activity, acetylcholinesterase inhibitory activity

## Περιεχόμενα

Πρόλογος .....	2
Περίληψη .....	4
Abstract .....	7
Εισαγωγή.....	12
1.1.    Κουμαρίνες .....	12
1.1.1.    Προέλευση κουμαρινών .....	12
1.1.2.    Χημική δομή απλών κουμαρινών .....	12
1.1.3.    Χαρακτηριστικά απλών κουμαρινών.....	16
1.1.4.    Χρήση κουμαρινών .....	16
1.1.5.    Χρήση κουμαρινών για τη θεραπεία της νόσου Alzheimer .....	30
1.2.    Δικουμαρίνες .....	32
1.2.1.    Φαρμακευτικό προφίλ δικουμαρινών.....	32
1.3.    Κλασσικές μέθοδοι σύνθεσης κουμαρινών και δικουμαρινών .....	33
1.3.1.    Αντίδραση Knoevenagel.....	33
1.3.2.    Συμπύκνωση Domino- Knoevenagel .....	35
1.3.3.    Αντίδραση Perkin .....	35
1.3.4.    Αντίδραση Pechman.....	36
1.3.5.    Αντίδραση Wittig.....	36
1.4.    Πράσινη Χημεία.....	37
1.4.1.    Ιοντικά υγρά- IL.....	38
1.4.2.    Βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες – DES.....	39
1.4.3.    Πράσινοι δείκτες .....	44
Σκοπός της διπλωματικής εργασίας .....	48
Σχεδιασμός, σύνθεση και ταυτοποίηση των νέων ενώσεων.....	49
3.1.    Σχεδιασμός νέων παραγώγων .....	49
3.2.    Ανακυκλωσιμότητα και Επαναχρησιμοποίηση Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη (Recyclability & Reusability).....	50
3.3.    Σύνθεση 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης (1a) .....	50
3.4.    Σύνθεση 4-υδροξυ-κουμαρινών (2a-2c).....	51
3.5.    Σύνθεση δικουμαρινών (3a-3o) .....	51
3.6.    Μηχανισμός σύνθεσης δικουμαρινικών αναλόγων με χρήση Βαθέων Ευτηκτικών Διαλυτών (DES's) μέσω αντίδρασης domino Knoevenagel -Michael .....	52
3.7.    Ταυτοποίηση ενώσεων.....	54
3.7.1.    Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού- Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) .....	54

4.	Πειραματικό μέρος .....	59
4.1.	Όργανα και συσκευές .....	59
4.1.1.	Υγρή Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας-Thin liquid chromatography (TLC) .....	59
4.1.2.	Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού – Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) .....	59
4.1.3.	Buchi Rotavapor® R-210 .....	60
4.1.4.	Συσκευή Gallenkamp .....	60
4.2.	Συνθετική πορεία κουμαρινικών αναλόγων.....	60
4.2.1.	Μέθοδοι σύνθεσης 4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη ( <b>1a</b> ) .....	60
4.2.2.	Γενική μέθοδος παρασκευής 4-υδροξυ-κουμαρινικών αναλόγων .....	62
4.2.3.	Γενική μέθοδος παρασκευής 4-υδροξυ-δικουμαρινικών αναλόγων .....	63
4.2.4.	Μέθοδος μελέτης ανακυκλωσιμότητας και επαναχρησιμοποίησης Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη (DES) .....	71
4.2.5.	Προσδιορισμός της αναγωγής της σταθερής ρίζας <b>DPPH</b> .....	72
4.2.6.	Προσδιορισμός της αναγωγής των θερμικών ελευθέρων ριζών (AAPH)..	73
4.2.7.	Προσδιορισμός αναστολής του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) 74	
5.	Αποτελέσματα και Συζήτηση αποτελεσμάτων .....	76
5.1.	Αποτελέσματα σύνθεσης και φασματοσκοπική μελέτη (NMR) .....	76
5.2.	Αξιολόγηση ανακυκλωσιμότητας και επαναχρησιμοποίησης του Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη (DES) .....	82
5.3.	Αξιολόγηση των πράσινων δεικτών .....	83
5.4.	Αξιολόγηση της βιοδραστικότητας των νέων κουμαρινικών και δικουμαρινικών παραγώγων.....	86
5.4.1.	Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης .....	86
5.5.	Αξιολόγηση αναστολής του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράσης.....	96
5.5.1.	Αποτελέσματα PharmMapper .....	96
5.5.2.	Προσδιορισμός της αναστολής του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση.....	100
	Συμπεράσματα.....	105
	Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	108
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	109
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ .....	116
	ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ .....	122
	ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ .....	125
	ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	125



## Εισαγωγή

### 1.1. Κουμαρίνες

#### 1.1.1. Προέλευση κουμαρινών

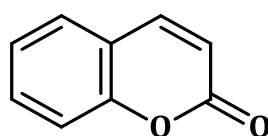
Οι κουμαρίνες είναι ετεροκυκλικές οργανικές ενώσεις (ή συντηγμένα συστήματα δακτυλίων βενζολίου και α-πυρόνης) οι οποίες μπορούν να συναντηθούν στη φύση ως δευτερογενείς μεταβολίτες. Η πρώτη κουμαρίνη ανακαλύφθηκε το 1820 στα φασόλια tonka (**tonka beans**), γνωστά και με τη γαλλική λέξη Coumarou από την οποία πήραν και το όνομα τους (*Dipteryx odoranta* Wild; *Fabaceae* family). Έχει γλυκιά χαρακτηριστική μυρωδιά κι έτσι το 1882 οι κουμαρίνες χρησιμοποιήθηκαν στην παραγωγή αρωμάτων. Ωστόσο, οι κουμαρίνες μπορούν να βρεθούν και σε πολλά άλλα φυτά, φρούτα, σπόρους, άνθη και ρίζες (**Εικόνα 2** **Error! Reference source not found.** **Error! Reference source not found.**). Η μεγαλύτερη συγκέντρωση κουμαρινών είναι στα φρούτα και στα λουλούδια. Ενδεικτικά, στις παρακάτω εικόνες παρατίθενται τα κυριότερα φυτά και φρούτα στα οποία συναντάται η κουμαρίνη <sup>1 2 3 4</sup>



Εικόνα 2. α)Κανέλα, β)Tonka φασόλια, γ)λεβάντα, δ)φράουλα, ε) Φύλλα *murraya paniculata*, στ)Φρούτο Bael

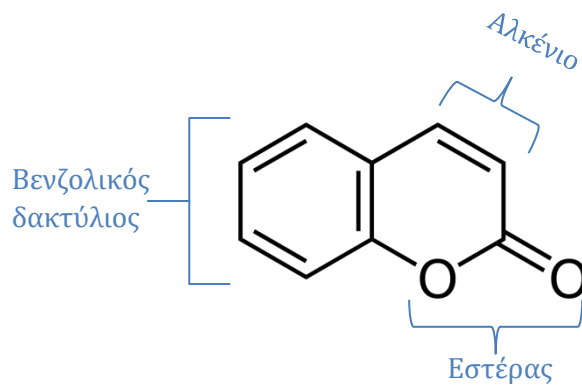
#### 1.1.2. Χημική δομή απλών κουμαρινών

Η απλή κουμαρίνη έχει χημική δομή η οποία παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3**. Χαρακτηρίζεται από την 1,2- βενζοπυρόνη, γνωστή και ως βενζο-α-πυρόνη, της οποίας η ονοματολογία καθιερώθηκε από την IUPAC ως **2H-chromen-2-one**. Ο πυρήνας της κουμαρίνης αποτελεί σημαντικό σκελετό και αντικείμενο μελέτης εδώ και πάρα πολλά χρόνια. <sup>5</sup>



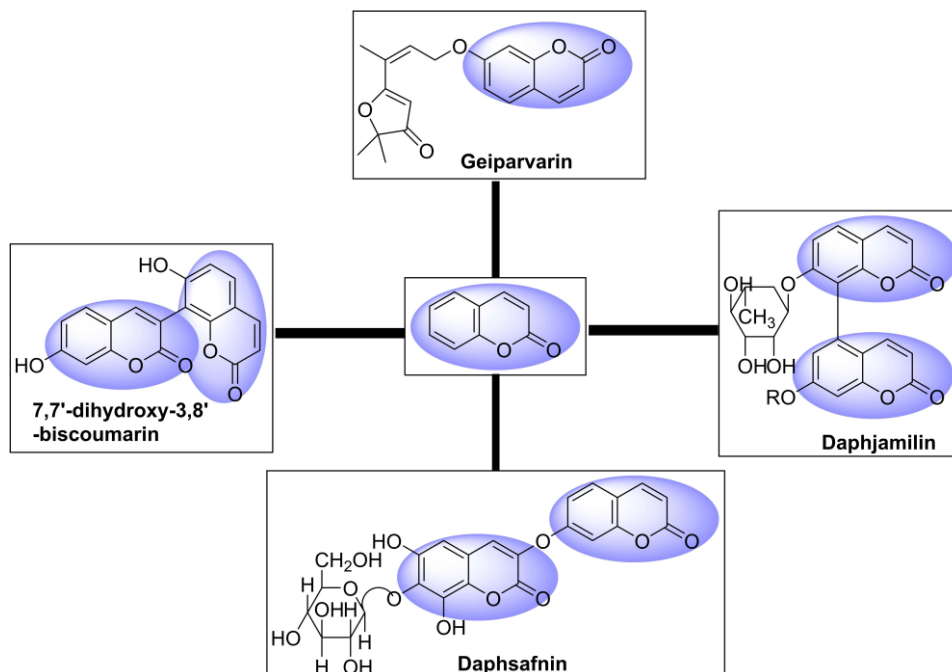
Εικόνα 3. Χημική δομή απλής κουμαρίνης

Συγκεκριμένα, η κουμαρίνη είναι μια οργανική ένωση που αποτελείται από δύο εξαμελείς δακτυλίους οι οποίοι έχουν συντηχθεί. Ο ένας δακτύλιος είναι δακτύλιος βενζολίου και ο άλλος περιέχει μια λειτουργική ομάδα αλκενίου και μια ομάδα εστέρας. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 4) σημειώνονται και οι δύο δακτύλιοι για την πλήρη κατανόηση της δομής της.



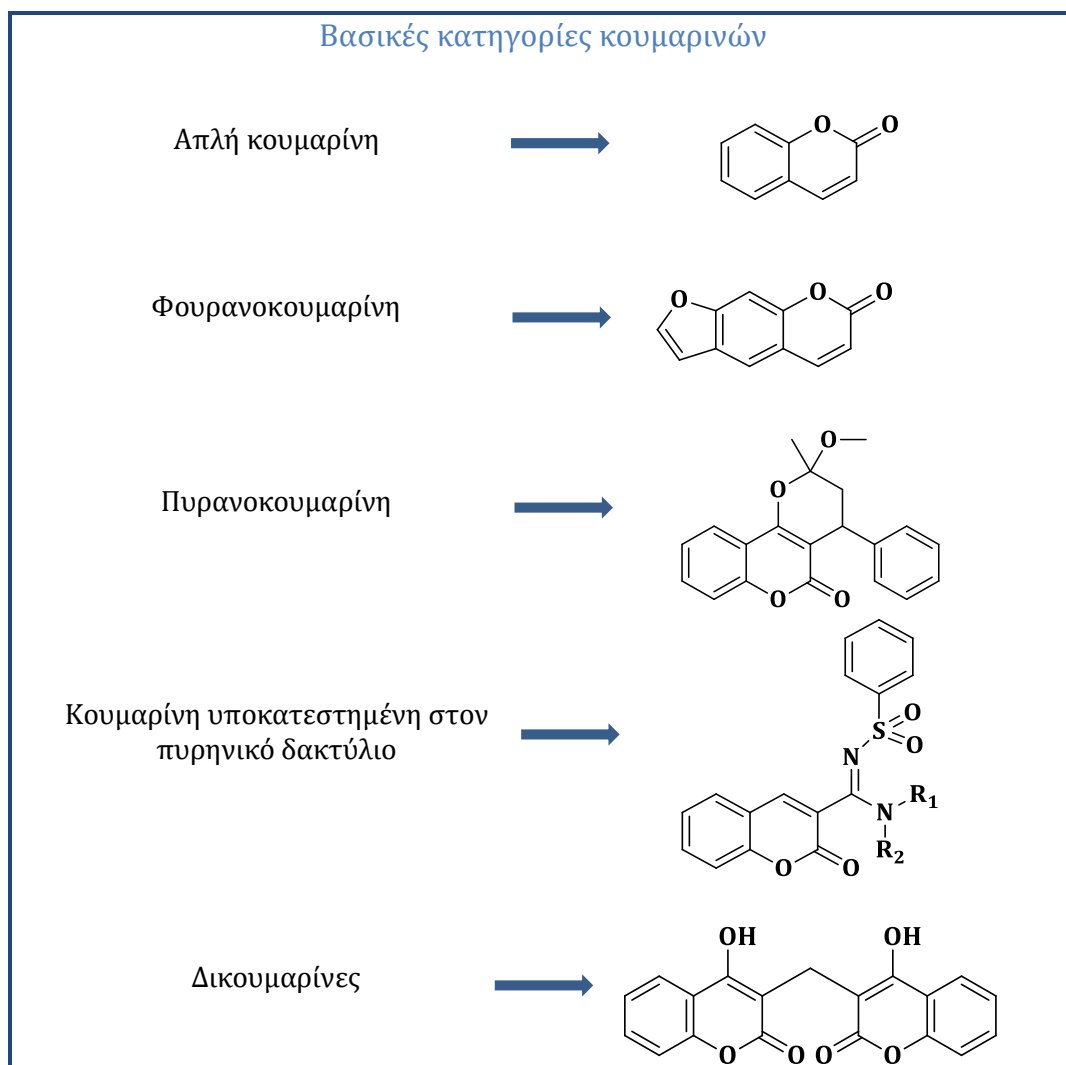
Εικόνα 4. Κουμαρίνη και οι λειτουργικές ομάδες της

Κουμαρινικά ανάλογα με βάση τον παραπάνω απλό σκελετό της κουμαρίνης συναντώνται αρκετά συχνά στη φύση, όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω. Ενδεικτικά, παρακάτω παρουσιάζονται κάποιες από τις κουμαρίνες που συναντώνται στη φύση (Εικόνα 5).

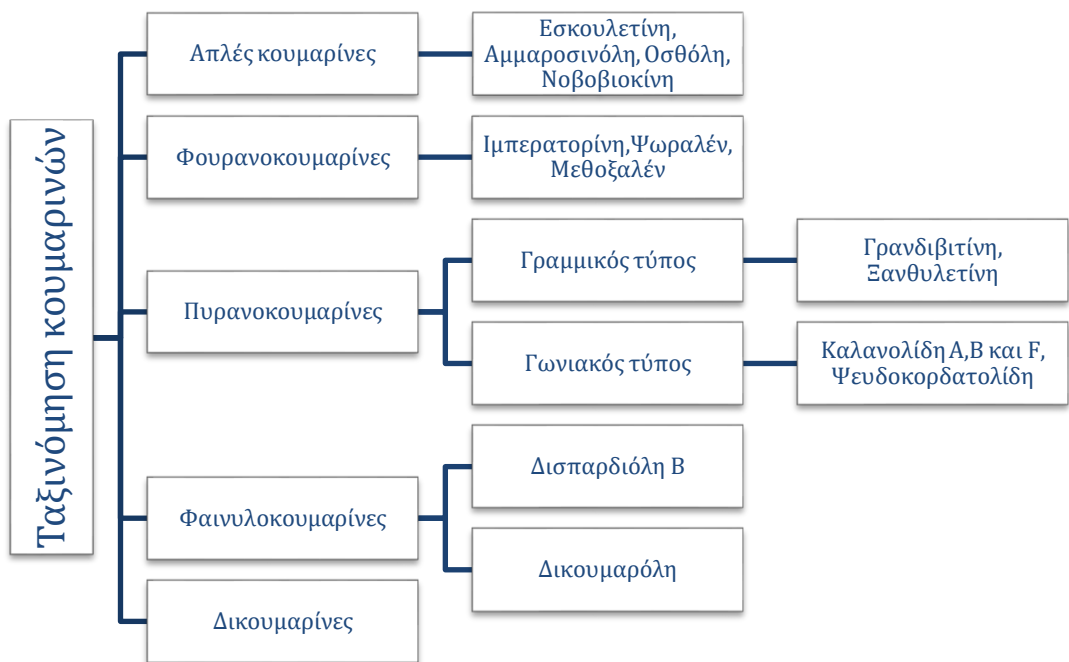


Εικόνα 5. Κουμαρίνες που συναντώνται στη φύση <sup>6</sup>

Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί πως εκτός από τις φυσικές κουμαρίνες υπάρχουν και οι συνθετικές, με αποτέλεσμα να υπάρχει μια ευρεία ποικιλία κουμαρινών παραγώγων, τα οποία εμφανίζουν ιδιαίτερη συμβολή στη φαρμακευτική επιστήμη. Παρακάτω αναφέρονται τα σημαντικότερα είδη κουμαρινών, η χημική δομή (Εικόνα 6) τους καθώς και μερικά παραδείγματα (Σχήμα 1).<sup>7</sup>

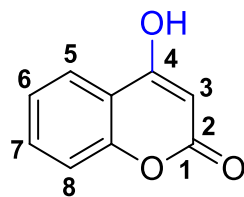


Εικόνα 6. Βασικές κατηγορίες κουμαρινών και η χημική δομή τους



Σχήμα 1. Ταξινόμηση κουμαρινών και μερικά παραδείγματα <sup>2</sup>

Οι κουμαρίνες είναι συνήθως δυσδιάλυτες σε υδατικό περιβάλλον, αλλά η 4-υδρόξυ-υποκατάσταση τους (Εικόνα 7) αποδίδει ασθενώς όξινες ιδιότητες στο μόριο με αποτέλεσμα να το καθιστά υδατοδιαλυτό υπό ελαφρώς αλκαλικές συνθήκες.<sup>7</sup>



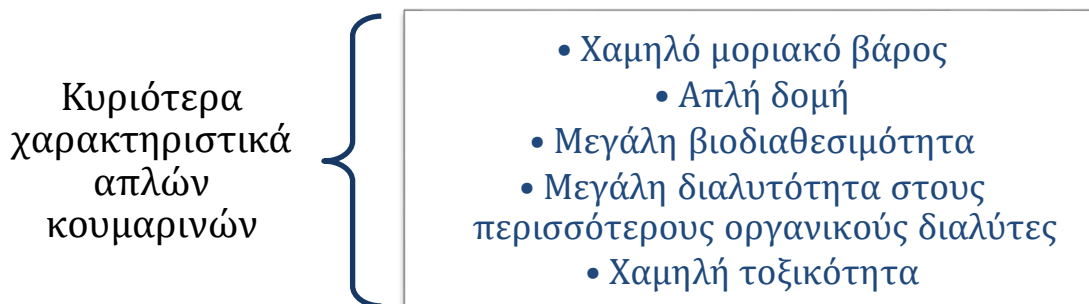
Εικόνα 7. 4-υδρόξυ-κουμαρίνη



### 1.1.3. Χαρακτηριστικά απλών κουμαρινών

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά των απλών κουμαρινών που τις καθιστούν πολύτιμες ενώσεις στο πεδίο της επιστημονικής κοινότητας παρουσιάζονται παρακάτω (Εικόνα 8).

8



Εικόνα 8. Κυριότερα χαρακτηριστικά απλών κουμαρινών

### 1.1.4. Χρήση κουμαρινών

Οι κουμαρίνες έχουν χρησιμοποιηθεί και μελετηθεί ευρέως για ποικίλες εφαρμογές. Ενδεικτικά η χρήση τους αφορά αρώματα, οπτικούς παράγοντες φωτεινότητας, παρασιτοκτόνα, βελτιωτικά γεύσης και φαρμακευτικά σκευάσματα για την αντιφλεγμονώδη, αντιοξειδωτική, αντικαρκινική τους δράση, καθώς και ως αντι-HIV παράγοντες, ως αντιπηκτικά και αντιμυκητιασικά παράγωγα. Όπως είναι λογικό, η χρήση των κουμαρινών εστιάζει τα τελευταία χρόνια στη μελέτη της βιοδραστικότητας τους και την ενσωμάτωσή τους σε διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα λόγω της χαμηλής τους τοξικότητας, των μειωμένων παρενεργειών και της μεγάλης βιοδιαθεσιμότητάς τους. Επιπρόσθετα, η ετεροκυκλική αυτή 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.<sup>2,9</sup>

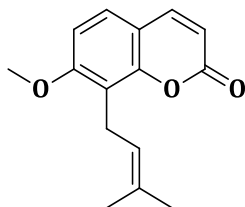
#### 1.1.4.1. Αντιφλεγμονώδης δράση

Η φλεγμονή είναι ένας μηχανισμός αυτοπροστασίας του οργανισμού έναντι επιβλαβών παραγόντων είτε ενδογενών (καρκίνος, ισχαιμία, αυτοάνοσα νοσήματα) είτε εξωγενών (τραύμα, ιογενείς και βακτηριακές λοιμώξεις). Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις μπορεί να εξελιχθούν σε διάφορες σοβαρές ασθένειες όπως είναι τα αυτοάνοσα νοσήματα, κοκκιωματώδεις καταστάσεις, ρευματοειδής αρθρίτιδα, χρόνια άσθμα και ψωρίαση. Έτσι, ο σχεδιασμός αντιφλεγμονωδών φαρμάκων αποτελεί καίρια ανάγκη για την πρόληψη ή και τη θεραπεία τέτοιων ασθενειών.<sup>10</sup>

Οι κουμαρίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ισχυρά αντιφλεγμονώδη φάρμακα τα οποία κατευθύνονται ενάντια στα μόρια προσκόλλησης των κυττάρων με αποτέλεσμα να προλαμβάνουν τη φλεγμονή. Η δράση τους στοχεύει στη θεραπεία του οιδήματος

απομακρύνοντας το υγρό του οιδήματος από τον τραυματισμένο ιστό μέσω ενεργοποίησης της φαγοκυττάρωσης, παραγωγής κυττάρων και πρωτεόλυσης.<sup>11 12</sup>

Η οσθόλη (osthole) (Εικόνα 9) δοκιμάστηκε σε βιοδοκιμές για την αναστολή της κυκλοξυγενάσης και της 5-λιποξυγενάσης και αποδείχτηκε πως έχει μεγάλη αποτελεσματικότητα και εκλεκτικότητα στην αναστολή της 5-λιποξυγενάσης. Μάλιστα υπολογίστηκε πως στην αναστολή της 5-λιποξυγενάσης παρουσιάζει  $IC_{50}=36.2\mu M$ .<sup>13</sup>

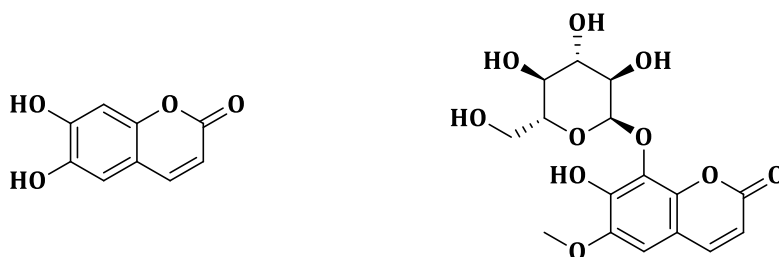


Εικόνα 9. Οσθόλη (osthole)

#### 1.1.4.2. Αντιοξειδωτική δράση

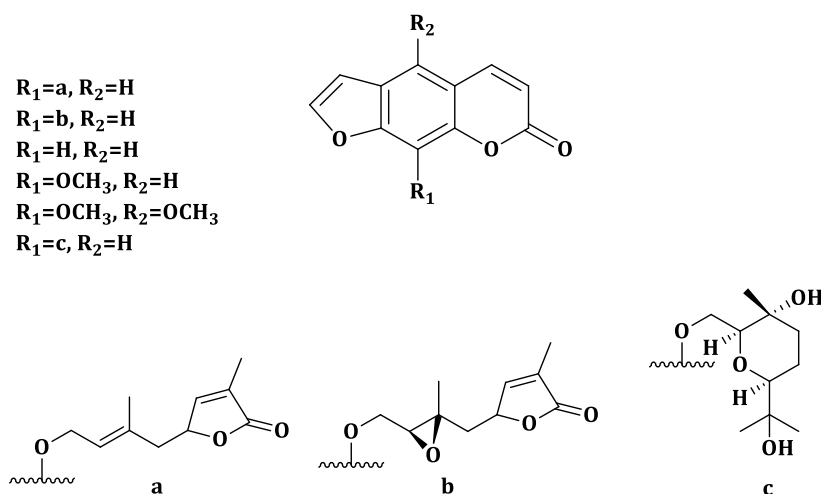
Τα αντιοξειδωτικά παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη διατροφή και την υγεία του ανθρώπου. Φαγητά που περιέχουν αντιοξειδωτικές ουσίες (βιταμίνη C, E) όπως φρούτα, λαχανικά και τρόφιμα ολικής αλέσεως είναι πολύ σημαντικά καθώς μπορεί να επιτελέσουν σημαντικό ρόλο στην αποφυγή χρόνιων παθήσεων όπως ο καρκίνος και τα καρδιαγγειακά νοσήματα.<sup>14</sup>

Σ' ένα υγιές ανθρώπινο σώμα οι μεταβολικές διεργασίες παράγουν ελεύθερες ρίζες και άλλες δραστικές ομάδες όπως είναι ιόντα, μόρια ασύζευκτα αλλά και οι δραστικές μορφές οξυγόνου, αζώτου και θείου (ROS, RNS, RSS). Από διάφορες μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση των κουμαρινών, έχει αποδειχθεί πως οι υδροξυκουμαρίνες και κυρίως οι δι-υδρόξυκουμαρίνες σε ορθο-υποκατάσταση εμφανίζουν πολύ μεγάλη αντιοξειδωτική δράση κάτι το οποίο οφείλεται στα υδροξύλια που υπάρχουν στο σκελετό του μορίου τους. Γενικά ο αριθμός των ομάδων υδροξυλίου στη δομή του δακτυλίου κουμαρίνης συσχετίζεται με τη λειτουργία καταστολής ROS (δραστικές μορφές οξυγόνου). Επιπρόσθετα, κουμαρίνες που περιέχουν στο μόριο τους ομάδες  $-CH_3$ ,  $-C_6H_5$  εμφανίζουν επίσης αυξημένη αντιοξειδωτική δράση λόγω της ικανότητας των υποκαταστών αυτών να είναι δότες ηλεκτρονίων και έτσι να μειώνουν τις ελεύθερες ρίζες και να αποτρέπεται η καταστροφή των κυττάρων. Η εσκουλετίνη και η φραξίνη (Εικόνα 10) είναι κουμαρίνες που διακρίνονται για την αντιοξειδωτική τους δράση.<sup>8 13 12 14</sup>



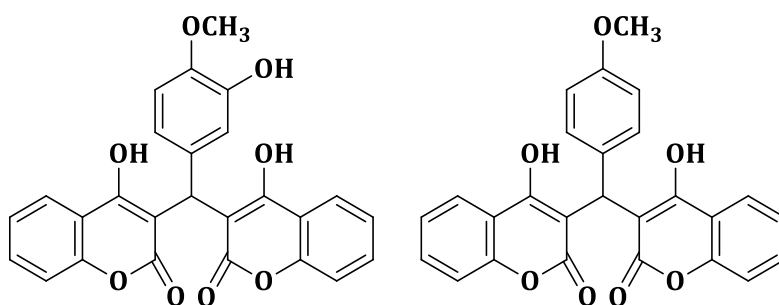
Εικόνα 10. α) Εσκουλετίνη και β) Φραξίνη

Ωστόσο, ορισμένες φουρανοκουμαρίνες παρουσιάζουν επίσης ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, καθώς έχουν προστατευτικό ρόλο έναντι της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Η λιπιδική υπεροξειδωση είναι μια αυτοκαταλυόμενη μη ενζυματική αλληλεπίδραση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) με μοριακό οξυγόνο. Η φουρανοκουμαρίνη που ονομάζεται feroniellamin και μπορεί να έχει διαφορετικούς υποκαταστάτες στις θέσεις 5 και 8 (Εικόνα 11), παρουσιάζει μεγάλη αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης.<sup>15</sup>



Εικόνα 11. Κουμαρίνες feroniellamin<sup>15</sup>

Οι δικουμαρίνες, για τις οποίες έχει γίνει και εκτενέστερη μελέτη, παρουσιάζουν μια τάση παρεμπόδισης της λιπιδικής υπεροξειδωσης με την απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών. Ο Sahar και οι συνεργάτες του συνέθεσαν δικουμαρινικά ανάλογα με αξιολογή αντιοξειδωτική δράση, εκ των οποίων τα δυο μόρια με την υψηλότερη δράση παρουσιάζονται στην Εικόνα 12.<sup>6,16</sup>



Εικόνα 12. Δικουμαρινικά ανάλογα με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση

#### 1.1.4.2.1. Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες, καθώς και άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου, προέρχονται είτε από βιολογικές μεταβολικές διεργασίες που υφίστανται στον ανθρώπινο οργανισμό, είτε από εξωτερικούς παράγοντες. Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα, μόρια ή ιόντα που περιέχουν μη συζευγμένα ηλεκτρόνια τα οποία είναι πολύ δραστικά όταν πραγματοποιείται κάποια χημική αντίδραση. Στο ανθρώπινο βιολογικό σύστημα, οι ελεύθερες ρίζες προέρχονται από μόρια που περιέχουν οξυγόνο, άζωτο και θείο και για το λόγο αυτό οι ελεύθερες ρίζες συναντώνται στις παρακάτω δραστικές ομάδες <sup>17</sup>:

ROS: δραστικές μορφές οξυγόνου	ROS {	• $O_2^{\cdot-}$ , $OH^{\cdot}$ , $RO^{\cdot}$ , $ROO^{\cdot}$ , $HO_2^{\cdot}$ , $H_2O_2$
►RNS: δραστικές μορφές αζώτου	RNS {	• $NO^{\cdot}$ , $ONOO^{\cdot}$ , $N_2O_3$ , $N_2O_4$
RSS: δραστικές μορφές θείου	RSS {	• $RS^{\cdot}$ , $RSOH$ , $RSSR$

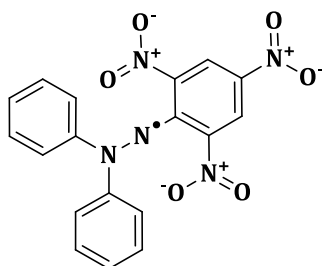
#### 1.1.4.2.2. Οξειδωτικό στρες

Στον ανθρώπινο οργανισμό, τα κύτταρα είναι ικανά να αμύνονται στις βλάβες που προκαλούν οι υψηλές συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου, μέσω ενδοκυττάρων ενζύμων τα οποία διατηρούν το επίπεδο των ROS σε πολύ χαμηλό επίπεδο. Ωστόσο, είναι πολύ πιθανό να υπάρξει μεγάλη αύξηση (υπερπαραγωγή) των δραστικών μορφών ROS είτε λόγω δυσλειτουργίας των κυττάρων είτε λόγω εξωτερικών παραγόντων, με αποτέλεσμα να δημιουργείται σοβαρό πρόβλημα στο ανθρώπινο σώμα λόγω της ιοντικής ανισορροπίας και της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας. Το παραπάνω, είναι γνωστό και ως *οξειδωτικό στρες* και είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση σοβαρών προβλημάτων υγείας όπως είναι φλεγμονώδεις παθήσεις, καρδιοαγγειακά προβλήματα, νόσος του Alzheimer, καρκίνος, αυτισμός και διαβήτης. Ωστόσο, το οξειδωτικό στρες σχετίζεται κατά κύριο λόγο με τη διαδικασία της φλεγμονής, καθώς οι δραστικές μορφές οξυγόνου παράγονται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής από φαγοκυτταρικά λευκοκύτταρα που εισβάλλουν στον ιστό. Οι βλάβες παρατηρούνται κυρίως σε μόρια DNA, RNA, πρωτεΐνες, λιπίδια και ορισμένους υδατάνθρακες καθώς είναι πολύ μικρά και δραστικά μόρια. Τα κατεστραμμένα κύτταρα, λοιπόν, λειτουργούν λανθασμένα με αποτέλεσμα να επιδεινώνεται και να κλιμακώνεται το οξειδωτικό στρες. Συνεπώς είναι πολύ σημαντικό να υπάρχουν εξωγενείς αντιοξειδωτικές ουσίες οι οποίες είναι ικανές να διατηρούν χαμηλές τις συγκεντρώσεις των ελευθέρων ριζών και να εμποδίζουν την εμφάνιση οξειδωτικού στρες. <sup>8,17,18</sup>

#### 1.1.4.2.3. Ικανότητα δέσμησης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH

Η μέθοδος DPPH αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τους Brand-Williams et al. και χρησιμοποιείται ευρέως για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των οργανικών ενώσεων. Η **2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλη** (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, **DPPH**) (Εικόνα 13) είναι μια από τις λίγες εμπορικά διαθέσιμες σταθερές οργανικές ρίζες αζώτου, η οποία δεν αποσυντίθεται, δε διμερίζεται και δεν αντιδρά με το οξυγόνο. <sup>19</sup>

Η ελεύθερη ρίζα DPPH διαθέτει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο και σε διάλυμα παρουσιάζει ένα έντονο πορφυρό χρώμα το οποίο μπορεί να μετρηθεί στα 517 nm. Παρουσία ενώσεων οι οποίες είναι ικανές να μεταφέρουν ή να δώσουν ένα υδρογόνο η ρίζα αποχρωματίζεται δίνοντας ένα υποκίτρινο χρώμα. Η μεταβολή της έντασης απορρόφησης που παρατηρείται κατά την αντίδραση, χρησιμοποιείται ως ένδειξη της ικανότητας των ενώσεων να δρουν ως δεσμευτές ελευθέρων ριζών και κατ' επέκταση της αντιοξειδωτικής τους δράσης.<sup>20</sup>

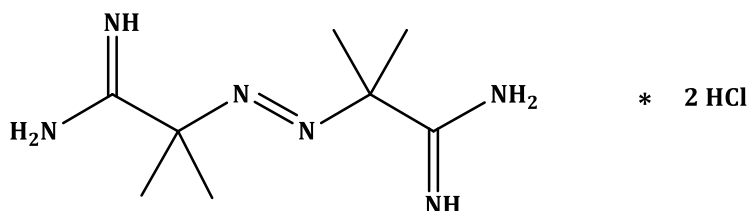


Εικόνα 13. Χημική δομή της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH

#### 1.1.4.2.4. Αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης

Η λιπιδική υπεροξειδωση αναφέρεται στην οξειδωτική φθορά των λιπιδίων που περιέχουν οποιονδήποτε αριθμό διπλών δεσμών άνθρακα-άνθρακα, όπως τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και τα φωσφολιπίδια. Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) προσβάλλουν τα ακόρεστα λιπαρά οξέα ξεκινώντας αλυσιδωτές αντιδράσεις λιπιδικής υπεροξειδωσης.<sup>21,22</sup>

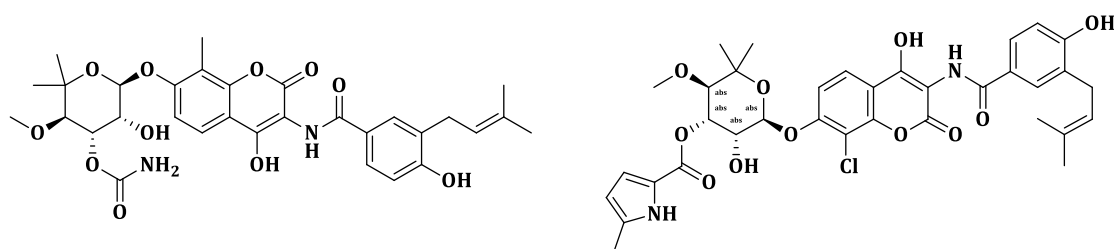
Η *in vitro* λιπιδική υπεροξειδωση, όπως στην περίπτωση του λινελαϊκού οξέος, μπορεί να αρχίσει είτε θερμικά με τη χρήση του υδατοδιαλυτού αζω-εκκινητή 2,2'-αζοδισ-(2-αμιδινοπροπανο)διϋδροχλώριο (AAPH) (Εικόνα 14), είτε από μεταλλικά ιόντα Fe<sup>2+</sup> ή Cu<sup>+</sup> με H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (αντίδραση Fenton). Το AAPH αποσυντίθεται σε φυσιολογική θερμοκρασία (37°C) σε υδατικά διαλύματα σχηματίζοντας ρίζα αλκυλίου (R), η οποία παρουσία οξυγόνου μετατρέπεται στις αντίστοιχες ρίζες υπεροξειδίου (ROO). Επειδή το AAPH είναι υδατοδιαλυτό, ο ρυθμός δημιουργίας ελευθέρων ριζών από το AAPH μπορεί εύκολα να ελεγχθεί και να μετρηθεί.<sup>18,23</sup>



Εικόνα 14. Χημική δομή του εκκινητή ελευθέρων ριζών 2,2'-αζοδισ-(2-αμιδινοπροπανο)διϋδροχλώριο (AAPH)

### 1.1.4.3. Αντιμικροβιακή- αντιβιοτική δράση

Η απλή κουμαρίνη από μόνη της δεν είναι ικανή να παρουσιάσει αντιμικροβιακή δράση. Ωστόσο, διάφορα ανάλογα της και κυρίως αυτά που φέρουν στο μόριο τους μακριές αλυσίδες υδρογονανθράκων εμφανίζουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Η νοβοβοικίνη, η χλωροβοικίνη (Εικόνα 15) καθώς και άλλα συνθετικά ανάλογα τους αποτελούν παράγωγα κουμαρινών που χαρακτηρίζονται τόσο από αντιβιοτικές όσο και από αντιβακτηριδιακές ιδιότητες. Οι Musicki et al. μελέτησαν τις σχέσεις δομής-δράσης μιας σειράς κουμαρινών ως αναστολέων της γυράσης του DNA. Τα αποτελέσματα της εν λόγω μελέτης οδήγησαν στη στερεοεκλεκτική σύνθεση 5-μονοαλκυλ- και 5,5-διαλκυλ-υποκατεστημένης νοβιόσης (νονιόσε) και την ανάπτυξη δύο σειρών αναστολέων της DNA γυράσης που δρουν εναντίον θετικών κατά gram βακτηρίων, όπως είναι ο *Staphylococcus aureus*.<sup>24 12 25</sup>

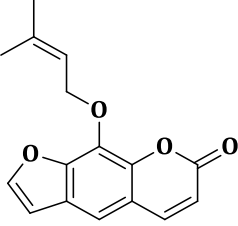
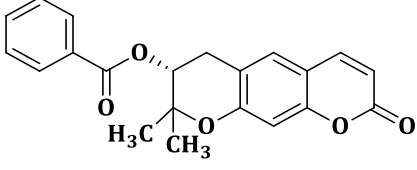
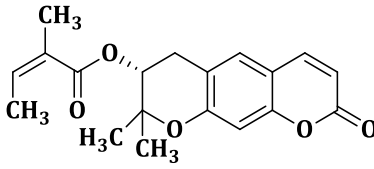
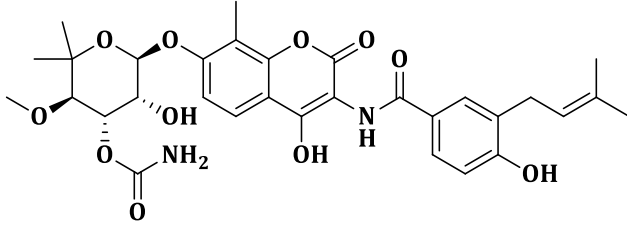


Εικόνα 15. α)Νοβοβοικίνη, β)χλωροβοικίνη

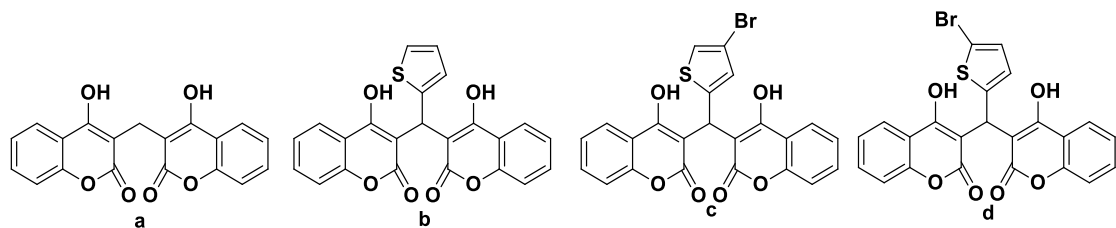
Έχουν βρεθεί και μελετηθεί πολλές κουμαρίνες για την αντιμικροβιακή και αντιβιοτική τους δράση. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται οι σημαντικότερες από τις κουμαρίνες με αντιμικροβιακή δράση, η χημική δομή τους καθώς και τα μικρόβια εναντίον των οποίων δρουν.

Πίνακας 1. Κουμαρίνες και η αντιμικροβιακή τους δράση<sup>12</sup>

Όνομασία κουμαρινικού παραγώγου	Χημική δομή	Μικρόβια εναντίον των οποίων δρα
Αμμορεσινόλη		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus megaterium</i></li> <li>• <i>Micrococcus luteus</i></li> <li>• <i>Micrococcus lysodeikticus</i></li> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> </ul>
Οστροθίνη		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus megaterium</i></li> <li>• <i>Micrococcus luteus</i></li> <li>• <i>Micrococcus lysodeikticus</i></li> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> </ul>
Ανθογενόλη		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Enterococcus</i></li> </ul>

<b>Ιμπερατορίνη</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Shigella dysenteriae</i></li> </ul>
<b>Αιγελινόλη</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>• <i>Salmonella typhi</i></li> <li>• <i>Enterobacter cloacae</i></li> <li>• <i>Enterobacter aerogenes</i></li> </ul>
<b>Αγασυλίνη</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>• <i>Salmonella typhi</i></li> <li>• <i>Enterobacter cloacae</i></li> <li>• <i>Enterobacter aerogenes</i></li> </ul>
<b>Νοβοβιοκίνη</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Corinebacterium diphtheria</i></li> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>• <i>Streptomyces pneumoniae</i></li> </ul>

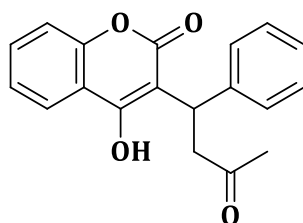
Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει έρευνα και για το φαρμακευτικό προφίλ των δικουμαρινών, οι οποίες έχουν επιδείξει αξιόλογη αντιμικροβιακή δράση. Ο Li et al. σε σχετική μελέτη που διεκπεραίωσαν, βρήκαν πως 4 δικουμαρίνες, (Εικόνα 16), εμφανίζουν καλή αντιμικροβιακή δράση έναντι τεσσάρων στελεχών του *S. aureus*. Συγκεκριμένα, οι δύο ενδομοριακές συνδέσεις υδρογόνου συντέλεσαν στη μεγαλύτερη αντιβακτηριδιακή δράση των δικουμαρινών.<sup>6,26</sup>



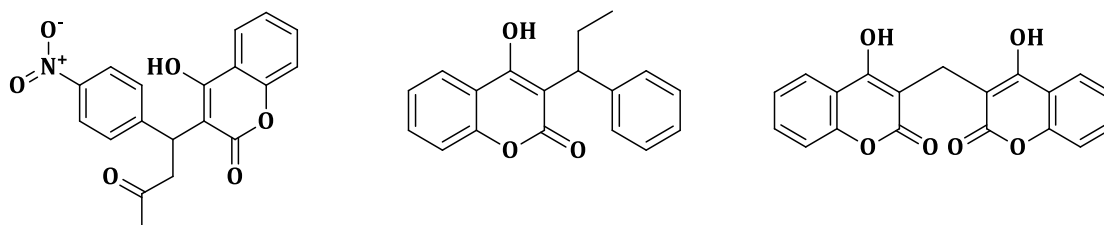
Εικόνα 16. Δικουμαρίνες με αντιμικροβιακή και αντιβακτηριδιακή δράση

#### 1.1.4.4. Αντιπηκτική δράση

Οι κουμαρίνες εμφανίζουν ισχυρή αντιπηκτική δράση καθώς θεωρούνται ανταγωνιστές της Βιταμίνης Κ, δηλαδή του πηκτικού παράγοντα που βρίσκεται στο ήπαρ. Η βιταμίνη Κ είναι ένας συμπαράγοντας ενός μικροσωμικού ενζύμου, της 2,3-εποξειδικής αναγωγάσης, το οποίο είναι απαραίτητο για τη λειτουργία και σύνθεση της προθρομβίνης, των παραγόντων VII, IX και X καθώς και των πρωτεϊνών C και S. Η αντιπηκτική τους δράση οφείλεται στην ικανότητα τους να αναστέλλουν τη σύνθεση της βιταμίνης Κ καθώς επίσης να ελέγχουν τη ροή του αίματος μέσω της παρέμβασης τους στην κυκλική αλληλομετατροπή της βιταμίνης Κ και του 2,3 εποξειδίου της. Η διαδικασία της πήξης περιλαμβάνει πολυμερισμό και διασύνδεση μιας διαλυτής πρωτεΐνης ορού, την προθρομβίνη, σε ένα σκληρό αδιάλυτο πολυπεπτίδιο γνωστό ως ινώδες. Η βαρφαρίνη (Εικόνα 17) είναι το πιο γνωστό αντιπηκτικό και χρησιμοποιείται ευρέως. Ωστόσο, μερικές ακόμα κουμαρίνες γνωστές για τις αντιπηκτικές τους ιδιότητες είναι η ακενοκουμαρόλη, η φαινοπρομόνη και η δικουμαρόλη (Εικόνα 18). Συνολικά από όλες τις κουμαρίνες, η βαρφαρίνη είναι η πιο δραστική καθώς έχει μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής με αποτέλεσμα να είναι πιο σταθερή.<sup>24 11 12 27</sup>



Εικόνα 17. Βαρφαρίνη, το πιο ισχυρό αντιπηκτικό



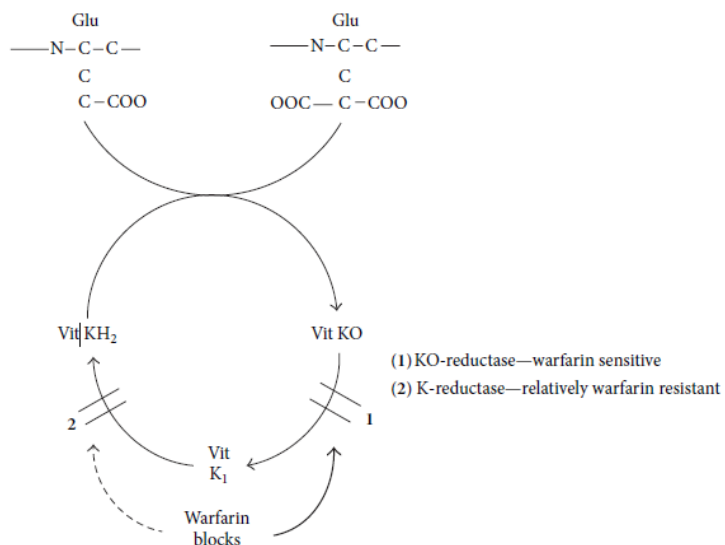
Εικόνα 18. Ακενοκουμαρόλη, φαινοπρομόνη και δικουμαρόλη



#### 1.1.4.4.1. Διαδικασία αναστολής Βιταμίνης Κ

Η αντιπηκτική δράση των κουμαρινών στηρίζεται στην αναστολή του κύκλου μετατροπής της βιταμίνης Κ, προκαλώντας έτσι παραγωγή μερικώς καρβοξυλιωμένων και αποκαρβοξυλιωμένων πρωτεϊνών στο ήπαρ με μειωμένη προ-πηκτική δράση. Επιπλέον οι ανταγωνιστές της βιταμίνης Κ, όπως είναι και οι κουμαρίνες, αναστέλλουν την καρβοξυλίωση των ρυθμιστικών αντιπηκτικών πρωτεϊνών C και S και επομένως έχουν τη δυνατότητα εμφάνισης προ-πηκτικής δράσης. Η αντίδραση της καρβοξυλίωσης, με τη βοήθεια ιόντων ασβεστίου, προκαλεί αναδιάταξη στις πρωτεΐνες πήξης. Η αντίδραση της καρβοξυλίωσης απαιτεί μικρή ποσότητα Βιταμίνης Κ (βιταμίνη ΚΗ<sub>2</sub>), μοριακό οξυγόνο και διοξείδιο του άνθρακα και έτσι συνδέεται με την οξείδωση της βιταμίνης ΚΗ<sub>2</sub> έως το

σηματισμό εποξειδίου της βιταμίνης Κ. Στη συνέχεια, το εποξείδιο της βιταμίνης Κ ανακυκλώνεται στη βιταμίνη ΚΗ<sub>2</sub> μέσω δύο σταδίων αναγωγής. Ο πρώτος, που είναι ευαίσθητος στον ανταγωνιστή της βιταμίνης Κ μειώνει το εποξείδιο της βιταμίνης Κ σε βιταμίνη Κ<sub>1</sub> (τη φυσική μορφή βιταμίνης Κ<sub>1</sub>), ενώ ο δεύτερος, που είναι σχετικά μη ευαίσθητος στους ανταγωνιστές της βιταμίνης Κ, μειώνει τη βιταμίνη Κ<sub>1</sub> σε βιταμίνη ΚΗ<sub>2</sub>.



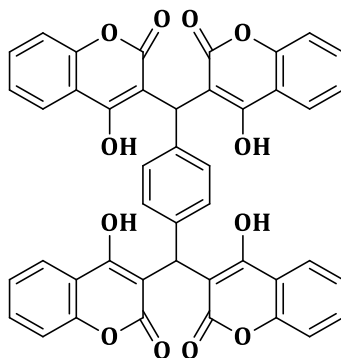
Εικόνα 19. Κύκλος μετατροπής της βιταμίνης Κ

Η θεραπεία με ανταγωνιστές της βιταμίνης Κ οδηγεί στην εξάντληση της βιταμίνης ΚΗ<sub>2</sub>, περιορίζοντας έτσι το  $\gamma$ -καρβοξυλίωση των πηκτικών πρωτεϊνών που εξαρτώνται από τη βιταμίνη Κ. Η επίδραση των κουμαρινών μπορεί να αντισταθμιστεί από τη βιταμίνη Κ<sub>1</sub> (είτε προσλαμβάνεται σε τροφή είτε χορηγείται θεραπευτικά) επειδή το δεύτερο στάδιο αναγωγής είναι σχετικά μη ευαίσθητος ανταγωνιστής της βιταμίνης Κ. <sup>12</sup>

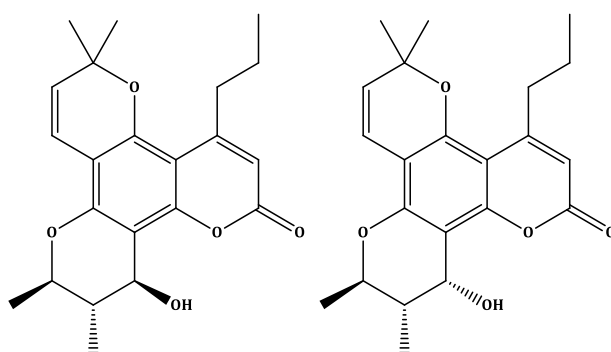
#### 1.1.4.5. Αντί-HIV δράση

Ο ανθρώπινος ιός ανοσοανεπάρκειας τύπου 1 (HIV-1) ανήκει σε μια υποοικογένεια του ρετροϊού, *Lenti virinae*, και είναι υπεύθυνος για το σύνδρομο ανοσοανεπάρκειας (AIDS). Ανάμεσα στα ένζυμα του HIV, τρία είναι κατάλληλα για στοχευμένη θεραπευτική ανάπτυξη και αυτά είναι τα εξής: αντίστροφη μεταγραφή, πρωτεάση και ιντεγκράση. Τέσσερις αναστολείς πρωτεάσης HIV-1 έχουν εγκριθεί για τη θεραπεία του AIDS: σακουιναβίρη, ριτοναβίρη, ινδιναβίρη και νελφίναβίρη. Ωστόσο, ένας σημαντικός αριθμός κουμαρινών έχει συμβάλει στην αναστολή της αναπαραγωγής του HIV και μερικές από αυτές μπορεί να αναστέλλουν διαφορετικά στάδια στον κύκλο αναπαραγωγής του HIV. Μια τετραμερής κουμαρίνη, η οποία συναντάται στη φύση και παρουσιάζεται στην Εικόνα 20, βρέθηκε να έχει ισχυρή ανασταλτική δράση στην ιντεγκράση του HIV σύμφωνα με σχετική έρευνα που διεξήχθη από τον Mazumder et al. Επιπρόσθετα, οι κουμαρίνες που απομονώνονται από το γένος *Calophyllum* (Guttiferae) έχοντας είτε άλκυλο είτε φαίνυλο ομάδα στη θέση 4 του κουμαρινικού σκελετού

παρουσιάζουν αντί-HIV δράση. Δομικές τροποποιήσεις των παραπάνω κουμαρινών έδειξαν ότι η στεreoχημεία του 2,3-dimethyl-4-chromone που υπάρχει σε τέτοια μόρια παίζει σημαντικό ρόλο σε αυτήν την δραστικότητα. Παρακάτω, στην **Εικόνα 21** παρουσιάζονται δύο από τις σημαντικότερες από μια σειρά κουμαρινών που εμφανίζουν αντί-HIV δράση.<sup>24-28</sup>

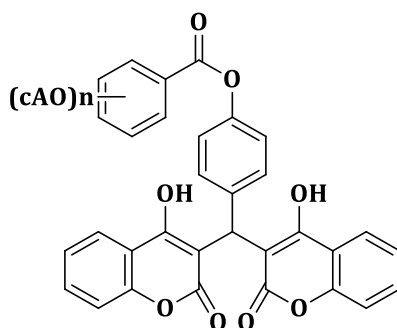


**Εικόνα 20. Φυσική τετραμερής κουμαρίνη**



**Εικόνα 21. Κουμαρίνες calanolides-A και calanolides-B**

Σε σχετική μελέτη που διεξήχθη σχετικά με την αντι-HIV δράση των δικουμαρινών βρέθηκε πως η δραστικότερη από όλες τις δικουμαρίνες είναι αυτή που παρουσιάζεται παρακάτω (**Εικόνα 22**).<sup>28</sup>



**n:3,4-di-OH**

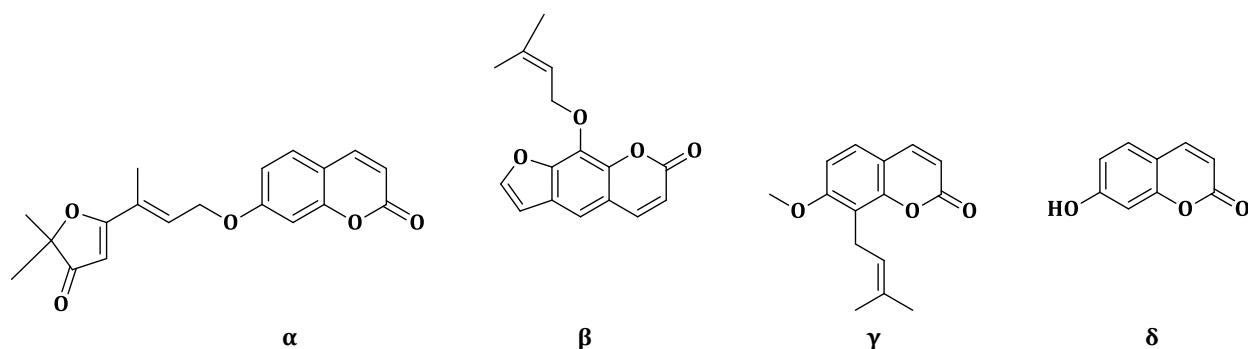
**Εικόνα 22. Δικουμαρίνη με ισχυρή αντι-HIV δράση**

#### 1.1.4.6. Αντικαρκινική δράση

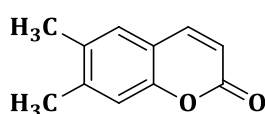
Μια από τις ασθένειες που αποτελούν μάστιγα στη σημερινή κοινωνία είναι ο καρκίνος. Ο όρος «καρκίνος» υποδηλώνει μια πληθώρα ασθενειών που συνδέονται με διάφορους παράγοντες και αρκετές μεταλλάξεις. Τα περισσότερα αντικαρκινικά φάρμακα έχουν σχεδιαστεί και παραχθεί έχουν ως μηχανισμό δράσης να εντοπίσουν τα κύτταρα εκείνα που διαταράσσουν την κυτταρική διαίρεση. Οι πιο αποτελεσματικές θεραπείες μέχρι σήμερα για τον καρκίνο είναι οι χημειοθεραπείες και οι ακτινοβολίες, που έχουν ωστόσο πολλές παρενέργειες στον οργανισμό οπότε είναι ζωτικής σημασίας η σύνθεση νέων φαρμάκων λιγότερο τοξικών και επιβλαβών για τον ανθρώπινο οργανισμό.<sup>11 8</sup>

Η κακοήθης αγγειογένεση είναι μια ακόμη περίπτωση που μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση θανατηφόρων ασθενειών όπως είναι ο καρκίνος, η αγγειοανεπάρκεια και η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Η αγγειογένεση σε φυσιολογικά επίπεδα μπορεί να επιτελέσει σημαντικό ρόλο στην επούλωση πληγών, την εμβρυική ανάπτυξη, το γυναικείο αναπαραγωγικό κύκλο αλλά όταν αυτή γίνει σε ανεξέλεγκτο βαθμό οδηγεί στην ανάπτυξη στερεών όγκων και στη μετάσταση αυτών.<sup>29,30</sup>

Οι κουμαρίνες έχουν αποδειχθεί ότι μπορεί να εμφανίζουν αντικαρκινική δράση αλλά επίσης και θεραπευτικές ιδιότητες στις παρενέργειες που προκαλούν οι ακτινοθεραπείες. Μέχρι σήμερα, οι κουμαρίνες έχουν μελετηθεί ευρέως για τη θεραπεία του καρκίνου του προστάτη, των νεφρών καθώς και της λευχαιμίας. Επίσης, επιφέρουν πολύ θετικά αποτελέσματα στην περίπτωση των μελανωμάτων και στην αναστολή της εξάπλωσης των όγκων. Το μεγάλο πεδίο μελέτης όσον αφορά τις κουμαρίνες βασίζεται στη μη τοξική και αντιπηκτική ιδιότητα τους. Κάποιες από τις σημαντικότερες κατηγορίες κουμαρινών που έχουν αποδεδειγμένη αντικαρκινική δράση είναι οι φυρανοκουμαρίνες και πυρανοκουμαρίνες, Από διάφορες επιστημονικές μελέτες σε ευρύ φάσμα κουμαρινών, έχει διαπιστωθεί πως οι κουμαρίνες geiparvarin (α), ιμπερατορίνη (β), οσθόλη (γ) και 7-υδροξυ-κουμαρίνη (δ) (Εικόνα 23) εμφανίζουν ισχυρές αντικαρκινικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, η τελευταία έχει αποδειχθεί από μελέτη σε κλινικές δοκιμές πως δρα ως ανασταλτικός παράγοντας της ανάπτυξης καρκινικών κυτταρικών σειρών όπως A549 (πνεύμονας), ACHN (νεφρό), H727 (πνεύμονας), MCF-7 (στήθος) και HL-60 (λευχαιμία), και δρα επίσης κατά του καρκίνου του προστάτη, του κακοήθους μελανώματος και του μεταστατικού καρκινώματος των νεφρικών κυττάρων. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί πως πολλά παράγωγα της 6,7-διμεθυλοκουμαρίνης (Εικόνα 24) αποτελούν αναστολείς της κακοήθους αγγειογένεσης. Η κουμαρίνη geiparvarin εντοπίζεται στα φύλλα της αμερικάνικης ιτιάς, είναι μονοαμίνη και λειτουργεί ως αναστολέας της οξειδάσης και ως αντικαρκινικό φάρμακο.<sup>31 11 12 3 30 32</sup>

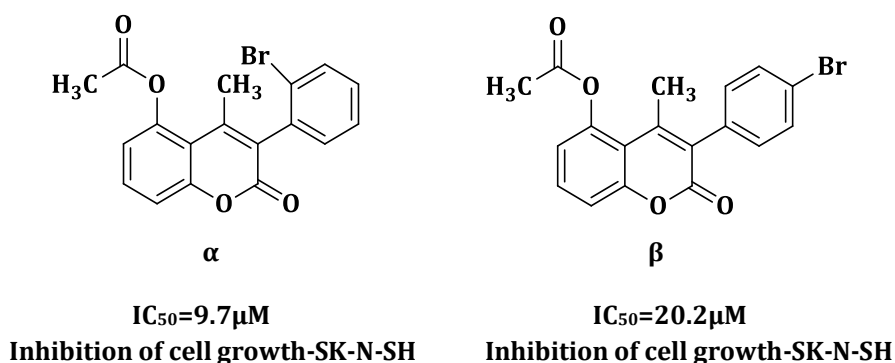


Εικόνα 23. α)geiparvarin, β)υπερρατορίνη, γ)οσθόλη, δ)7-υδροξυ-κουμαρίνη



Εικόνα 24. 6,7-διμεθυλο-κουμαρίνη

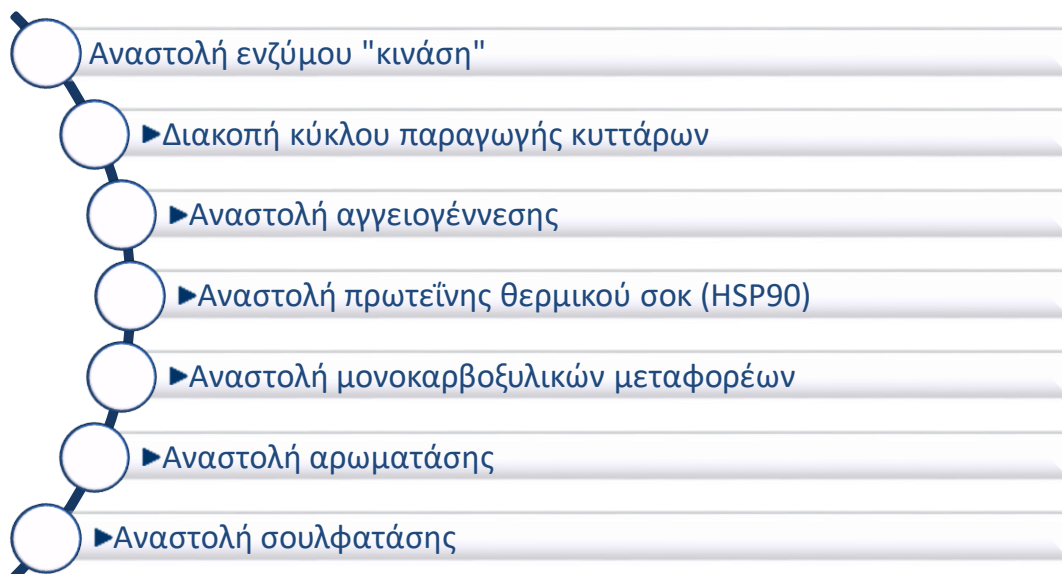
Σε μελέτη που διεξήχθη στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, ΕΜΠ, βρέθηκε πως μερικά 3-αρυλ-5-υποκατεστημένα κουμαρινικά ανάλογα εμφανίζουν αξιόλογη αντικαρκινική δράση. Συγκεκριμένα, τα κουμαρινικά ανάλογα εξετάστηκαν στην αντικαρκινική τους δράση μελετώντας την κυτταροτοξικότητά τους χρησιμοποιώντας την ανθρώπινη κυτταρική σειρά νευροβλαστώματος SK-N-SH και την ανθρώπινη κυτταρική σειρά αυχενικού επιθηλιοειδή HeLa και βρέθηκε πως η 3-(2-βρωμοφαινυλ)-4-μεθυλ-2-οξο-κουμαρίνη (**α**) και η 3-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-2-οξο-κουμαρίνη (**β**) εμφανίζουν την καλύτερη δράση (Εικόνα 25).<sup>18</sup>



Εικόνα 25. α)3-(2-βρωμοφαινυλ)-4-μεθυλ-2-οξο-κουμαρίνη, β) 3-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-2-οξο-κουμαρίνη

Ακόμη, σε *in vitro* μελέτη των A. Lacy et al. αποδείχτηκε πως η κουμαρίνη από μόνη της δεν είναι υπεύθυνη για όλα τα παρατηρούμενα αποτελέσματα που προκύπτουν *in vivo* αλλά αποτελεί προφάρμακο άλλων δραστικών μεταβολιτών.<sup>3</sup>

Μερικές από τις δράσεις των κουμαρινών σε διάφορα στάδια του καρκίνου εμφανίζονται παρακάτω:<sup>1</sup>

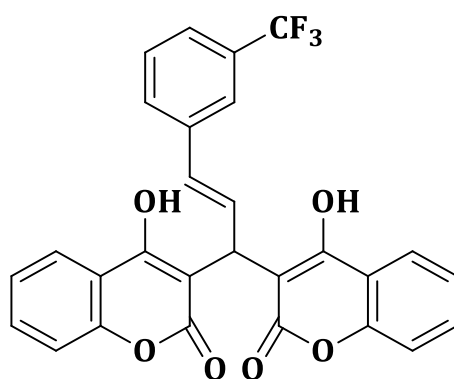


Παρακάτω, παρουσιάζεται συνοπτικά ένας πίνακας με τις σημαντικότερες κουμαρίνες και τις δράσεις τους (Πίνακας 2).<sup>11</sup>

**Πίνακας 2.Κουμαρίνες και η αντικαρκινική τους δράση**

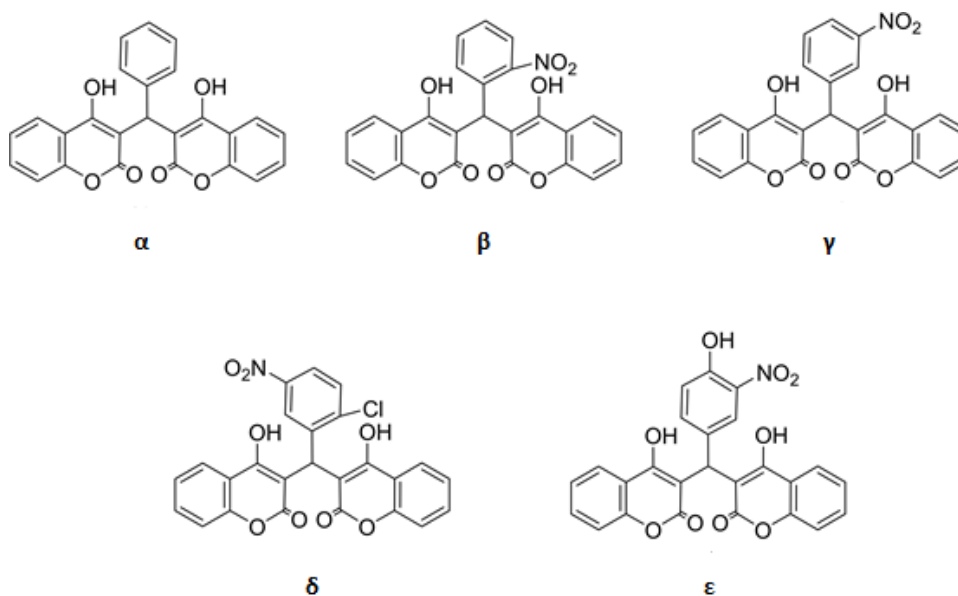
Κουμαρίνη	Χημική δομή	Θεραπευτικός ρόλος
Βαρφαρίνη		Κακοήθες μελάνωμα
Πυρανοκουμαρίνες		Καρκίνωμα νεφρικών κυττάρων
Πυρανοκουμαρίνες		Καρκίνος του προστάτη
7-υδροξυκουμαρίνη		Λευχαιμία
α-Βενζοπυρόνες		Καρκίνος του μαστού
Ψωραλένιο		Καρκίνος του τραχήλου της μήτρας

Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναφερθεί πως οι δικουμαρίνες, αν και δεν έχουν μελετηθεί σε τόσο μεγάλο βαθμό όσο οι κουμαρίνες, εμφανίζουν επίσης αντικαρκινική δράση. Συγκεκριμένα, οι biscoumarins, δηλαδή οι δικουμαρίνες που έχουν υδροξύλιο στη θέση 4, έχουν μελετηθεί εκτενέστερα για την αντικαρκινική τους δράση. Οι Perumalsamy et al. ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν την αντικαρκινική δράση της στυρένιο-υποκατεστημένης biscoumarin (SSBC) (Εικόνα 26) έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών του στομάχου. Ο μηχανισμός της κυτταροτοξικής δράσης της συγκεκριμένης κουμαρίνης είναι η απόπτωση, καθώς δεσμεύεται στην ενεργή θέση της BH3 της αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης. Μάλιστα βρέθηκε  $IC_{50}=4.56 \mu\text{g/mL}$ . Η ίδια δικουμαρίνη και για τον καρκίνο του μαστού, όπου βρέθηκε ακόμα πιο αποτελεσματική. Συγκεκριμένα, η SSBC αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων του μαστού μέσω απόπτωσης των εγγενών μιτοχονδριακών κυττάρων. <sup>6,33</sup>



Εικόνα 26. Στυρένιο-υποκατεστημένη δικουμαρίνη

Τέλος, ο Xin και οι συνεργάτες τους συνέθεσαν διάφορες 4-υδροξυ-δικουμαρίνες με αξιόλογη αντικαρκινική δράση σε καρκινικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης λόγω της αντι-πολλαπλασιαστικής και αντιαποπτωτικής τους δράσης. Οι συγκεκριμένες κουμαρίνες παρουσιάζονται παρακάτω, με την κουμαρίνη  $\delta$  να εμφανίζει την ισχυρότερη αντικαρκινική δράση (Εικόνα 27). <sup>6,34</sup>



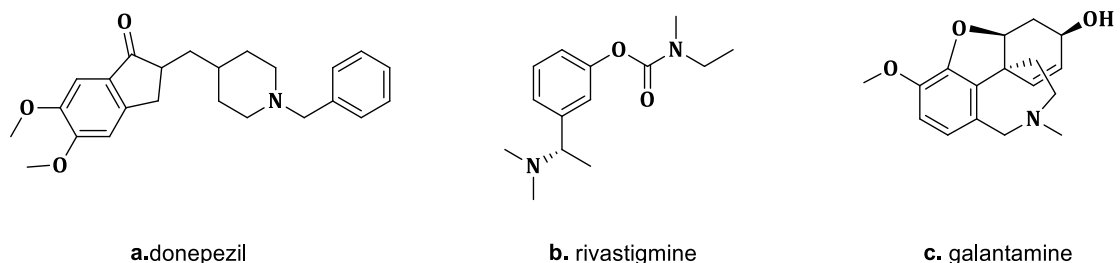
Εικόνα 27. Δικουμαρίνες με ισχυρή αντικαρκινική δράση

### 1.1.5. Χρήση κουμαρινών για τη θεραπεία της νόσου Alzheimer

Η νόσος Alzheimer (AD-Alzheimer Disease) προσδιορίστηκε πρώτη φορά από τον Alois Alzheimer και αποτελεί τον πιο διαδεδομένο τύπο άνοιας όπου υφίσταται μεγάλος εκφυλισμός της μνήμης και συνοδεύεται από απραξία, διαταραχές ομιλίας αλλά και από σύνδρομο ψυχικών διαταραχών. Αποτελεί μια πολυπαραγοντική νευροεκφυλιστική νόσο, ωστόσο έχει βρεθεί ότι σχετίζεται σημαντικά με τη μειωμένη δράση του χολινεργικού συστήματος, και πιο συγκεκριμένα με τα μειωμένα επίπεδα του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη (ACh) στις περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με τη μάθηση, τη μνήμη, τη συμπεριφορά και τις συναισθηματικές αντιδράσεις. Χαρακτηρίζεται από μη φυσιολογική αναδίπλωση και συσσωμάτωση πρωτεϊνών καθώς και από οξειδωτικό άγχος και μιτοχονδριακή ανωμαλία. Νευροπαθολογικά, χαρακτηρίζεται επίσης από την παρουσία πλακών β-αμυλοειδούς (beta-amyloid) και από εκφυλισμό-ατροφία των βασικών χολινεργικών νευρώνων του πρόσθιου μέρους του εγκεφάλου. Πολλοί παράγοντες θεωρούνται ότι μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση της νόσου Alzheimer, όμως ο βασικότερος απ' όλους είναι η ηλικία. Όσο γηραιότερος είναι ο άνθρωπος τόσο αυξάνονται οι πιθανότητες εμφάνισης της νόσου.<sup>35 36 37</sup>

Τα ένζυμα χολινεστεράσης, η ακετυλοχολινεστεράση (AChE) και η βουτυρυλοχολινεστεράση (BuChE), αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για τη θεραπεία της νόσου του Alzheimer. Η αναστολή των εν λόγω ενζύμων είναι μέχρι σήμερα η κύρια προσέγγιση για τη θεραπεία της νόσου. Η ακετυλοχολινεστεράση βρίσκεται κυρίως στο αίμα και είναι το ένζυμο που συμβάλλει στην υδρόλυση του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη, η μείωση του οποίου συμβάλλει στην παθογένεση της νόσου. Σύμφωνα με τη χολινεργική υπόθεση, μια έλλειψη χολινεργικών νευροδιαβιβαστών στο πρόσθιο μέρος του εγκεφάλου, εμπλέκεται άμεσα στη νόσο του Alzheimer. Έτσι, η αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης και η ενίσχυση της χολινεργικής νευροδιαβίβασης του εγκεφάλου αποτελεί μια ελπιδοφόρα προσέγγιση για τη θεραπεία της νόσου του Alzheimer, καθώς με αυτό τον τρόπο εμποδίζεται η διάσπαση του ενζύμου της χολινεστεράσης και αυξάνεται η προσβασιμότητά της στον εγκέφαλο.<sup>35 38</sup>

Τα φάρμακα που υπάρχουν σήμερα για τη θεραπεία του Alzheimer περιορίζονται κυρίως σε τρεις αναστολείς AChE, τους donepezil, rivastigmine και galantamine (Εικόνα 28). Ωστόσο, τα φάρμακα αυτά, λόγω της πολυπλοκότητας της νόσου, έχουν ένα μοναδικό στόχο, την αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν μια προσεγγιστική θεραπεία κατά του Alzheimer και όχι πρόληψη ή ολοκληρωμένη θεραπεία του. Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια η επιστήμη έχει στραφεί στο σχεδιασμό πολυλειτουργικών μορίων με δύο ή και περισσότερες βιολογικές δράσεις, όπως αναστολή της BuChE σε συνδυασμό με τη μείωση της συσσωμάτωσης του αβ-πεπτιδίου και των χηλικών μετάλλων.<sup>39</sup>

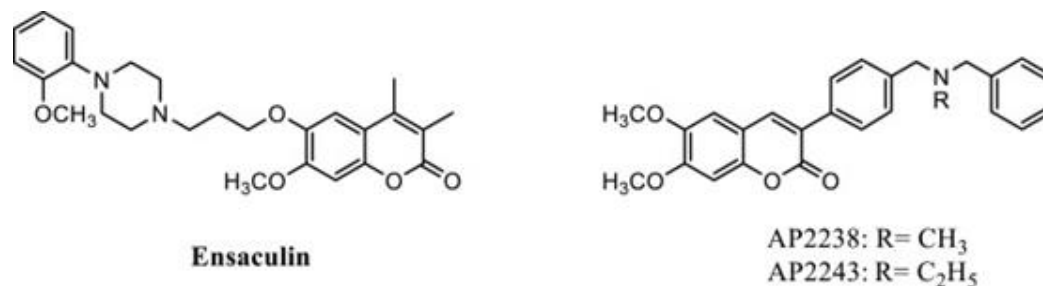


Εικόνα 28. Αναστολείς ακετυλοχολινεστεράσης ενσωματωμένοι σε φάρμακα κατά του Alzheimer

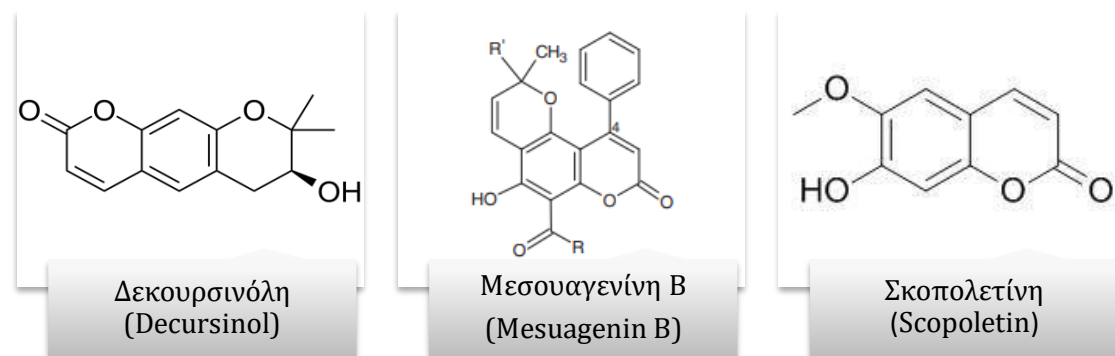
Οι κουμαρίνες, είτε φυσικές είτε συνθετικές, εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία βιολογικών δράσεων, όπως έχει ήδη αναφερθεί, μεταξύ των οποίων και η αναστολή του ενζύμου AChE. Οι επιστήμονες τα τελευταία χρόνια έχουν προσπαθήσει να συνθέσουν κουμαρινικά παράγωγα τα οποία εκτός από την αναστολή του ενζύμου AChE να

εμφανίζουν και περαιτέρω φαρμακολογικές ιδιότητες όπως η μείωση απόθεσης του β-αμυλοειδούς και η αναστολή της β-σεκρετάσης (beta-secretase) που είναι πολύ σημαντικές για την προσέγγιση της θεραπείας της νόσου AD. Τα περισσότερα κουμαρινικά ανάλογα που συντίθενται για τον σκοπό αυτό περιλαμβάνουν υποκατάσταση στη θέση 3- ή 4- του κουμαρινικού σκελετού με χαρακτηριστική ομάδα αμίνης συμπεριλαμβανομένων ομάδων βενζυλαμίνης, φαινυλπιπεραζίνης ή ανιλίνης.<sup>36,40</sup>

Μέχρι σήμερα υπάρχουν μερικά κουμαρινικά ανάλογα που έχουν επιδείξει αξιόλογη αναστολή AChE, όπως είναι τα AP2238, AP 2243 και η ενσακουλίνη (Εικόνα 29).<sup>39</sup> Ωστόσο, από διάφορες μελέτες που έχουν διεξαχθεί, μερικές φυσικές κουμαρίνες παρουσιάζουν επίσης αξιόλογη ανασταλτική δράση του ενζύμου Ache (Εικόνα 30).<sup>36</sup>



Εικόνα 29. Κουμαρινικά ανάλογα με αξιόλογη αναστολή AChE



Εικόνα 30. Κουμαρινικά ανάλογα με ανασταλτική δράση κατά της Ακετυλοχολινεστεράσης (AChE)

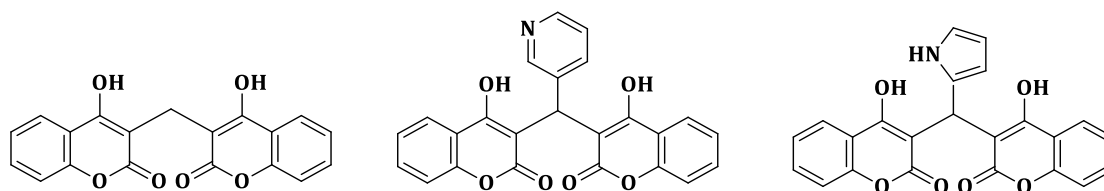
Επιπρόσθετα, είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί πως τα τελευταία χρόνια έχει διαπιστωθεί πως τα αντιοξειδωτικά φάρμακα είναι ικανά να βοηθήσουν στην αποτροπή εμφάνισης ή και στη θεραπεία της νόσου Alzheimer.<sup>35</sup>



## 1.2. Δικουμαρίνες

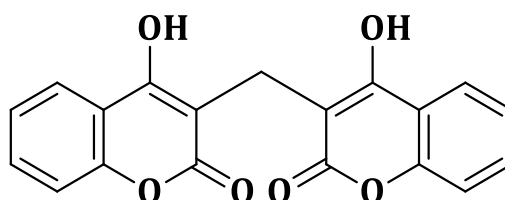
Οι δικουμαρίνες είναι βιολογικά δραστικές φαρμακοφόρες δομές και αποτελούν ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον πεδίο μελέτης στην επιστημονική κοινότητα. Οι δικουμαρίνες έχουν επιδείξει πληθώρα βιολογικών δράσεων όπως είναι η αντιπηκτική και αντιοξειδωτική δράση, η αναστολή της  $\alpha$ -γλυκοζιδάσης για αντίδιαβητική δράση, η αναστολή της ουρεάσης για την πρόληψη ασθενειών όπως πυελονεφρίτιδα, ηπατική εγκεφαλοπάθεια και ηπατικό κώμα και η αναστολή των νουκλεοτιδικών πυροφωσφατασών. Είναι επομένως σημαντικό να μελετηθούν περαιτέρω τα μόρια αυτά για τη διερεύνηση παραπάνω φαρμακολογικών δράσεων τους.<sup>41 42 43</sup>

Παρακάτω (Εικόνα 31) απεικονίζονται μερικές από τις δικουμαρίνες που εμφανίζουν ισχυρή ανασταλτική δράση της ουρεάσης.



Εικόνα 31. Δικουμαρίνες με ισχυρή ανασταλτική δράση ουρεάσης

Μια από τις πιο γνωστές δικουμαρίνες είναι η δικουμαρόλη (Εικόνα 32), η οποία απομονώθηκε πρώτη φορά από τα αποσυντιθέμενα φύλλα του φυτού *Melilotus albus* (Fabaceae / Leguminosae) και η οποία έχει χρησιμοποιηθεί στην ιατρική για τη μείωση της πήξης του αίματος σε ασθενείς που πάσχουν από καρδιαγγειακές παθήσεις και θρομβώσεις.<sup>2 24 44 45</sup>

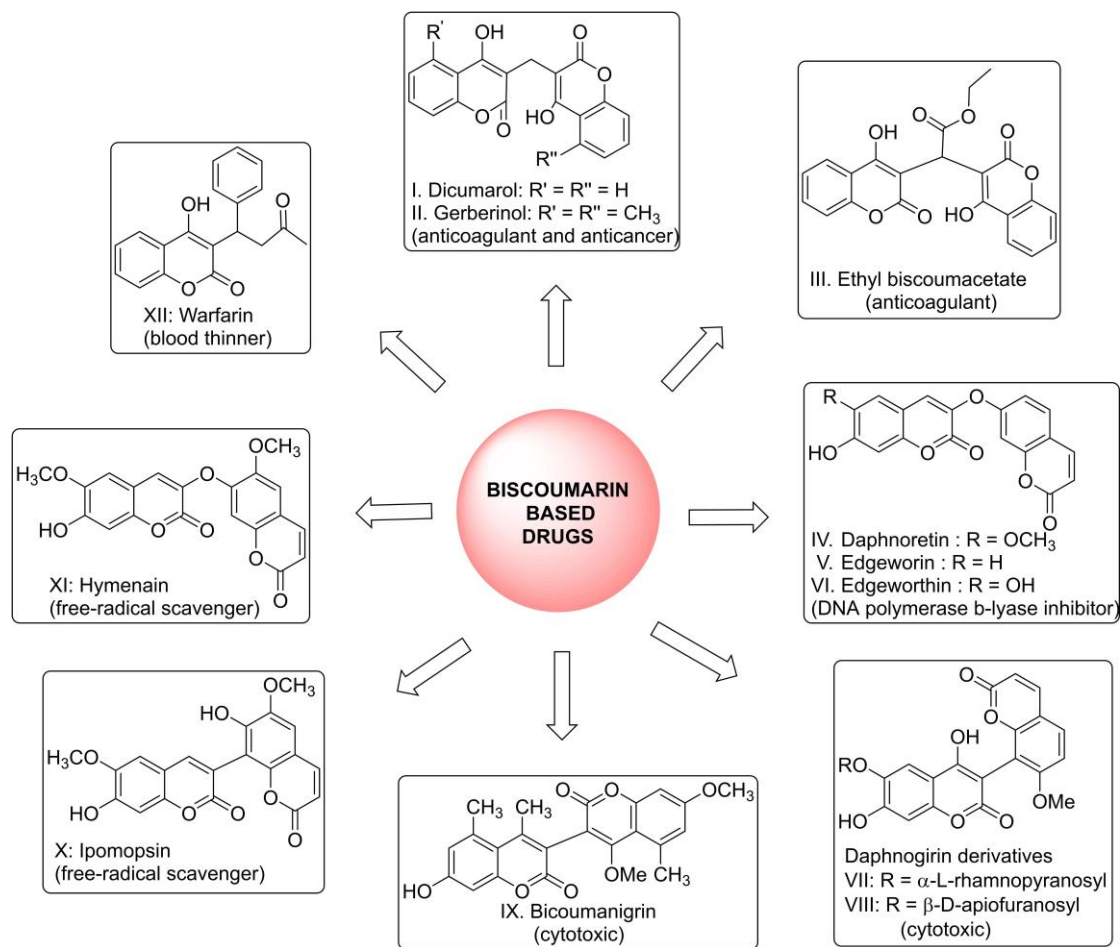


Εικόνα 32. Δικουμαρόλη

### 1.2.1. Φαρμακευτικό προφίλ δικουμαρινών

Οι δικουμαρίνες, και συγκεκριμένα οι 4-υδροξυ-υποκατεστημένες δικουμαρίνες, έχουν αναδειχθεί πολύτιμες τόσο στο χώρο της φαρμακευτικής χημείας όσο και της οργανικής σύνθεσης. Εμφανίζουν ένα αξιόλογο και ευρύ φαρμακευτικό προφίλ. Το φαρμακευτικό αυτό προφίλ έγκειται σε δράσεις όπως αντιπηκτική, αντιοξειδωτική και αντιβακτηριακή δράση, αναστολή ουρεάσης καθώς και αναστολή  $\alpha$ -γλυκοζιδάσης.<sup>6,46-49</sup>

Παρακάτω (Εικόνα 33) παρουσιάζονται μερικά από τα φάρμακα που υπάρχουν μέχρι και σήμερα στην αγορά και έχουν ως βάση σύνθεσης τις δικουμαρίνες.

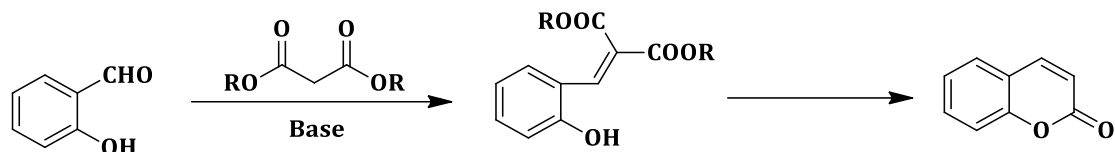


Εικόνα 33. Φάρμακα με βάση σύνθεσης δικουμαρίνες <sup>6</sup>

### 1.3. Κλασικές μέθοδοι σύνθεσης κουμαρινών και δικουμαρινών

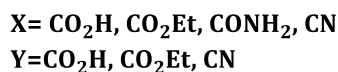
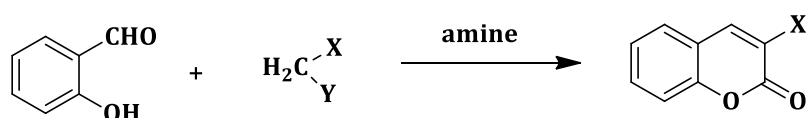
#### 1.3.1. Αντίδραση Knoevenagel

Η αντίδραση Knoevenagel περιλαμβάνει τη συμπύκνωση των βενζαλδευδών με ενεργές ενώσεις μεθυλενίου παρουσία καταλύτη με βάση το άζωτο όπως πρωτοταγείς-δευτεροταγείς-τριτοταγείς αμίνες και αμμωνιούχα άλατα, και χρησιμοποιείται για τη σύνθεση α,β-ακόρεστων δικαρβονυλικών ενώσεων ή και διάφορων άλλων ενώσεων. Ωστόσο, πολλές φορές ο καταλύτης μπορεί να είναι κάποια ασθενής βάση ή κάποιο οξύ κατά Lewis κάτω από ομοιογενείς συνθήκες. Σε πιο εξειδικευμένο επίπεδο, όσον αφορά τις κουμαρίνες, η αντίδραση Knoevenagel χρησιμοποιείται για να εξαλείψει εγγενείς δυσκολίες που σχετίζονται με τη σύνθεση κουμαρινών μέσω της αντίδρασης Perkin. Για να είναι εφικτή η σύνθεση κουμαρίνης είναι απαραίτητο να υπάρχει μια 2-υδροξυ-υποκατάσταση στον αρωματικό δακτύλιο της αλδεύδης. Έτσι, αντιδρώντας με μια ενεργή μεθυλενική ομάδα παρουσία πυριδίνης ή πεπιριδίνης λαμβάνονται κουμαρινικά-3-καρβοξυλικά οξέα μετά από λακτονοποίηση και έπειτα μπορεί να συντεθεί η κουμαρίνη. Μια τυπική αντίδραση Knoevenagel για τη σύνθεση της απλής κουμαρίνης παρουσιάζεται παρακάτω (Σχήμα 2). <sup>24,50,51 31 52</sup>



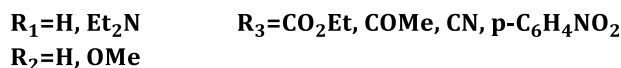
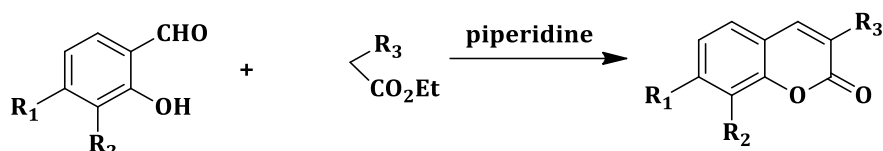
**Σχήμα 2. Αντίδραση Knoevenagel για τη σύνθεση κουμαρινών- Τροποποίηση Doebner** <sup>31</sup>

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η αντίδραση Knoevenagel έχει συμβάλει στη σύνθεση αρκετών κουμαρινών και κουμαρινικών αναλόγων όπως κουμαρινοκαρβοξυλικά οξέα αμινοκουμαρίνες, αλκυλαμινοκουμαρίνες, 3-ακετυλοκουμαρίνες, 3-καρβοξυκουμαρίνες και ετεροκυκλικά συνδεδεμένες κουμαρίνες καθώς και C-Glycosyl κουμαρινικά ανάλογα (Σχήμα 3). <sup>31,53 54</sup>



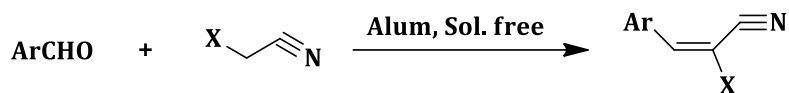
**Σχήμα 3. Τυπική αντίδραση σύνθεσης κουμαρινών Knoevenagel**

Ωστόσο, μερικές έρευνες έχουν δείξει ότι η αντίδραση Knoevenagel υπό επίδραση μικροκυμάτων μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία στη σύνθεση ενός αριθμού κουμαρινών με απόδοση ως 94%. Αυτή η αντίδραση περιλαμβάνει τη συμπύκνωση σαλικυλαλδευδών με καρβοξυλικούς εστέρες παρουσία πιπεριδίνης υπό συνθήκες χωρίς διαλύτες. Μια τέτοιου είδους αντίδραση φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 4). <sup>24 9</sup>



**Σχήμα 4. Αντίδραση Knoevenagel απουσία διαλύτη**

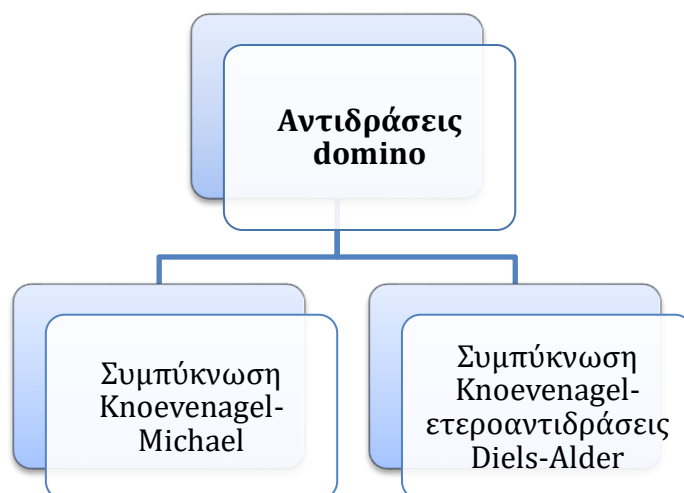
Μια ομάδα επιστημόνων πραγματοποίησε με μια απλή, πράσινη και πολύ αποτελεσματική μεθοδολογία, τη συμπύκνωση ποικίλων αρωματικών και ετεροαρωματικών αλδευδών με ενεργές ενώσεις μεθυλενίου, όπως το μαλονιτρίλιο και η κυανοακεταμίδη, παρουσία 10 mol % στυπτηρίας (alum) στους 80°C. Οι περισσότερες από τις αντιδράσεις ολοκληρώθηκαν σε λίγα λεπτά δίνοντας εξαιρετικές αποδόσεις του προϊόντος Knoevenagel. Μια τέτοια αντίδραση παρουσιάζεται παρακάτω (Σχήμα 5). <sup>51</sup>



Σχήμα 5. Αντίδραση Knoevenagel παρουσία 10 mol % στυπτηρίας (alum)

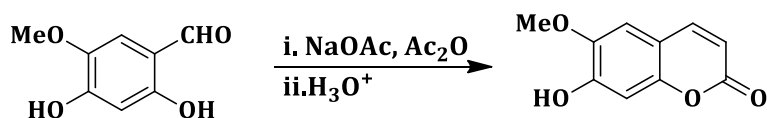
### 1.3.2. Συμπύκνωση Domino- Knoevenagel

Η αντίδραση Knoevenagel, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι μια αντίδραση συμπύκνωσης αλδευδών ή κετονών με δραστικές ενώσεις μεθυλενίου, καταλυόμενη από αμίνες και χρησιμοποιείται συνήθως για τη σύνθεση α,β-ακόρεστων δικαρβονυλικών ενώσεων ή και διάφορων άλλων ενώσεων. Τον τελευταίο καιρό η συγκεκριμένη αντίδραση χρησιμοποιείται ως έναυσμα σε αντιδράσεις domino με σκοπό να δημιουργηθούν πολλαπλοί χημικοί δεσμοί καθώς το σχηματιζόμενο α, β-ακόρεστο δικαρβονύλιο μπορεί να πάρει μέρος σε μια σειρά από μεταγενέστερους σχηματισμούς διατηρώντας τις ήδη υπάρχουσες λειτουργικές ομάδες του.<sup>50,55</sup>



### 1.3.3. Αντίδραση Perkin

Η αντίδραση Perkin αποτελεί μια επιπλέον μέθοδο σύνθεσης κουμαρινών. Είναι μια αντίδραση η οποία αποτελείται από θέρμανση κάποια υδρόξυ-αλδεΐδης στους 200°C με οξικό ανυδρίτη παρουσία άνυδρου οξικού νατρίου. Ένα από τα μειονεκτήματα της συγκεκριμένης αντίδρασης είναι η χαμηλή απόδοση της συντιθέμενης κουμαρίνης λόγω ταυτόχρονης παραγωγής ακαθαρσιών. Ωστόσο, η αντίδραση Perkin πλεονεκτεί έναντι της αντίδρασης Pechman στο γεγονός ότι δε σχηματίζονται ισομερή chromones. Ένα τυπικό παράδειγμα τέτοιας αντίδρασης φαίνεται παρακάτω (Σχήμα 6).<sup>24</sup>

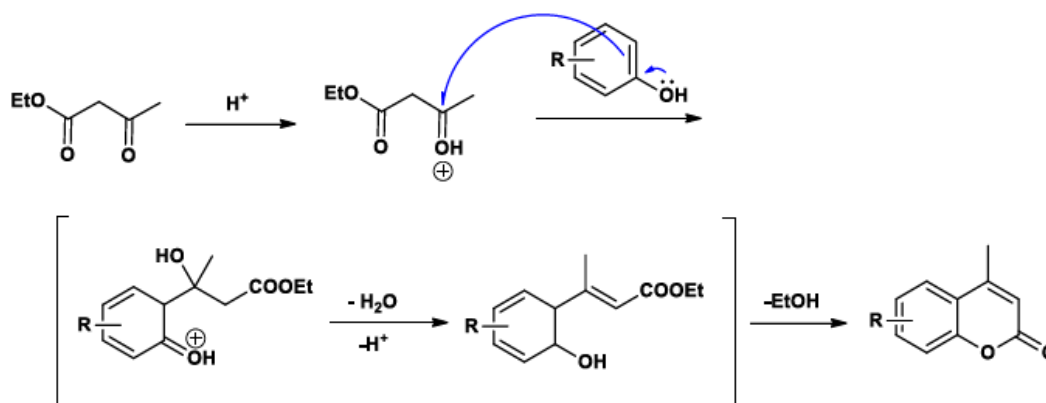


Σχήμα 6. Παράδειγμα αντίδρασης Perkin

### 1.3.4. Αντίδραση Pechman

Η αντίδραση Pechman είναι μία από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους σύνθεσης κουμαρινών με πολύ μεγάλη απόδοση. Συμπεριλαμβάνει την αντίδραση μιας φαινόλης με έναν εστέρα παρουσία καταλύτη. Οι κύριοι καταλύτες που χρησιμοποιούνται για τη διεκπεραίωση της συγκεκριμένης αντίδρασης είναι οξικοί καταλύτες όπως: θειικό οξύ, υδροχλωρικό οξύ, τριφθοροξικό οξύ, πεντοξείδιο του φωσφόρου και άλλα. Άλλοι οξικοί καταλύτες είναι οξέα κατά Lewis όπως είναι χλωριούχος ψευδάργυρος, χλωριούχο σίδηρο, χλωριούχο αργίλιο και άλλα. Πολλές φορές όταν στην αντίδραση χρησιμοποιούνται ακετο-οξικοί εστέρες η αντίδραση αυτή αναφέρεται ως αντίδραση Pechman-Duisberg.<sup>24</sup>

Ο μηχανισμός σύνθεσης μέσω αντίδρασης Pechman έγκειται στην ηλεκτρονιόφιλη αρωματική υποκατάσταση στη φαινόλη στη θέση 0 ως προς το υδροξύλιο από τον άνθρακα της καρβονυλικής ομάδας του β-κετο-εστέρα προς σχηματισμό των ενδιάμεσων. Στη συνέχεια πραγματοποιείται λακτονοποίηση με απόσπαση νερού και αιθανόλης προκειμένου να σχηματιστεί ο κουμαρινικός σκελετός (Εικόνα 34).<sup>56</sup>

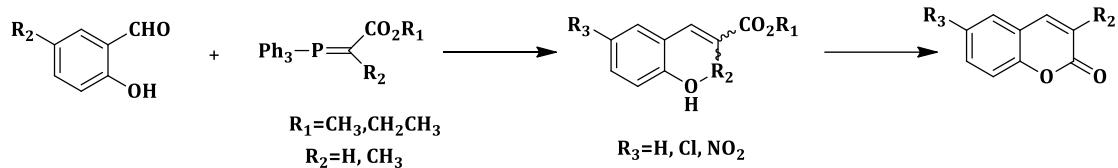


Εικόνα 34. Προτεινόμενος μηχανισμός σύνθεσης κουμαρίνης μέσω αντίδρασης Pechman

### 1.3.5. Αντίδραση Wittig

Η αντίδραση Wittig ανακαλύφθηκε από τον Georg Wittig και παρέχει έναν τρόπο σύνθεσης αλκενίων από καρβονυλικές ενώσεις. Συγκεκριμένα είναι μια αντίδραση στην οποία λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός αλκενίου από καρβονυλικές ενώσεις και υλίδια φωσφονίου μέσω οξαφωσφετονικών ενδιάμεσων. Ο όρος «υλίδια» αναφέρεται στις ενώσεις φωσφονίου οι οποίες αντιδρούν με τις καρβονυλικές ενώσεις και είναι μόρια τα οποία συμβάλλουν με τη δομή τους σε ένα υβρίδιο συντονισμού ώστε και τα δύο άτομα να έχουν μια πλήρη οκτάδα. Η χρήση της συγκεκριμένης αντίδρασης έγκειται στο σχηματισμό διπλού δεσμού, συνήθως με ένα υψηλό επίπεδο γεωμετρικού ελέγχου.<sup>31 57 58</sup>

Η αντίδραση Wittig έχει μελετηθεί και χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση κουμαρινών με αρκετά καλές αποδόσεις. Συγκεκριμένα, με χρήση της εν λόγω αντίδρασης συντέθηκαν αντιψυχωσικές ενώσεις που περιέχουν ως σκελετό το σκελετό της κουμαρίνης. Η συγκεκριμένη σύνθεση έγινε με την αντίδραση κετοδιφαινολών με τριφαινυλοφωσφοράνιο ώστε να παραχθεί η 7-υδροξυκουμαρίνη σε απόδοση 70%.<sup>24</sup> Επιπρόσθετα, οι Loffler et al ανέφεραν την one-pot σύνθεση κουμαρινών βασιζόμενη στην αντίδραση σαλικυλικών εστέρων με κάποιο υλίδιο φωσφόρου. (Σχήμα 7)



Σχήμα 7. Σχηματική απεικόνιση αντίδρασης Witting<sup>24</sup>

#### 1.4. Πράσινη Χημεία

Η επιστήμη της Πράσινης Χημείας έχει χαρακτηριστεί από τον Οργανισμό Προστασίας Περιβάλλοντος ως ο «σχεδιασμός χημικών προϊόντων και αντιδράσεων που μειώνουν ή εξαλείφουν τη χρήση ή τη δημιουργία επικίνδυνων και επιβλαβών ουσιών». Τα τελευταία χρόνια η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει την προσοχή της στο σχεδιασμό και την παραγωγή πιο «πράσινων» διεργασιών με σκοπό να εξαλειφθούν εγγενείς επιπτώσεις ως προς το περιβάλλον. Ο όρος «Πράσινη Χημεία» εισήχθη για πρώτη φορά στο κομμάτι της επιστήμης από τον Paul Anastas, ο οποίος καθιέρωσε και τις «12 Αρχές της Πράσινης Χημείας», οι οποίες παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω.<sup>59 60 61</sup>

#### ΟΙ 12 ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΠΡΑΣΙΝΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

1. Είναι προτιμότερο να παρεμποδίζεται η δημιουργία αποβλήτων από το να επανεπεξεργάζονται και να καθαρίζονται μετά τη δημιουργία τους

2. Οι συνθετικές μέθοδοι πρέπει να είναι κατάλληλα σχεδιασμένες ώστε να μεγιστοποιείται η ενσωμάτωση όλων των υλικών που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης στο τελικό προϊόν
3. Στις συνθετικές μεθόδους, όταν αυτό είναι εφικτό, πρέπει να χρησιμοποιούνται ουσίες και διαλύτες με ελαχιστοποιημένη ή και ανύπαρκτη τοξικότητα ως προς τον ανθρώπινο οργανισμό και το περιβάλλον
4. Οι χημικές μέθοδοι πρέπει να σχεδιάζονται κατάλληλα ώστε να διατηρείται η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης ενώ παράλληλα μειώνεται η τοξικότητα
5. Η χρήση βοηθητικών ουσιών (π.χ. διαλύτες, διαχωριστικά) πρέπει να αποφεύγεται όταν αυτό είναι εφικτό ή στην περίπτωση που είναι αναγκαίες αυτές πρέπει να είναι αβλαβείς
6. Οι ενεργειακές απαιτήσεις κάθε αντίδρασης πρέπει να είναι γνωστές για τις περιβαλλοντικές και οικονομικές επιπτώσεις και θα έπρεπε να μειωθούν. Οι συνθετικές μέθοδοι πρέπει να διεξάγονται σε θερμοκρασία και πίεση περιβάλλοντος
7. Οι πρώτες ύλες πρέπει να είναι ανανεώσιμες, όπου αυτό είναι τεχνικά και οικονομικά δυνατό, και όχι να εξαντλούνται και εξαλείφονται
8. Περιττή παραγοντοποίηση (π.χ. προσωρινή τροποποίηση φυσικών και χημικών αντιδράσεων) πρέπει να αποφεύγεται όταν αυτό είναι εφικτό.
9. Καταλυτικά αντιδραστήρια είναι προτιμότερα από τα στοιχειομετρικά
10. Τα χημικά προϊόντα πρέπει να σχεδιάζονται έτσι ώστε στο τέλος της λειτουργικότητας τους να μην επιμένουν στο περιβάλλον αλλά να αποδωθούν σε μη βλαβερές ουσίες
11. Οι αναλυτικές μέθοδοι πρέπει να εξελιχθούν περαιτέρω με σκοπό την παρακολούθηση μιας διεργασίας και το σχηματισμό επικίνδυνων ουσιών σε πραγματικό χρόνο
12. Ουσίες καθώς και η μορφή μιας ουσίας που χρησιμοποιείται σε μια χημική αντίδραση πρέπει να επιλέγονται έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται το δυναμικό χημικών ατυχημάτων, όπως απελευθερώσεις, εκρήξεις και φωτιά

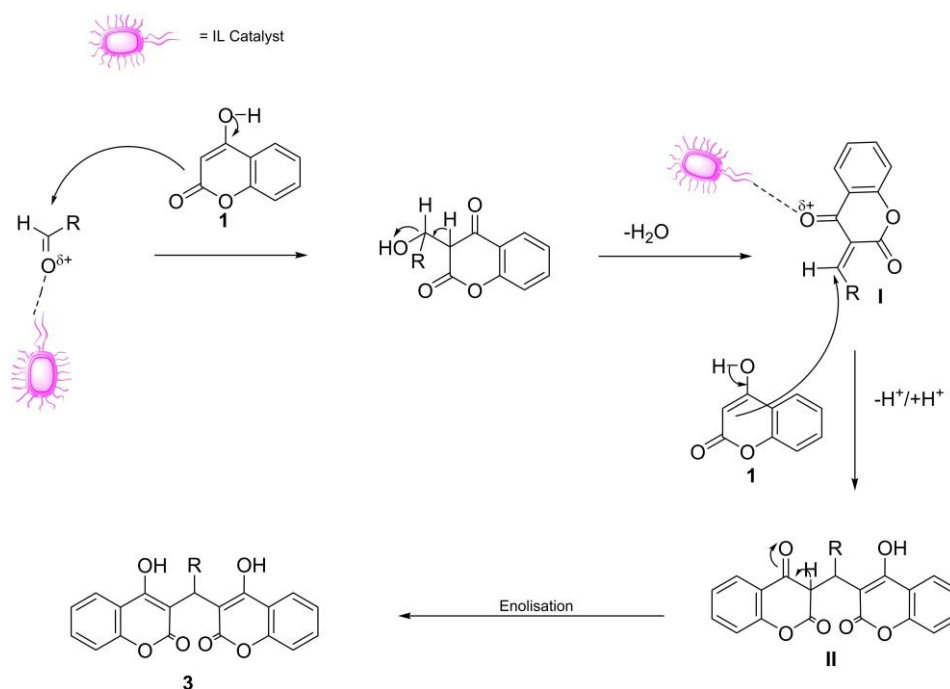
Η αναγκαιότητα για μείωση ή εξάλειψη των βλαβερών επιπτώσεων στο περιβάλλον, καθιστά αναγκαία τη χρήση «πράσινων» διαλυτών σε διάφορες εφαρμογές όπως η οργανική σύνθεση και η εκχύλιση βιοδραστικών συστατικών όπως είναι τα Ιοντικά Υγρά-Ionic Liquids-IL και οι Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες- Deep Eutectic Solvents-DES. Οι συγκεκριμένοι διαλύτες καθώς και τα βασικότερα χαρακτηριστικά τους αναλύονται εκτενώς στην επόμενη παράγραφο.

#### 1.4.1. Ιοντικά υγρά- IL

Οι ανάγκες της κοινωνίας για χρήση πράσινων και μη τοξικών διαλυτών έχει οδηγήσει στην ανακάλυψη νέων διαλυτών όπως τα ιοντικά υγρά. Συγκεκριμένα, η επιστήμη της «Πράσινης Τεχνολογίας» τις τελευταίες δύο δεκαετίες αναζητά τρόπους αντικατάστασης των οργανικών διαλυτών οι οποίοι παρουσιάζουν εγγενή τοξικότητα και έχουν υψηλή πτητικότητα, οδηγώντας στην εξάτμιση οργανικών πτητικών ενώσεων στην ατμόσφαιρα. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, τα ιοντικά υγρά χρησιμοποιούνται τόσο σε εργαστηριακό όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο, εξαλείφοντας εγγενή προβλήματα που

αφορούν το περιβάλλον. Συγκεκριμένα, τα ιοντικά υγρά θεωρούνται πλέον μια αποδοτική και φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική έναντι της χρήσης οργανικών διαλυτών. Σχετίζονται με συγκεκριμένες βιολογικές, χημικές, φυσικές και θερμικές ιδιότητες. Όπως συμβαίνει και με τα άλατα, τα ιοντικά υγρά σχηματίζονται από ξεχωριστά κατιοντικά και ανιοντικά είδη, αλλά με τη διαφορά ότι τα ILs εμφανίζουν χαμηλή τάση κρυστάλλωσης. Οι ιδιότητες των ILs ως διαλύτες, καθορίζονται πλήρως από την ικανότητα του άλατος να λειτουργεί ως δέκτης ή/ και δότης δεσμού υδρογόνου.<sup>62,63</sup>

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως τα Ιοντικά Υγρά έχουν αξιοποιηθεί και χρησιμοποιηθεί ως διαλύτες για τη σύνθεση δικουμαρινικών αναλόγων. Παρακάτω, Εικόνα , παρουσιάζεται ένας προτεινόμενος μηχανισμός σύνθεσης δικουμαρινικών αναλόγων με χρήση Ιοντικών Υγρών. Ο προτεινόμενος μηχανισμός σύνθεσης περιλαμβάνει τη διπλή ενεργοποίηση των ενολών της 4-υδρόξυκουμαρίνης **1** και της καρβονυλικής ομάδας από τον ιοντικό καταλύτη ο οποίος αντιδρά για το σχηματισμό του ενδιάμεσου **I**. Στη συνέχεια, ο καταλύτης ενεργοποιεί το ενδιάμεσο **I** και την 4-υδρόξυκουμαρίνη **1** ώστε να επιτευχθεί η προσθήκη Michael. Τέλος, πραγματοποιείται ταυτομερισμός και σχηματίζεται η επιθυμητή δικουμαρίνη (Εικόνα 35).<sup>6</sup>



Εικόνα 35. Μηχανισμός σύνθεσης δικουμαρίνης με χρήση Ιοντικών υγρών- ILs

#### 1.4.2. Βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες – DES

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες ή γνωστοί και ως DES (Deep Eutectic Solvents) αναγνωρίζονται πλέον ως μια νέα κατηγορία αναλόγων ιοντικών υγρών (IL) καθώς παρουσιάζουν πολλά από τα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες τους. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει μεγάλη στροφή των ερευνητών ως προς τους βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες καθώς αποτελούν ευέλικτους διαλύτες και μπορούν να κατεργαστούν, να εκχυλιστούν και να χρησιμοποιηθούν ως καταλύτες σε διάφορες χημικές διεργασίες. Η χρήση τους



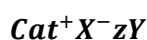
όμως είναι περιορισμένη λόγω του υψηλού ιξώδους τους και ως εκ τούτου της μειωμένης αγωγιμότητας τους σε πολλές περιπτώσεις. Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (DES) σχηματίζονται από ευτηκτικά μείγματα οξέων και βάσεων κατά Lewis ή κατά Bronsted. Παρόλο που έχουν παρόμοιες φυσικές ιδιότητες με τα IL, παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ως προς τη χρήση τους. <sup>64,65 66 67 68</sup>

#### 1.4.2.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Τα DES αποτελούνται από μεγάλα, μη συμμετρικά ιόντα που έχουν χαμηλή ενέργεια πλέγματος με αποτέλεσμα να έχουν και χαμηλά σημεία τήξεως. Για το σχηματισμό τους, συνήθως, συμπλοκοποιούνται ένα τεταρτοταγές άλας αμμωνίου με ένα άλας μετάλλου ή ένα δότη δεσμού υδρογόνου. Χρειάζονται, δηλαδή, δύο συστατικά εκ των οποίων το ένα πρέπει να έχει την ικανότητα να είναι δότης ή δέκτης ηλεκτρονίων ώστε να μπορέσει να δημιουργηθεί το ευτηκτικό μείγμα. Ένα από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους είναι η ρευστότητα τους σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Όπως ήδη αναφέρθηκε τα DES σχηματίζονται από τη συμπλοκοποίηση δύο ή περισσότερων συστατικών τα οποία μπορεί να είναι στερεά ή υγρά αλλά παρουσιάζουν πολύ υψηλά σημεία τήξεως. Σε σχετική μελέτη που διεξήχθη το 2001 από τους Abbott et al για τα σημεία πήξης τεταρτοταγούς αμμωνίου που θερμαίνεται με χρήση χλωριούχου ψευδάργυρου  $ZnCl_2$  αποδείχτηκε πως το χαμηλότερο σημείο τήξης λήφθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε χλωριούχα χολίνη (choline chloride) ως αμμωνιούχο αλάτι. Η συγκεκριμένη μελέτη με χλωριούχο ψευδάργυρο και χλωριούχο χολίνη ήταν η πιο φθηνή και εύκολη εναλλακτική λύση για σύνθεση συγκριτικά με τα ιοντικά υγρά. <sup>64,69 68</sup>

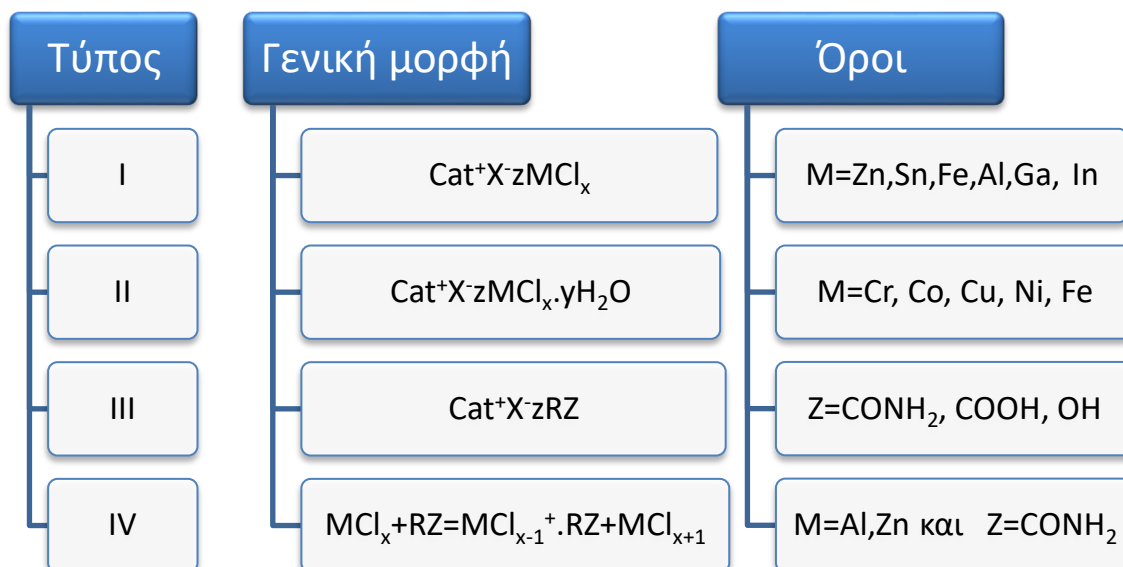
Κάποια από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά που έχουν οι DES ως πράσινοι διαλύτες είναι ο σύντομος χρόνος παραγωγής τους, η πολύ καλή βιοαποικοδομησιμότητα και η πολύ χαμηλή τοξικότητα. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί πως οι DES παρουσιάζουν 20% χαμηλότερο κόστος παρασκευής σε σχέση με τα ιοντικά υγρά. Επιπρόσθετα, είναι πολύ σημαντική η χρήση των DES ως καταλύτες σε διάφορες χημικές και βιοχημικές διεργασίες, καθώς μπορούν να προστεθούν σε στοιχειομετρική αναλογία, να ανακτηθούν και να επαναχρησιμοποιηθούν με ίδια δραστηριότητα και να εμφανίσουν ίδιο ή παρόμοιο καταλυτικό αποτέλεσμα με άλλους πιο τοξικούς καταλύτες. <sup>64,70,71 72</sup>

Η γενική μορφή των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών είναι η εξής:

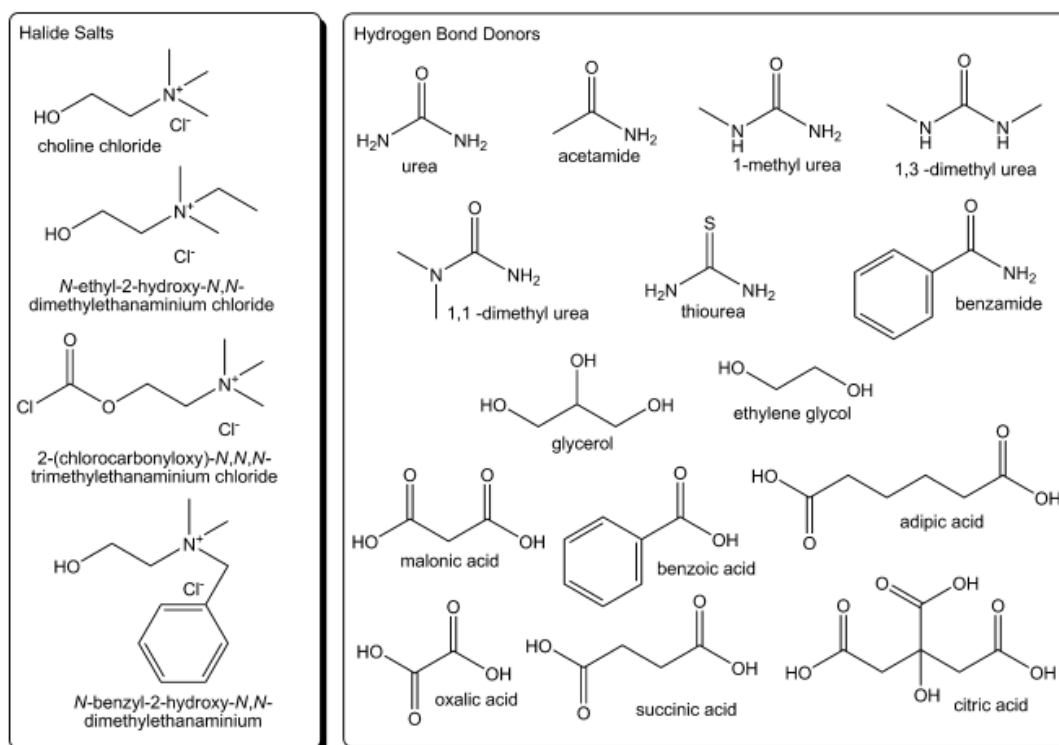


- **Cat<sup>+</sup>**: κατιόν αμμωνίου, φωσφονίου ή σουλφονίου
- **X<sup>-</sup>**: βάση κατά Lewis
- **Y**: οξύ κατά Lewis ή Bronsted
- **z**: αριθμό των μορίων Y που αλληλεπιδρούν με το ανιόν

παρακάτω (Σχήμα 8) απεικονίζεται μια γενικότερη ταξινόμηση των DES σύμφωνα με τη μορφή που έχει αποδοθεί παραπάνω <sup>64</sup>:



Σχήμα 8. Γενική μορφή για την ταξινόμηση των DES



Εικόνα 36. Χημική δομή αλάτων αλογονιδίου και δωτών δεσμού υδρογόνου για το σχηματισμό DES

64

### Φυσικοχημικές ιδιότητες DES

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι βαθώς ευτηκτικοί διαλύτες σχηματίζονται συνδυάζοντας διάφορα τεταρτοταγή άλατα αμμωνίου, όπως η χλωριούχος χολίνη ChCl, με δότες δεσμού υδρογόνου, HBD. Έτσι, αναλόγως τη χρήση για την οποία προορίζεται ο DES πρέπει να σχεδιαστεί κατάλληλα ώστε να αποκτήσει τα επιθυμητά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. Οι βασικότερες από τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω.<sup>70</sup>

### Σημείο πήξης- Freezing Point ( $T_f$ )

Κατά την ανάμειξη δύο στερεών ιδανικών για το σχηματισμό ενός νέου ιονικού διαλύματος, η νέα φάση που σχηματίζεται έχει αρκετά χαμηλότερο σημείο πήξης από ότι τα στερεά συστατικά από μόνα τους. Για παράδειγμα, ο διαλύτης  $\text{ChCl}:\text{urea}$  σε αναλογία 1:2 έχει σημείο πήξης  $12^\circ\text{C}$  που είναι σημαντικά μικρότερο από της  $\text{ChCl}$  που έχει σημείο πήξης  $302^\circ\text{C}$  και της ουρίας που είναι  $133^\circ\text{C}$ . Οι πιο ελκυστικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες είναι αυτοί που έχουν freezing point χαμηλότερο από  $50^\circ\text{C}$  καθώς είναι πιο οικονομική και πιο ασφαλή λύση σε πάρα πολλά πεδία εφαρμογής.<sup>70</sup>

### Πυκνότητα

Η πυκνότητα είναι ακόμη μια από τις βασικές φυσικοχημικές ιδιότητες που παρουσιάζουν οι DES. Έχει παρατηρηθεί πως οι Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα από τα αντιδρώντα- δότες ηλεκτρονίων από τα οποία σχηματίζονται. Αυτό το φαινόμενο μπορεί εύκολα να εξηγηθεί από τη θεωρία της τρύπας (*hole theory*) καθώς πολλές φορές συντίθενται DES τρυπών ή κενών θέσεων. Για παράδειγμα, όταν αναμειγνύεται χλωριούχος ψευδάργυρος  $\text{ZnCl}_2$  με ουρία urea, μειώνεται η μέση ακτίνα των οπών με αποτέλεσμα να αυξάνεται η πυκνότητα του DES.<sup>70,73</sup>

### Ιξώδες

Το ιξώδες των βαθέων ευτηκτικών διαλυτών είναι από τις ιδιότητες οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν δυσχέρεια στη χρήση τους. Οι DES παρουσιάζουν αρκετά υψηλό ιξώδες σε θερμοκρασία δωματίου, το οποίο αποδίδεται στην ύπαρξη ενός εκτεταμένου δικτύου δεσμού υδρογόνου μεταξύ κάθε συστατικού που οδηγεί σε χαμηλή κινητικότητα των ελεύθερων μορίων μέσα στο DES. Σημαντικό ρόλο στο υψηλό ιξώδες των DES διαδραματίζει το μεγάλο μέγεθος των ιόντων και ο πολύ μικρός κενός χώρος των περισσότερων DES, καθώς επίσης και άλλες δυνάμεις που σχηματίζονται όπως ηλεκτροστατικές ή δυνάμεις van der Waals.<sup>70,74</sup>

### Ιοντική αγωγιμότητα

Η ιοντική αγωγιμότητα των DES επηρεάζεται άμεσα από το ιξώδες τους. Συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερο είναι το ιξώδες τόσο χαμηλότερες είναι οι ιοντικές αγωγιμότητες (χαμηλότερες από  $2 \text{ mS/cm}$ ). Γενικότερα, η αγωγιμότητα των DES αυξάνεται όσο αυξάνεται η θερμοκρασία αφού όπως είναι λογικό μειώνεται το ιξώδες τους.<sup>70</sup>

### Επιφανειακή τάση

Όσον αφορά την επιφανειακή τάση, δεν έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για την διεξαγωγή κάποιου συμπεράσματος. Ωστόσο, οι Abbot et al ανέφεραν ορισμένα δεδομένα σχετικά με την επιφανειακή τάση DES που έχουν ως βάση  $\text{ChCl}$  και  $\text{ZnCl}_2$ . Η επιφανειακή τάση παρουσιάζει την ίδια συμπεριφορά με το ιξώδες, καθώς εξαρτάται αυστηρά από την αντοχή των αλληλεπιδράσεων που διέπουν το σχηματισμό του DES.<sup>70</sup>

### Χρήσεις DES

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες έχουν μελετηθεί και έχουν αξιοποιηθεί για ποικίλες εφαρμογές. Πολλές από αυτές παρουσιάζονται παρακάτω (Σχήμα 8).



Σχήμα 9. Εφαρμογές και χρήσεις DES <sup>64,75-77</sup>

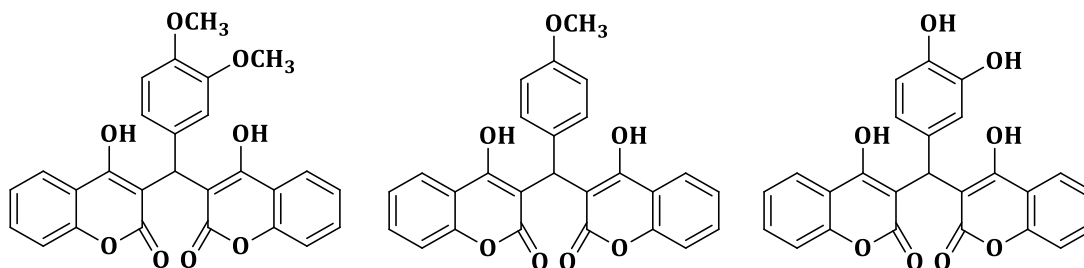
#### 1.4.2.2. Παραδείγματα οργανικών συνθέσεων με χρήση DES

Τα τελευταία χρόνια η χρήση των DES έχει επικεντρωθεί στη σύνθεση οργανικών ενώσεων σε ίδιες ή παρόμοιες αποδόσεις με αυτή που επιτυγχάνεται με χρήση οργανικών πτητικών διαλυτών. Η ομάδα των Shankarling et al χρησιμοποίησε βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες για την επιλεκτική N-αλκυλίωση αρωματικών πρωτοταγών αμινών, αποφεύγοντας την παραγωγή πολλαπλών αλκυλίωσεων που επιτυγχάνεται συνήθως με τη χρήση πολικών οργανικών διαλυτών και με υψηλές θερμοκρασίες αντίδρασης. Η αντίδραση που μελέτησαν οι συγκεκριμένοι ερευνητές ήταν η αντίδραση μεταξύανιλίνης και εξυλοβρωμιδίου. Συγκεκριμένα το σύστημα χλωριούχου χολίνης: ουρίας (ChCl: Urea) έδωσε προϊόντα στον ίδιο χρόνο αντίδρασης με τους οργανικούς διαλύτες αλλά σε ελαφρώς μικρότερη απόδοση. Παρακάτω (Πίνακας 3), παρατίθεται η διεξαγωγή της συγκεκριμένης αντίδρασης με διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες και με χρήση DES καθώς και οι αποδόσεις τους στο σχηματισμό των ίδιων προϊόντων. Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα που παρατηρήθηκε στη χρήση των DES ήταν η ευκολία ανακύκλωσης τους και επαναχρησιμοποίησής τους για τουλάχιστον 5 φορές. <sup>64,78</sup>

Πίνακας 3. Μονοαλκυλίωση ανιλίνης με εξυλοβρωμίδιο <sup>64</sup>

	Χρόνος Αντίδρασης (h)	Απόδοση (%)
<b>ΟΡΓΑΝΙΚΟΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΤΟ ΕΝΖΥΜΟ ΛΙΠΑΣΗ</b>		
<b>Αιθανόλη</b>	4	85
<b>Χλωροφόρμιο</b>	5	81
<b>Διχλωρομεθάνιο</b>	6-8	75
<b>Εξάνιο</b>	12	50
<b>ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ DES</b>		
<b>ChCl:glycerol</b>	8	65
<b>ChCl:urea</b>	4	78

Επιπρόσθετα, οι A. Tzani et al. συνέθεσαν τρία δικουμαρινικά ανάλογα (Εικόνα 37) με χρήση Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη (χλωριούχος χολίνη:ουρία = 1:2) σε ικανοποιητικές αποδόσεις.<sup>79</sup>



Εικόνα 37. Συντιθέμενα δικουμαρινικά ανάλογα με χρήση DES

### 1.4.3. Πράσινοι δείκτες

#### 1.4.3.1. Απόδοση αντίδρασης

Η απόδοση της αντίδρασης αποτελεί κύριο κριτήριο για την αξιολόγηση αποδοτικότητας και «πράσινης» πορείας μιας χημικής αντίδρασης. Η απόδοση της αντίδρασης ορίζεται ως ο λόγος της ποσότητας προϊόντος που παράγεται προς τη θεωρητική ποσότητα που θα παραγόταν, αν η αντίδραση ήταν ποσοτική. Στις οργανικές συνθέσεις, συνήθως, ένα από τα αντιδρώντα βρίσκεται σε έλλειμμα (περιοριστικό αντιδρών), ενώ ένα άλλο τουλάχιστον βρίσκεται σε περίσσεια. Έτσι, ο υπολογισμός της απόδοσης μιας χημικής αντίδρασης, γίνεται κατά κύριο λόγο με βάση την ποσότητα του περιοριστικού προϊόντος.<sup>80</sup>

$$\% \text{Απόδοση αντίδρασης} = \frac{\text{πραγματική ποσότητα προϊόντος}}{\text{θεωρητική ποσότητα προϊόντος}} \times 100$$

Η κατάταξη των χημικών αντιδράσεων με βάση την απόδοσή τους έχει καθοριστεί πλήρως σύμφωνα με το Textbook of Practical Organic Chemistry και παρουσιάζεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Κατάταξη χημικών αντιδράσεων με βάση την απόδοσή τους

Χαρακτηρισμός	Ποσοστό απόδοσης (%)
Ποσοτικές	100
Εξαιρετικές	>90
Πολύ καλές	>80
Καλές	>70
Μέτριες	>50
Χαμηλές	<40

#### 1.4.3.2. Οικονομία ατόμου – Atom Economy (AE)

Η οικονομία ατόμου θεωρείται ο πιο βασικός δείκτης στο πεδίο της «Πράσινης» Χημείας. Αποτελεί έναν από τις βασικότερες και πιο δημοφιλείς παραμέτρους για το σχεδιασμό και την παραγωγή φαρμάκων.<sup>81</sup> Η έννοια της οικονομίας του ατόμου εισήχθη πρώτη φορά από τον καθηγητή Barry Trost (Stanford University, 1991), καθώς υπήρχε η θεώρηση ότι ορισμένα μόνο άτομα από τα αντιδρώντα ενσωματώνονται στο τελικό προϊόν της αντίδρασης, ενώ τα υπόλοιπα σπαταλούνται στο σχηματισμό αποβλήτων. Η οικονομία ατόμου ορίζεται ως εξής:<sup>82</sup>

$$AE = \frac{Mr_{\text{επιθυμητού προϊόντος}}}{\sum Mr_{\text{όλων των αντιδρώντων}}}$$
$$\%AE = \frac{Mr_{\text{επιθυμητού προϊόντος}}}{\sum Mr_{\text{όλων των αντιδρώντων}}} \times 100$$

Η εκατοστιαία οικονομία ατόμου υπολογίζεται γρήγορα και εύκολα καθώς είναι ένας θεωρητικός δείκτης που βασίζεται στη στοιχειομετρία της εκάστοτε χημικής αντίδρασης και υπολογίζεται κατά το στάδιο σχεδιασμού της για 100% απόδοση.

#### 1.4.3.3. Πειραματική Οικονομία Ατόμου – Experimental Atom Economy (EAE)

Εκτός από το θεωρητικό υπολογισμό της οικονομίας ατόμου, υπάρχει και η πειραματική οικονομία ατόμου, η οποία υπολογίζεται ως εξής:

$$\%EAE = \frac{\text{θεωρητική μάζα προϊόντος}}{\sum \text{πειραματική μάζα αντιδρώντων}} \times 100$$

#### 1.4.3.4. Χρήση ατόμου – Atom Utilization (AU)

Αυτός ο δείκτης χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της ποσοστιαίας αναλογίας της μάζας του τελικού προϊόντος σχετικά με τη μάζα όλων των προϊόντων (προϊόντα και παραπροϊόντα). Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως οι διαλύτες δεν προσμετρώνται στον υπολογισμό του συγκεκριμένου δείκτη. Αν και σήμερα η χρήση του έχει περιοριστεί ή και εξαλειφθεί τελείως, ο συγκεκριμένος δείκτης παρέχει μια γρήγορη και απλή εκτίμηση της «πρασινότητας» της διεργασίας με βάση τα παραγόμενα απόβλητα.<sup>81,83</sup>

$$AU = \frac{Mr_{\text{επιθυμητού προϊόντος}}}{\sum Mr_{\text{όλων των προϊόντων}}}$$
$$\%AU = \frac{Mr_{\text{επιθυμητού προϊόντος}}}{\sum Mr_{\text{όλων των προϊόντων}}} \times 100$$

#### 1.4.3.5. Αποδοτικότητα Μάζας Αντίδρασης – Reaction Mass Efficiency (RME)

Ο RME δείκτης χρησιμοποιείται ως ένας εύκολος και γρήγορος τρόπος αναγνώρισης των καλύτερων ή χειρότερων αντιδράσεων που έχουν επιρροή σε ολόκληρη τη βιομηχανική σύνθεση. Θεωρείται ως ο αποτελεσματικότερος δείκτης όσον αφορά την προσπάθεια μείωσης των αποβλήτων σε εγγενές και σε παγκόσμιο επίπεδο.<sup>81</sup> Ο δείκτης αποδοτικότητας μάζας υπολογίζεται ως το γινόμενο της Απόδοσης επί την Πειραματική Οικονομία Ατόμου και συσχετίζει τη πραγματική ποσότητα του προϊόντος (δείκτης

απόδοσης) και της συνολικής μάζας των αντιδρώντων (δείκτης Πειραματικής Οικονομίας Ατόμου-EAE). Συγκεκριμένα, μπορεί να οριστεί ως εξής:

$$\%RME = \frac{\text{Πραγματική μάζα προϊόντος}}{\sum \text{Πειραματική μάζα αντιδρώντων}} \times 100$$

#### 1.4.3.6. Αποτελεσματική Απόδοση Μάζας- Effective Mass Yield (EMY)

Ο δείκτης Αποτελεσματικής Απόδοσης Μάζας αποτελεί έναν νέο δείκτη και θεωρείται η πιο εξειδικευμένη παράμετρος που έχει ενταχθεί στο πεδίο της Πράσινης Χημείας. Συγκεκριμένα, σχετίζεται με την ποσοτικοποίηση του τελικού προϊόντος σε τοξικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται κατά την οργανική σύνθεση. Αντιδραστήρια με χαμηλή ή πολύ χαμηλή περιβαλλοντική επίπτωση εξαιρούνται από τον υπολογισμό του EMY.<sup>84,85</sup>

$$\%EMY = \frac{\text{Μάζα τελικού προϊόντος}}{\sum \text{μάζα τοξικών και επικίνδυνων αντιδραστηρίων}}$$

#### 1.4.3.7. Απόδοση άνθρακα -Carbon Efficiency (CE)

Ο συγκεκριμένος δείκτης χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του ποσοστού άνθρακα των αντιδραστηρίων που παραμένει στο τελικό επιθυμητό προϊόν. Αυτός ο δείκτης σχετίζεται με την αξιολόγηση της «πράσινης» διεργασίας με βάση τον άνθρακα που υπάρχει. Ο δείκτης αυτός θεωρείται εργαλείο σχεδιασμού νέων ενώσεων σε βιομηχανικούς κλάδους, όπως οι φαρμακοβιομηχανίες, όπου βασικό ρόλο έχει η ανάπτυξη συγκεκριμένων οργανικών ενώσεων με στοχευμένη δράση (task specific activity).<sup>82,83</sup>

$$\%Απόδοση \text{ άνθρακα} = \frac{\text{Μάζα άνθρακα στο προϊόν}}{\sum \text{μάζα άνθρακα στα αντιδρώντα}} \times 100$$

#### 1.4.3.8. Παράγοντας E - E-factor

Ο παράγοντας E είναι ένας δείκτης ο οποίος μετράει την αποτελεσματικότητα της πορείας μιας διεργασίας για τη σύνθεση συγκεκριμένων μορίων. Συγκεκριμένα, ο παράγοντας E, γνωστός και ως παράγοντας Περιβαλλοντική Αποδεκτικότητα (environmental factor) αναπτύχθηκε πρώτη φορά από τον Sheldon και είναι ένας μικρός και εύκολος τρόπος μέτρησης των περιβαλλοντικών επιπτώσεων των βιομηχανικών διεργασιών. Έτσι, ο παράγοντας E ορίζεται ως το συνολικό βάρος των παραγόμενων αποβλήτων από μια βιομηχανική ή τεχνολογική διεργασία και μετρείται σε κιλά ανά κιλό προϊόντος. Όσο πλησιέστερα στο 0 είναι η τιμή του παράγοντα E, τόσο πιο «πράσινη» θεωρείται η διεργασία. Για παράδειγμα, στην περίπτωση της διύλισης πετρελαίου ο παράγοντας E υπολογίζεται <0.1 ενώ αντίθετα στη φαρμακευτική βιομηχανία υπολογίζεται από 25 μέχρι 100. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στις φαρμακευτικές βιομηχανίες απαιτείται ο σχεδιασμός και η παραγωγή προϊόντων υψηλής καθαρότητας, με αποτέλεσμα να πραγματοποιούνται πολλαπλές αντιδράσεις με πολλά παράγωγα απόβλητα. Έτσι, ο παράγοντας E χρησιμοποιείται σε βιομηχανικό επίπεδο και όχι σε εργαστηριακό, καθώς όπως είναι λογικό, σε εργαστηριακό επίπεδο η τιμή του θα είναι αρκετά υψηλή και δεν θα μπορεί να αξιολογηθεί.<sup>86</sup>

$$\text{Παράγοντας E} = \frac{\sum \text{μάζα αποβλήτων \& παραπροϊόντων}}{\text{Μάζα προϊόντος}}$$

$$\% \text{Παράγοντας } E = \frac{\text{Σ μάζα αποβλήτων \& παραπροϊόντων}}{\text{Μάζα προϊόντος}} \times 100$$

ή

$$\% \text{Παράγοντας } E = \frac{\text{Σ μάζα αντιδρώντων} - \text{Σ μάζα προϊόντων}}{\text{Μάζα προϊόντος}} \times 100$$

#### 1.4.3.9. Εκλεκτικότητα

Η εκλεκτικότητα μιας χημικής αντίδρασης είναι ένας δείκτης που χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις όπου μια αντίδραση μπορεί να αναπτυχθεί με παράλληλες επιμέρους αντιδράσεις και ορίζεται ως εξής:

$$\text{Εκλεκτικότητα} = \frac{\text{Παραγόμενη ποσότητα επιθυμητού προϊόντος}}{\text{Παραγόμενη ποσότητα ανεπιθύμητου προϊόντος}}$$

#### 1.4.3.10. Ένταση Μάζας- Mass Intensity (MI)

Πολλές φορές και κατά κύριο λόγο στις Φαρμακευτικές Βιομηχανίες, εκτός από τον παράγοντα E χρησιμοποιείται και η Ένταση Μάζας ή αλλιώς γνωστή ως Mass Intensity (MI). Αυτό συμβαίνει καθώς ο συγκεκριμένος δείκτης λαμβάνει υπόψιν την απόδοση της αντίδρασης, τη στοιχειομετρία της, την ποσότητα των διαλυτών καθώς και όλα τα αντιδραστήρια και τα βοηθητικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίηση μιας οργανικής σύνθεσης. Συγκεκριμένα, η συνολική μάζα των αντιδρώντων πρέπει να περιέχει τόσο τα ίδια τα αντιδρώντα όσο και τους διαλύτες ή/και καταλύτες που χρησιμοποιούνται χωρίς τον συνυπολογισμό του νερού καθώς αυτό πολλές φορές μπορεί να παρακάμψει τα δεδομένα μάζας σε πολλές διεργασίες. Η ιδανική τιμή του συγκεκριμένου δείκτη είναι 1, καθώς σε αυτή την περίπτωση η συνολική μαζική εισροή αντιδρώντων ισούται με τη μάζα του προϊόντος, ωστόσο σε πειραματικό επίπεδο η τιμή του είναι πολύ μεγαλύτερη καθώς δεν επιτυγχάνονται ποσοτικές αποδόσεις.<sup>82,83</sup>

$$MI = \frac{\text{Συνολική μάζα αντιδρώντων και διαλυτών \& καταλυτών σε g}}{\text{Μάζα προϊόντος σε g}}$$

Ισχύει ότι: Παράγοντας E= Ένταση μάζας -1

#### 1.4.3.11. Παραγωγικότητα μάζας

$$\text{Παραγωγικότητα μάζας} = \frac{\text{Μάζα προϊόντος σε g}}{\text{Σ μάζα αντιδρώντων και διαλυτών \& σε g}}$$

#### 1.4.3.12. Στοιχειομετρικός Παράγοντας- Stoichiometric factor (SF)

Αυτός ο δείκτης υπολογίζεται στην περίπτωση όπου ένα ή περισσότερα αντιδρώντα χρησιμοποιούνται σε περίσσεια. Στην περίπτωση στοιχειομετρικής αναλογίας ο παράγοντας f έχει την τιμή 1. Σε περίπτωση μη στοιχειομετρικής αναλογίας ισχύει SF>1.

81

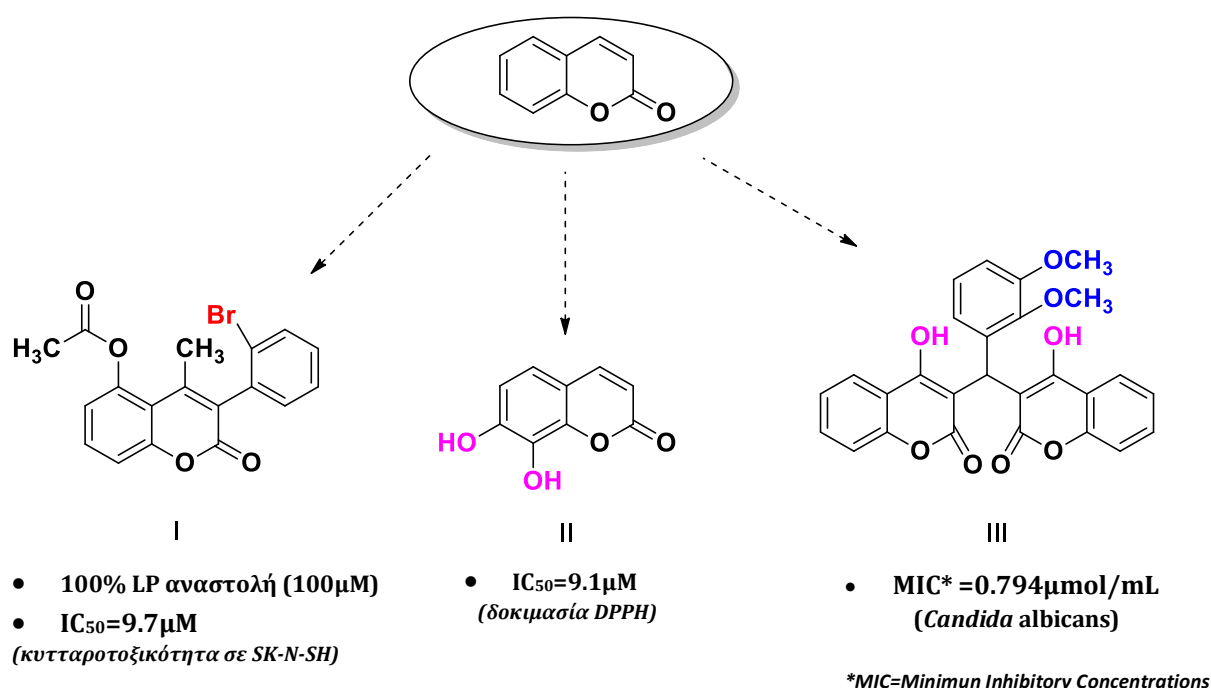
$$SF = \frac{\text{Σ μάζα περίσσειας ποσότητας αντιδρώντων}}{\text{αναμενόμενη μάζα προϊόντος για 100\% απόδοση}}$$



## Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί ο σχεδιασμός, η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός νέων 4-υδροξυ-κουμαρινικών καθώς και δικουμαρινικών αναλόγων, μέσω της ανάπτυξης κατάλληλης πράσινης μεθολογίας και της χρήσης φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών. Επιπρόσθετο σκοπό αποτελεί η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης και η αξιολόγηση της ικανότητάς τους να αναστέλλουν το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση.

Η επιλογή των κουμαρινικών αναλόγων στηρίχτηκε σε μόρια οδηγούς, που έχουν συντεθεί στο Εργαστήριο Οργανικής Χημείας ΕΜΠ και έχουν επιδείξει αξιόλογη βιολογική δράση. Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 38**, η 5-ακετυλοξυ-3-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-κουμαρίνη (**I**), η φυσική κουμαρίνη δαφνετίνη (**II**) καθώς και η 3,3'-(2,3-διμεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη) (**III**) αποτέλεσαν μόρια οδηγούς για τη σύνθεση νέων κουμαρινικών και δικουμαρινικών μορίων.<sup>18,79</sup>



**Εικόνα 38. Μόρια οδηγού**

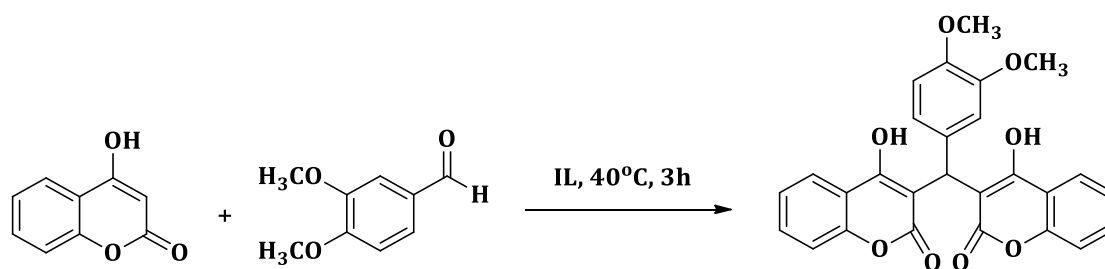
Αναλυτικότερα, ο σχεδιασμός περιλαμβάνει τη σύνθεση νέων δικουμαρινικών αναλόγων δομικά τροποποιημένων με βρωμο-, χλωρο-, μεθοξυ- και υδροξυ- υποκαταστάτες σε διάφορες θέσεις του κουμαρινικού σκελετού καθώς και του φαινολικού δακτυλίου της θέσης 1'', προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του υποκαταστάτη στη βιολογική δράση των νέων παραγώγων.

Τα νέα κουμαρινικά ανάλογα που συντέθηκαν, αξιολογήθηκαν για την αντιοξειδωτική τους δράση, μέσω των *in vitro* δοκιμών δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH και αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης υποκινούμενη από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH, καθώς και για την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση ως ένδειξη πιθανής δράσης κατά της νόσου Αλτσχάιμερ. Τέλος, ακολούθησε ο υπολογισμός βασικών πράσινων δεικτών των αντιδράσεων.<sup>87</sup>

## Σχεδιασμός, σύνθεση και ταυτοποίηση των νέων ενώσεων

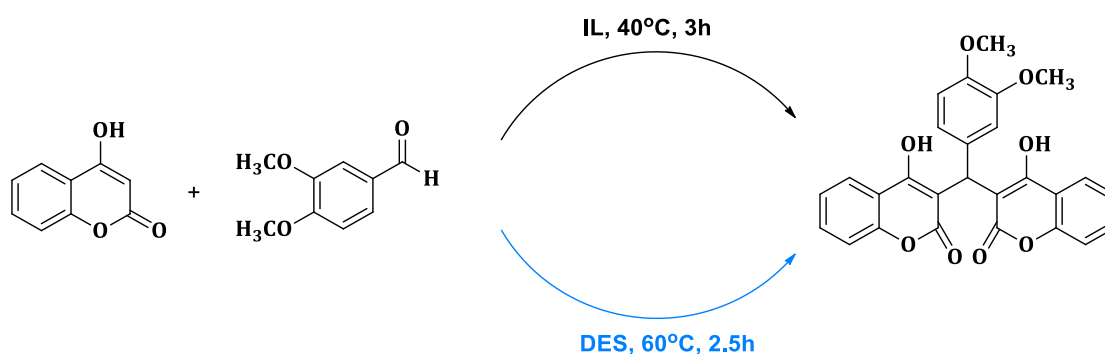
### 3.1. Σχεδιασμός νέων παραγώγων

Ο σχεδιασμός των νέων παραγώγων βασίστηκε στην ανάγκη για περισσότερο «πράσινες» και φιλικές προς το περιβάλλον μεθοδολογίες σύνθεσης. Ειδικότερα, η σύνθεση των νέων δικουμαρινικών αναλόγων πραγματοποιήθηκε μέσω της χρήσης φυσικών Βαθέων Ευτηκτικών Διαλυτών (NaDES). Συγκεκριμένα, για την επιλογή του κατάλληλου NaDES, χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη αντίδραση η αντίδραση μεταξύ της 4-υδροξυ-κουμαρίνης της 3,4-διμεθοξυ-βενζαλδεΐδης, η οποία πραγματοποιείται μέσω Ιοντικού Υγρού (IL) στους 40°C για 3h. (Εικόνα 39)<sup>88</sup>



Εικόνα 39. 3,3'-(3,4-διμεθοξυ-φαινυλομεθυλο)-δι-(4-υδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη)

Οι Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες, όπως έχει ήδη αναφερθεί, χαρακτηρίζονται ως μια νέα κατηγορία Ιοντικών Υγρών (Ionic Liquids, ILs) και για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της 3,3'-(3,4-διμεθοξυ-φαινυλομεθυλο)-δι-(4-υδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνης) με χρήση L-προλίνης και γαλακτικού οξέος σε αναλογία 1:2, έναντι της χρήσης των Ιοντικών Υγρών. Έτσι, εξακριβώθηκε η καταλληλότητα του συγκεκριμένου DES για τη σύνθεση δικουμαρινικών αναλόγων, με αποτέλεσμα τη χρήση του για τη σύνθεση όλων των δικουμαρινικών αναλόγων που ακολουθούν (3a-3n) (Εικόνα 40).



#### ILs

a. HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>OOCH

b. HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>OOCCH<sub>3</sub>

#### DES

L-proline: lactic acid (1:2)

Εικόνα 40. Εναλλακτική πορεία σύνθεσης έναντι της χρήσης Ιοντικών Υγρών

### 3.2. Ανακυκλωσιμότητα και Επαναχρησιμοποίηση Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη (Recyclability & Reusability)

Μια από τις βασικότερες έρευνες στη χρήση των Βαθέων Ευτηκτικών Διαλυτών είναι η ικανότητα ανακύκλωσής τους και επαναχρησιμοποίησής τους σε ίδιες ή και άλλες συνθετικές πορείες (Εικόνα 41). Έτσι, έγινε μοντελοποίηση της 3,3'-(3,4-διμεθοξυφαινυλομεθυλο)-δι-(4-υδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνης) και τόσο η ανακυκλωσιμότητα όσο και η επαναχρησιμοποίηση του DES αξιολογήθηκαν με βάση τη σύνθεση της συγκεκριμένης δικουμαρίνης.



Εικόνα 41. Ικανότητα ανακυκλωσιμότητας και επαναχρησιμοποίησης DES

### 3.3. Σύνθεση 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης (1a)

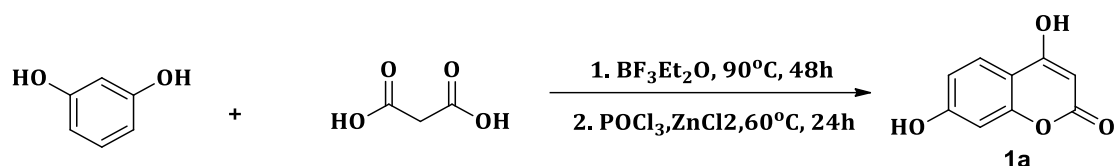
Για την επίτευξη της σύνθεσης της 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης εξετάστηκαν δύο εναλλακτικές πορείες σύνθεσης μελετώντας τις παραμέτρους τις αντιδράσης, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 5. Σε κάθε περίπτωση, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε μεταξύ της ρεσορκινόλης και του μηλονικού οξέος. Στην πρώτη περίπτωση, η αναλογία mol είναι 1:3, ενώ στη δεύτερη περίπτωση η αναλογία mol είναι 1:1. Επιπλέον, η διαφορά μεταξύ των διαφορετικών πορειών σύνθεσης έγκειται και στις διαφορετικές συνθήκες αντίδρασης.

Πίνακας 5. Μελέτη συνθηκών αντίδρασης σύνθεσης της 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης

Συνθετική πορεία	Ρεσορκινόλη (mol)	Μηλονικό οξύ (mol)	Συνθήκες	Απόδοση
1	1	3	BF <sub>3</sub> Et <sub>2</sub> O, 90°C, 48h	78.4%
2	1	1	POCl <sub>3</sub> , ZnCl <sub>2</sub> , 60°C, 24h	50.1%

Παρατηρήθηκε, λοιπόν, πως η σύνθεση του επιθυμητού προϊόντος **1a** από τη ρεσορκινόλη και το μηλονικό οξύ (Σχήμα 10) επιτεύχθηκε σε μεγαλύτερη απόδοση μέσω

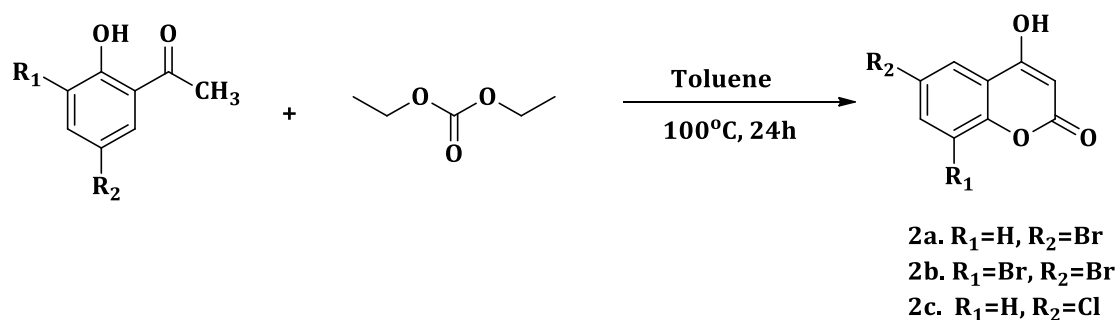
της πρώτης μεθόδου (78.4%). Ακόμη, η χρήση του συμπλόκου τριφθοριούχου βορίου-διαιθυλαιθέρα έναντι του οξυχλωριούχου φωσφόρου αποτελεί μια περισσότερο «πράσινη» πορεία σύνθεσης, το οποίο αποτελεί σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας.



Σχήμα 10. Συνθετικές πορείες 4,7-διυδροξυ-κουμαρινών

### 3.4. Σύνθεση 4-υδροξυ-κουμαρινών (2a-2c)

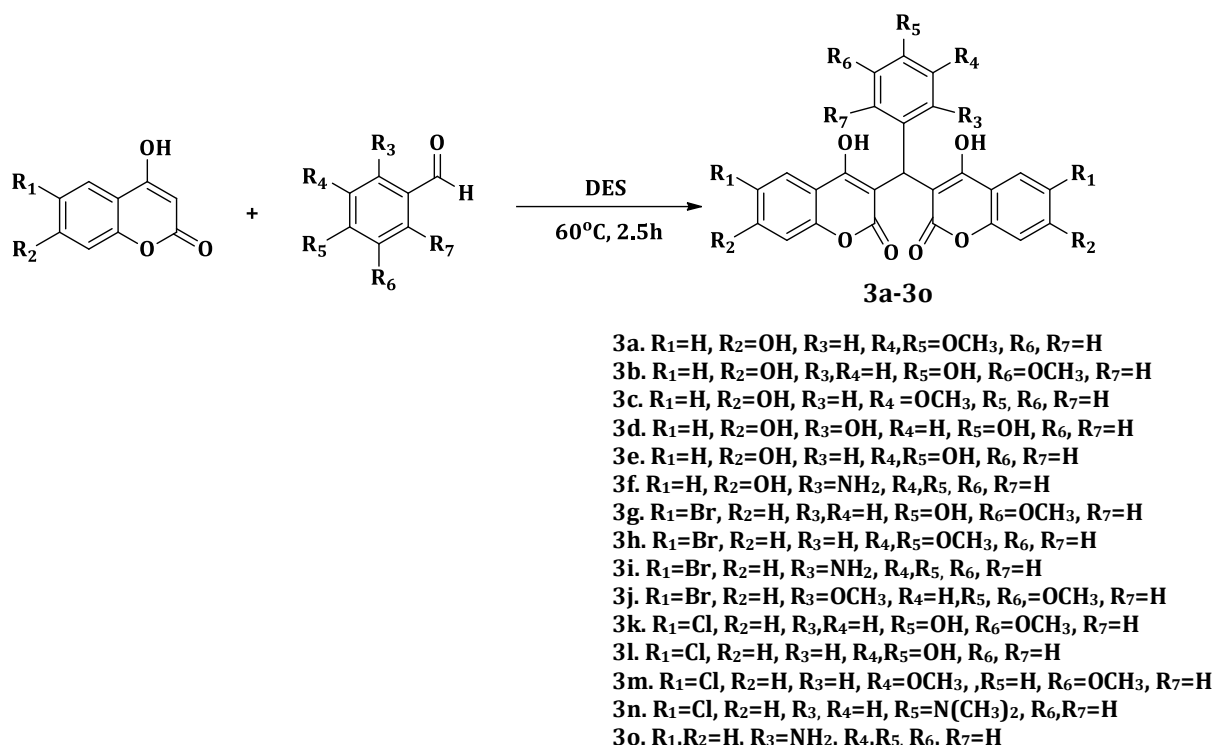
Η σύνθεση των νέων 4-υδροξυ-κουμαρινών πραγματοποιήθηκε μεταξύ μιας κατάλληλα υποκατεστημένης 2-υδροξυ-ακετοφαινόνης και του ανθρακικού διαιθυλεστέρα, παρουσία περίσσειας υδριδίου του νατρίου και τολουολίου ως διαλύτη. Ως αποτέλεσμα, προέκυψαν τα τρία 4-υδροξυ-κουμαρινικά παράγωγα, που φαίνονται στο Σχήμα 11.



Σχήμα 11. Συνθετική πορεία νέων 4-υδροξυ-κουμαρινών

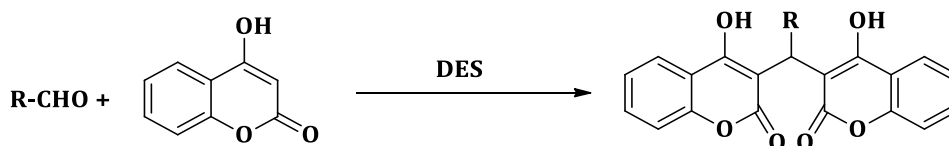
### 3.5. Σύνθεση δικουμαρινών (3a-3o)

Η σύνθεση των νέων δικουμαρινικών αναλόγων πραγματοποιήθηκε μέσω αντίδρασης Domino- Knoevenagel μεταξύ μιας κατάλληλα υποκατεστημένης βενζαλδεΐδης και μιας από τις κουμαρίνες **1a**, **2a-2c**, παρουσία του βαθέως ευτηκτικού διαλύτη L-proline: lactic acid 1:2 στους 60°C για 2.5 ώρες. Ως αποτέλεσμα προέκυψαν τα 15 δικουμαρινικά ανάλογα που φαίνονται στο Σχήμα 12.

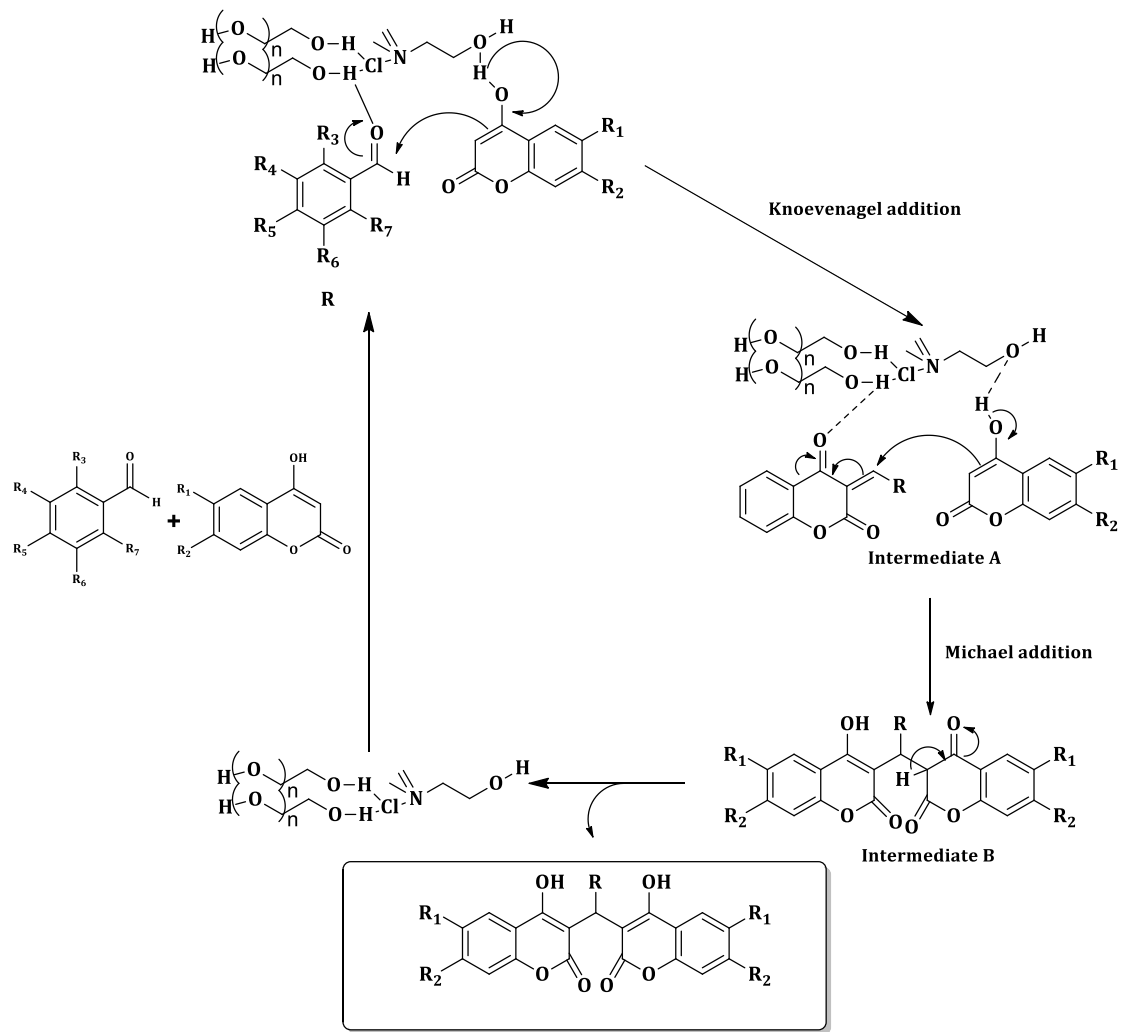


Σχήμα 12. Συνθετική πορεία νέων 3,3-δι-(4-υδροξυ)κουμαρινών

### 3.6. Μηχανισμός σύνθεσης δικουμαρινικών αναλόγων με χρήση Βαθέων Ευτηκτικών Διαλυτών (DES's) μέσω αντίδρασης domino Knoevenagel -Michael



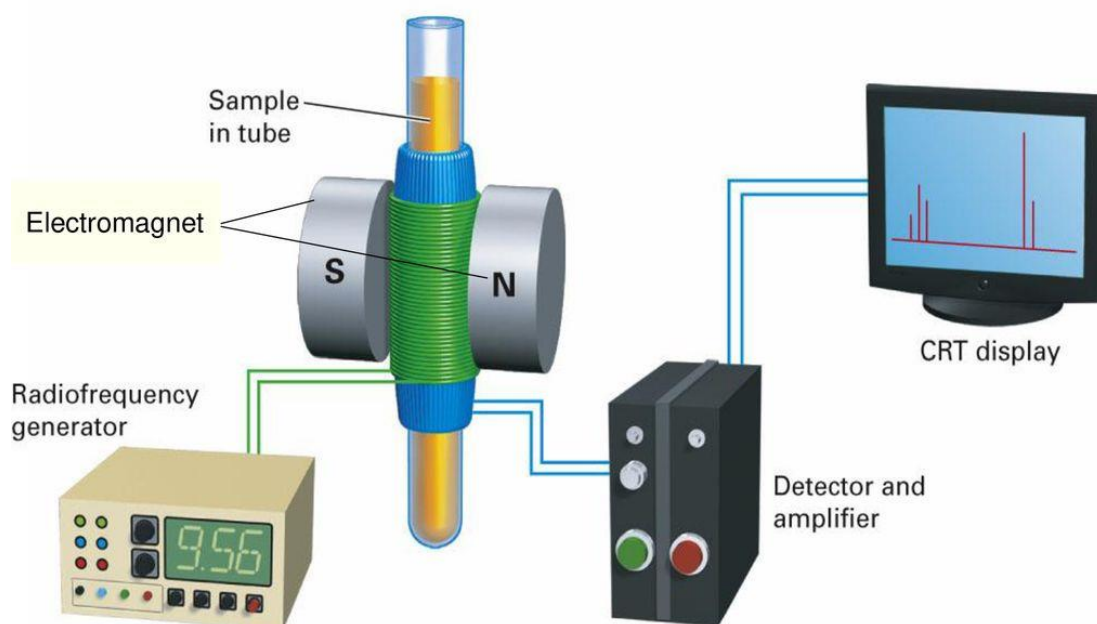
Ο μηχανισμός σύνθεσης της συγκεκριμένης αντίδρασης έγκειται στον τρόπο δράσης του εκάστοτε βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (DES). Συγκεκριμένα, το DES καταλύει την αντίδραση μέσω της ενεργοποίησης του καρβονυλίου της αλδεϋδης και ενίσχυσης του πυρηνόφιλου χαρακτήρα του ενολικού συστήματος με σχηματισμό δεσμού υδρογόνου. Παραδείγματος χάριν, σε DES που αποτελείται από χλωριούχο χολίνη (ChCl) και πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), η ChCl σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο της καρβονυλικής ομάδας της βενζαλδεϋδης και η PEG σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την ομάδα υδροξυλίου της υδροξυκουμαρίνης, οπότε πραγματοποιείται συμπύκνωση Knoevenagel προς το σχηματισμό του ενδιάμεσου **A**. Στη συνέχεια το DES ενεργοποιεί το ενδιάμεσο **A** ώστε να επιτευχθεί η προσθήκη Michael για το σχηματισμό του ενδιάμεσου **B**. Τέλος, το ενδιάμεσο **B** υπόκειται σε ταυτομερισμό της ενόλης και σχηματίζεται το τελικό επιθυμητό προϊόν. (Εικόνα 42).<sup>89</sup>



Εικόνα 42. Μηχανισμός σύνθεσης δικουμαρινών με χρήση Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών (DES)

### 3.7. Ταυτοποίηση ενώσεων

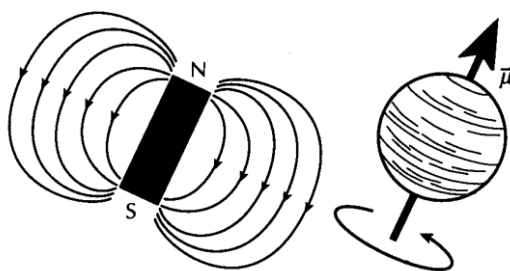
#### 3.7.1. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού- Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)



Εικόνα 43. Διάταξη Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού  $^1\text{H}$  NMR

Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός είναι μια φασματοσκοπική μέθοδος η οποία βασίζεται στις μαγνητικές ιδιότητες των ατομικών πυρήνων. Το NMR σήμερα αποτελεί το πιο σημαντικό, μη καταστρεπτικό και μη καταστρεπτικό αναλυτικό εργαλείο στη Χημεία. (Εικόνα 44). Με χρήση της συγκεκριμένης φασματοσκοπίας μπορεί να γίνει ταυτοποίηση μιας ένωσης παρέχοντας χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τη μοριακή δομή, τη σύνθεση, την καθαρότητα, το μοριακό βάρος, τους ρυθμούς μιας χημικής αντίδρασης καθώς και τις διαδικασίες διάχυσης της εν λόγω ένωσης.<sup>90,91</sup>

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού βασίζεται σε διεγέρσεις μαγνητικών πυρήνων οι οποίοι βρίσκονται σε ισχυρό ομογενές μαγνητικό πεδίο, με συχνότητα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στο πεδίο των ραδιοσυχνοτήτων. Αναλυτικότερα, ορισμένοι πυρήνες ατόμων έχουν μια ιδιότητα που ονομάζεται ιδιοπεριστροφή γνωστή και ως spin, η οποία είναι ένας κβαντικός αριθμός που παίρνει τιμές 0,  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{2}{2}$ ,  $\frac{3}{2}$  κ.ο.κ., σε μονάδες  $h/2\pi$ , ανάλογα με το είδος του πυρήνα. Το μαγνητικό πεδίο (ή μαγνητική ροπή,  $\mu$ ) γύρω από έναν πυρήνα δημιουργείται όταν περιστρέφεται ο εν λόγω πυρήνας, ο οποίος μάλιστα είναι φορτισμένος με ηλεκτρικά φορτία. Όταν αυτός ο πυρήνας τοποθετηθεί σε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, τότε θα προσανατολιστεί όπως ακριβώς η βελόνα της πυξίδας στο μαγνητικό πεδίο της γης. Συγκεκριμένα, ο θετικά προσανατολισμένος περιστρεφόμενος πυρήνας, συμπεριφέρεται σαν μικροσκοπική ράβδος που παράγει μαγνητικό δίπολο κατά την κατεύθυνση του άξονα περιστροφής.<sup>90-92</sup>

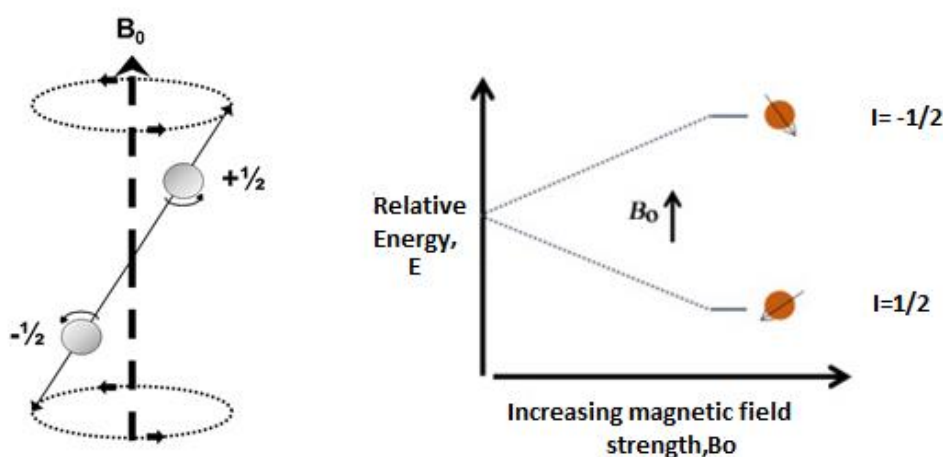


Εικόνα 44. Δημιουργία μαγνητικής ροπής  $\mu$  λόγω της περιστρεφόμενης κίνησης των ηλεκτρονίων <sup>90</sup>

Υπάρχουν τρεις βασικές ομάδες πυρήνων: <sup>92</sup>

1. Πυρήνες που έχουν άρτιο ατομικό και μαζικό αριθμό, όπως  $^{12}_6C$ ,  $^{16}_8O$ ,  $^{32}_{16}S$  δεν παρουσιάζουν γωνιακή στροφορμή ( $I=0$ ), δεν εκδηλώνουν μαγνητικές ιδιότητες και δε δίνουν φάσματα NMR.
2. Πυρήνες που έχουν περιττό μαζικό αριθμό και περιττό ή άρτιο ατομικό αριθμό, όπως  $^1_1H$ ,  $^{13}_6C$ ,  $^{19}_9F$  παρουσιάζουν αριθμούς spin που είναι περιττά ακέραια πολλαπλάσια του  $\frac{1}{2}$ .
3. Πυρήνες που έχουν άρτιο μαζικό αριθμό και περιττό ατομικό αριθμό, όπως  $^2_1H$ ,  $^{14}_7N$  παρουσιάζουν ακέραιους αριθμούς spin.

Το πρωτόνιο έχει τη μεγαλύτερη μαγνητική ροπή από όλους τους σταθερούς, μη ραδιενεργούς πυρήνες. Σύμφωνα με την κβαντική μηχανική, πυρήνες με  $I = \frac{1}{2}$  παρουσιάζουν δύο βασικούς προσανατολισμούς της γωνιακής περιστροφής, τους «spin up» και «spin down». Όταν ο προσανατολισμός είναι παράλληλος ή αλλιώς «spin up», δηλαδή  $I = \frac{1}{2}$ , τότε επικρατεί η βασική κατάσταση χαμηλής ενέργειας, ενώ όταν ο προσανατολισμός είναι αντιπαράλληλος ή «spin down», δηλαδή  $I = -\frac{1}{2}$ , τότε επικρατεί η διεγερμένη κατάσταση υψηλής ενέργειας (Εικόνα 45). <sup>90</sup>

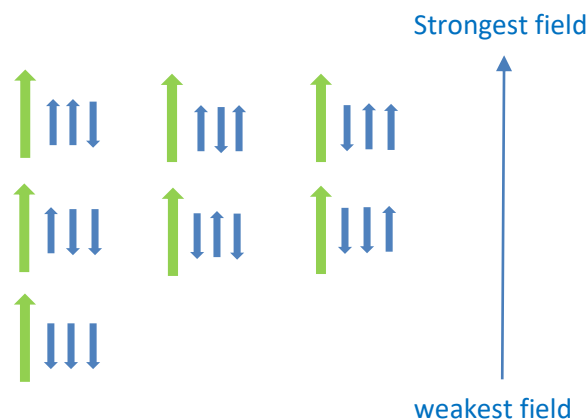


Εικόνα 45. Διάταξη πρωτονίων σε σχέση με το μαγνητικό πεδίο  $B_0$  και Ενεργειακή Διαφορά  $\Delta E$  μεταξύ πυρήνων με παράλληλο και αντιπαράλληλο spin σε σχέση με το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο ( $B_0$ )



### 3.7.1.1. Χαρακτηριστικά φασμάτων NMR

Σ' ένα φάσμα NMR ένας πολύ μεγάλος αριθμός πυρηνικών περιστροφών αποτυπώνονται ταυτόχρονα. Συγκεκριμένα, το φάσμα βασίζεται κατά κύριο λόγο στο φαινόμενο της spin-spin συζεύξεως (Εικόνα 46), δηλαδή του διαχωρισμού μίας κορυφής συντονισμού σε ομάδα πολλαπλών συμμετρικών κορυφών, που οφείλεται στην αλληλεπίδραση των spin των γειτονικών πυρήνων. Εάν δύο μαγνητικοί πυρήνες είναι αρκετά κοντά και οι γωνιακές σχέσεις μεταξύ των δεσμών που τους συγκρατούν είναι κατάλληλες, τότε οι δύο πυρήνες δεν δρουν ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο.<sup>92</sup>



Εικόνα 46. Φαινόμενο spin spin συζεύξεως στο NMR

Η παραγωγή και η αποτύπωση φασμάτων επιτυγχάνεται εφαρμόζοντας έναν σύντομο αλλά έντονο παλμό ραδιοσυχνότητας στο δείγμα υπό εξέταση, ο οποίος απορροφάται από τους εκάστοτε πυρήνες του δείγματος. Μετά το πέρας της εφαρμογής του παλμού, το δείγμα εκπέμπει σήματα για κάποιο χρονικό διάστημα, τα οποία καταλήγουν σ' ένα τελικό σήμα που επεξεργάζεται με μια γνωστή αριθμητική διαδικασία, το μετασχηματισμό Fourier, ώστε να προκύψει το τελικό φάσμα.<sup>93</sup>

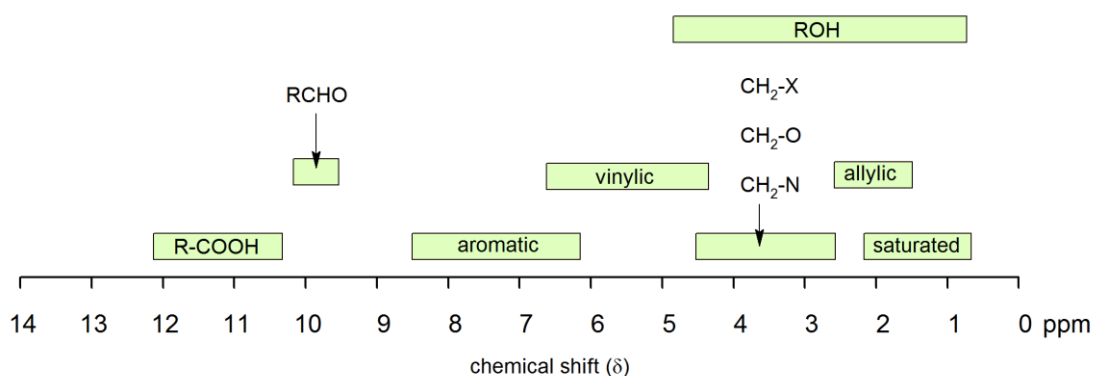
Το φαινόμενο της χημικής μετατόπισης οδηγεί τα πρωτόνια να συντονίζονται σε διαφορετικές συχνότητες, ανάλογα με το είδος του δεσμού H-X και την ύπαρξη στο μόριο ομάδων, που επηρεάζουν τη συμπεριφορά των πρωτονίων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα ηλεκτρόνια έχουν την τάση να «προστατεύουν» τον πυρήνα (διαμαγνητική θωράκιση), δημιουργώντας με την επίδραση του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου ένα μικρό τοπικό μαγνητικό πεδίο αντίθετης κατευθύνσεως από το εφαρμοζόμενο.<sup>92,93</sup>

Όταν υπάρχουν δεσμοί H→X, όπου X είναι δέκτης ηλεκτρονίων, η ηλεκτρονική πυκνότητα στον πυρήνα υδρογόνου είναι ελαττωμένη, με αποτέλεσμα τη μετατόπιση του σήματος συντονισμού σε μικρότερες τιμές πεδίου. Όταν υπάρχουν δεσμοί H←Y, όπου Y είναι δότης ηλεκτρονίων, η ηλεκτρονική πυκνότητα στον πυρήνα υδρογόνου θα είναι αυξημένη με αποτέλεσμα της μετατόπιση του σήματος συντονισμού σε μεγαλύτερες τιμές πεδίου.

Εκτός από την ηλεκτρονική πυκνότητα, τη θωράκιση του πρωτονίου επηρεάζει κι η ύπαρξη πολλαπλών δεσμών (π-ηλεκτρόνια), λόγω της εμφανίσεως διαμαγνητικής ανισοτροπίας, δηλαδή λόγω της δυνατότητας περιστροφής των π-ηλεκτρονίων μόνο σε ορισμένες κατευθύνσεις.

Οι χημικές μετατοπίσεις ερμηνεύονται με βάση κάποια πρότυπα, καθώς όλες οι χημικές μετατοπίσεις εξαρτώνται από την ισχύ του εφαρμοζόμενου πεδίου. Έτσι, ως χημική μετατόπιση ορίζεται η σχετική διαφορά που παρατηρείται με τη συχνότητα συντονισμού ενός δείγματος αναφοράς, συνήθως tetramethylsilane (TMS). Το τετραμεθυλοσιλάνιο είναι το πρότυπο, διότι τα πρωτόνια του εμφανίζουν συχνότητες απορρόφησης σε μεγαλύτερα πεδία από αυτά που παρατηρούνται σε οποιαδήποτε άλλη οργανική ένωση. Εάν  $\nu$  και  $\nu_0$  είναι οι συχνότητες συντονισμού του εξεταζόμενου πρωτονίου (ή ομάδας πρωτονίων) του δείγματος και της ουσίας αναφοράς αντίστοιχα, και  $\nu_0$  η βασική συχνότητα λειτουργίας του φασματομέτρου (σε Hz), τότε η χημική μετατόπιση εκφράζεται με την κλίμακα  $\delta$ , όπου  $\delta = \frac{\nu - \nu_0}{\nu_0} \times 10^6$  ppm.

Παρακάτω, στην **Εικόνα 47**, παρουσιάζονται οι χημικές μετατοπίσεις των βασικότερων χαρακτηριστικών ομάδων σε ένα φάσμα.



**Εικόνα 47. Χημικές μετατοπίσεις των κυριότερων χαρακτηριστικών ομάδων στο φάσμα <sup>1</sup>H NMR**

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

Η συχνότητα εξαρτάται από την ένταση του μαγνητικού πεδίου και για το λόγο αυτό οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων δίνονται σε αδιάστατες μονάδες, ppm (parts per million), όπως φαίνεται και παραπάνω. Η πολλαπλότητα των σημάτων στα φάσματα <sup>1</sup>H NMR αναφέρεται ως: s (singlet, απλό), d (doublet, διπλό), t (triplet, τριπλό), m (multiplet, πολλαπλό), br (broad, ευρύ), dd (doublet of doublets, διπλή διπλών). Επιπρόσθετα, η σταθερά σύζευξης J, η οποία δηλώνει την ισχύ της αλληλεπίδρασης των δύο ομάδων, υπολογίζεται από την απόσταση σε Hz των επιμέρους κορυφών που δημιουργούνται.

Οι πολλαπλές ομάδες κορυφών όπως διπλές, τριπλές, κλπ. εμφανίζονται λόγω της αλληλεπίδρασης των spin γειτονικών πρωτονίων. Η πολλαπλότητα αυτή καλείται spin spin σύζευξη και οφείλεται στην αλληλεπίδραση των spin γειτονικών μαγνητικών πυρήνων, η οποία διαδίδεται όχι μέσω του χώρου, αλλά μέσω δεσμών του μορίου. Όταν μία ομάδα μαγνητικώς ισοτίμων <sup>1</sup>H, δηλαδή πρωτονίων με ίδιο J, έχει n ισοτίμα γειτονικά <sup>1</sup>H, τα <sup>1</sup>H της ομάδας δίνουν μία σύνθετη κορυφή στο φάσμα NMR με πολλαπλότητα (n+1).<sup>92,94</sup>

### 3.7.1.2. Εφαρμογές NMR <sup>91,92</sup>

#### *Ποιοτική ανάλυση*

Το NMR είναι ένα εργαλείο, το οποίο παρέχει τη δυνατότητα εύρεσης των ειδών των χαρακτηριστικών ομάδων του δείγματος προς εξέταση, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 38. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή και η παρατήρηση ύπαρξης πιθανών προσμίξεων ή ακαθαρσιών με βάση τα μήκη κύματος στα οποία εμφανίζονται οι κορυφές.

#### *Ποσοτική ανάλυση*

Το NMR χρησιμοποιείται, επίσης, για τον προσδιορισμό της καθαρότητας της ένωσης προς εξέταση.

#### *Προσδιορισμός δομής μιας ένωσης*

Τα φάσματα NMR παρέχουν τις περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη δομή της ένωσης προς εξέταση. Για το λόγο αυτό, λαμβάνονται, αρκετές φορές, δεδομένα από άλλες τεχνικές όπως είναι η φασματομετρία μάζας.

#### *Προσδιορισμός ρυθμού διαφόρων αντιδράσεων*

Η φασματοσκοπία NMR δίνει τη δυνατότητα μελέτης και καταγραφής του ρυθμού πολλών αντιδράσεων, οι οποίες εξελίσσονται πολύ γρήγορα και δεν μπορούν να μετρηθούν με άλλες τεχνικές. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι αντιδράσεις γρήγορης ανταλλαγής πρωτονίων.

## 4. Πειραματικό μέρος

### 4.1. Όργανα και συσκευές

Κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν αρκετά όργανα και συσκευές για την παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων, το χαρακτηρισμό των ενώσεων, τη μελέτη καθαρότητας μιας ένωσης καθώς και τον προσδιορισμό βασικών ιδιοτήτων τους. Έτσι, παρακάτω αναφέρονται συνοπτικά τα βασικά όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και κάποιες βασικές ιδιότητες τους.

#### 4.1.1. Υγρή Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας-Thin liquid chromatography (TLC)

Η παρακολούθηση της πορείας των αντιδράσεων, αλλά κι ο αρχικός έλεγχος της καθαρότητάς του έγινε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, TLC, (Thin Liquid Chromatography) σε πλάκες αλουμινίου. Η υγρή χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας είναι ένα είδος υγρής χρωματογραφίας όπου η κινητή φάση είναι υγρή και η στατική φάση ένα λεπτό στρώμα εξειδικευμένου υλικού (γνωστό και ως ροφητικό) πάνω σε μια πλάκα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση οι πλάκες που χρησιμοποιούνται είναι πλάκες αλουμινίου και είναι επιστρωμένες με Silica gel F254 της εταιρείας Merck. Η κινητή φάση αποτελείται από ένα σύστημα διαλυτών το οποίο μεταφέρει τις διαλυτές ουσίες μέσω της στατικής φάσης. Τα μόρια κινούνται κατά μήκος της πλάκας με κίνηση η οποία είναι γνωστή και ως stop&go καθώς η διαλυμένη ουσία απορροφάται από την κινητή φάση και έπειτα εκροφάται εξαιτίας της αντίστασης του ροφητή. Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της Υγρής Χρωματογραφίας Λεπτής Στοιβάδας είναι η ικανότητα διαχωρισμού των ενώσεων με βάση την πολικότητα τους. Έτσι, όταν ο ροφητής είναι πολική ένωση, όπως συμβαίνει και με τη silica gel, οι πολικές διαλυτές ενώσεις κινούνται πιο αργά και παραμένουν σε κατώτερο ύψος πάνω στην πλάκα αλουμινίου, ενώ οι μη πολικές κινούνται αρκετά πιο γρήγορα. Επιπρόσθετα, με αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης (δηλαδή του συστήματος διαλυτών), οι πολικές διαλυτές ουσίες κινούνται γρηγορότερα με αποτέλεσμα να είναι σε μεγαλύτερο ύψος πάνω στην πλάκα και έτσι να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός, οπουδήποτε αυτό κρίνεται αναγκαίο.<sup>95</sup>

Οι κηλίδες των χρωματογραφημάτων TLC είναι διακριτές κυρίως με τη χρήση λάμπας υπεριώδους UV ακτινοβολίας στα 254nm. Στη συνέχεια, οι πλάκες εμποτίζονται σε διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος (αιθανόλικό διάλυμα PMA 7%) και θερμαίνονται.

#### 4.1.2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού – Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)

Ο χαρακτηρισμός των νέων προϊόντων κι ο έλεγχος της καθαρότητάς τους επιτεύχθηκε μέσω φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Τα φάσματα <sup>1</sup>H (πρωτονίου) NMR, έχουν καταγραφεί με το όργανο Varian V600 MHz του Εθνικού Ιδρύματος Έρευνών. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε δευτεριωμένο διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d<sub>6</sub>). Οι τιμές των χημικών μετατοπίσεων δίνονται σε ppm, ενώ η πολλαπλότητα των σημάτων στα φάσματα <sup>1</sup>H NMR αναφέρεται ως: s (singlet, απλό), d (doublet, διπλό), t (triplet, τριπλό), m (multiplet, πολλαπλό) και dd (doublet of doublets, διπλή διπλών). Οι σταθερές συζεύξεως, J, δίνονται σε Hz.

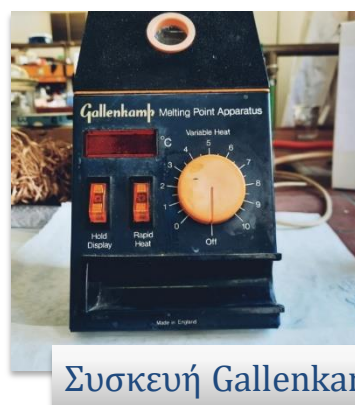
#### 4.1.3. Buchi Rotavapor® R-210

Περιστροφικός εξατμιστήρας κατάλληλος για την εξάτμιση διαλυτών και τη συμπύκνωση των διαλυμάτων.

#### 4.1.4. Συσκευή Gallenkamp

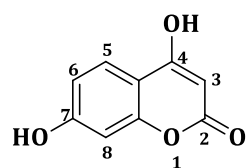
Η χρήση της συγκεκριμένης συσκευής έγκειται στον προσδιορισμό των σημείων τήξεων μέσω ανοιχτών τριχοδιαμετρικών σωλήνων.

Όλα τα αντιδραστήρια αγοράστηκαν από τις εταιρίες Sigma-Aldrich, Fluka, Alfa Aesar και Acros και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό.



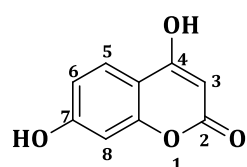
## 4.2. Συνθετική πορεία κουμαρινικών αναλόγων

### 4.2.1. Μέθοδοι σύνθεσης 4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη (1a)



Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, η 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνη παρασκευάστηκε με δύο διαφορετικές πορείες σύνθεσης, οι οποίες παρουσιάζονται παρακάτω. Με βάση την πρώτη πορεία σύνθεσης, παρατηρήθηκε υψηλή καθαρότητα της κουμαρίνης, ενώ μέσω της δεύτερης πορείας σύνθεσης, ήταν απαραίτητη η διαδικασία καθαρισμού της ένωσης μέσω στήλης σε κατάλληλο σύστημα διαλυτών.

#### 4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη παρουσία $ZnCl_2$ , $POCl_3$



Σε σφαιρική φιάλη των 10mL προστίθεται αρχικά 1030.2mg  $ZnCl_2$ . Στη συνέχεια προστίθενται 264.7mg ρεσορκινόλης (1eq) και 251.4mg μηλονικού οξέος (1eq). Τέλος, στις παραπάνω ποσότητες προστίθενται 686.8mL  $POCl_3$  υπό ψύξη. Η σφαιρική φιάλη συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες, στους 60°C για 12 ώρες.

Η αντίδραση παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 60% (PE)/ 40% (EtOAc). Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθενται στη σφαιρική 8.6 ml  $H_2O$ , τα οποία ήταν αρχικά τοποθετημένα σε

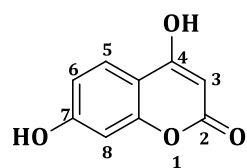
παγόλουτρο, και στη συνέχεια η σφαιρική τοποθετείται στο ψυγείο για όλη τη νύχτα (overnight). Την επόμενη μέρα, διηθείται και ξηραίνεται. Λαμβάνεται σκούρο μωβ προϊόν.

**Απόδοση:** 50.1%

**Σημείο τήξης:** 270-274°C

**<sup>1</sup>H NMR** (600MHz, DMSO-*d*6): δ (ppm) 12.23 (s, 1H, OH-7), 10.51 (s, 1H, OH-4), 7.63 (d, J=13.2Hz, 1H, H-5), 6.76 (dd, J=13.2Hz, J=3.6Hz, 1H, H-6), 6.66 (d, J=3.6Hz, 1H, H-8), 5.38 (s, 1H, H-3)

#### 4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη παρουσία BF<sub>3</sub>Et<sub>2</sub>O



Σε σφαιρική φιάλη των 25mL προστίθενται 4.718mmol (519.4mg) ρεσορκινόλης (1eq) και 14.1526mmol (1.4727g) μαλονικού οξέος (3eq). Στη συνέχεια, τοποθετείται η σφαιρική σε παγόλουτρο και προστίθενται 2.4mL BF<sub>3</sub>Et<sub>2</sub>O (0,5eq). Στη συνέχεια, η σφαιρική τοποθετείται σε ελαιόλουτρο στους 90°C και συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες για 48h. Η αντίδραση παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 60% (PE)/ 40% (EtOAc).

Μετά το πέρας της αντίδρασης, η σφαιρική φιάλη αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, τοποθετείται σε παγόλουτρο και έπειτα προστίθενται 28mL (6eq) υδατικού διαλύματος οξικού νατρίου 20% για εξουδετέρωση της περίσσειας BF<sub>3</sub>Et<sub>2</sub>O και σχηματισμό στερεού. Κατά τη διήθηση του προϊόντος, πραγματοποιούνται εκπλύσεις με νερό και διαιθυλαιθέρα και στη συνέχεια το προϊόν ξηραίνεται. Το τελικό προϊόν παραλήφθηκε έπειτα από χρωματογραφία στήλης με σύστημα διαλυτών 95%(DCM)/5% (MeOH). Λαμβάνεται πορτοκαλί στερεό.



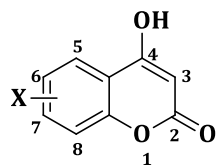
Εικόνα 48. Πορεία καθαρισμού του προϊόντος με χρωματογραφία στήλης

**Απόδοση:** 78.4%

**Σημείο τήξης:** 270-274°C

**<sup>1</sup>H NMR** (600MHz, DMSO-*d*6): δ (ppm) 12.23 (s, 1H, OH-7), 10.51 (s, 1H, OH-4), 7.63 (d, J=13.2Hz, 1H, H-5), 6.76 (dd, J=13.2Hz, J=3.6Hz, 1H, H-6), 6.66 (d, J=3.6Hz, 1H, H-8), 5.38 (s, 1H, H-3)

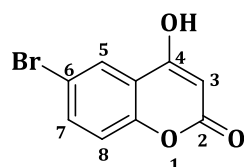
#### 4.2.2. Γενική μέθοδος παρασκευής 4-υδροξυ-κουμαρινικών αναλόγων



Κατάλληλη ποσότητα 2-υδροξυ-ακετοφαινόνης (1eq) προστίθεται σε σφαιρική φιάλη μαζί με κατάλληλη ποσότητα υδριδίου του νατρίου (5eq) και ανθρακικού διαιθυλεστέρα (1.5eq), παρουσία τολουολίου (2.8eq). Συγκεκριμένα, στη σφαιρική φιάλη, η οποία είναι τοποθετημένη αρχικά σε παγόλουτρο, προστίθεται μέρος της ποσότητας του τολουολίου και στη συνέχεια το υδρίδιο του νατρίου. Ακολουθεί προσθήκη της ακετοφαινόνης διαλυμένης στο υπόλοιπο τολουόλιο και το διάλυμα αφήνεται σε ανάδευση για 30min, παρουσία κάθετου ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες (χρήση αζώτου). Τέλος, προστίθεται στάγδην ο ανθρακικός διαιθυλεστέρας, τοποθετείται η σφαιρική φιάλη σε ελαιόλουτρο στους 90°C και αφήνεται για 24h, παρουσία κάθετου ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες.

Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 90% (PE)/ 10% (EtOAc). Μετά το πέρας της αντίδρασης, η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο και αποχύνεται σταδιακά σε νερό και αναδεύεται. Στη συνέχεια προστίθεται στάγδην υδροχλωρικό οξύ (HCl) ώστε να γίνει οξύνιση του διαλύματος με ταυτόχρονο έλεγχο του pH. Το προϊόν που καταβυθίζεται διηθείται. Η καθαρότητα του προϊόντος ελέγχεται με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H NMR.

#### 6-βρωμο-4-υδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη (2a)



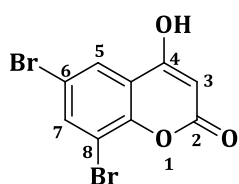
Σε σφαιρική φιάλη των 25mL, προστίθενται 2.2552 mmol (700 mg) της ακετοφαινόνης, 16.2320 mmol (389.6 mg) υδριδίου του νατρίου και 4.8828 mmol (576.8mg ή 591.6μL) του διαιθυλεστέρα. Στα παραπάνω mmol αντιστοιχούν 7mL τολουόλιο για την ακετοφαινόνη και τον διαιθυλεστέρα μαζί και 2.2mL τολουόλιο για το υδρίδιο. Έτσι, υπολογίζεται πως στη σφαιρική πρέπει να προστεθούν συνολικά περίπου 650mg σκόνης υδριδίου του νατρίου. Λαμβάνεται μπεζ στερεό.

**Απόδοση:** 44.5%

**Σημείο τήξης:** 276-279°C

**<sup>1</sup>H NMR** (600MHz, DMSO-*d*6): δ (ppm) 7.90 (d, J=4.2Hz, 1H, H-8), 7.80 (dd, J=17.4Hz, J=4.8Hz, 1H, H-7), 7.36 (d, J=18Hz, 1H, H-8), 5.61 (s, 1H, H-3)

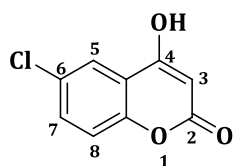
### 6,8-διβρωμο-4-υδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη (2b)



Σε σφαιρική φιάλη των 25mL, προστίθενται 1.8854 mmol (554.2mg) της ακετοφαινόνης, 9.4015 mmol (225.6mg) υδριδίου του νατρίου και 2.8281mmol (334.08mg ή 342.7μL) του διαιθυλεστέρα. Στα παραπάνω mmol αντιστοιχούν 4.1mL τολουόλιο για την ακετοφαινόνη και τον διαιθυλεστέρα μαζί και 1.3 mL τολουόλιο για το υδρίδιο. Έτσι, υπολογίζεται πως στη σφαιρική πρέπει να προστεθούν συνολικά περίπου 376mg σκόνης υδριδίου του νατρίου. Λαμβάνεται μπεζ στερεό. Απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός.

**Απόδοση:** 49.7%

### 4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνη (2c)



Σε σφαιρική φιάλη των 25mL, προστίθενται 2.2815mmol (389.2mg) της ακετοφαινόνης, 11.376mmol (273mg) υδριδίου του νατρίου και 3.422mmol (404.3mg ή 414.6μL) του διαιθυλεστέρα, με τη διαδικασία που έχει αναφερθεί παραπάνω. Στα παραπάνω mmol αντιστοιχούν 4.9mL τολουόλιο για την ακετοφαινόνη και τον διαιθυλεστέρα μαζί και 1.5mL τολουόλιο για το υδρίδιο. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως το υδρίδιο του νατρίου είναι αποθηκευμένο σε λάδι με περιεκτικότητα 60% w/w. Έτσι, υπολογίζεται πως στη σφαιρική πρέπει να προστεθούν συνολικά περίπου 455mg σκόνης υδριδίου του νατρίου. Λαμβάνεται μπεζ στερεό. Το προϊόν χρησιμοποιείται στο επόμενο στάδιο, χωρίς περαιτέρω επεξεργασία καθαρισμού.

**Απόδοση:** 48.5%

**Σημείο τήξης:** 264°C

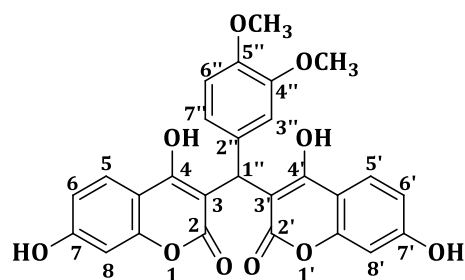
### 4.2.3. Γενική μέθοδος παρασκευής 4-υδροξυ-δικουμαρινικών αναλόγων

Για τη σύνθεση των δικουμαρινικών αναλόγων, κατάλληλη ποσότητα κατάλληλα υποκατεστημένης 4-υδροξυ-κουμαρίνης (2eq) προστίθεται σε σφαιρική φιάλη μαζί με κατάλληλη ποσότητα κατάλληλα υποκατεστημένης βενζαλδεΐδης (1eq), παρουσία DES L-προλίνη: γαλακτικό οξύ, 1:2 (3.3eq) και νερού (1.6eq). Η φιάλη τοποθετείται σε ελαιόλουτρο στους 60°C, συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες και αφήνεται για 2.5h.

Η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 60% (PE)/ 40% (EtOAc) και σε 90% DCM/10% MeOH. Μετά το πέρας της αντίδρασης, τοποθετείται η σφαιρική φιάλη σε παγόλουτρο, προστίθεται σταδιακά νερό και καταβυθίζεται στερεό. Έπειτα διηθείται και ξηραίνεται. Τέλος, με κατάλληλο σύστημα διαλυτών, το οποίο επιλέγεται μέσω της παρακολούθησης TLC, το προκύπτον προϊόν λαμβάνεται σε καθαρή μορφή είτε μέσω καθαρισμού με μεθανόλη είτε μέσω χρωματογραφίας στήλης.



### 3,3'-(3,4-διμεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-ονη) (3a)



Σε σφαιρική φιάλη των 10mL εισάγονται 0.3091mmol (60mg) 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης και 0.1545mmol (25.7mg) της 3,4-διμεθοξυ-βενζαλδεΐδης. Έπειτα, προστίθενται 1007μL DES και 504μL H<sub>2</sub>O και η σφαιρική τοποθετείται σε ελαιόλουτρο και συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες. Το προϊόν που λαμβάνεται, οδηγείται προς καθαρισμό μέσω χρωματογραφίας στήλης σε σύστημα διαλυτών

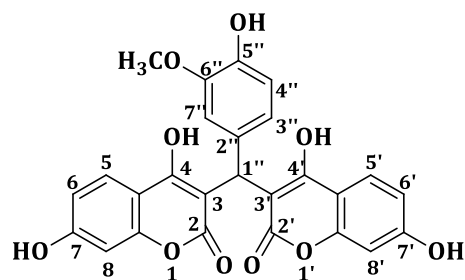
90% DCM/10% MeOH. Λαμβάνεται σωμών στερεό.

**Απόδοση:** 36.1%

**Σημείο τήξης:** 210 °C (dec.)

<sup>1</sup>H NMR (600MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) 8.49 (s, 1H, H-6''), 8.35 (s, 1H, H-4''), 7.74 (d, J=2.4Hz, 2H, H-5 & H-5'), 7.64 (dd, J=8.4Hz, J=2.4Hz, 2H, H-7 & H-7'), 7.30 (d, J=9 Hz, 2H, H-8 & H-8'), 6.59 (m, 2H, H-3'' & H-6''), 6.31 (d, J=8.4Hz, 1H, H-7''), 6.08 (s, 1H, H-1'')

### 3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη) (3b)



Σε σφαιρική φιάλη των 10mL εισάγονται 0.165038mmol (29.4mg) 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης και 0.082519mmol (12.6mg) της 4-υδροξυ-3-μεθοξυ-βενζαλδεΐδης.

Έπειτα, προστίθενται 538μL DES και 269μL H<sub>2</sub>O και η σφαιρική τοποθετείται σε ελαιόλουτρο και συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες. Το προϊόν που λαμβάνεται, οδηγείται

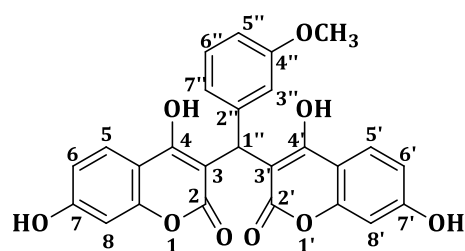
προς καθαρισμό μέσω χρωματογραφίας στήλης σε σύστημα διαλυτών 90% DCM/10% MeOH. Λαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

**Απόδοση:** 49.7%

**Σημείο τήξης:** 220-225 °C

<sup>1</sup>H NMR (600MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm)

### 3,3'-(3-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη) (3c)



Σε σφαιρική φιάλη των 10mL εισάγονται 0.3065mmol (59.5mg) 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης και 0.1532mmol (20.9mg) της 3,5-διμεθοξυ-βενζαλδεΐδης. Έπειτα, προστίθενται 999μL DES και 500μL H<sub>2</sub>O και η σφαιρική τοποθετείται σε ελαιόλουτρο και συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες. Το προϊόν που

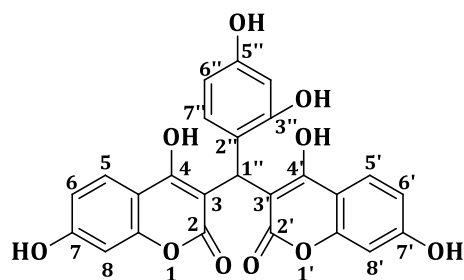
λαμβάνεται, οδηγείται προς καθαρισμό μέσω χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 90% DCM/ 10% MeOH. Λαμβάνεται ροζ στερεό.

**Απόδοση:** 35.5%

**Σημείο τήξης:** 203°C (dec.)

**<sup>1</sup>H NMR** (600MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) 10.1(s, 2H, H-4& H-4'), 7.59 (d, J=9Hz, 2H, H-5 &H-5'), 7.04 (t, J=7.8Hz, 1H, H-6''), 6.64(d, J=6.6Hz, 4H, H-6 H-6', H-8 & H-8'), 6.56 (t, J=9.0Hz, 3H, H-3'',H-5'' & H-7''), 6.11(s, 1H, H-1''), 3.60 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>)

**3,3'-(3,5-διυδροξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη) (3d)**



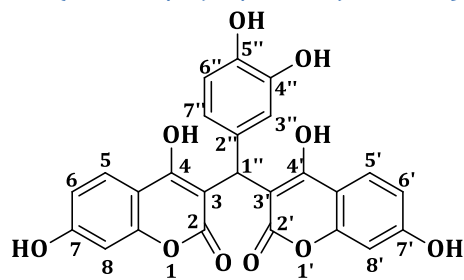
Σε σφαιρική φιάλη των 10mL εισάγονται 0.3446mmol (61.4mg) 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης και 0.17223mmol (23.8mg) της 3,5-διυδροξυ-βενζαλδεΐδης. Έπειτα, προστίθενται 1123μL DES και 562μL νερό, και η σφαιρική τοποθετείται σε ελαιόλουτρο και συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες. Το προϊόν που λαμβάνεται, οδηγείται προς καθαρισμό μέσω χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 95% DCM/ 5% MeOH καθώς και 80% DCM/ 20% MeOH. Λαμβάνεται στερεό έντονου ροζ χρώματος.

**Απόδοση:** 93.9%

**Σημείο τήξης:** 180°C (dec.)

**<sup>1</sup>H NMR** (600MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) 10.50 (s, 1H, H-5), 9.43 (s, 1H, H-5'), 7.82 (d, J=12Hz, 1H, H-7''), 7.06 (d, J=11.4Hz, 1H, H-6') 6.85 (d, J=12.6Hz, 1H, H-6), 6.68 (s, 1H, H-4'') 6.52(s, 2H, H-8 & H-8'), 6.44 (d, J=12.6Hz, 1H, H-6''), 6.36 (s, 1H, H-1'')

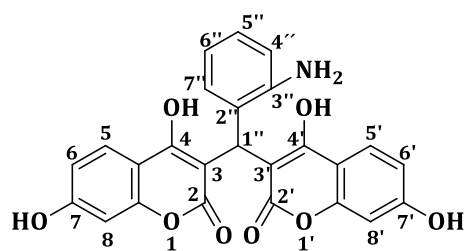
**3,3'-(3,4-διυδροξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη) (3e)**



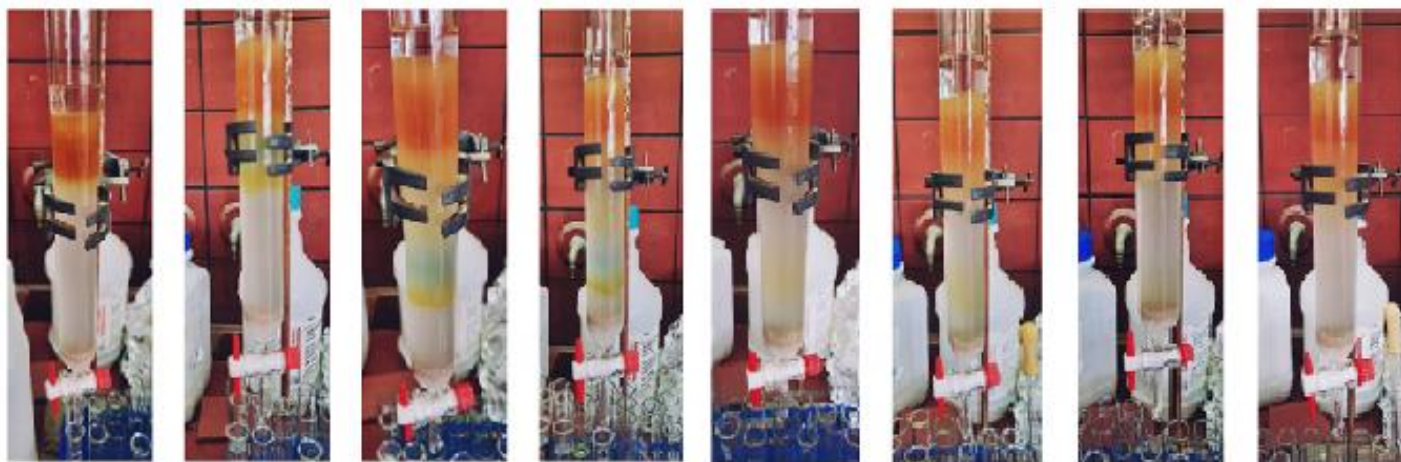
Σε σφαιρική φιάλη των 10mL εισάγονται 0.0791mmol (14.1mg) 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης και 0.0395mmol (5.5mg) της 3,4-διυδροξυ-βενζαλδεΐδης. Έπειτα, προστίθενται 258μL DES και 129μL νερό, και η σφαιρική τοποθετείται σε ελαιόλουτρο και συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες.

**Απόδοση:** 42.4%

*3,3'-(2-αμινο-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη) (3f)*



Σε σφαιρική φιάλη των 10mL εισάγονται 0.2851mmol (50.8 mg) 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης και 0.1425mmol (17.3mg) της 2-αμινοβενζαλδεΐδης. Έπειτα, προστίθενται 950μL DES και 465μL νερό, και η σφαιρική τοποθετείται σε ελαιόλουτρο και συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες. Το προϊόν που λαμβάνεται, οδηγείται προς καθαρισμό μέσω χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 95% DCM/ 5% MeOH. Λαμβάνεται στερεό μπεζ χρώματος.



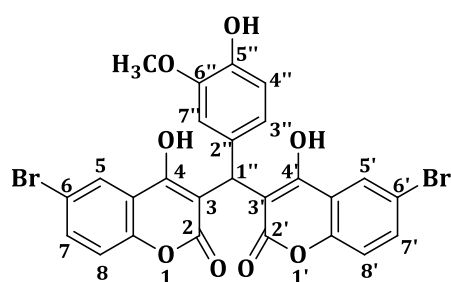
Εικόνα 49. Πορεία καθαρισμού προϊόντος

**Απόδοση:** 61.7%

**Σημείο τήξης:** decomposed at 219°C

**<sup>1</sup>H NMR** (600MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm)

*3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-βρωμο-2H-βενζοπυραν-2-όνη) (3g)*



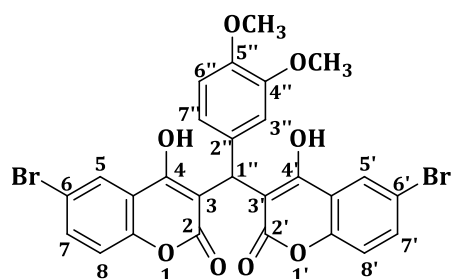
Σε σφαιρική φιάλη των 10mL εισάγονται 0.2460mmol (59.3mg) 4-υδροξυ-6-βρωμο-κουμαρίνης και 0.1230mmol (18.7mg) βανιλίνης. Έπειτα, προστίθενται 803μL DES και 402μL η σφαιρική τοποθετείται σε ελαιόλουτρο και συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες. Το προϊόν που λαμβάνεται, οδηγείται προς καθαρισμό μέσω χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 90% DCM/10% MeOH. Λαμβάνεται πορτοκαλί στερεό.

**Απόδοση:** 93.7%

**Σημείο τήξης:** 208°C (dec)

**<sup>1</sup>H NMR** (600MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) 7.87 (d, J=2.4Hz, 2H, H-5 & H-5'), 7.69 (m, 3H, OH-4, OH-4' & OH-4''), 7.64 (dd, J=9Hz, J=2.4Hz, 2H, H-7 & H-7'), 7.25 (d, J=8.4Hz, 2H, H-8 & H-8'), 6.59 (s, 1H, H-7''), 6.56 (d, J=8.4Hz, 1H, H-4''), 6.48 (d, J=8.4Hz, 1H, H-3''), 6.12 (s, 1H, H-1''), 3.54 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>)

**3,3'-(3,4-διμεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-βρωμο-2H-βενζοπυραν-2-όνη) (3h)**



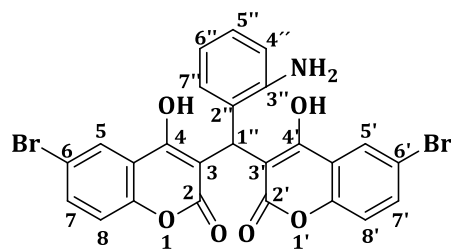
Σε σφαιρική φιάλη των 10mL εισάγονται 0.3820mmol (74.3mg) 4-υδροξυ-6-βρωμοκουμαρίνης και 0.1541mmol (25.6mg) της 3,4-διμεθοξυ-βενζαλδεΐδης. Έπειτα, προστίθενται 1240μL DES και 623μL H<sub>2</sub>O και η σφαιρική τοποθετείται σε ελαιόλουτρο και συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες. Το προϊόν που λαμβάνεται, οδηγείται προς καθαρισμό μέσω χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 90% DCM/10% MeOH. Λαμβάνεται κίτρινο στερεό.

**Απόδοση:** 95.3%

**Σημείο τήξης:** 175-178 °C

**<sup>1</sup>H NMR** (600MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) 7.86 (d, J=2.4Hz, 2H, H-5 & H-5'), 7.69 (m, 2H, OH-4 & OH-4'), 7.64 (dd, J=8.4Hz, J=2.4Hz, 2H, H-7 & H-7'), 7.25 (d, J=8.4Hz, 2H, H-8 & H-8'), 6.74 (d, J=8.4 Hz, 1H, H-7''), 6.62 (s, 1H, H-3''), 6.59 (d, J=8.4Hz, 1H, H-6''), 6.15 (s, 1H, H-1''), 3.68 (s, 3H, H-5'', OCH<sub>3</sub>), 3.52 (s, 3H, H-4'' OCH<sub>3</sub>)

**3,3'-(2-αμινο-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-βρωμο-2H-βενζοπυραν-2-όνη) (3i)**



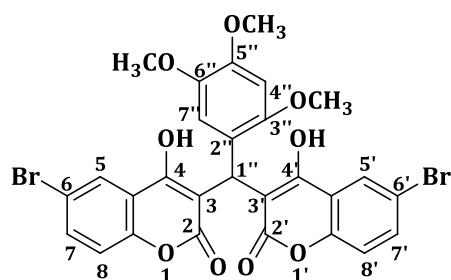
Σε σφαιρική φιάλη των 10mL εισάγονται 0.3783mmol (91.2 mg) 4-υδροξυ-6-βρωμοκουμαρίνης και 0.1892mmol (22.9mg) της 2-αμινο-βενζαλδεΐδης. Έπειτα, προστίθενται 1233.7μL DES και 617μL νερό, και η σφαιρική τοποθετείται σε ελαιόλουτρο και συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες.

**Απόδοση:** 88.2%

**Σημείο τήξης:** 295°C

**<sup>1</sup>H NMR** (600MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm)

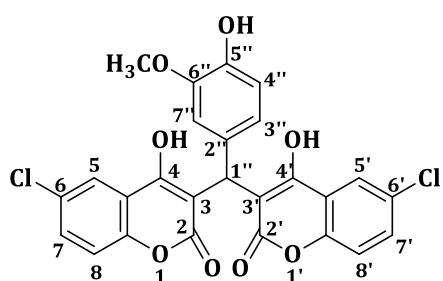
*3,3'-(2,4,5-τριμεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-βρωμο-2H-βενζοπυραν-2-όνη)*  
**(3j)**



Σε σφαιρική φιάλη των 10mL εισάγονται 0.2904mmol (70.0mg) 4-υδροξυ-6-βρωμο-κουμαρίνης και 0.1452mmol (28.5mg) της 2,4,5-τριμεθοξυ-βενζαλδεΐδης. Έπειτα, προστίθενται 947μL DES και 473μL H<sub>2</sub>O και η σφαιρική τοποθετείται σε ελαιόλουτρο και συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες. Απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός του προϊόντος.

**Απόδοση:** 36.5%

*3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνη)*  
**(3k)**



Σε σφαιρική φιάλη των 10mL εισάγονται 0.2681mmol (52.7mg) 4-υδροξυ-6-χλωρο-κουμαρίνης και 0.1340mmol (20,4mg) 4-υδροξυ-5-μεθοξυ-βενζαλδεΐδης. Έπειτα, προστίθενται 873μL DES και 437μL H<sub>2</sub>O και η σφαιρική τοποθετείται σε ελαιόλουτρο και συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες. Το προϊόν που λαμβάνεται, οδηγείται προς καθαρισμό

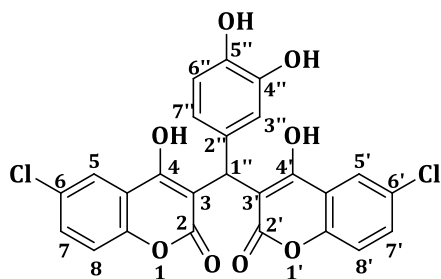
μέσω χρωματογραφίας στήλης σε σύστημα διαλυτών 95% DCM/5% MeOH στην αρχή και στη συνέχεια σε σύστημα 90% DCM/10% MeOH. Λαμβάνεται υποκίτρινο στερεό.

**Απόδοση:** 77.8%

**Σημείο τήξης:** 241°C (dec.)

<sup>1</sup>H NMR (600MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) **8,55 (s, 1H, H-5'')**, 7.73 (d, J=3Hz, 2H, H-5 & H-5'), 7.52 (dd, J=10.8Hz, J=2.4Hz, 2H, H-7 & H-7'), 7.30 (d, J=8.4Hz, 2H, H-8 & H-8'), 6.59 (s, 1H, H-7''), 6.56 (d, J=8.4Hz, 1H, H-4''), 6.48 (d, J=7.8Hz, 1H, H-3''), 6.13 (s, 1H, H-1''), 3.54 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>)=

*3,3'-(3,4-υδροξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνη)* **(3l)**



Σε σφαιρική φιάλη των 10mL εισάγονται 0.3591mmol (70.6mg) 4-υδροξυ-6-χλωρο-κουμαρίνης και 0.1795mmol (24.8mg) της 3,4-διυδροξυ-βενζαλδεΐδης. Έπειτα, προστίθενται 1170μL DES και 585μL H<sub>2</sub>O και η σφαιρική τοποθετείται σε ελαιόλουτρο και συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες. Το προϊόν που λαμβάνεται, οδηγείται προς καθαρισμό μέσω

χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 80% DCM/20% MeOH. Λαμβάνεται ανοιχτό πορτοκαλί στερεό.



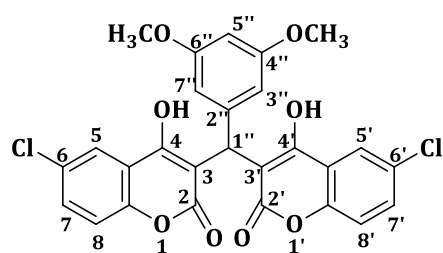
Εικόνα 50. Πορεία διαχωρισμού προϊόντος από ακαθαρσίες

**Απόδοση:** 52.8%

**Σημείο τήξης:** 205°C (dec.)

<sup>1</sup>H NMR (600MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) 8.49 (s, 1H, H-5''), 8.35 (s, 1H, H-4''), 7.73 (d, J=2.4Hz, 2H, H-5 & H-5'), 7.53 (dd, J=8.4Hz, J=2.4Hz, 2H, H-7 & H-7'), 7.30 (d, J=9Hz, 2H, H-7 & H-7'), 6.50 (d, J=7.8Hz, 2H, H-3'' & H-6''), 6.31 (d, J=8.4Hz, 1H, H-7''), 6.08 (s, 1H, H-1'')

*3,3'-(3,5-διμεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνη)*(**3m**)



Σε σφαιρική φιάλη των 10mL εισάγονται 0.34285mmol (67.4mg) 4-υδροξυ-6-χλωρο-κουμαρίνης και 0.1714mmol (28.5mg) της 3,5-διμεθοξυ-βενζαλδεύδης. Έπειτα, προστίθενται 1118μL DES και 559μL H<sub>2</sub>O και η σφαιρική τοποθετείται σε ελαιόλουτρο και συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες. Το προϊόν που λαμβάνεται, οδηγείται προς καθαρισμό

μέσω χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών 95% DCM/ 5% MeOH καθώς και 85% DCM/ 15% MeOH. Λαμβάνεται κίτρινο στερεό.

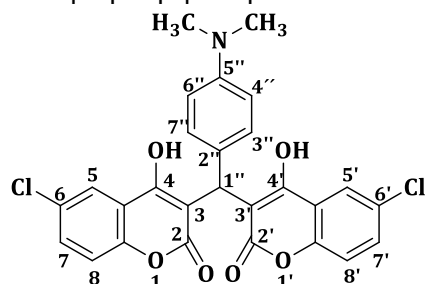
**Απόδοση:** 48.2%

**Σημείο τήξης:** 187°C (dec.)

<sup>1</sup>H NMR (600MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) 7.74 (d, J=2.4Hz, 2H, H-7 & H-7'), 7.54 (dd, J=9.0Hz, J=2.4Hz, 2H, H-8 & H-8'), 7.31 (d, J=9.0Hz, 2H, H-5 & H-5'), 6.27 (s, 1H, H-5''), 6.20 (s, 2H, H-3'' & H-7''), 6.14 (s, 1H, H-1''), 3.59 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>)

### 3,3'-(παρα-διμεθυλαμινο-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη) (3n)

Σε σφαιρική φιάλη των 10mL εισάγονται 0.3265mmol (64.2mg) 4-υδροξυ-6-χλωρο-κουμαρίνης και 0.16328mmol (24.4mg) της παρα-διμεθυλαμινο-βενζαλδεΐδης. Έπειτα, προστίθενται 1063μL DES και 532μL νερό, και η σφαιρική τοποθετείται σε ελαιόλουτρο και συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες. Το προϊόν που λαμβάνεται, οδηγείται προς καθαρισμό με χρήση μεθανόλης. Λαμβάνεται ανοιχτό ροζ στερεό.



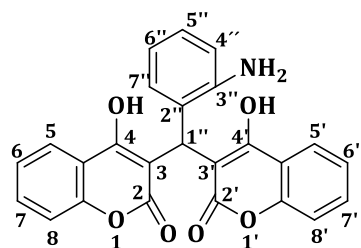
**Απόδοση:** 57.9%

**Σημείο τήξης:** 245-250°C

<sup>1</sup>H NMR (600MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ (ppm) 7.72 (s, 2H, H-4'' & H-6''), 7.55 (d, J=12.6Hz, 2H, H-8 & H-8'), 7.33 (d, J=12Hz, 4H, H-5, H-5', H-3'' & H-7''), 7.21 (d, J=12Hz, 2H, H-7 & H-7'), 6.23 (s, 1H, H-1''), 3.11 (s, 6H, CH<sub>3</sub>)

### 3,3'-(2-αμινο-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη) (3o)

Σε σφαιρική φιάλη των 10mL εισάγονται 0.5341mmol (86.6mg) 4-υδροξυ-κουμαρίνης και 0.2670mmol (32.4mg) της 2-αμινο-βενζαλδεΐδης. Έπειτα, προστίθενται 1740μL DES και 870μL νερό, και η σφαιρική τοποθετείται σε ελαιόλουτρο και συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα υπό αδρανείς. Το προϊόν καθαρίζεται από τυχόν ακαθαρσίες με προσθήκη μεθανόλης. Λαμβάνεται προϊόν μπεζ χρώματος.

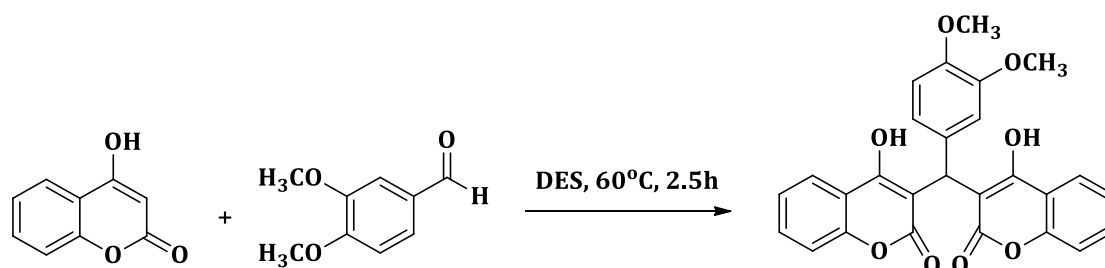


**Απόδοση:** 36.2%

**Σημείο τήξης:** 271-273°C

#### 4.2.4. Μέθοδος μελέτης ανακυκλωσιμότητας και επαναχρησιμοποίησης Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη (DES)

Για τη μελέτη της ανακυκλωσιμότητας και επαναχρησιμοποίησης του DES συντίθεται η 3,3'-(3,4-διμεθοξυ-φαινυλομεθυλο)-δι-(4-υδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη) με τη συνθετική πορεία που έχει περιγραφεί παραπάνω για τα δικουμαρινικά ανάλογα. (Σχήμα 13). Η συγκεκριμένη πορεία επαναλαμβάνεται τρεις φορές: η πρώτη περίπτωση περιλαμβάνει το αρχικό DES, ενώ οι άλλες δυο περιλαμβάνουν το ανακτώμενο DES από την πρώτη και δεύτερη επανάληψη αντίστοιχα.



Σχήμα 13. Συνθετική πορεία της 3,3'-(3,4-διμεθοξυ-φαινυλομεθυλο)-δι-(4-υδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνης)

Η πορεία της κάθε αντίδρασης παρακολουθείται μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) σε σύστημα διαλυτών 60% (PE)/ 40% (EtOAc) και σε 90% DCM/10% MeOH. Μετά το πέρας της αντίδρασης, τοποθετείται η σφαιρική φιάλη σε παγόλουτρο, προστίθεται σταδιακά νερό και καταβυθίζεται στερεό μπεζ χρώματος. Έπειτα διηθείται και ξηραίνεται. Το διήθημα εκχυλίζεται με διαλύτη EtOAc και με αυτό τον τρόπο συλλέγεται το ανακτώμενο DES για επαναχρησιμοποίησή του.

1. Σε σφαιρική φιάλη των 10mL εισάγονται 0.700 mmol (113.6mg) 4-υδροξυκουμαρίνης και 0.3499mmol (58.2mg) της 3,4-διμεθοξυ-βενζαλδεύδης. Έπειτα, προστίθενται 2.2mL DES και 1.1μL νερό, και η σφαιρική τοποθετείται σε ελαιόλουτρο και συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες για 2.5h.
2. Σε σφαιρική φιάλη των 10mL εισάγονται 0.1733mmol (28.1mg) 4-υδροξυκουμαρίνης και 0.0865mmol (14.4mg) της 3,4-διμεθοξυ-βενζαλδεύδης. Έπειτα, προστίθενται 520μL DES και 260μL νερό, και η σφαιρική τοποθετείται σε ελαιόλουτρο και συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες για 2.5h.
3. Σε σφαιρική φιάλη των 10mL εισάγονται 0.06117mmol (10.0mg) 4-υδροξυκουμαρίνης και 0.03085mmol (5.1mg) της 3,4-διμεθοξυ-βενζαλδεύδης. Έπειτα, προστίθενται 200μL DES και 100μL νερό, και η σφαιρική τοποθετείται σε ελαιόλουτρο και συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα υπό αδρανείς συνθήκες για 2.5h

Πίνακας 6. Επαναληψιμότητα συνθετικής πορείας για έλεγχο της απόδοσης της και της ανάκτησης του DES

Επανάληψη Αντίδρασης	Απόδοση αντίδρασης	Ανάκτηση Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη
1	76.1%	75.8%
2	68.6%	65.1%
3	62.2%	60.3%



#### 4.2.5. Προσδιορισμός της αναγωγής της σταθερής ρίζας DPPH

##### Υλικά & Συσκευές

Πίνακας 7. Υλικά και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της σταθερής ρίζας DPPH

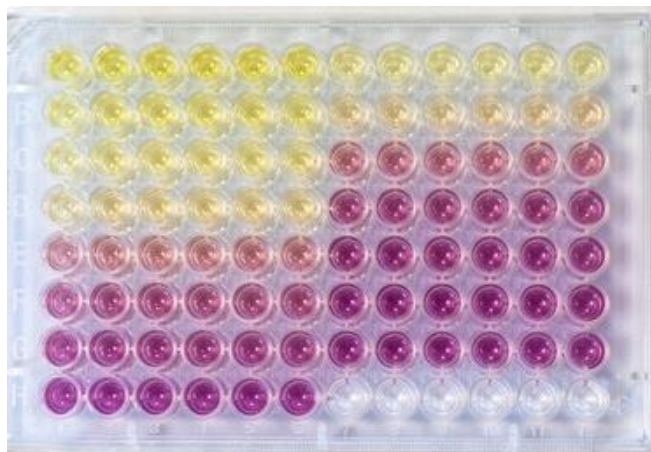
	Όνομασία	Εταιρεία
Υλικά	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	Sigma-Aldrich
	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), 97%	Acros Organics
	Αιθανόλη, 99.8%	AppliChem Panreac
	Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)	Fischer Scientific
Όργανα & Συσκευές	Plate reader	SPECTRA MAX 250 Molecular Devices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

##### Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει, αρχικά, την παρασκευή διαλύματος DPPH 0.0025% (w/v) σε αιθανόλη, το οποίο αφήνεται υπό μαγνητική ανάδευση για 20min, απουσία φωτός. Έπειτα, ζυγίζονται κατάλληλες ποσότητες των δειγμάτων προς εξέταση και διαλύονται στην απαραίτητη ποσότητα διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Με αυτό τον τρόπο, σε κάθε θέση ενός πλακιδίου 96 θέσεων (96 well plate), προστίθενται 195μL DPPH και 5μL από κάθε μια από τα δείγματα προς εξέταση για τη δημιουργία τελικών συγκεντρώσεων 100μM, 70μM, 50μM, 30μM, 10μM και 5μM. Παράλληλα, παρασκευάζονται δείγματα αναφοράς (control), τα οποία περιέχουν 195μL DPPH και 5μL διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Το plate αναδεύεται ελαφρώς και αφήνεται σε σκοτάδι για 30min και 60min. Τέλος, με τη βοήθεια του reader μετράται η απορρόφηση στα 515nm, και εξετάζεται ως προς την απορρόφηση των control.

Στα αποτελέσματα εμφανίζεται το ποσοστό (%) δέσμησης της ελεύθερης ρίζας DPPH σε συγκέντρωση 100μM καθώς και το IC<sub>50</sub> για τα 30 και 60min. Για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο του DPPH χρησιμοποιήθηκε ως ένωση αναφοράς το Trolox.

Παρακάτω, παρατίθεται το πλακίδιο 96 θέσεων (Εικόνα 51) το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των νέων παραγώγων που συντέθηκαν στις πέντε συγκεντρώσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω. Τα δείγματα που εμφανίζονται με μωβ χρώμα αποτελούν τις ενώσεις που δεν εμφανίζουν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση. Αντιθέτως, τα δείγματα που εμφανίζουν κίτρινο και υποκίτρινο χρώμα αποτελούν ενώσεις που εμφανίζουν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση, καθώς το κίτρινο χρώμα αποδεικνύει την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH.



Εικόνα 51. Πλακίδιο 96 θέσεων (96 well plate)

#### 4.2.6. Προσδιορισμός της αναγωγής των θερμικών ελευθέρων ριζών (AAPH)

Όλα τα κουμαρινικά και δικουμαρινικά παράγωγα αξιολογήθηκαν, επίσης, για την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξείδωση του λινελαϊκού οξέος, η οποία επάγεται από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών AAPH.

#### Υλικά & Όργανα

	Όνομασία	Εταιρεία
Υλικά	2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH)	Fluorochem
	Linoleic acid	Sigma-Aldrich
	Boric acid	Sigma-Aldrich
	Sodium hydroxide	Penta
	Tween20	Sigma-Aldrich
	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), 97%	Acros Organics
	L-Ascorbic acid	Penta
Όργανα & Συσκευές	Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)	Fischer Scientific
	UV-Vis spectrometer	Jasco V770
	Vortex	VELP SCIENTIFICA ZX3 Advanced Vortex Mixer

#### Πειραματική διαδικασία

Για τον έλεγχο της ικανότητας των νέων κουμαρινικών αναλόγων να αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξειδωση εισάγονται αρχικά στην κυψελίδα του φασματόμετρου: 14μL λινελαϊκού οξέος (ρυθμιστικό διάλυμα βορικού οξέος-υδροξειδίου του νατρίου 50mM, pH 9.0), 1302μL (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH=7.4, 14μL κουμαρινικού αναλόγου (DMSO) και 70μL AAPH (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων pH=7.4), ενώ στη συνέχεια παρασκευάζεται το ίδιο διάλυμα παραλείποντας την προσθήκη της βιοδραστικής ένωσης, η οποία αντικαθίσταται από 14μL DMSO.

Σε κάθε περίπτωση, μετράται η απορρόφηση στα 234nm για t=0 και t=60s και συγκρίνεται ο ρυθμός αύξησης της απορρόφησης του διαλύματος που περιέχει δείγμα με το ρυθμό αύξησης της απορρόφησης του control. Συγκεκριμένα σε κάθε μια απορρόφηση αφαιρείται η απορρόφηση του AAPH για t=0 και t=60s αντίστοιχα και υπολογίζεται η αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (LP) ως εξής:

$$\% \text{Αναστολή LP} = \left( 100 - \frac{\Delta A_{\text{δείγματος}}}{\Delta A_{\text{control}}} * 100 \right)$$

Τα αποτελέσματα δίνονται σε (%) ποσοστό αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης σε συγκέντρωση 100μM, ενώ ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε και σε αυτή την περίπτωση το Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) και το ασκορβικό οξύ (Vitamin C).

#### 4.2.7. Προσδιορισμός αναστολής του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράσης (AChE)

##### Υλικά & Όργανα

	Όνομασία	Εταιρεία
Υλικά	5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic Acid) (DTNB)	Fluorochem
	Acetylthiocholine (ATCI)	Alfa Aesar
	<i>Electrophorus Electricus</i> Acetylcholinesterase (AChE)	Sigma-Aldrich
	Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)	Fischer Scientific
	Trizma-base	
Όργανα & Συσκευές	Plate reader	SPECTRA MAX 250 Molecular Devices
	Vortex	VELP SCIENTIFICA ZX3 Advanced Vortex Mixer

### Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει την προσθήκη σε κάθε θέση ενός πλακιδίου 96 θέσεων (96 well plate) 158μL ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (C=50mM, pH=8.0), 20μL ακετυλοχολινεστεράσης *electrophorus electricus* (*electrophorus electricus* AChE) (C=0.1units/mL) και 2μL της ένωσης προς εξέταση διαλυμένη σε DMSO. Τα παραπάνω επωάζονται για 15min και στη συνέχεια προστίθενται 10μL DTNB (C=3mM) και 10μL ATCI (C=14mM). Μετράται η απορρόφηση τις χρονικές στιγμές t=0 και t=15min στα 412nm και εξετάζεται ως προς τις αντίστοιχες απορροφήσεις του control (ctrl)<sup>1</sup>. Συγκεκριμένα, η ποσοστιαία αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης υπολογίζεται ως εξής:

$$\%Inhibition = \left( 1 - \frac{\Delta A_{\text{δείγματος}}}{\Delta A_{\text{control}}} \right) \times 100$$

Όπου

- $\Delta A_{\text{sample}}$ =Απορρόφηση δείγματος στα 10min- Απορρόφηση δείγματος στα 0min
- $\Delta A_{\text{control}}$ <sup>1</sup>= Απορρόφηση control στα 10min- Απορρόφηση control στα 0min

Όλα τα δείγματα προς εξέταση αραιώνονται κατάλληλα σε DMSO ώστε να επιτευχθούν τελικές συγκεντρώσεις ίσες με 100μM, 85μM, 70μM, 50μM, 30μM και 10μM αντίστοιχα.

Τα δείγματα που αποκτούν ένα ωχρό κίτρινο χρώμα αποτελούν αξιόλογους αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης, ενώ τα δείγματα που εμφανίζονται με κίτρινο έντονο χρώμα δεν εμφανίζουν ανασταλτική δράση ακετυλοχολινεστεράσης. Ως ένωση αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η γαλανταμίνη.

Σημειώνεται ότι για την *in vitro* δοκιμή αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης, χρησιμοποιήθηκε ένζυμο απομονωμένο από τον οργανισμό *electrophorus electricus*, καθώς το ενεργό του κέντρο προσομοιάζει σε μεγάλο βαθμό το ενεργό κέντρο της ανθρώπινης AChE.

---

<sup>1</sup> Το control (ctrl) περιέχει 2μL DMSO στη θέση του δείγματος προς εξέταση

## 5. Αποτελέσματα και Συζήτηση αποτελεσμάτων

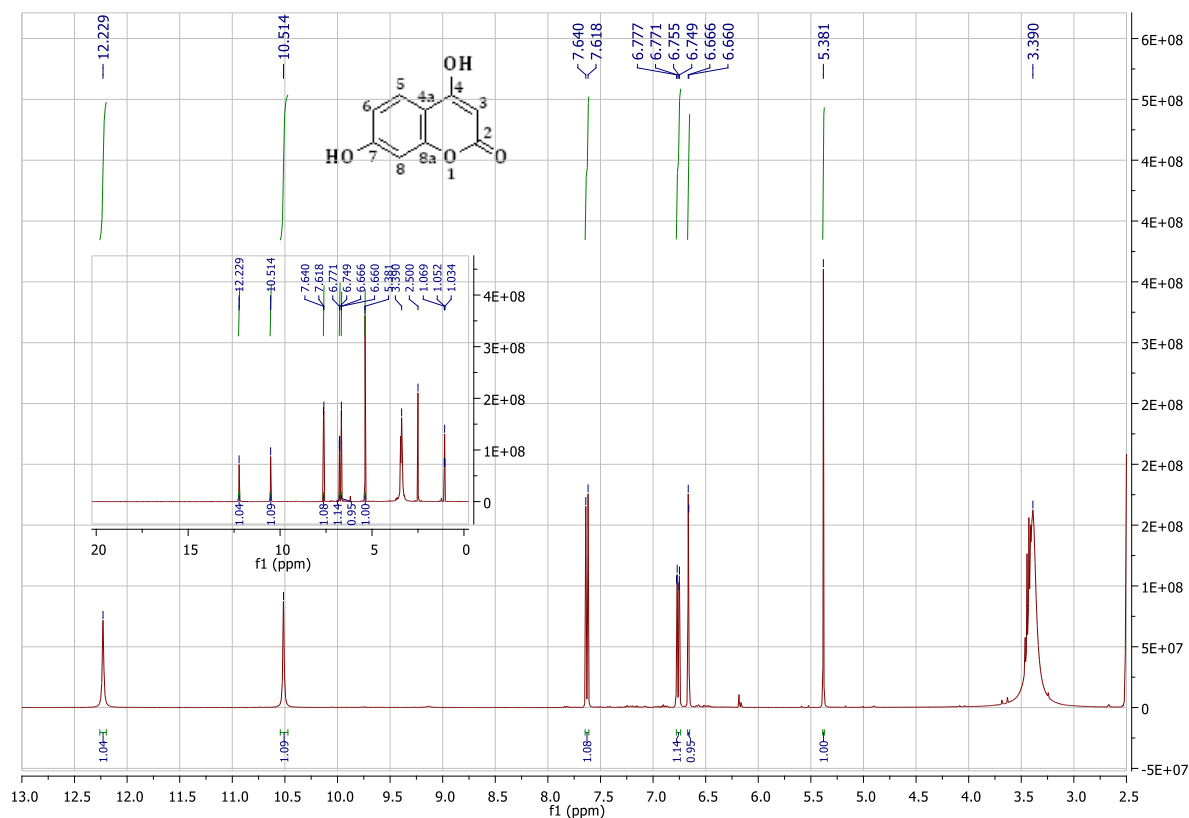
### 5.1. Αποτελέσματα σύνθεσης και φασματοσκοπική μελέτη (NMR)

Στην παρούσα διπλωματική εργασία συντέθηκαν 4 κουμαρινικά ανάλογα και 15 νέα δικουμαρινικά παράγωγα, σύνολο 19 ενώσεις, οι οποίες ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας  $^1\text{H}$  NMR.

Αρχικά, εξετάστηκαν δύο εναλλακτικές πορείες σύνθεσης της 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης (**1a**) που διέφεραν ως προς τις αναλογίες των αντιδρώντων καθώς και ως προς τις συνθήκες. Επιλέχθηκε η πορεία που απέδωσε υψηλότερες αποδόσεις, καθώς και είχε πιο φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση. Στη συνέχεια συντέθηκαν οι 6-βρωμο-4-υδροξυ-κουμαρίνη (**2a**), 6,8-διβρωμο-4-υδροξυ-κουμαρίνη (**2b**) και 4-υδροξυ-6-χλωρο-κουμαρίνη (**2c**). Όλες οι κουμαρίνες συντέθηκαν σε ικανοποιητικές αποδόσεις, με την 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνη να απαιτεί περαιτέρω διεργασία καθαρισμού ενώ οι **2a** και **2c** οδηγήθηκαν στο επόμενο στάδιο χωρίς περαιτέρω επεξεργασία.

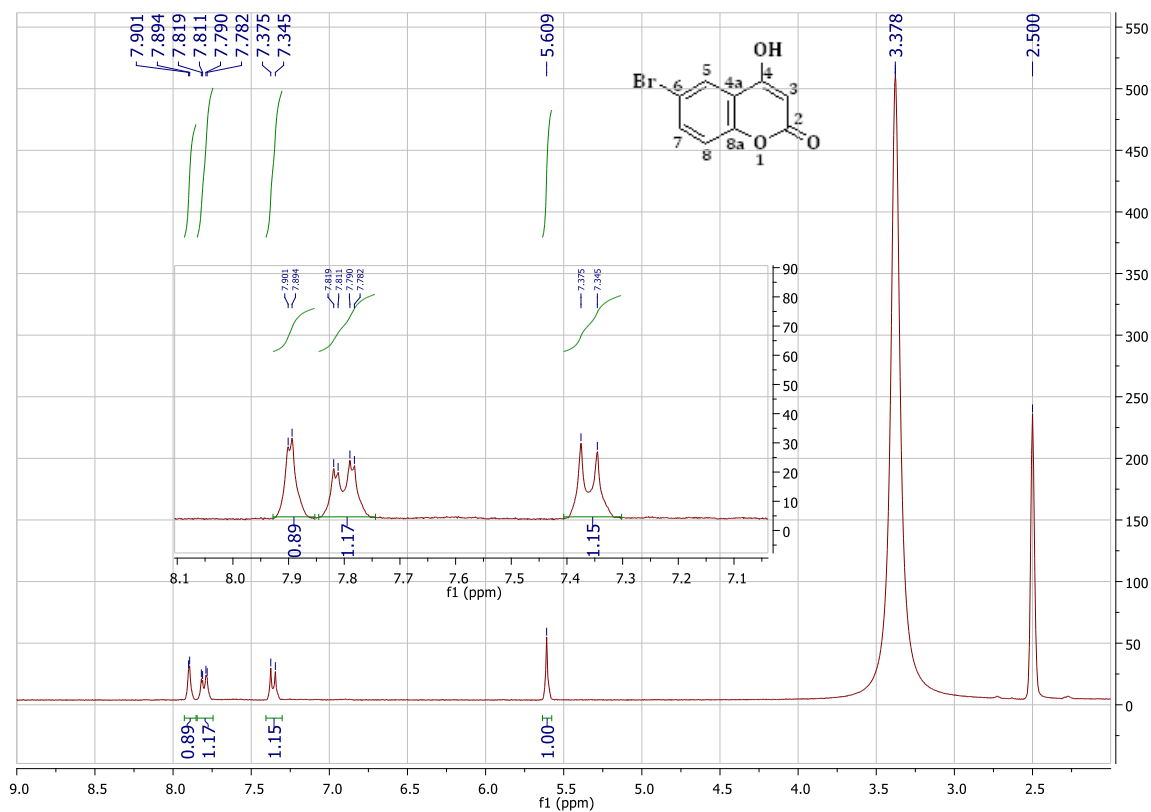
Οι παραπάνω κουμαρίνες αποτέλεσαν αντιδρώντα στη σύνθεση των νέων δικουμαρινών μέσω συμπύκνωσης Domino-Knoevenagel σε αρκετά υψηλές αποδόσεις (36.1-95.3%), αφού πρώτα υπέστησαν καθαρισμό μέσω στήλης διαχωρισμού σε κατάλληλο σύστημα διαλυτών ή καθαρισμό με χρήση μεθανόλης.

Παρακάτω, ακολουθεί φασματοσκοπική μελέτη των πιο χαρακτηριστικών μορίων από όσα αναφέρθηκαν παραπάνω. Συγκεκριμένα, θα αναλυθούν τα φάσματα των **1a**, **2a**, **3k**, **3l**, **3n** και **3o**.



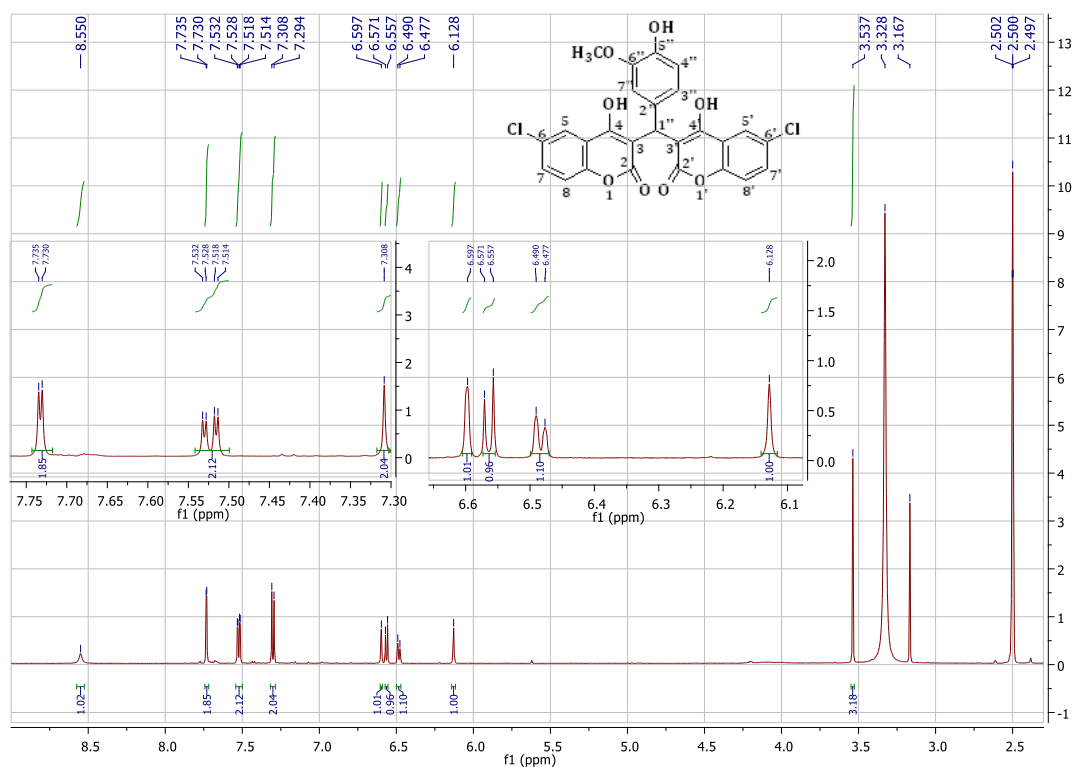
Εικόνα 52. <sup>1</sup>H NMR της 4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνης (1a)

Στο φάσμα αυτό, εμφανίζεται αρχικά μια απλή κορυφή στα 2.5 ppm, που αποδίδεται στο διαλύτη (DMSO), και μια κορυφή στα 3.39 ppm που αποδίδεται στο περιεχόμενο H<sub>2</sub>O του διαλύτη. Στη συνέχεια στα 5.38 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο, το H-3, ενώ στα 6.66 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή, η οποία αποδίδεται στο H-8. Στα 6.76 ppm εμφανίζεται μια διπλή διπλών κορυφή, η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο H-6, καθώς αυτό διαθέτει ένα γειτονικό, μη ισοδύναμο πρωτόνιο και επηρεάζεται επίσης από το H-8. Στα 7.63 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο, που αποδίδεται στο H-5. Τέλος, στα 10.51 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή που αποδίδεται στο υδροξύλιο της θέσης 4, ενώ στα 12.23 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή που αποδίδεται στο υδροξύλιο της θέσης H-7.



Εικόνα 53. <sup>1</sup>H NMR φάσμα της 6-βρωμο-4-υδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνης (2a)

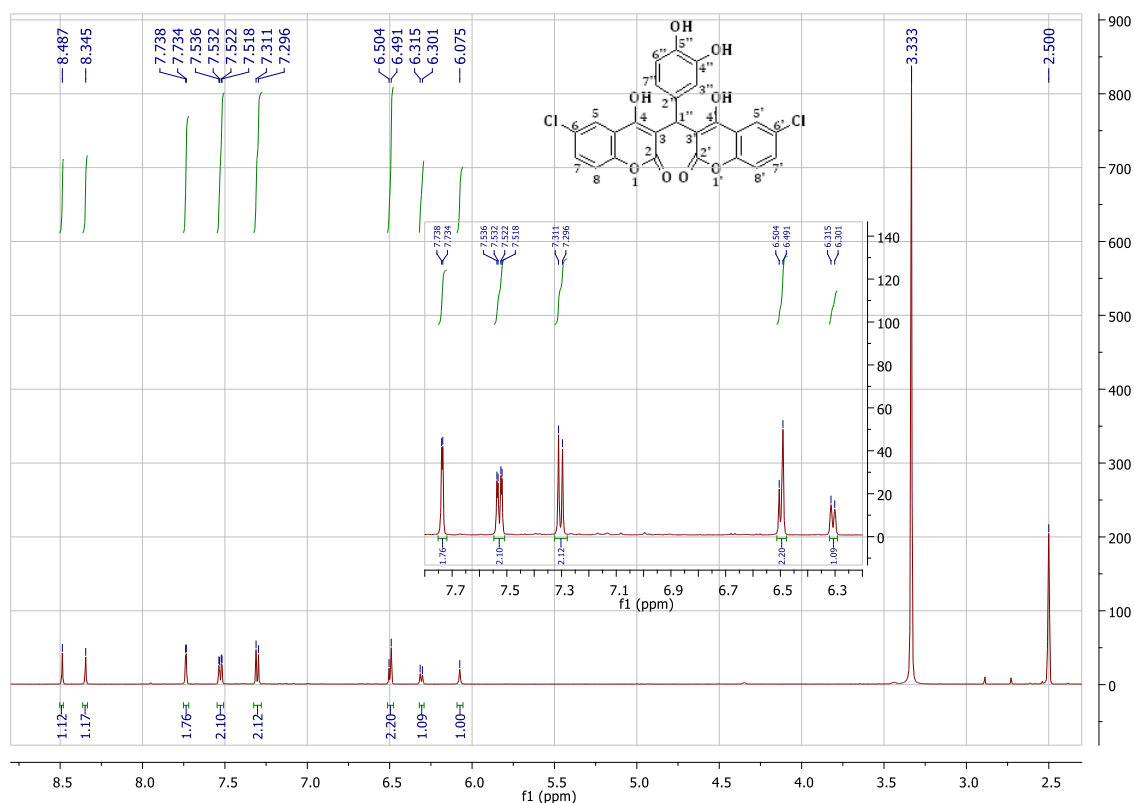
Στο συγκεκριμένο φάσμα εμφανίζεται αρχικά μια απλή κορυφή στα 2.5 ppm, που αποδίδεται στο διαλύτη, και μια απλή κορυφή στα 3.38 ppm που αποδίδεται στο περιεχόμενο H<sub>2</sub>O του διαλύτη. Στη συνέχεια, στα 5.61 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο H-3, ενώ στα 7.36 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή, η οποία οφείλεται στο πρωτόνιο H-5. Στα 7.80 ppm εμφανίζεται μια διπλή διπλών κορυφή, η οποία οφείλεται στο πρωτόνιο H-7, καθώς αυτό διαθέτει ένα γειτονικό, μη ισοδύναμο πρωτόνιο και επιπρόσθετα επηρεάζεται από το H-5. Τέλος, στα 7.90 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή που οφείλεται στο H-8.



**Εικόνα 54. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της 3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (DMSO) (3k)**

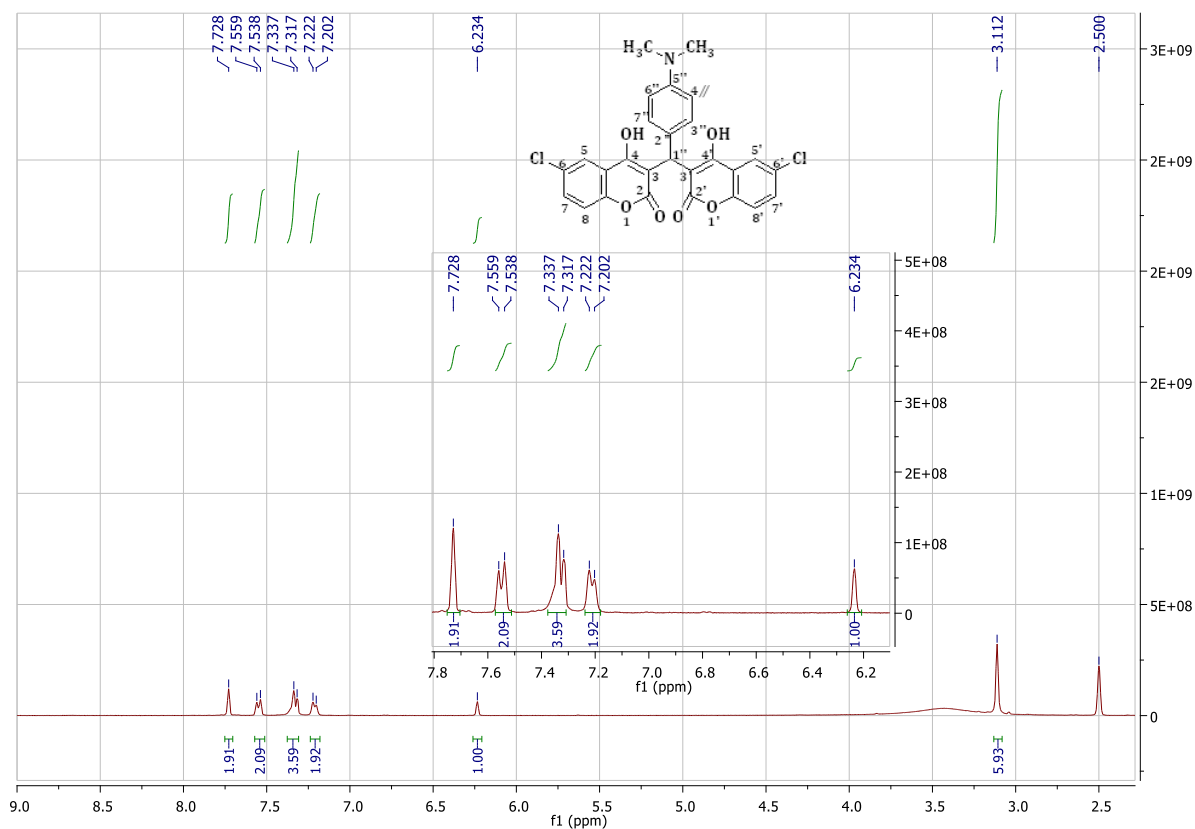
Στο συγκεκριμένο φάσμα εμφανίζεται, αρχικά, μια απλή κορυφή στα 2.5 ppm που είναι χαρακτηριστική για τον διαλύτη (διμεθυλοσουλφοξείδιο), ενώ στα 3.33 ppm εμφανίζεται μια κορυφή που αποδίδεται στο νερό που υπάρχει στο διάλυμα (το DMSO είναι ιδιαίτερα υγροσκοπικός διαλύτης). Χαρακτηρίζεται, επίσης, από την παρουσία μιας απλής κορυφής στα 3.54 ppm που ολοκληρώνεται και αποδίδεται στα τρία ισοδύναμα πρωτόνια της μεθοξυ-ομάδας της θέσης 6''. Στη συνέχεια, στα 6.13 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή, η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο H-1'' και σηματοδοτεί το σχηματισμό της δικουμαρίνης. Στα 6.48 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο H-3'' και στα 6.56 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή, η οποία επίσης ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο H-4''. Στα 6.59 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή, η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο H-7'', ενώ στα 7.30 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια, τα H-8 και H-8' αντίστοιχα. Έπειτα, στα 7.52 ppm εμφανίζεται μια διπλή διπλών κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια, τα H-7 και H-7', καθώς καθένα από τα δύο διαθέτει ένα γειτονικό, μη ισοδύναμο πρωτόνιο αλλά επηρεάζεται και από το H-5 και H-5' αντίστοιχα. Τέλος, στα 7.73 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια, τα H-5 και H-5' αντίστοιχα και στα 8.55 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο υδροξύλιο (OH) του φαινολικού δακτυλίου στη θέση 5''.





Εικόνα 55. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της 3,3'-(3,4-διυδροξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (31)

Στο φάσμα της 3,3'-(3,4-διυδροξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) εμφανίζονται, αρχικά, από δύο απλές κορυφές στα 2.5 ppm και στα 3.33 ppm που αποδίδονται στον διαλύτη (DMSO) και στο υδατικό μέρος του διαλύτη αντίστοιχα. Στη συνέχεια, στα 6.08 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή, η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο της θέσης H-1'' και σηματοδοτεί το σχηματισμό της δικουμαρίνης. Στα 6.31 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για ένα πρωτόνιο και αποδίδεται στο H-7'', ενώ στα 6.59 ppm εμφανίζεται μια πολλαπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και αποδίδεται στα H-3'' και H-6''. Έπειτα, στα 7.30 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια, τα H-8 και H-8' αντίστοιχα. Στα 7.64 ppm εμφανίζεται μια διπλή διπλών κορυφή η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια, τα H-7 και H-7' καθώς καθένα από τα δύο διαθέτει ένα γειτονικό, μη ισοδύναμο πρωτόνιο αλλά επηρεάζεται και από το H-5 και H-5' αντίστοιχα. Στα 7.74 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια, τα H-5 και H-5', ενώ τέλος στα 8.35 και 8.49 ppm εμφανίζονται δύο απλές κορυφές, οι οποίες αποδίδονται στα υδροξύλια των θέσεων H-4'' και H-6'' αντίστοιχα.

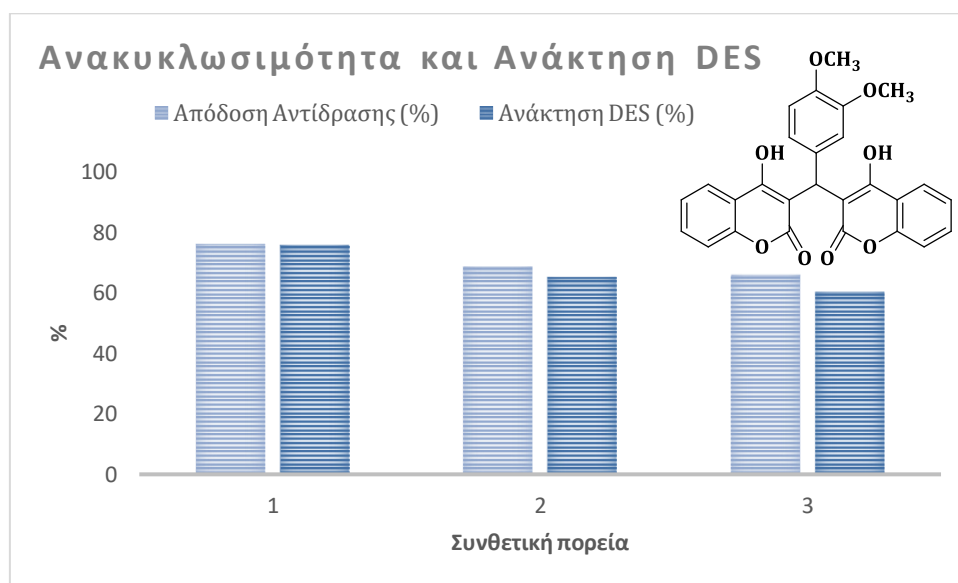


**Εικόνα 56. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της 3,3'-(παρα-διμεθυλ-αμινο-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (3n)**

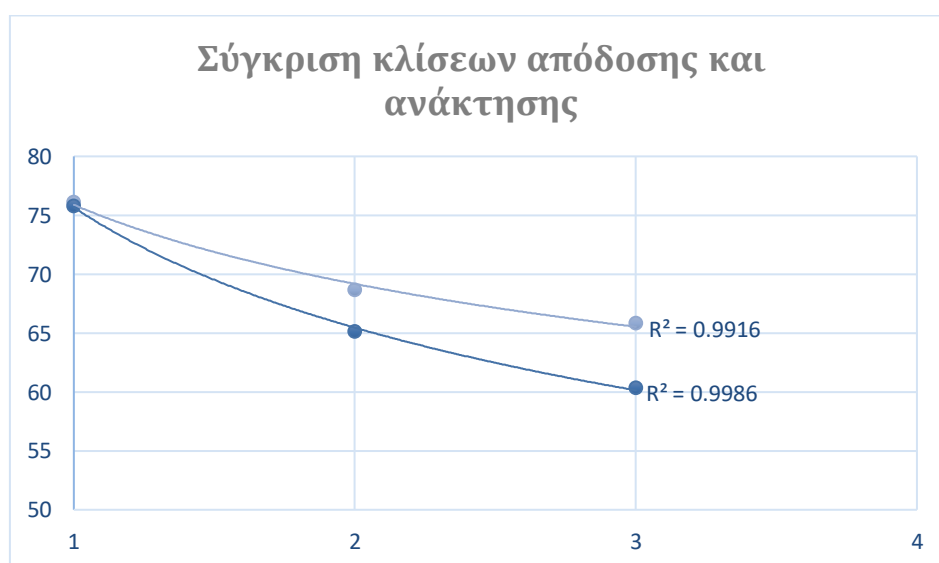
Στο φάσμα της 3,3'-(παρα-διμεθυλ-αμινο-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) εμφανίζεται, αρχικά, μια απλή κορυφή στα 2.5 ppm που αποδίδεται στον διαλύτη (DMSO), ενώ στα 3.11 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για έξι πρωτόνια και αποδίδεται στα έξι ισοδύναμα πρωτόνια της μεθυλο-ομάδας στη θέση 5". Στη συνέχεια, στα 6.23 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή, η οποία αποδίδεται στο πρωτόνιο της θέσης H-1" και σηματοδοτεί το σχηματισμό της δικουμαρίνης. Στα 7.21 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια και αποδίδεται στα H-7 και H-7', ενώ στα 7.33 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για τέσσερα πρωτόνια, τα H-5, H-5', H-3" και H-7". Έπειτα, στα 7.55 ppm εμφανίζεται μια διπλή κορυφή, η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια, τα H-8 και H-8' αντίστοιχα. Τέλος, στα 7.72 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή η οποία ολοκληρώνεται για δύο πρωτόνια, τα H-4" και H-6".

## 5.2. Αξιολόγηση ανακυκλωσιμότητας και επαναχρησιμοποίησης του Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη (DES)

Για τη σύνθεση των δικουμαρινικών αναλόγων, χρησιμοποιήθηκε ο Βαθέως Ευτηκτικός Διαλύτης (DES) L-προλίνη: Γαλακτικό οξύ σε αναλογία 1:2. Σε αυτό το πλαίσιο, με σκοπό την αξιολόγηση της αποδοτικότητας και της ανακυκλωσιμότητας του DES, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της 3,3'-(3,4-διμεθοξυ-φαινυλομεθυλο)-δι-(4-υδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη) τρεις φορές. Ειδικότερα, η πρώτη αντίδραση περιλαμβάνει το αρχικό DES, ενώ οι άλλες δυο περιλαμβάνουν το ανακτώμενο DES από την πρώτη και δεύτερη επανάληψη αντίστοιχα. Παρακάτω, παρουσιάζονται δύο διαγράμματα (Διάγραμμα 1 και Διάγραμμα 2) στα οποία φαίνονται συγκριτικά οι % αποδόσεις και οι % ανακτήσεις του DES.



Διάγραμμα 1. Απόδοση (%) και ανάκτηση (%) για κάθε συνθετική πορεία



Διάγραμμα 2. Σύγκριση μείωσης απόδοσης και μείωσης ανάκτησης του DES για τις 3 συνθετικές πορείες

Όπως είναι φανερό και από τα δύο διαγράμματα τόσο η απόδοση όσο και η ανάκτηση του DES μειώνονται σχεδόν με τον ίδιο ρυθμό κατά 6.9% και 7.9% αντίστοιχα. Συνεπώς, ο φυσικός Βαθέως Ευτηκτικός Διαλύτης L-προλίνη: γαλακτικό οξύ σε αναλογία 1:2 κρίνεται κατάλληλος τόσο για την προσέγγιση μιας «πράσινης» συνθετικής πορείας, όσο και για την ικανότητα υψηλής ανάκτησής του και επαναχρησιμοποίησής του σε αρκετά καλές αποδόσεις. Οι αποδόσεις των αντιδράσεων στη 2<sup>η</sup> και 3<sup>η</sup> συνθετική πορεία είναι αρκετά κοντά στην απόδοση της 1<sup>ης</sup> συνθετικής πορείας, ενώ οι ανακτήσεις κυμαίνονται στα ίδια ποσοστά με αποτέλεσμα το συγκεκριμένο DES να κρίνεται κατάλληλο και για περαιτέρω χρήση.

### 5.3. Αξιολόγηση των πράσινων δεικτών

Για την αξιολόγηση των πράσινων δεικτών σε κάθε μια από τις συντιθέμενες ενώσεις υπολογίστηκαν οι κατάλληλες παράμετροι και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 8. Οι αποδόσεις όλων των κουμαρινικών και δικουμαρινικών αναλόγων αξιολογήθηκαν με βάση τον Πίνακα 8, ενώ οι υπόλοιποι δείκτες αξιολογήθηκαν με βάση όσα έχουν προαναφερθεί.

Πίνακας 8. Υπολογισμός Πράσινων δεικτών των συντιθέμενων μορίων

A/A	Απόδοση (%)	%AE <sup>2</sup>	%EAE <sup>3</sup>	%RME <sup>4</sup>	MI <sup>5</sup> (kg/kg)	Παραγωγικότητα Μάζας	Απόδοση άνθρακα (%)
1a	78.4	82.97	15.36	12.05	19.80	0.12	14.52
2a	44.5	72.35	61.45	27.35	7.20	0.27	26.17
2b	49.7	77.64	67.91	33.77	5.37	0.34	30.12
2c	48.5	68.09	56.52	27.42	7.61	0.27	27.88
3a	36.1	96.55	90.94	32.79	42.54	0.33	2.03
3b	49.7	96.46	96.35	47.86	31.58	0.48	24.99
3c	35.5	96.34	90.42	32.09	45.78	0.32	63.39
3d	93.9	96.36	96.36	90.49	17.15	0.90	99.12
3e	42.4	96.36	96.18	40.82	41.71	0.41	9.74
3f	61.7	96.23	96.18	59.32	27.60	0.59	100.0
3g	93.7	97.16	97.17	91.03	13.56	0.91	80.78
3h	95.3	97.22	97.22	92.69	15.83	0.93	100.0
3i	88.2	97.01	97.03	85.54	15.10	0.86	100.0
3j	36.5	97.34	97.33	35.53	32.63	0.36	28.02
3k	77.8	96.70	96.66	75.24	18.82	0.75	71.82
3l	52.8	96.61	96.65	51.05	28.43	0.51	70.78
3m	48.2	96.78	96.75	46.61	29.71	0.47	45.99
3n	57.9	96.68	96.63	55.98	25.40	0.56	55.17
3o	36.2	95.95	63.75	23.07	50.76	0.23	59.15

<sup>2</sup> %AE: % Οικονομία Ατόμου (Atom Economy)

<sup>3</sup> %EAE: % Πειραματική Οικονομία Ατόμου (Experimental Atom Economy)

<sup>4</sup> %RME: Αποδοτικότητα Μάζας Αντίδρασης (Reaction Mass Efficiency)

<sup>5</sup> MI: Ένταση Μάζας (Mass Intensity)

Η συνθετική πορεία του κουμαρινικού αναλόγου **1a**, το οποίο έχει συντεθεί με χρήση  $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ , χαρακτηρίζεται ως καλή με απόδοση 78.4%, ενώ τα υπόλοιπα τρία κουμαρινικά ανάλογα **2a-2c**, που έχουν συντεθεί με την ίδια συνθετική πορεία, εμφανίζουν παρόμοιες αλλά ικανοποιητικές αποδόσεις 44.5%, 49.7% και 48.5% αντίστοιχα. Ωστόσο, τα δικουμαρινικά ανάλογα **3a-3o** εμφανίζουν αποδόσεις τόσο χαμηλές όσο και εξαιρετικές. Συγκεκριμένα, τα δικουμαρινικά ανάλογα **3d**, **3g**, **3h** και **3i** χαρακτηρίζονται από εξαιρετικές αποδόσεις με τιμές 93.9%, 93.7%, 95.3% και 88.2%, ενώ τα δικουμαρινικά ανάλογα **3a**, **3c**, **3j**, **3o** χαρακτηρίζονται από πολύ χαμηλές αποδόσεις με τιμές 36.1%, 35.5%, 36.5% και 36.2% αντίστοιχα. Όλα τα υπόλοιπα έχουν πολύ ικανοποιητικές αποδόσεις. Είναι φανερό πως η απόδοση παραμένει ένας ισχυρός δείκτης στην περίπτωση των οργανικών συνθέσεων και ειδικότερα στις οργανικές συνθέσεις με υψηλή προστιθέμενη αξία (Παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων).

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε και αξιολογήθηκε τόσο η εκατοστιαία Οικονομία Ατόμου (**%AE**) όσο και η εκατοστιαία Πειραματική Οικονομία Ατόμου (**%EAE**). Αναλυτικότερα, στο κουμαρινικό ανάλογο **1a** υπάρχει 47.81% απόκλιση μεταξύ θεωρητικής και πειραματικής τιμής, ενώ στα κουμαρινικά ανάλογα **2a-2c** υπάρχει απόκλιση κατά προσέγγιση 7.59%. Ωστόσο, σε όλα τα δικουμαρινικά ανάλογα **3a-3n** υπάρχουν πολύ μικρότερες αποκλίσεις μεταξύ θεωρητικής και πειραματικής τιμής, από 0.002% έως 4.19%, ενώ στο δικουμαρινικό ανάλογο **3o**, παρουσιάζεται απόκλιση 22.77%, το οποίο πιθανώς υποδηλώνει τη δημιουργία παραπροϊόντος, όπως παρατηρείται και στη φασματοσκοπική μελέτη  $^1\text{H NMR}$ . Η οικονομία ατόμου στηρίζεται στη μεγιστοποίηση της ενσωμάτωσης της μάζας των ατόμων των αντιδρώντων στο τελικό προϊόν και την ελαχιστοποίηση των παραγόμενων αποβλήτων/ παραπροϊόντων. Με βάση τις θεωρητικές τιμές που υπολογίστηκαν φαίνεται πως όλα τα συντιθέμενα κουμαρινικά και δικουμαρινικά ανάλογα παρουσιάζουν υψηλή Οικονομία Ατόμου, με τα δικουμαρινικά ανάλογα να παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη. Το κουμαρινικό ανάλογο **2c** παρουσιάζει τη χαμηλότερη εκατοστιαία Οικονομία Ατόμου (68.09%), το οποίο αποδίδεται πιθανώς στο σχηματισμό μεγαλύτερης ποσότητας παραπροϊόντων. Τέλος, το δικουμαρινικό ανάλογο **3h** παρουσιάζει τη μεγαλύτερη εκατοστιαία Οικονομία Ατόμου (**%AE** και **%EAE**) με τιμή 97.22%, το οποίο αποδίδεται στη μεγαλύτερη ενσωμάτωση της μάζας των ατόμων των αντιδρώντων μέσα στο τελικό προϊόν. Η Οικονομία Ατόμου (**%AE**, **%EAE**) από μόνη της δεν παρέχει πλήρη εικόνα για την πράσινη προσέγγιση μιας συνθετικής πορείας, αλλά σε συνδυασμό με άλλους δείκτες μπορεί να αξιοποιηθεί και να αξιολογηθεί κατάλληλα.

Αναφορικά με την Αποδοτικότητα Μάζας Αντίδρασης (**%RME**) καθώς και την **% Απόδοση του Ανθρακα** που υπολογίστηκαν, είναι φανερό πως σαν δείκτες δε μπορούν να προσφέρουν επιπρόσθετες πληροφορίες για τη βελτίωση των συνθηκών της αντίδρασης. Όλα τα κουμαρινικά (**1a**, **2a-2c**) αλλά και ορισμένα δικουμαρινικά ανάλογα (**3a**, **3c**, **3j**, **3o**) εμφανίζουν πολύ χαμηλή αποδοτικότητα μάζας (**%RME**) με τιμές 12.05%, 27.35%, 33.77%, 32.79%, 32.09%, 35.53% και 23.07% αντίστοιχα, κάτι το οποίο δικαιολογείται άμεσα από τις αποδόσεις των εν λόγω συνθετικών πορειών. Άλλωστε, ο συγκεκριμένος δείκτης συσχετίζει την πραγματική παραχθείσα ποσότητα του προϊόντος και τη συνολική μάζα των αντιδρώντων. Τα υπόλοιπα δικουμαρινικά ανάλογα εμφανίζουν αξιόλογη **Παραγωγικότητα Μάζας** ή αλλιώς **Αποδοτικότητα Μάζας Αντίδρασης(%)**. Η Αποτελεσματική Απόδοση Μάζας (**%RME**) είναι ένας πάρα πολύ εύχρηστος και χρήσιμος δείκτης, καθώς συνδυάζει ποσοτικοποίηση δεδομένων που

αφορούν τόσο τη χημεία της αντίδρασης, όσο και και τη διεργασία που υφίσταται και παράλληλα προωθεί εναλλακτικές βιώσιμες πρακτικές με κριτήριο τη χρήση των υλικών και όχι την παραγωγή αποβλήτων

Η ένταση μάζας (**MI**) είναι ένας δείκτης που λαμβάνει υπόψιν την απόδοση της αντίδρασης, τη στοιχομετρία της, τους διαλύτες, όλα τα αντιδραστήρια και τις βοηθητικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση. Από τον υπολογισμό της συνολικής μάζας εξαιρείται μόνο το νερό, όπου αυτό έχει χρησιμοποιηθεί.<sup>82</sup> Έχει την ιδανική τιμή 1 όταν η συνολική εισαγόμενη μάζα ενσωματώνεται στο τελικό προϊόν, ενώ σε κάθε άλλη περίπτωση η τιμή είναι μεγαλύτερη. Τα κουμαρινικά ανάλογα **2a**, **2b** και **2c** εμφανίζουν την καλύτερη Ένταση Μάζας με τιμές  $7.20\text{g}_{\text{αντ}}/\text{g}_{\text{πρ}}$ ,  $5.37\text{g}_{\text{αντ}}/\text{g}_{\text{πρ}}$  και  $7.61\text{g}_{\text{αντ}}/\text{g}_{\text{πρ}}$  αντίστοιχα, καθώς η μεγαλύτερη συνολική μαζική εισροή ενσωματώνεται στο τελικό προϊόν. Η απόκλιση από την τιμή 1 έγκειται κυρίως στην περίσσεια ποσότητα του υδριδίου του νατρίου. Τα δικουμαρινικά ανάλογα **3f**, **3h** και **3i** εμφανίζουν τη μικρότερη τιμή Έντασης Μάζας με τιμές  $27.60\text{g}_{\text{αντ}}/\text{g}_{\text{πρ}}$ ,  $15.83\text{g}_{\text{αντ}}/\text{g}_{\text{πρ}}$  και  $15.10\text{g}_{\text{αντ}}/\text{g}_{\text{πρ}}$  αντίστοιχα, ενώ τα **3c** και **3o** εμφανίζουν τη μεγαλύτερη με τιμές  $45.78\text{g}_{\text{αντ}}/\text{g}_{\text{πρ}}$  και  $50.76\text{g}_{\text{αντ}}/\text{g}_{\text{πρ}}$ . Όλα τα δικουμαρινικά ανάλογα έχουν μεγάλη απόκλιση από την τιμή 1 πράγμα το οποίο οφείλεται ότι το DES χρησιμοποιείται ως καταλύτης/διαλύτης και δεν ενσωματώνεται στο τελικό προϊόν. Έτσι, είναι φανερό πως η Ένταση Μάζας (**MI**) είναι επίσης ένας δείκτης που από μόνος του δεν μπορεί να αξιολογηθεί ως προς τη βελτιστοποίηση των πράσινων μεθοδολογιών, αλλά μπορεί να αξιολογηθεί όταν υπολογιστούν και επιπρόσθετοι δείκτες.

Όσον αφορά τον δείκτη απόδοσης άνθρακα, αυτός χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του ποσοστού άνθρακα των αντιδρώντων που παραμένει στο τελικό προϊόν και βασίζεται καθαρά στον άνθρακα, χωρίς να μπορεί απαραίτητα να συγκριθεί με κάποιον άλλον δείκτη. Από τα συντιθέμενα κουμαρινικά ανάλογα, το **1a** εμφανίζει τη μικρότερη % απόδοση άνθρακα με τιμή 14.52%, το οποίο οφείλεται στην αναλογία των αντιδρώντων (1:3) στη συγκεκριμένη συνθετική πορεία. Τα δικουμαρινικά ανάλογα **3f**, **3h** και **3i** εμφανίζουν 100% απόδοση άνθρακα, δηλαδή όλοι οι άνθρακες των αντιδρώντων ενσωματώνονται στο τελικό προϊόν, πράγμα το οποίο δικαιολογείται και από τις υψηλές αποδόσεις των συγκεκριμένων συνθετικών πορειών, ενώ τα δικουμαρινικά ανάλογα **3a** και **3e** εμφανίζουν πολύ μικρή απόδοση άνθρακα με τιμές 2.03% και 9.74% αντίστοιχα.

Τέλος, για τα κουμαρινικά ανάλογα **2a-2c** υπολογίστηκε ένας επιπλέον δείκτης, η Αποτελεσματική Απόδοση Μάζας (**%EMY**) ο οποίος συνυπολογίζει τη μάζα των επικίνδυνων αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν. Η συνθετική πορεία των συγκεκριμένων κουμαρινικών αναλόγων απαιτεί την παρουσία υδριδίου του νατρίου (NaH) και τολουολίου, και έτσι τα αποτελέσματα που προκύπτουν παρουσιάζονται στον [Πίνακας 9](#). Και τα τρία κουμαρινικά ανάλογα **2a-2c** εμφανίζουν μικρή Αποτελεσματική Απόδοση Μάζας, ενώ το **2c** με τη χλωρο-υποκατάσταση παρουσιάζει τη μικρότερη.

Πίνακας 9. Υπολογισμός % Αποτελεσματικής Απόδοσης Μάζας

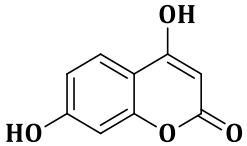
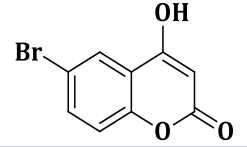
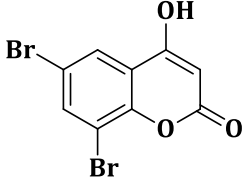
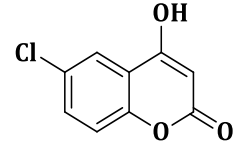
A/A	%EMY <sup>6</sup>
<b>2a</b>	28.22
<b>2b</b>	41.48
<b>2c</b>	25.22

#### 5.4. Αξιολόγηση της βιοδραστικότητας των νέων κουμαρινικών και δικουμαρινικών παραγώγων

##### 5.4.1. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των *in vitro* βιοδοκιμών αντιοξειδωτικής δράσης (DPPH, AAPH).

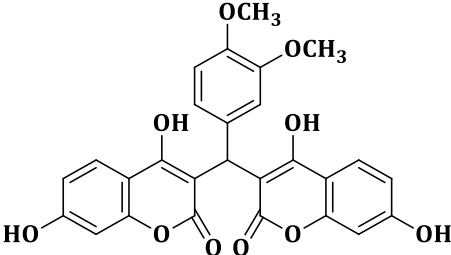
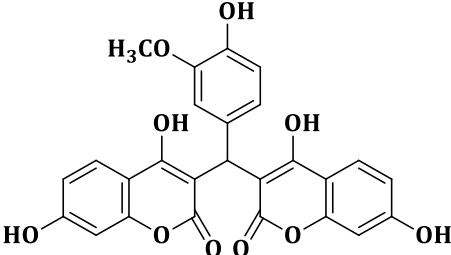
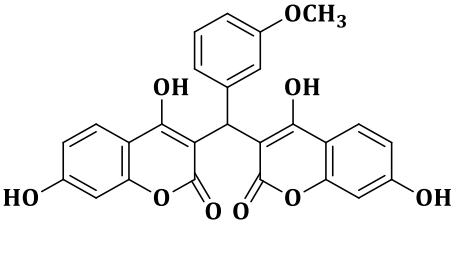
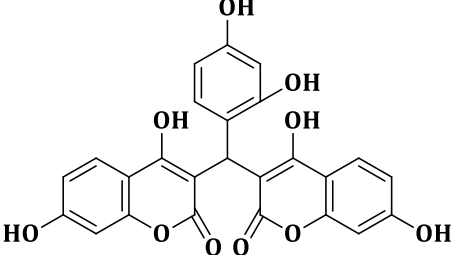
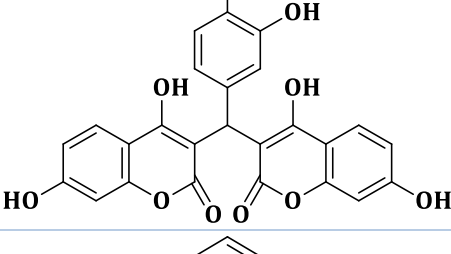
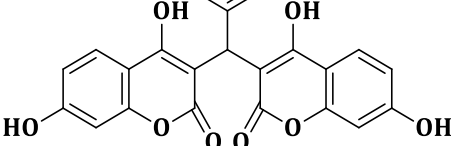
Πίνακας 10. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης (DPPH, AAPH) των νέων 4-υδροξου-κουμαρινικών αναλόγων

A/A	Δομή	Ικανότητα αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH	Ικανότητα αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH	Ικανότητα αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH	Ικανότητα αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH	Ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH)
		30min %100μM	60min %100μM	30min IC <sub>50</sub> (μM)	60min IC <sub>50</sub> (μM)	%100μM
<b>1a</b>		NA <sup>7</sup>	NA	-	-	100
<b>2a</b>		NA	NA	-	-	87.0 ±5.1
<b>2b</b>		NT <sup>8</sup>	NT	-	-	N.T.
<b>2c</b>		NA	NA	-	-	56.7 ±6.8

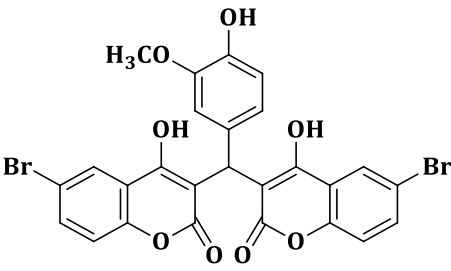
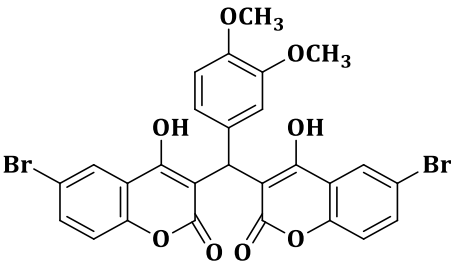
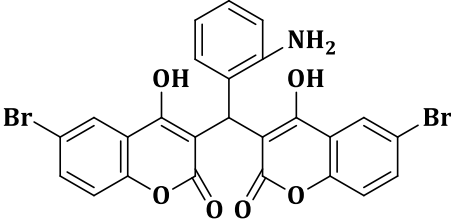
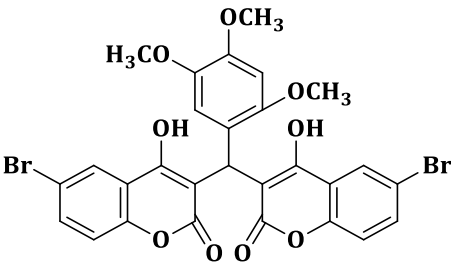
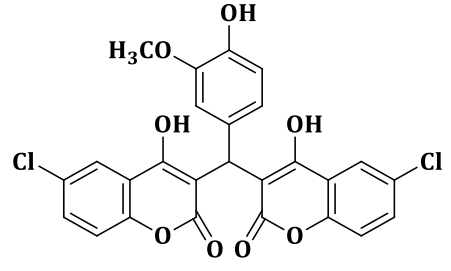
<sup>6</sup> **EMY**: Αποτελεσματική Απόδοση Μάζας (Effective Mass Yield)

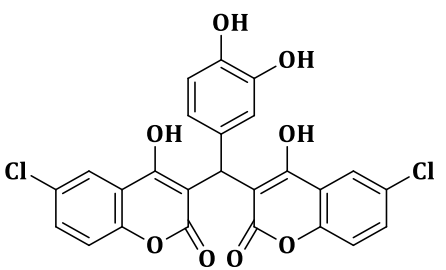
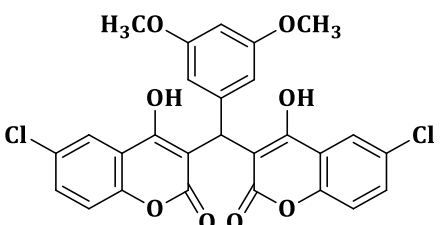
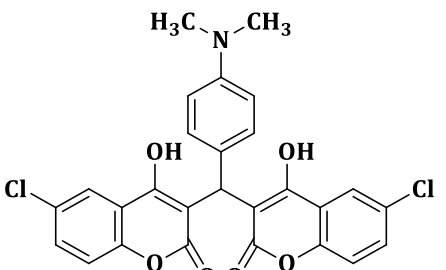
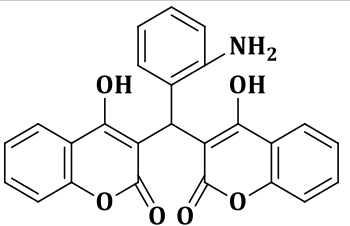
<sup>7</sup> NA: No Activity

<sup>8</sup> NT: Not Tested

3a		NA	NA	-	-	75.2 ±3.9
3b		41.7±1.8	62.6 ±3.9	-	51.6 ±3.1	91.9 ±2.3
3c		NT	NT	NT	NT	NT
3d		NA	NA	-	-	93.4 ±0.1
3e		NT	NT	NT	NT	NT
3f		NA	NA	-	-	66.9 ±7.1



3g		35.2 ±2.9	57.9 ±4.8	-	63.5 ±6.3	83.0 ±1.6
3h		NA	NA	-	-	95.1 ±1.7
3i		NT	NT	NT	NT	NT
3j		NT	NT	NT	NT	NT
3k		55.2 ±8.4	73.9 ±8.2	59.16 ±3.8	37.0 ±3.6	92.1 ±2.6

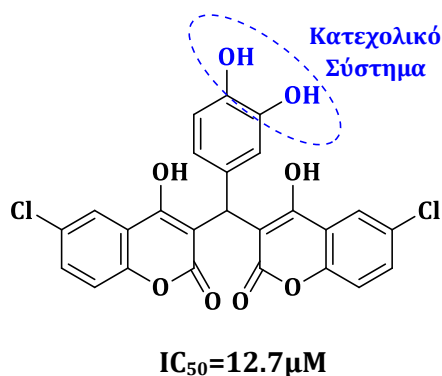
3l		53.3 ±4.9	68.1 ±1.1	71.9 ±1.3	12.7 ±0.07	82.2 ±0.2
3m		NT	NT	NT	NT	NT
3n		27.4 ±1.4	32.6 ±1.8	-	-	95.2 ±1.9
3o		NA	NA	-	-	42.8 ±8.2
-	Trolox	82.8	92.3	-	12	81.4
-	Vitamin C	-	-	-	-	75.1

#### 5.4.1.1. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης DPPH

Έπειτα από μελέτη και ανάλυση των αποτελεσμάτων, παρατηρείται ότι κανένα από τα κουμαρινικά παράγωγα (**1a-2c**), τα οποία διαθέτουν υδροξυ- ή/και βρωμο- και χλωρο-υποκαταστάτες στον κουμαρινικό σκελετό, δεν παρουσιάζει ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH. Συγκεκριμένα, η **1a** αν και διαθέτει δύο υδροξύλια στον κουμαρινικό σκελετό της, αυτά δεν είναι σε ορθο-υποκαταστάσεις με αποτέλεσμα να εμφανίζει ελάχιστη ή και ανύπαρκτη αντιοξειδωτική δράση. Οι κουμαρίνες **2a-2c** διαθέτουν μια μόνο υδροξυλομάδα στον κουμαρινικό σκελετό τους και για το λόγο αυτό έχουν είτε χαμηλή αντιοξειδωτική είτε καθόλου δράση, καθώς η παρουσία μόνο μιας ελεύθερης φαινολικής υδροξυλομάδας δεν ευνοεί τη συγκεκριμένη δράση. Επιπρόσθετα, τα αλογόνα που εμπεριέχονται στον κουμαρινικό σκελετό δεν ευνοούν την αναστολή της ελεύθερης ρίζας DPPH.

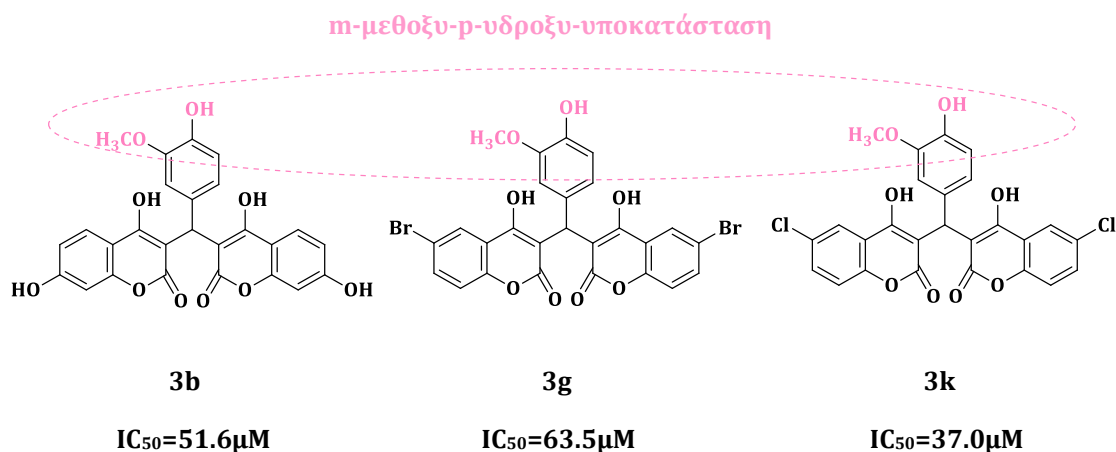
Όσον αφορά τα δικουμαρινικά ανάλογα (**3a-3o**) που εξετάστηκαν, αυτά είχαν διαφορετικές υποκαταστάσεις τόσο στον κουμαρινικό σκελετό όσο και στον φαινολικό δακτύλιο της θέσης 1". Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την ύπαρξη ενώσεων με μικρή ή και καθόλου αντιοξειδωτική δράση (**3a, 3d, 3f, 3h, 3n, 3o**), καθώς και τη σύνθεση αξιόλογων αναστολέων της ελεύθερης ρίζας DPPH (**3b, 3g, 3k & 3l**).

Οι τιμές  $IC_{50}$  για τα 60min κυμαίνονται από 12.7-63.5 $\mu$ M και συγκρίνονται με την τιμή  $IC_{50}=12\mu$ M του Trolox, το οποίο αποτελεί την ένωση αναφοράς με εξαιρετική αντιοξειδωτική δράση. Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε ότι η 3,3'-(3,4-υδροξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνη) (**3l**) επέδειξε την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση, καθώς η τιμή του  $IC_{50} = 12.7\mu$ M είναι πολύ κοντά με την τιμή του  $IC_{50}=12\mu$ M του Trolox (Εικόνα 57). Αυτό οφείλεται στην παρουσία του κατεχολικού συστήματος, δηλαδή στην παρουσία της ορθο-διυδροξυ-υποκατάστασης στο φαινολικό δακτύλιο, καθώς αυτό το σύστημα ενισχύει σημαντικά την αντιοξειδωτική δράση. Το κατεχολικό σύστημα έχει αναγνωριστεί ως μια απαραίτητη προϋπόθεση ύπαρξης αντιοξειδωτικής δράσης σε κάθε μόριο προς εξέταση, είτε είναι φλαβονοειδές είτε είναι κουμαρίνη.<sup>87</sup>



Εικόνα 57. Χημική δομή της 3l

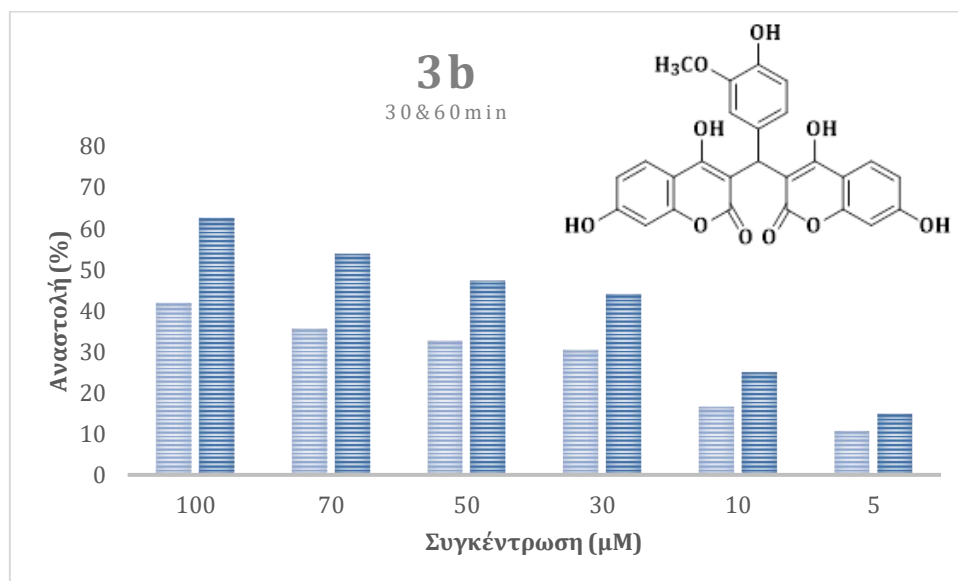
Επιπρόσθετα, σημαντική παρατήρηση αποτελεί ότι οι ενώσεις **3b, 3g** και **3k** (Εικόνα 58), οι οποίες διαθέτουν m-μεθοξυ-p-υδροξυ-υποκατάσταση στο φαινολικό δακτύλιο της θέσης 1" εμφανίζουν επίσης αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση με τιμές  $IC_{50}= 51.6\mu$ M , 63.5 $\mu$ M και 37.0 $\mu$ M αντίστοιχα.



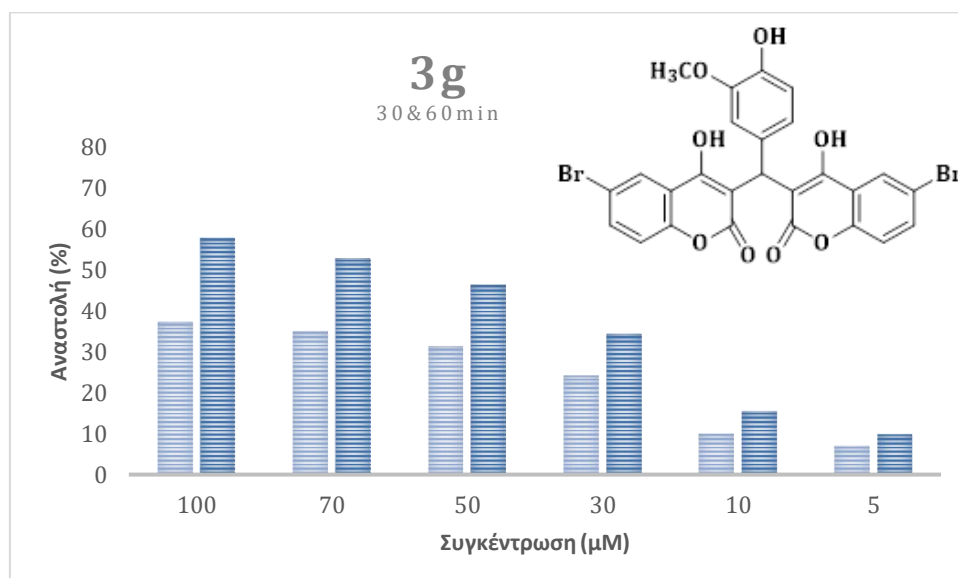
Εικόνα 58. Χημική δομή δικουμαρινικών αναλόγων 3b, 3g και 3k

Συμπεραίνεται ότι η αντιοξειδωτική δράση των νέων δικουμαρινικών αναλόγων όπως αυτή εκφράζεται μέσω της δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH ευνοείται σημαντικά από την παρουσία μεθοξυ και υδροξυ-ομάδων σε ορθο—θέση μεταξύ τους και ακόμη περισσότερο από την ορθο-διυδροξυ-υποκατάσταση στο φαινυλικό δακτύλιο της θέσης 1”.

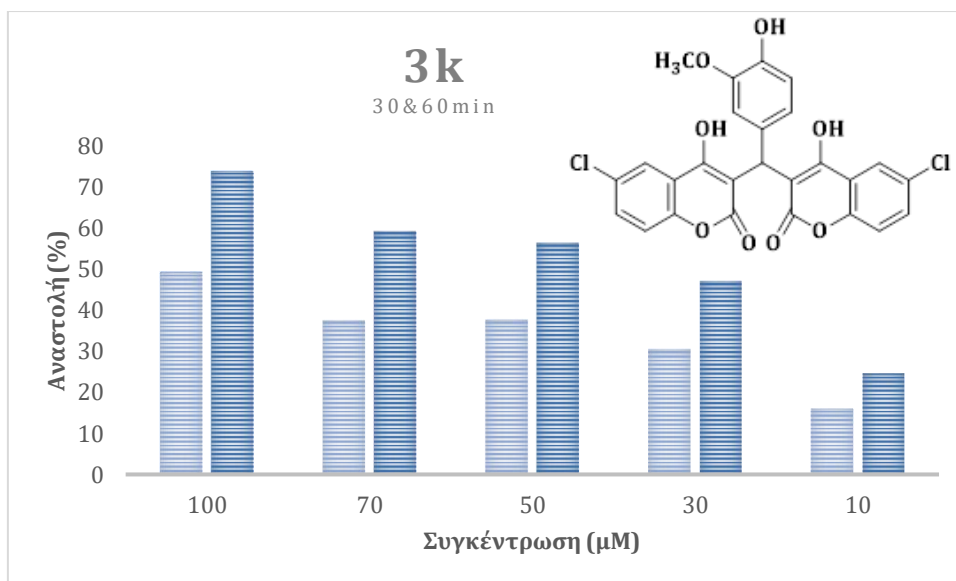
Παρακάτω, στα διαγράμματα 3-6 (Διάγραμμα 3, Διάγραμμα 4, Διάγραμμα 5, Διάγραμμα 6) παρουσιάζεται η αναστολή της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH (%) στα 30 και 60min των ενώσεων για κάθε συγκέντρωση που μελετήθηκε, δηλαδή για συγκεντρώσεις 100, 70, 50, 30, 10 και 5μΜ.



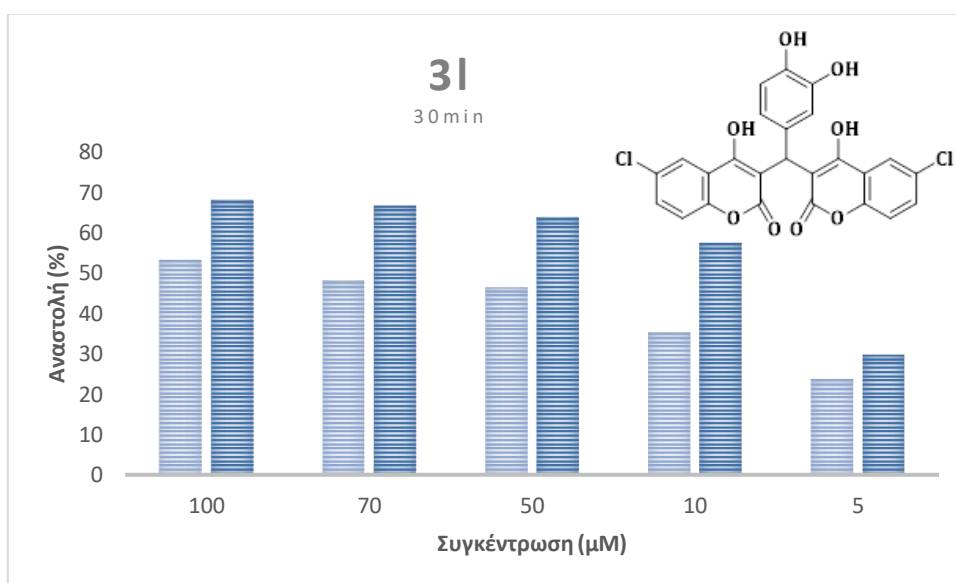
Διάγραμμα 3. %Αναστολή της 3b στα 30 & 60min



Διάγραμμα 4. %Αναστολή της 3g στα 30 & 60min



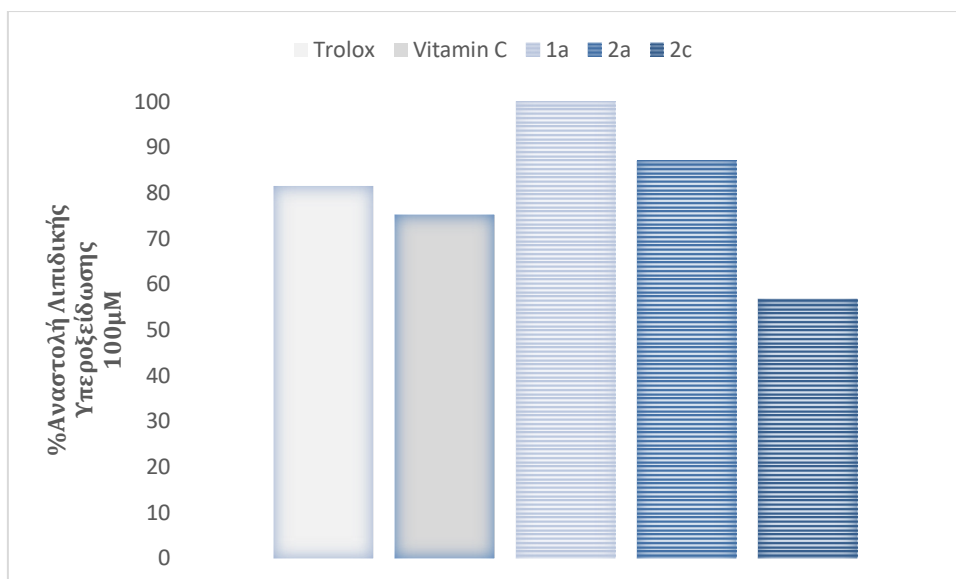
**Διάγραμμα 5. %Αναστολή της 3k στα 30 & 60min**



**Διάγραμμα 6. %Αναστολή της 3l στα 30 & 60min**

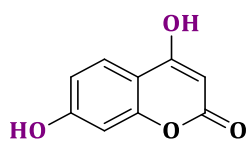
#### 5.4.1.2. Αξιολόγηση της αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (AAPH)

Από όλα τα νέα κουμαρινικά και δικουμαρινικά ανάλογα που εξετάστηκαν, είναι φανερό πως η πλειονότητά τους εμφανίζει εξαιρετική αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης (LP) που επάγεται από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών 2,2'-αζωδις(2-αμιδινοπροπανίου)διϋδροχλωρίδιο, AAPH (Πίνακας 10). Στα [Διάγραμμα 7](#) και [Διάγραμμα 8](#) παρουσιάζονται τα ποσοστά αναστολής των κουμαρινικών και δικουμαρινικών αναλόγων αντίστοιχα.



**Διάγραμμα 7. Ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης των εξεταζόμενων κουμαρινικών αναλόγων**

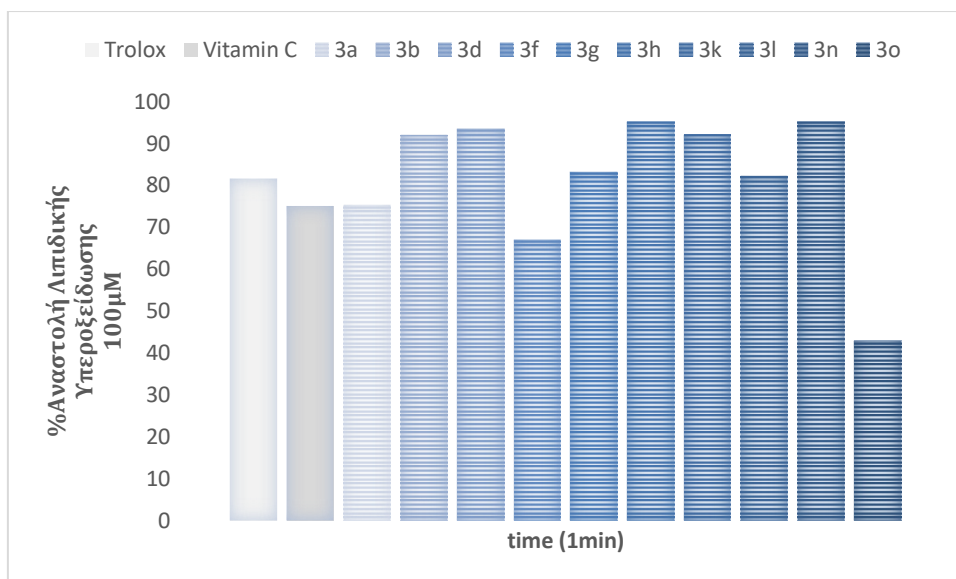
Το κουμαρινικό ανάλογο **1a** (Εικόνα 59) επέδειξε την καλύτερη ανασταλτική δράση, με ποσοστό αναστολής 100%, ενώ οι ενώσεις αναφοράς Trolox και Ασκορβικό Οξύ (Vitamin C) παρουσιάζουν αναστολή με τιμές 81.4% και 75.1% αντίστοιχα. Επίσης, τα άλλα δύο εξεταζόμενα κουμαρινικά ανάλογα **2a** και **2c** παρουσιάζουν αναστολή 87.0% και 56.7%. Η παρουσία φαινολικών υδροξυλίων στις θέσεις 4 και 7 του κουμαρινικού σκελετού φαίνεται πως ενισχύει σημαντικά την αντιοξειδωτική τους δράση, ενώ η παρουσία ενός μόνο φαινολικού υδροξυλίου και ενός αλογόνου στη θέση 6 του κουμαρινικού σκελετού μειώνουν την ανασταλτική δράση. Ειδικότερα, η Cl-υποκατάσταση (**2c**) μειώνει τη δράση κατά 43.3% ενώ η Br-υποκατάσταση μειώνει τη δράση κατά 12.9% (**2a**). Συγκεκριμένα, ο μηχανισμός της λιπιδικής υπεροξειδωσης περιλαμβάνει την αλυσιδωτή αντίδραση, η οποία ξεκινά με τη δράση των ριζών υδροξυλίου ( $\text{OH}\cdot$ ) που προσβάλλουν τη μεθυλενική ομάδα του λινελαϊκού οξέος. Έτσι, όσα περισσότερα φαινολικά υδροξύλια υπάρχουν στο σκελετό μιας οργανικής ένωσης, τόσο μεγαλύτερη ανασταλτική δράση της λιπιδικής υπεροξειδωσης θα έχει.<sup>96</sup>



**1a**

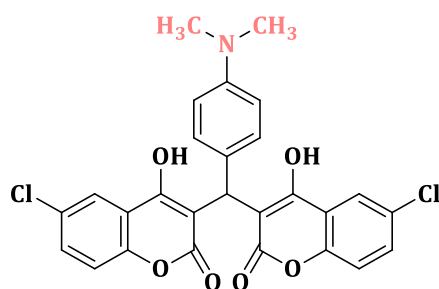
**100% Αναστολή LP**

**Εικόνα 59. Χημική δομή ένωσης 1a**



**Διάγραμμα 8. Ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης των εξεταζόμενων δικουμαρινικών αναλόγων**

Τα δικουμαρινικά ανάλογα που εξετάστηκαν επέδειξαν στην πλειονότητά τους εξαιρετική ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης (LP) και πιο συγκεκριμένα το δικουμαρινικό ανάλογο **3n** (Εικόνα 60) επέδειξε τη μεγαλύτερη δράση με αναστολή 95.2%, ενώ το δικουμαρινικό ανάλογο **3o** επέδειξε τη μικρότερη δράση, με αναστολή 42.8%. Το δικουμαρινικό ανάλογο **3a** παρουσιάζει ίδια αναστολή με τη Βιταμίνη C, ίση με' ενώ το **3f** παρουσιάζει σχετικά χαμηλή δράση, με αναστολή 66.9%. Τα υπόλοιπα δικουμαρινικά ανάλογα **3b**, **3d**, **3g**, **3h**, **3k** και **3l** παρουσιάζουν ισχυρή ανασταλτική δράση με ποσοστά 91.9%, 93.4%, 83.0%, 95.1%, 92.1% και 82.2% αντίστοιχα. Φαίνεται πως η λιπόφιλη παρα-υποκατάσταση στο φαινολικό δακτύλιο της θέσης 1' ενισχύει δραστικά την ανασταλτική δράση κατά της λιπιδικής υπεροξειδωσης.

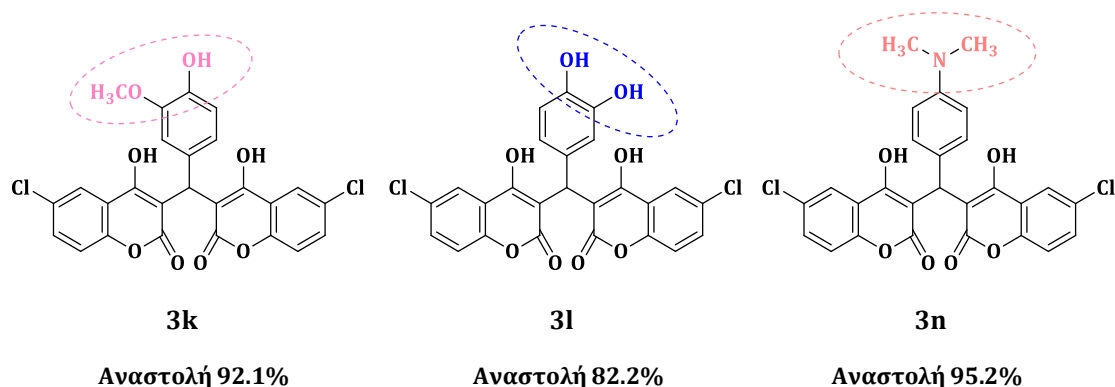


**95.2% αναστολή LP**

**Εικόνα 60. Χημική δομή της 3n**

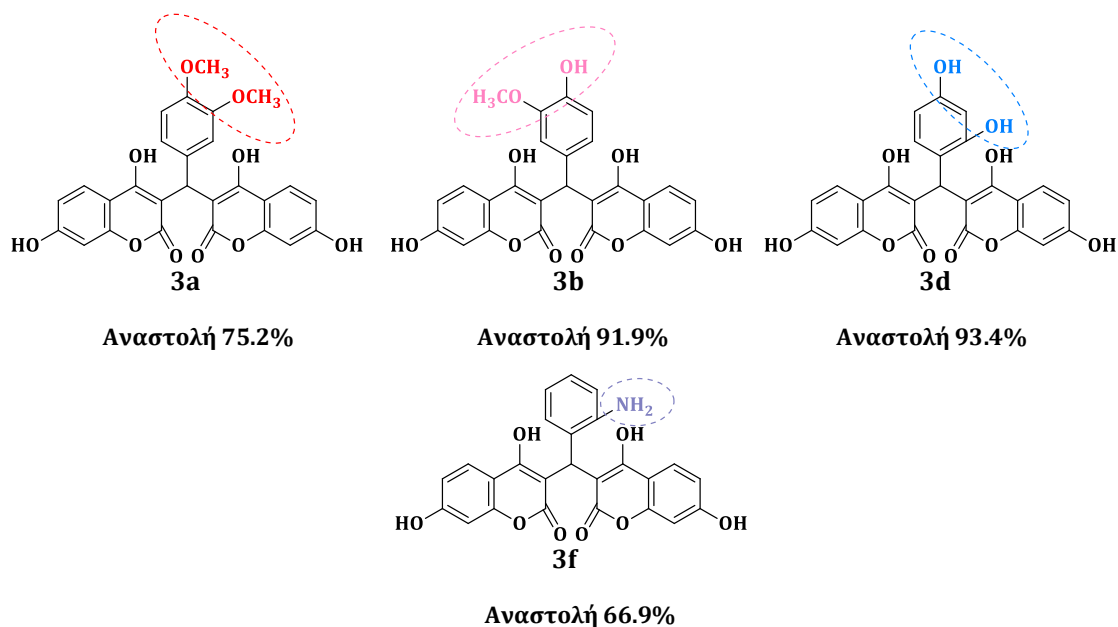
Συγκεκριμένα, συγκρίνονται, αρχικά, τα μόρια **3k**, **3l** και **3n** (Εικόνα 61) μεταξύ τους, καθώς είναι συντιθέμενα από το κουμαρινικό παράγωγο **2c** και περιέχουν υδροξυ- και χλωρο- υποκαταστάτες στον κουμαρινικό σκελετό. Παρατηρείται ότι τόσο η ορθο-μεθοξυ-υδροξυ- όσο και η ορθο-διυδροξυ-υποκατατάσταση στο φαινολικό δακτύλιο της θέσης 1' προκαλούν αξιόλογη ανασταλτική δράση, το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με την αντιοξειδωτική δράση που βασίζεται στην αναστολή της ελεύθερης ρίζας DPPH.

Ωστόσο, η παρα-διμεθυλ-αμινο-υποκατάσταση φαίνεται να ευνοεί ακόμα περισσότερο τη δράση αυτή.



Εικόνα 61. Χημική δομή δικουμαρινικών αναλόγων 3k, 3l και 3n

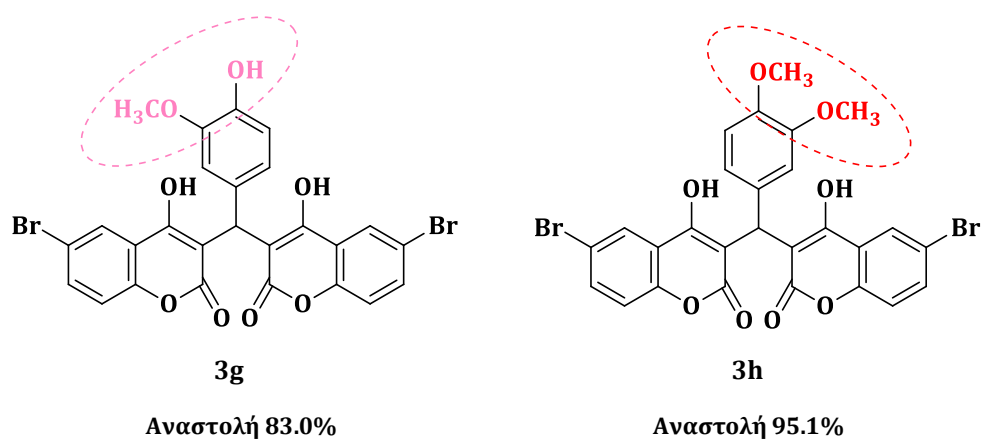
Στη συνέχεια, συγκρίνονται τα δικουμαρινικά ανάλογα **3a**, **3b**, **3d** και **3f** (Εικόνα 62) τα οποία είναι συντιθέμενα από το κουμαρινικό παράγωγο **1a**, το οποίο μάλιστα παρουσιάζει 100% αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Η μετα-διυδροξυ υποκατάσταση, σε αντίθεση με τη μέθοδο DPPH, ενισχύει δραστικά την αντιοξειδωτική δράση με τη μέθοδο AAPH (93.4%), ενώ και στη συγκεκριμένη περίπτωση, η ύπαρξη της m-μεθοξυ-p-υδροξυ-υποκατάστασης ενισχύει σημαντικά την ανασταλτική δράση με μόλις 0.2% διαφορά από το δικουμαρινικό ανάλογο **3k**. Η ορθο-διμεθοξυ-υποκατάσταση (**3a**) αναστέλλει τη λιπιδική υπεροξειδωση σε ικανοποιητικό ποσοστό (75.2%), ενώ η ύπαρξη μιας αμινομάδας (**3f**) μειώνει την ανασταλτική δράση (**3f**).



Εικόνα 62. Χημική δομή δικουμαρινικών αναλόγων 3a, 3b, 3d και 3f



Τέλος, συγκρίνονται μεταξύ τους και τα δικουμαρινικά ανάλογα **3g** και **3h** (Εικόνα 63), τα οποία έχουν συντεθεί από το κουμαρινικό παράγωγο **2a** και περιέχουν υδροξυ- και βρωμο- υποκαταστάτες στον κουμαρινικό σκελετό. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, αντίθετα με το μόριο **3a**, η ορθο-διμεθοξυ-υποκατάσταση στο φαινολικό δακτύλιο της θέσης 1'' ενισχύει δραστικά την αντιοξειδωτική δράση (95.1%), όταν στον κουμαρινικό σκελετό υπάρχει αλογόνο στις θέσεις 6 και 6' (**3h**). Τέλος, η m-μεθοξυ-p-υδροξυ-υποκατάσταση στο φαινολικό δακτύλιο της θέσης 1'' ενισχύει επίσης σημαντικά την αντιοξειδωτική δράση αλλά όχι τόσο πολύ όσο η ορθο-διμεθοξυ-υποκατάσταση.



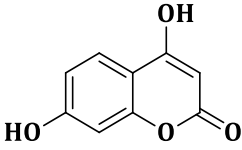
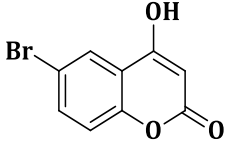
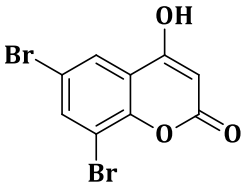
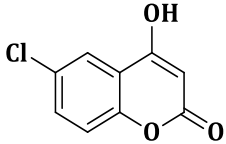
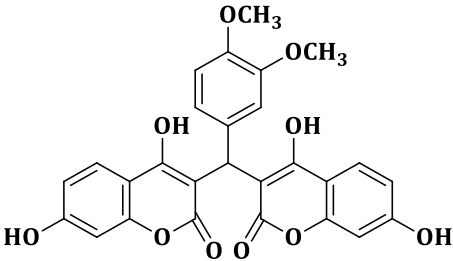
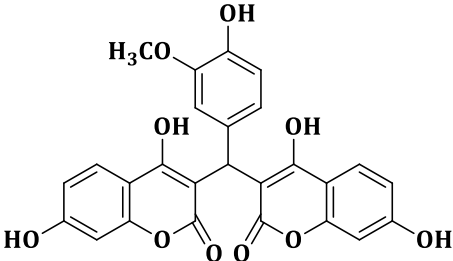
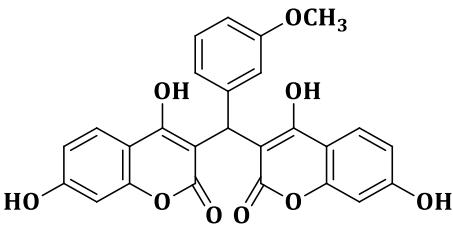
Εικόνα 63. Χημική δομή δικουμαρινικών μορίων **3g** και **3h**

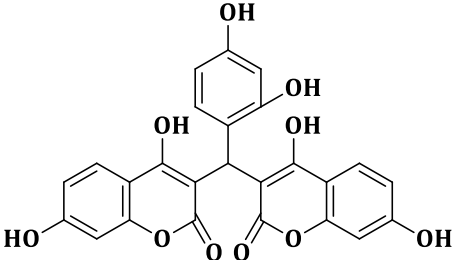
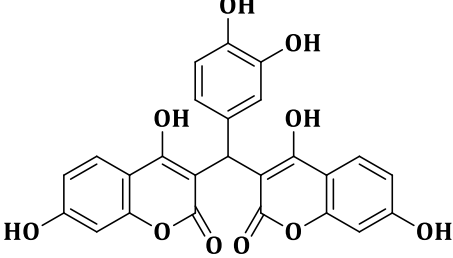
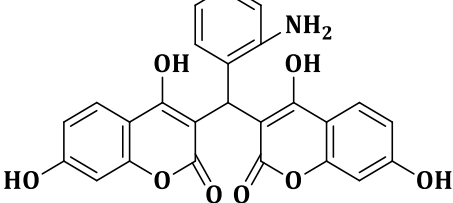
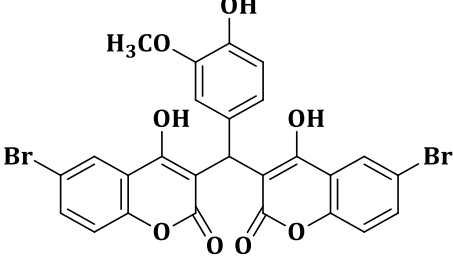
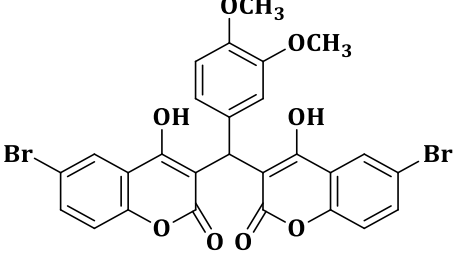
## 5.5. Αξιολόγηση αναστολής του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράσης

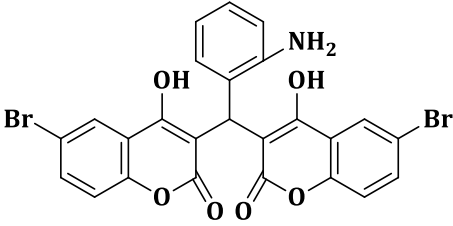
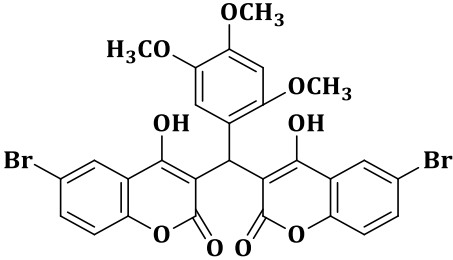
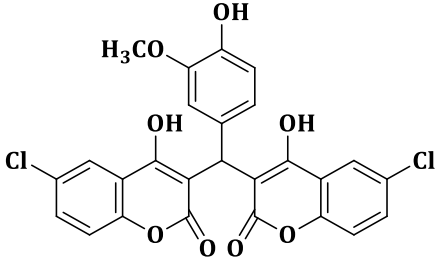
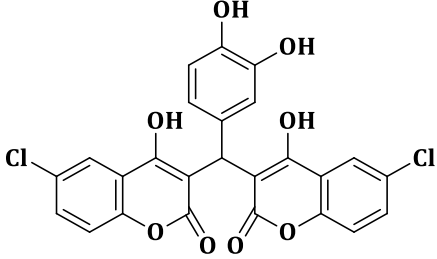
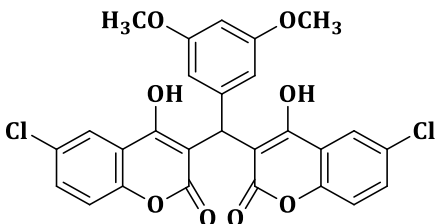
### 5.5.1. Αποτελέσματα PharmMapper

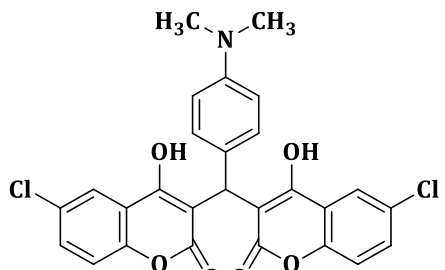
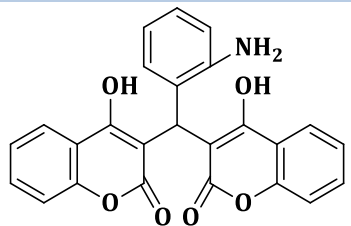
Για την περαιτέρω αξιολόγηση της βιολογικής δράσης των νέων κουμαρινικών και δικουμαρινικών αναλόγων, προσδιορίστηκαν πιθανοί πρωτεϊνικοί στόχοι μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας «PharmMapper», η οποία εξετάζει την προσαρμογή των φαρμακοφόρων ομάδων των συντιθέμενων κουμαρινικών αναλόγων στις φαρμακοφόρες ομάδες των. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ως πιθανός στόχος το ένζυμο της ακετυλοχολινεστεράσης το οποίο εμφανίστηκε στις θέσεις 7-70 ανάμεσα σε 300 πιθανούς στόχους με fit score μεταξύ 2.575-2.953. Η **δονεπεζίλη**, η **ριβαστιγμίνη** και η **γαλανταμίνη** που αποτελούν φαρμακευτικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της νόσου Αλτσχάιμερ εμφανίστηκαν στις θέσεις 25, 22 και 7 με fit score 2.798, 2.213 και 2.941 αντίστοιχα. Στον Πίνακα 11 εμφανίζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την πλατφόρμα, με τα δικουμαρινικά ανάλογα να είναι αυτά για τα οποία προτείνεται το ένζυμο της ακετυλοχολινεστεράσης ως πιθανός πρωτεϊνικός στόχος. Τα δικουμαρινικά ανάλογα εμφανίζουν. Συγκεκριμένα, τα δικουμαρινικά ανάλογα **3a**, **3f**, **3l** και **3m** παρουσίασαν τα υψηλότερα fit score **2.953**, **2.946**, **2.925** και **2.926**, αντίστοιχα.

Πίνακας 11. Αποτελέσματα πλατφόρμας "PharmMapper" ως προς το ένζυμο της ακετυλοχολινεστεράσης

A/A	Δομή	Fit Score	Rank	No of features
1a		-	-	-
2a		-	-	-
2b		-	-	-
2c		-	-	-
3a		2.953	7	3
3b		2.892	23	3
3c		2.818	27	3

3d		2.865	24	3
3e		2.818	37	3
3f		2.946	7	3
3g		2.878	13	3
3h		2.792	40	3

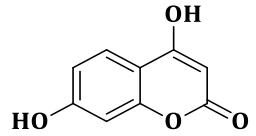
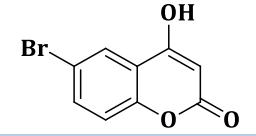
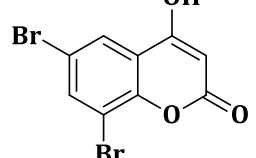
3i		2.894	16	3
3j		2.575	70	3
3k		2.889	16	3
3l		2.925	10	3
3m		2.926	10	3

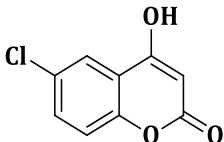
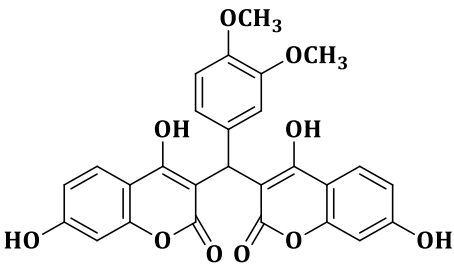
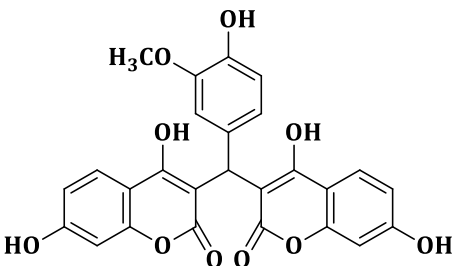
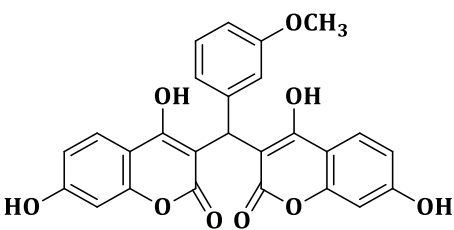
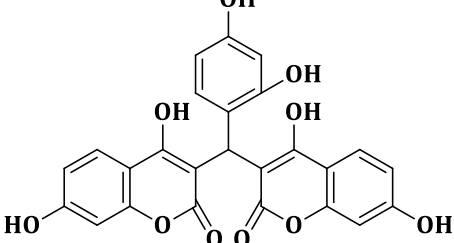
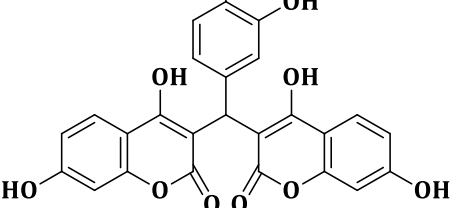
3n		2.728	51	3
3o		2.693	46	3
-	<b>Donepezil</b>	<b>2.798</b>	<b>25</b>	<b>3</b>
-	<b>Rivastigmine</b>	<b>2.213</b>	<b>22</b>	<b>3</b>
-	<b>Galantamine</b>	<b>2.941</b>	<b>7</b>	<b>3</b>

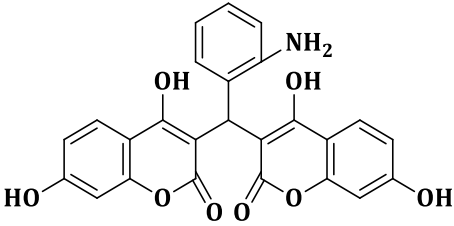
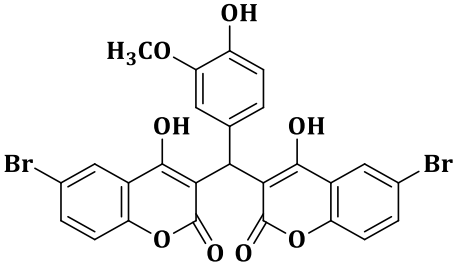
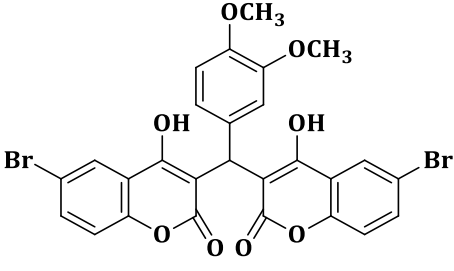
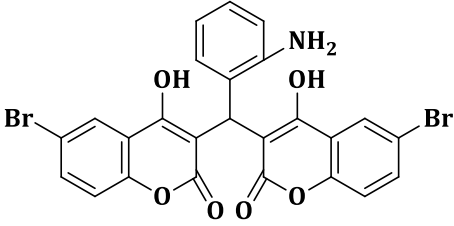
### 5.5.2. Προσδιορισμός της αναστολής του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση

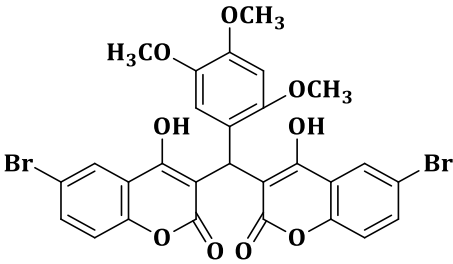
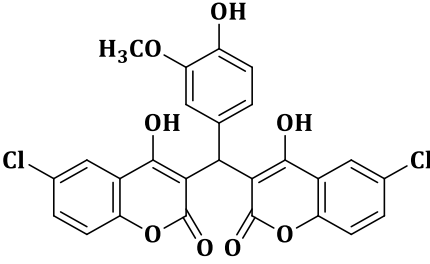
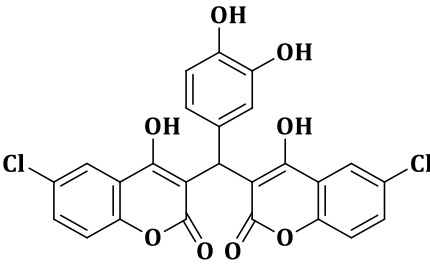
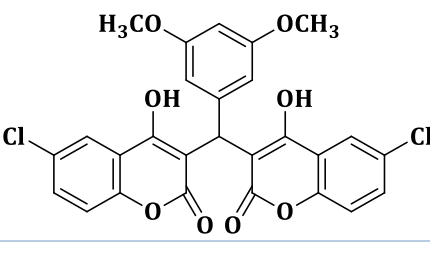
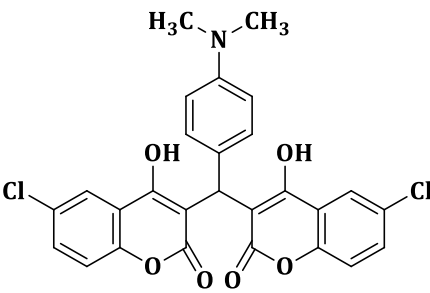
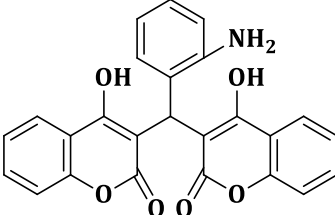
Με βάση τα αποτελέσματα της πλατφόρμας “PharmMapper”, τα νέα κουμαρινικά και δικουμαρινικά ανάλογα που συντέθηκαν εξετάστηκαν για την ικανότητα αναστολής του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση. Τα αποτελέσματα, που προέκυψαν, παρουσιάζονται στον Πίνακα 12.

**Πίνακας 12. Ικανότητα αναστολής του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (% 100μM) και υπολογισμός IC<sub>50</sub> (μM)**

A/A	Δομή	Ικανότητα αναστολής του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (AChE) %100μM	AChE IC <sub>50</sub> (μM)
1a		NA	-
2a		NA	-
2b		NA	-

2c		NA	-
3a		22.8	-
3b		NA	-
3c		NT	NT
3d		NA	-
3e		NT	NT

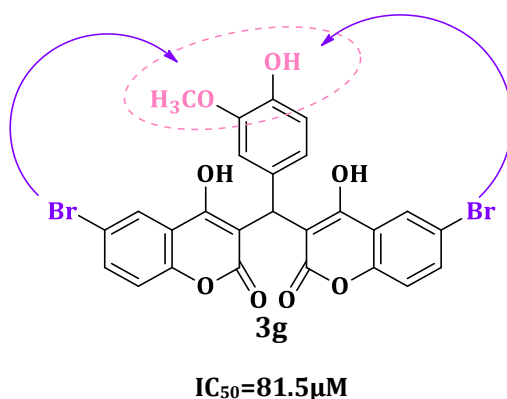
3f		NT	NT
3g		64.96	81.5
3h		29.26	-
3i		NT	NT
3j		NT	NT

			
3k		26.30	-
3l		43.48	113.8
3m		NT	NT
3n		37.1	104
3o		35.1	-
-	<b>Galantamine</b>	-	0.88



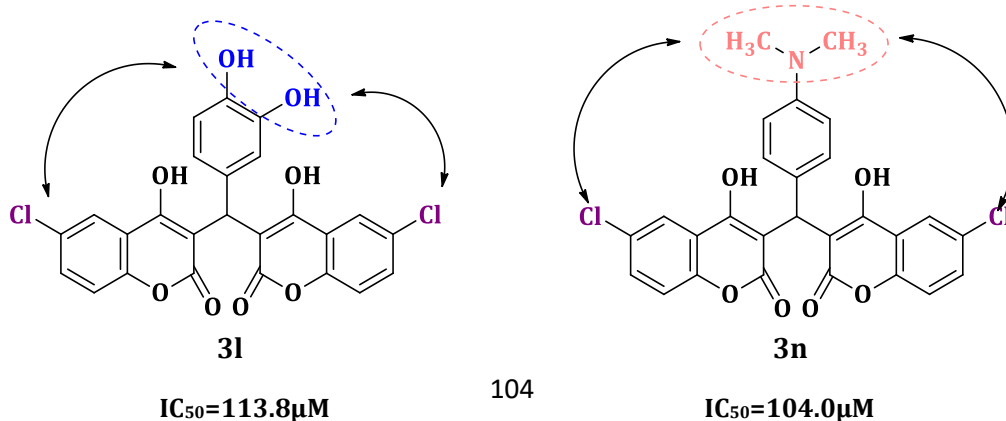
Από όσα μόρια εξετάστηκαν, τα κουμαρινικά αλλά και ορισμένα δικουμαρινικά ανάλογα δεν παρουσίασαν καμία ανασταλτική δράση, πράγμα το οποίο πιθανώς οφείλεται στην απλή δομή τους και στη μη ύπαρξη κάποιου καταλυτικού συνδέσμου στον κουμαρινικό σκελετό.<sup>36</sup>

Το μόριο με τη μεγαλύτερη ανασταλτική δράση του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση είναι το δικουμαρινικό ανάλογο **3g** με  $IC_{50}=81.5\mu M$  (Εικόνα 64). Η m-μεθοξυ-p-υδροξυ-υποκατάσταση στο φαινολικό δακτύλιο της θέσης 1' σε συνδυασμό με τη βρωμο-υποκατάσταση στις θέσεις 6 και 6' του κουμαρινικού σκελετού φαίνεται να ενισχύει την ανασταλτική δράση του ενζύμου.



Εικόνα 64. Χημική δομή του δικουμαρινικού αναλόγου **3g**

Τα υπόλοιπα δικουμαρινικά ανάλογα που παρουσίασαν ανασταλτική δράση του ενζύμου AChE είναι τα δικουμαρινικά ανάλογα **3l** και **3n** με  $IC_{50}=113.8\mu M$  και  $IC_{50}=104.0\mu M$  αντίστοιχα (Εικόνα 65), ενώ τα δικουμαρινικά ανάλογα **3a**, **3h**, **3k** και **3o** παρουσιάζουν πολύ μικρή % αναστολή. Συγκεκριμένα, τόσο η ορθο-διυδροξυ-υποκατάσταση όσο και η παρα-διμεθυλ-αμινο-υποκατάσταση στο φαινολικό δακτύλιο της θέσης 1' σε συνδυασμό με τη χλωρο-υποκατάσταση στις θέσεις 6 και 6' του κουμαρινικού σκελετού βοηθά στην εμφάνιση ανασταλτικής δράσης του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση. Όλα τα υπόλοιπα κουμαρινικά ανάλογα, και κυρίως όλα τα παράγωγα που συντέθηκαν με την 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνη (**1a**) δεν επέδειξαν καμία δράση στην αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η παρουσία αλογόνου στον κουμαρινικό σκελετό ευνοεί τη δράση σε σχέση με την υποκατάσταση με ομάδες υδροξυλίου

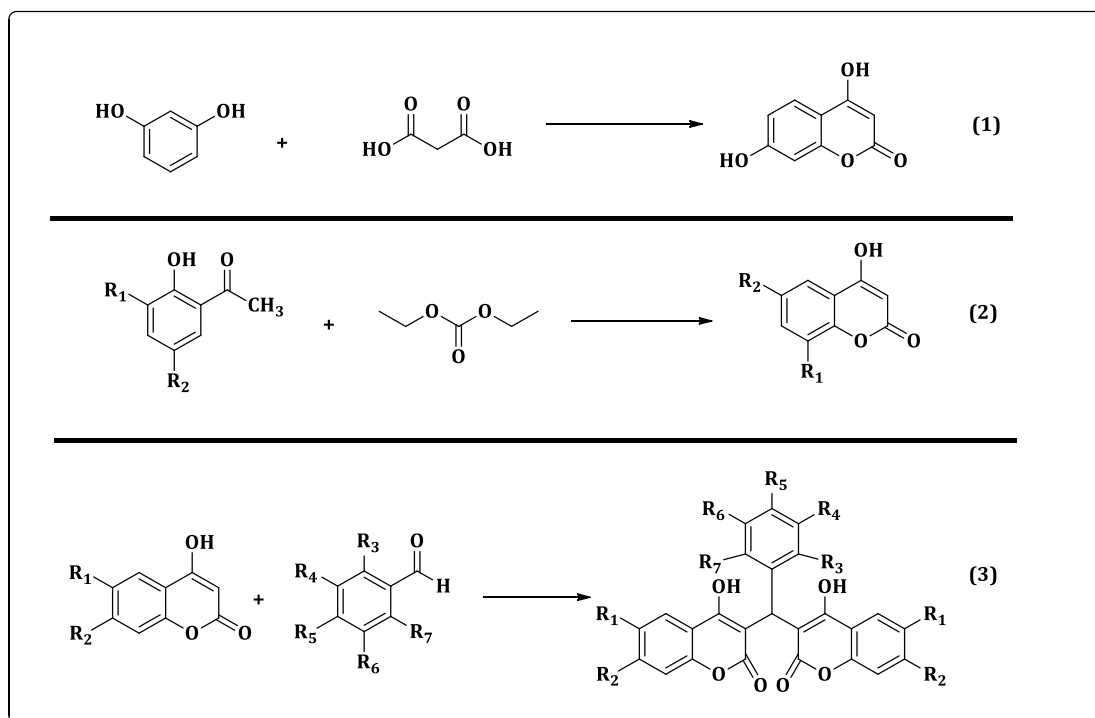


### Εικόνα 65. Χημική δομή δικουμαρινικών αναλόγων 3I και 3n

#### Συμπεράσματα

Η κουμαρίνη και τα φυσικά ή συνθετικά ανάλογά της έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα τα τελευταία χρόνια, καθώς έχουν επιδείξει ποικίλες βιολογικές δράσεις όπως είναι η αντιοξειδωτική, η αντιφλεγμονώδης και η αντικαρκινική δράση. Ωστόσο, το τελευταίο χρονικό διάστημα η έρευνα έχει στραφεί και στα δικουμαρινικά ανάλογα, τα οποία παρουσιάζουν εξίσου αξιόλογες βιολογικές δράσεις. Παράλληλα, η αναγκαιότητα για μείωση ή εξάλειψη των βλαβερών επιπτώσεων στο περιβάλλον, καθιστά αναγκαία τη χρήση «πράσινων» διαλυτών στον κλάδο της Οργανικής Χημείας με αποτέλεσμα την προσπάθεια χρήσης πιο φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων σύνθεσης οργανικών ενώσεων.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός δεκαεννέα νέων κουμαρινικών και δικουμαρινικών αναλόγων, τα οποία ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού  $^1\text{H NMR}$ . Αρχικά, συντέθηκαν τέσσερα 4-υδροξυ-κουμαρινικά ανάλογα σε ικανοποιητικές αποδόσεις από 45% έως 78%, τα οποία στη συνέχεια αποτέλεσαν αντιδρώντα στη σύνθεση νέων διαφορετικά υποκατεστημένων στο φαινυλικό δακτύλιο δικουμαρινικών αναλόγων μέσω αντίδρασης Knoevenagel και προσθήκης Michael σε αποδόσεις από 35% έως 95%.



**Εικόνα 66. Σχηματικές πορείες σύνθεσης κουμαρινικών (1 & 2) και δικουμαρινικών αναλόγων (3)**

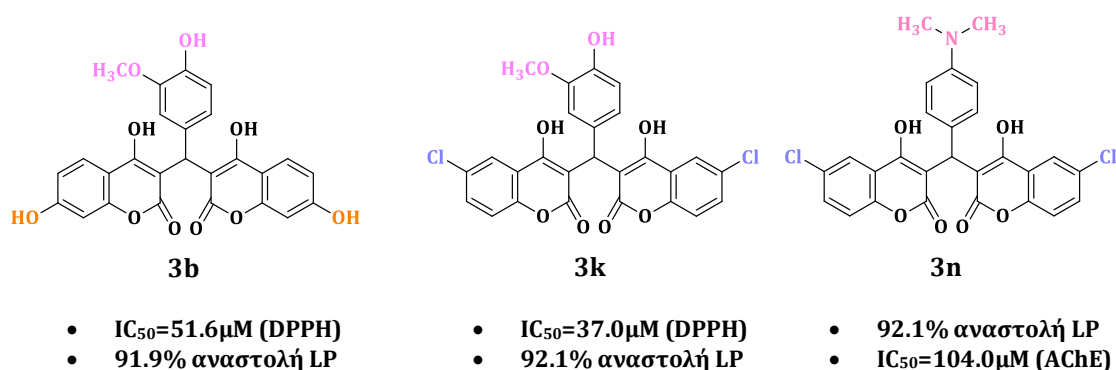
Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν δύο πορείες σύνθεσης της 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης (**1a**) με τη χρήση συμπλόκου τριφθοριούχου βορίου-διαιθυλαιθέρα (1<sup>η</sup> πορεία σύνθεσης) με απόδοση 78.4% και με τη χρήση οξυχλωριούχου φωσφόρου (2<sup>η</sup> πορεία σύνθεσης) με απόδοση 50.1%. Επιλέχτηκε η πρώτη πορεία σύνθεσης τόσο λόγω της υψηλότερης απόδοσης όσο και λόγω του  $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$  ως πιο φιλικός προς το περιβάλλον διαλύτης. Στη συνέχεια, συντέθηκαν τα κουμαρινικά ανάλογα **2a-2c** σε αποδόσεις 45-50%, τα οποία μαζί με το κουμαρινικό ανάλογο **1a** αποτέλεσαν αντιδρώντα για τη σύνθεση των νέων δικουμαρινικών αναλόγων **3a-3o** με χρήση ενός φυσικού Βαθέως Ευτηκτικού Διαλύτη, του L-προλίνη:γαλακτικό οξύ σε αναλογία 1:2, ο οποίος βρέθηκε ότι μπορεί να ανακτηθεί και να επαναχρησιμοποιηθεί έως και τρεις φορές επιφέροντας μικρή μείωση της απόδοσης.

Στη συνέχεια, υπολογίστηκαν οι πράσινοι δείκτες που έχουν προαναφερθεί και αξιολογήθηκαν ως προς τη συμβολή τους στην ανάπτυξη της πράσινης συνθετικής πορείας των δικουμαρινικών αναλόγων. Συμπεραίνεται πως δεν υφίσταται ένας μοναδικός δείκτης που να ενσωματώνει και να ποσοτικοποιεί όλες τις προϋποθέσεις της

Πράσινης Χημείας. Τα περισσότερα δικουμαρινικά ανάλογα παρουσιάζουν εξαιρετική οικονομία ατόμου ( 63.09 – 97.22%), ενώ για την ορθή μελέτη και ανάπτυξη μιας «πράσινης» συνθετικής πορείας απαιτείται η συνδυαστική αξιολόγηση πολλών πράσινων δεικτών.

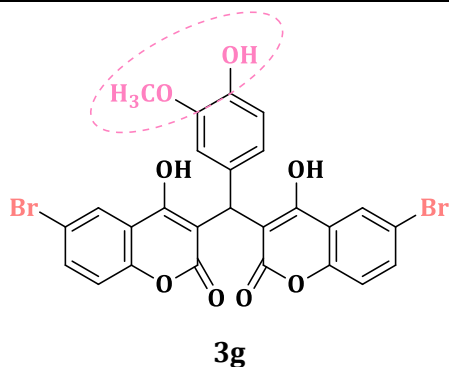
Όλα τα συντιθέμενα ανάλογα αξιολογήθηκαν *in vitro* για την αντιοξειδωτική τους δράση, τόσο για την ικανότητα δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH όσο και για την ικανότητα αναστολής της λιπιδικής υπεροξειδωσης που επάγεται από τον εκκινητή ελευθέρων ριζών 2,2'-αζωδις(2-αμιδινοπροπανίου)διϋδροχλωρίδιο, AAPH. Επιπρόσθετα, αξιολογήθηκαν για την ικανότητά τους να αναστέλλουν το ένζυμο της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE), ως ένδειξη δράσης κατά της νόσου του Αλτσχάιμερ.

Τα δικουμαρινικά ανάλογα επέδειξαν στην πλειοψηφία τους ισχυρή αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης, ενώ τα **3b**, **3k** και **3n** (Εικόνα 67) εμφανίζουν συνδυασμένη βιολογική δράση. Συγκεκριμένα, τα **3b** και **3k** εμφανίζουν εξαιρετική αντιοξειδωτική δράση τόσο όσον αφορά την ελεύθερη ρίζα DPPH όσο και όσον αφορά τη λιπιδική υπεροξειδωση (LP). Το δικουμαρινικό ανάλογο **3n** εμφανίζει εξαιρετική ανασταλτική δράση της λιπιδικής υπεροξειδωσης, ενώ εμφανίζει και ικανοποιητική ανασταλτική δράση κατά της AchE.

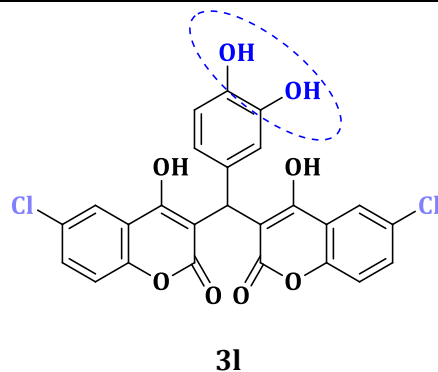


Εικόνα 67. Βιολογική δράση δικουμαρινικών αναλόγων **3b**, **3k** και **3n**

Τέλος, διαπιστώθηκε πως τα δικουμαρινικά ανάλογα **3g** και **3i** εμφανίζουν συνδυασμένη βιολογική δράση, καθώς έχουν τόσο αντιοξειδωτική δράση και στις δύο περιπτώσεις, όσο και ανασταλτική δράση του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση. Η ορθο-διυδροξυ-υποκατάσταση στο φαινολικό δακτύλιο της θέσης -1'' σε συνδυασμό με την ύπαρξη αλογόνου στις θέσεις -6 και -6' του κουμαρινικού σκελετού φαίνεται να ενισχύει και τις τρεις δράσεις που μελετήθηκαν (**3i**) (Εικόνα 68). Επιπρόσθετα, η m-μεθοξυ-p-υδροξυ-υποκατάσταση στο φαινολικό δακτύλιο σε συνδυασμό με τη βρωμο-υποκατάσταση στις θέσεις -6 και -6' του κουμαρινικού σκελετού ενισχύει και τις τρεις εξεταζόμενες δράσεις (**3g**) (Εικόνα 68).



- $IC_{50}=63.5\mu M$  (DPPH)
- 83.0% αναστολή LP
- $IC_{50}=81.5\mu M$  (AChE)



- $IC_{50}=12.7\mu M$  (DPPH)
- 82.2% αναστολή LP
- $IC_{50}=113.8\mu M$  (AChE)

---

Εικόνα 68. Βιολογική δράση δικουμαρινικών αναλόγων 3g και 3l

### Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη σύνθεση και τη μελέτη των νέων κουμαρινικών και δικουμαρινικών αναλόγων οδηγούν στην ανάγκη για περαιτέρω έρευνα της βιοδραστητικότητάς τους τόσο στις δράσεις που ήδη μελετήθηκαν όσο και σε διαφορετικές δράσεις όπως είναι η καρκινική και η αντιφλεγμονώδης δράση.

- Επικειμένη πρόταση αποτελεί η σύνθεση νέων δικουμαρινικών μορίων που να περιέχουν κατεχολικό σύστημα ή m-μεθοξυ-p-υδροξυ-υποκατάσταση στο φαινολικό

δακτύλιο της θέσης -1” αλλά διαφορετικές υποκαταστάσεις στον κουμαρινικό σκελετό, ώστε να εξακριβωθεί η σχέση δομής για την αντιοξειδωτική δράση.

- Τα δικουμαρινικά ανάλογα **31** και **3g**, που επέδειξαν αξιόλογη ανασταλτική δράση του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση, προτείνεται να αξιολογηθούν και ως προς την αναστολή του ενζύμου βουτυλοχολινεστεράση (BuChE) ώστε να εμφανίζουν μια συνδυασμένη δράση κατά της νόσου του Αλτσχάιμερ.
- Κρίνεται αναγκαία η *in silico* μελέτη της μοριακής πρόσδεσης των παραπάνω μορίων στο ενεργό κέντρο των προαναφερθέντων ενζύμων.
- Κρίνεται χρήσιμη η δομική τροποποίηση του κουμαρινικού σκελετού σε όλες τις θέσεις του κουμαρινικού σκελετού, εκτός από τη θέση -3 η οποία συντελεί στη σύνθεση του δικουμαρινικού αναλόγου, όπου θα μπορούσαν να εξαχθούν χρήσιμα και πιο ολοκληρωμένα συμπεράσματα για τη σχέση δομής-βιολογικής δράσης των δικουμαρινικών αναλόγων.
- Οι χλωρο- και βρωμο-υποκαταστάσεις ενίσχυσαν σημαντικά την λιπιδική υπεροξείδωση, με αποτέλεσμα να πρέπει να αξιολογηθεί και η συμβολή των υπόλοιπων αλογόνων στην εν λόγω δράση σε ίδια ή και διαφορετική υποκατάσταση στον κουμαρινικό σκελετό.
- Μελλοντική πρόταση αποτελεί η δοκιμή και αξιολόγηση διαφορετικών φυσικών ή συνθετικών Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών (NaDEs ή DES) ώστε να εξακριβωθεί η καταλληλότητά τους στη συγκεκριμένη συνθετική πορεία.
- Προτείνεται η μελέτη και αξιολόγηση της ανάκτησης και ανακυκλωσιμότητας του DES παραπάνω από τρεις φορές (δηλαδή από όσες εξετάστηκαν) ώστε να προσεγγίζεται μια ολοένα πιο φιλική προς το περιβάλλον μεθοδολογία σύνθεσης.
- Θεωρείται χρήσιμη η έρευνα και αξιολόγηση της ίδιας συνθετικής πορείας με χρήση υπερήχων ώστε να μειωθεί ο χρόνος σύνθεσης και η καταναλισκόμενη ενέργεια, αλλά και να αυξηθεί πιθανώς η αποδοτικότητά της. Με αυτό τον τρόπο, και σε συνδυασμό με τον υπολογισμό των πράσινων δεικτών, θα έχει πραγματοποιηθεί μια πολύπλευρη προσέγγιση των 12 «Αρχών» της Πράσινης Χημείας.
- Επικείμενη πρόταση στη μελέτη των διάφορων πράσινων δεικτών αποτελεί και η μελέτη του κόστους σύνθεσης καθώς μια πιθανή σπατάλη πρώτων υλών δεν ευνοεί την πράσινη συνθετική πορεία που επιδιώκεται να πραγματοποιηθεί.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Thakur A, Singla R, Jaitak V. Coumarins as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies. *Eur J Med Chem.* 2015;101:476-495. doi:10.1016/j.ejmech.2015.07.010
2. Matos MJ, Santana L, Uriarte E, Abreu OA. Coumarins — An Important Class of Phytochemicals.
3. Musa M, Cooperwood J, Khan MO. A Review of Coumarin Derivatives in Pharmacotherapy of Breast Cancer. *Curr Med Chem.* 2008;15(26):2664-2679. doi:10.2174/092986708786242877

4. Detsi A, Kontogiorgis C, Hadjipavlou-Litina D. Coumarin derivatives: an updated patent review (2015-2016). *Expert Opin Ther Pat.* 2017;27(11):1201-1226. doi:10.1080/13543776.2017.1360284
5. Stefanachi A, Leonetti F, Pisani L, et al. *Coumarin : A Natural , Privileged and Versatile Scaffold for Bioactive Compounds.*; 2018. doi:10.3390/molecules23020250
6. Teli P, Sethiya A, Agarwal S. An Insight View on Synthetic Protocol, Mechanistic and Biological Aspects of Biscoumarin Derivatives. *ChemistrySelect.* 2019;4(47):13772-13787. doi:10.1002/slct.201903632
7. Jain PK, Joshi H. Coumarin: Chemical and pharmacological profile. *J Appl Pharm Sci.* 2012;2(6):236-240. doi:10.7324/JAPS.2012.2643
8. Annunziata F, Pinna C, Dallavalle S, Tamborini L, Pinto A. An Overview of Coumarin as a Versatile and Readily Accessible Scaffold with Broad-Ranging Biological Activities. 2020;(Table 1).
9. Bogdal D. Coumarins: Fast Synthesis by Knoevenagel Condensation under Microwave Irradiation. *J Chem Res - Part S.* 1998;(8):468-469. doi:10.1039/a801724g
10. panelG.Z.FeuersteinR.R.RuffoloC.CoughlinJ.WangD.Miller. *Encyclopedia of Stress.* 2nd ed.; 2007.
11. Rohini K SP. Therapeutic Role of Coumarins and Coumarin-Related Compounds. *J Biofertilizers Biopestic.* 2014;05(01):5-7. doi:10.4172/2157-7544.1000130
12. Venugopala KN, Rashmi V, Odhav B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *Biomed Res Int.* 2013;2013(Table 1). doi:10.1155/2013/963248
13. Wu L, Wang X, Xu W, Farzaneh F, Xu R. The Structure and Pharmacological Functions of Coumarins and Their Derivatives. *Curr Med Chem.* 2009;16(32):4236-4260. doi:10.2174/092986709789578187
14. Al-majedy Y, Al-amiery A, Kadhum AA, Bakarmohamad A, Al-amiery A. Antioxidant Activity of Coumarins. 2017;8(1):24-30.
15. Jang MH, Piao XL, Kim JM, Kwon SW, Park JH. Inhibition of cholinesterase and amyloid- $\beta$  aggregation by resveratrol oligomers from *Vitis amurensis*. *Phyther Res.* 2008;22(4):544-549. doi:10.1002/ptr
16. Sahar A, Khan ZA, Ahmad M, Zahoor AF, Mansha A, Iqbal A. Synthesis and antioxidant potential of some biscoumarin derivatives. *Trop J Pharm Res.* 2017;16(1):203-210. doi:10.4314/tjpr.v16i1.27
17. Kostova I, Bhatia S, Grigorov P, et al. Coumarins as Antioxidants. *Curr Med Chem.* 2012;18(25):3929-3951. doi:10.2174/092986711803414395
18. Kavetsou E, Katopodi A, Argyri L, et al. Novel 3-aryl-5-substituted-coumarin analogues: Synthesis and bioactivity profile. *Drug Dev Res.* 2020;(December 2019):1-14. doi:10.1002/ddr.21639
19. Abd-Rabou AA, Ahmed HH. CS-PEG decorated PLGA nano-prototype for delivery of bioactive compounds: A novel approach for induction of apoptosis in HepG2

- cell line. *Adv Med Sci*. 2017;62(2):357-367. doi:10.1016/j.advms.2017.01.003
20. Marin E, Briceño MI, Caballero-George C. Critical evaluation of biodegradable polymers used in nanodrugs. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:3071-3091. doi:10.2147/IJN.S47186
  21. Leong TSH, Wooster TJ, Kentish SE, Ashokkumar M. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrason Sonochem*. 2009;16(6):721-727. doi:10.1016/j.ultsonch.2009.02.008
  22. Raj S, Jose S, Sumod US, Sabitha M. Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. *J Pharm Bioallied Sci*. 2012;4(3):186-193. doi:10.4103/0975-7406.99016
  23. Astray G, Gonzalez-Barreiro C, Mejuto JC, Rial-Otero R, Simal-Gándara J. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocoll*. 2009;23(7):1631-1640. doi:10.1016/j.foodhyd.2009.01.001
  24. Kaye PT, Musa MA. Application of Baylis-Hillman methodology in the synthesis of coumarin derivatives. *Synth Commun*. 2003;33(10):1755-1770. doi:10.1081/SCC-120018937
  25. Matos MJ, Vazquez-Rodriguez S, Santana L, et al. Synthesis and structure-activity relationships of novel amino/nitro substituted 3-aryl coumarins as antibacterial agents. *Molecules*. 2013;18(2):1394-1404. doi:10.3390/molecules18021394
  26. Li J, Meng JR, Qu D, et al. New biscoumarin and dihydropyran derivatives as antimicrobials. *Res Chem Intermed*. 2015;41(11):8257-8267. doi:10.1007/s11164-014-1889-x
  27. Studies of the Vitamin K. Published online 1986:193-215.
  28. Chang-Xiao SU, Mouscadet JF, Chiang CC, Tsai HJ, Hsu LY. HIV-1 integrase inhibition of biscoumarin analogues. *Chem Pharm Bull*. 2006;54(5):682-686. doi:10.1248/cpb.54.682
  29. Lee S, Sivakumar K, Shin WS, Xie F, Wang Q. Synthesis and anti-angiogenesis activity of coumarin derivatives. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2006;16(17):4596-4599. doi:10.1016/j.bmcl.2006.06.007
  30. Kim J, Park C, Ok T, et al. Discovery of 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones with inhibitory activity against HIV-1 replication. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2012;22(5):2119-2124. doi:10.1016/j.bmcl.2011.12.090
  31. Borges F, Roleira F, Milhazes N, Santana L, Uriarte E. Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity. *Curr Med Chem*. 2005;12(8):887-916. doi:10.2174/0929867053507315
  32. Mahmoodi NO, Pirbasti FG, Jalalifard Z. Recent Advances in the Synthesis of Biscoumarin Derivatives Nosrat O. Mahmoodi, . Published online 2018:1-12. doi:10.1002/jccs.201700363
  33. Perumalsamy H, Sankarapandian K, Kandaswamy N, Balusamy SR, Periyathambi D, Raveendiran N. Cellular effect of styrene substituted biscoumarin caused cellular apoptosis and cell cycle arrest in human breast cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2017;92(September):104-114. doi:10.1016/j.biocel.2017.09.019



34. Xin JJ, Li J, Zhang ZD, Hu X Bin, Li MK. Biscoumarin derivatives: Synthesis, crystal structure, theoretical studies and induced apoptosis activity on bladder urothelial cancer cell. *J Mol Struct.* 2015;1084:200-206. doi:10.1016/j.molstruc.2014.12.024
35. Karakaya S, Koca M, Sytar O, et al. Antioxidant and anticholinesterase potential of *Ferulago cassia* with further bio-guided isolation of active coumarin constituents. *South African J Bot.* 2019;121:536-542. doi:10.1016/j.sajb.2019.01.020
36. Anand P, Singh B, Singh N. Bioorganic & Medicinal Chemistry A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer ' s disease. *Bioorg Med Chem.* 2012;20(3):1175-1180. doi:10.1016/j.bmc.2011.12.042
37. Yao D, Wang J, Wang G, et al. Design, synthesis and biological evaluation of coumarin derivatives as novel acetylcholinesterase inhibitors that attenuate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Bioorg Chem.* 2016;68:112-123. doi:10.1016/j.bioorg.2016.07.013
38. Ibrar A, Shehzadi SA, Saeed F, Khan I. Developing hybrid molecule therapeutics for diverse enzyme inhibitory action: Active role of coumarin-based structural leads in drug discovery. *Bioorganic Med Chem.* 2018;26(13):3731-3762. doi:10.1016/j.bmc.2018.05.042
39. Xie SS, Wang XB, Li JY, Yang L, Kong LY. Design, synthesis and evaluation of novel tacrine-coumarin hybrids as multifunctional cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem.* 2013;64:540-553. doi:10.1016/j.ejmech.2013.03.051
40. Baruah P, Basumatary G, Yesylevskyy SO, Aguan K, Bez G, Mitra S. Novel coumarin derivatives as potent acetylcholinesterase inhibitors: insight into efficacy, mode and site of inhibition. *J Biomol Struct Dyn.* 2019;37(7):1750-1765. doi:10.1080/07391102.2018.1465853
41. Salar U, Nizamani A, Arshad F, et al. Bis-coumarins; non-cytotoxic selective urease inhibitors and antiglycation agents. *Bioorg Chem.* 2019;91(May):103170. doi:10.1016/j.bioorg.2019.103170
42. Khan KM, Rahim F, Wadood A, et al. Synthesis and molecular docking studies of potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitors based on biscoumarin skeleton. *Eur J Med Chem.* 2014;81:245-252. doi:10.1016/j.ejmech.2014.05.010
43. Khan KM, Iqbal S, Lodhi MA, et al. Biscoumarin: New class of urease inhibitors; Economical synthesis and activity. *Bioorganic Med Chem.* 2004;12(8):1963-1968. doi:10.1016/j.bmc.2004.01.010
44. Chand M. L UPINE PUBLISHERS Solvent Free Synthesis of Biscoumarins. 2018;2(3):204-207. doi:10.32474/AOICS.2018.02.000139
45. Synthesis of Furodiketochroman and bis-Furocoumarin Derivatives and their Biological Activity. 1988;11(2):87-92.
46. Manolov I, Maichle-Moessmer C, Nicolova I, Danchev N. Synthesis and anticoagulant activities of substituted 2,4-diketochromans, biscoumarins, and chromanocoumarins. *Arch Pharm (Weinheim).* 2006;339(6):319-326. doi:10.1002/ardp.200500149
47. Li MK, Li J, Liu BH, et al. Synthesis, crystal structures, and anti-drug-resistant *Staphylococcus aureus* activities of novel 4-hydroxycoumarin derivatives. *Eur J*

- Pharmacol.* 2013;721(1-3):151-157. doi:10.1016/j.ejphar.2013.09.040
48. Taha M, Ismail NH, Imran S, et al. Novel quinoline derivatives as potent in vitro  $\alpha$ -glucosidase inhibitors: In silico studies and SAR predictions. *Medchemcomm.* 2015;6(10):1826-1836. doi:10.1039/c5md00280j
  49. Choudhary MI, Fatima N, Khan KM, Jalil S, Iqbal S, Atta-ur-Rahman. New biscoumarin derivatives-cytotoxicity and enzyme inhibitory activities. *Bioorganic Med Chem.* 2006;14(23):8066-8072. doi:10.1016/j.bmc.2006.07.037
  50. Kim M, Jung Y, Kim I. Domino Knoevenagel condensation/intramolecular aldol cyclization route to diverse indolizines with densely functionalized pyridine units. *J Org Chem.* 2013;78(20):10395-10404. doi:10.1021/jo401801j
  51. Beurden K Van, Koning S De, Molendijk D, Van J. Green Chemistry Letters and Reviews The Knoevenagel reaction : a review of the unfinished treasure map to forming carbon – carbon bonds. Published online 2020. doi:10.1080/17518253.2020.1851398
  52. Cope AC. Condensation Reactions. I. The Condensation of Ketones with Cyanoacetic Esters and the Mechanism of the Knoevenagel Reaction. *J Am Chem Soc.* 1937;59(11):2327-2330. doi:10.1021/ja01290a068
  53. Ferroud D, Collard J, Klich M, et al. Synthesis and biological evaluation of coumarincarboxylic acids as inhibitors of gyrase B. L-rhamnose as an effective substitute for L-noviose. *Bioorganic Med Chem Lett.* 1999;9(19):2881-2886. doi:10.1016/S0960-894X(99)00493-X
  54. Bandgar BP, Uppalla LS, Kurule DS. Solvent-free one-pot rapid synthesis of 3-carboxycoumarins. *Green Chem.* 1999;1(5):243-245. doi:10.1039/a905811g
  55. Sandhu JS. Green Chemistry Letters and Reviews Knoevenagel reaction : alum-mediated efficient green condensation of active methylene compounds with arylaldehydes. 2009;8253. doi:10.1080/17518250903260925
  56. Daru J, Stirling A. Mechanism of the Pechmann reaction: A theoretical study. *J Org Chem.* 2011;76(21):8749-8755. doi:10.1021/jo201439u
  57. Robiette R, Richardson J, Aggarwal VK, Harvey JN. Reactivity and selectivity in the Wittig reaction: A computational study. *J Am Chem Soc.* 2006;128(7):2394-2409. doi:10.1021/ja056650q
  58. Ouellette RJ, Rawn JD. Aldehydes and Ketones: Nucleophilic Addition Reactions. *Org Chem.* Published online 2018:595-623. doi:10.1016/b978-0-12-812838-1.50020-7
  59. Dunn PJ. Green Chemistry themed issue The importance of Green Chemistry in Process Research and. 2012;(4). doi:10.1039/c1cs15041c
  60. PT Anastas JW. *Green Chemistry: Theory and Praxis.* Oxford University Press; 1998. [https://books.google.gr/books/about/Green\\_Chemistry.html?id=SrO8QgAACAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.gr/books/about/Green_Chemistry.html?id=SrO8QgAACAAJ&redir_esc=y)
  61. Lenoir D, Schramm KW, Lalah JO. Green Chemistry: Some important forerunners and current issues. *Sustain Chem Pharm.* 2020;18(August):100313. doi:10.1016/j.scp.2020.100313

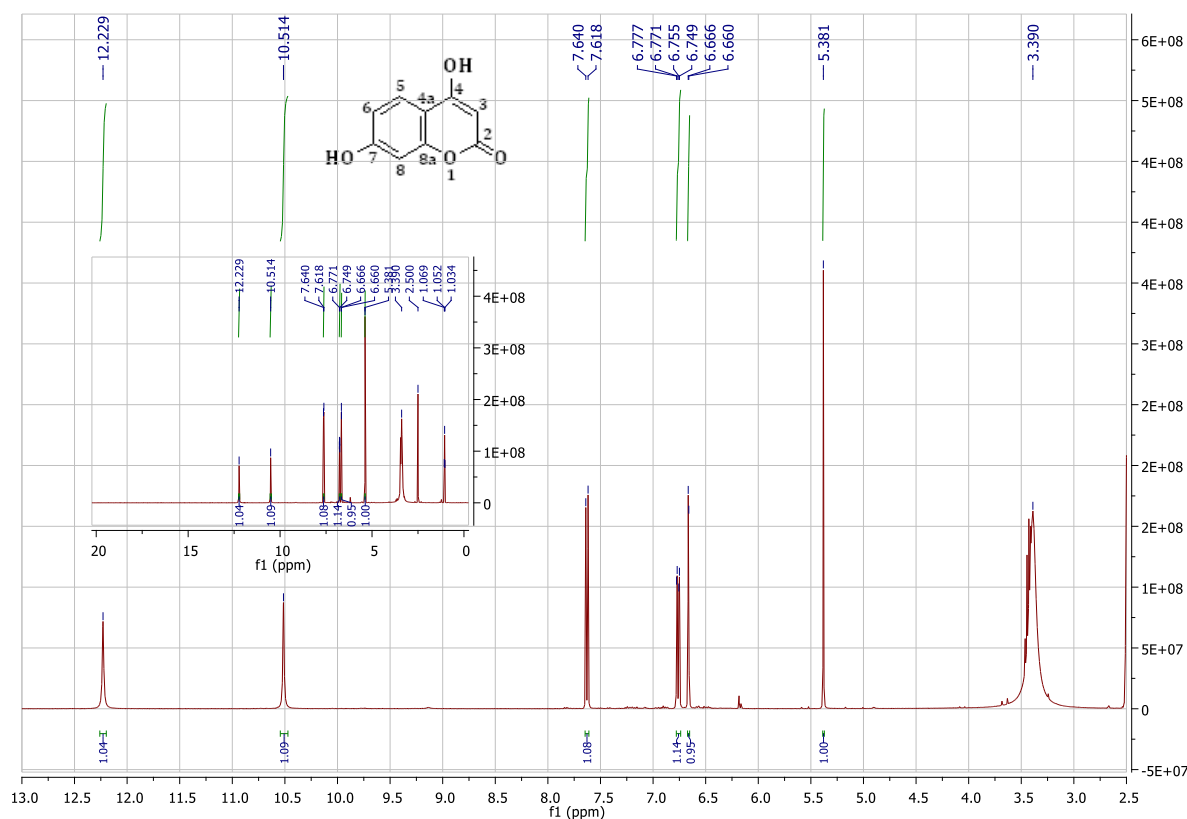
62. Singh SK, Savoy AW. Ionic liquids synthesis and applications: An overview. *J Mol Liq.* 2020;297:112038. doi:10.1016/j.molliq.2019.112038
63. Mohammad A, Inamuddin. *Green Solvents II: Properties and Applications of Ionic Liquids.*; 2012. doi:10.1007/978-94-007-2891-2
64. Smith EL, Abbott AP, Ryder KS. Deep Eutectic Solvents (DESS) and Their Applications. *Chem Rev.* 2014;114(21):11060-11082. doi:10.1021/cr300162p
65. Kalhor P, Ghandi K. Deep eutectic solvents for pretreatment, extraction, and catalysis of biomass and food waste. *Molecules.* 2019;24(22). doi:10.3390/molecules24224012
66. Hu HC, Liu YH, Li B Le, Cui ZS, Zhang ZH. Deep eutectic solvent based on choline chloride and malonic acid as an efficient and reusable catalytic system for one-pot synthesis of functionalized pyrroles. *RSC Adv.* 2015;5(10):7720-7728. doi:10.1039/c4ra13577f
67. Abbott AP, Boothby D, Capper G, Davies DL, Rasheed RK. Deep Eutectic Solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids. *J Am Chem Soc.* 2004;126(29):9142-9147. doi:10.1021/ja048266j
68. Paiva A, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis RL, Duarte ARC. Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century. *ACS Sustain Chem Eng.* 2014;2(5):1063-1071. doi:10.1021/sc500096j
69. Abbott AP, Capper G, Davies DL, Munro HL, Rasheed RK, Tambyrajah V. Preparation of novel, moisture-stable, lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains. *Chem Commun.* 2001;1(19):2010-2011. doi:10.1039/b106357j
70. Zhang Q, De Oliveira Vigier K, Royer S, Jérôme F. Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications. *Chem Soc Rev.* 2012;41(21):7108-7146. doi:10.1039/c2cs35178a
71. Anuradha Das RB. Dynamic Solvent Control of a Reaction in Ionic Deep Eutectic Solvents: Time Resolved Fluorescence Measurements of Reactive and Non-reactive Dynamics in (Choline Chloride+ Urea) Melts. *J Chem Inf Model.* 2019;53(9):1689-1699.
72. Nomura K, Terwilliger P. Self-dual Leonard pairs Use of deep eutectic solvents as catalyst : a. Published online 2019:355-372.
73. Abbott AP, Barron JC, Ryder KS, Wilson D. Eutectic-based ionic liquids with metal-containing anions and cations. *Chem - A Eur J.* 2007;13(22):6495-6501. doi:10.1002/chem.200601738
74. Abbott AP, Capper G, Gray S. Design of improved deep eutectic solvents using hole theory. *ChemPhysChem.* 2006;7(4):803-806. doi:10.1002/cphc.200500489
75. Zainal-abidin MH, Hayyan M, Hayyan A, Natesan JS. New Horizons in the Extraction of Bioactive Compounds using Deep Eutectic Solvents: A Review. *Anal Chim Acta.* Published online 2017. doi:10.1016/j.aca.2017.05.012
76. Mulyono S, Hizaddin HF, Alnashef IM, Hashim MA. Separation of BTEX aromatics from n-octane using a (tetrabutylammonium bromide + sulfolane) deep eutectic solvent – experiments and COSMO-RS prediction. Published online 2014:17597-

17606. doi:10.1039/c4ra01081g
77. Isaifan RJ, Amhamed A. Review on Carbon Dioxide Absorption by Choline Chloride / Urea Deep Eutectic Solvents. 2018;2018.
  78. Avalos M, Babiano R, Cintas P, Jiménez JL, Palacios JC. Greener media in chemical synthesis and processing. *Angew Chemie - Int Ed.* 2006;45(24):3904-3908. doi:10.1002/anie.200504285
  79. Tzani A, Vaitsis C, Kritsi E, et al. Green synthesis of bis-( $\beta$ -dicarbonyl)-methane derivatives and biological evaluation as putative anticandidal agents. *J Mol Struct.* 2020;1216:128276. doi:10.1016/j.molstruc.2020.128276
  80. Παπαγοποτλο ΓΑ, Δμπ Δ. ΠΡΑ Ξ INH ΥΗΜΔΙΑ ΚΑΙ ΜΗΥΑΝΙΚΗ Γιδακηκός Ξ ημειώζεις Μαθήμαχορ. Published online 2020.
  81. Tobiszewski M, Marć M, Gałuszka A, Namieśnik J. Green chemistry metrics with special reference to green analytical chemistry. *Molecules.* 2015;20(6):10928-10946. doi:10.3390/molecules200610928
  82. Constable DJC, Curzons AD, Cunningham VL. Metrics to “green” chemistry - Which are the best? *Green Chem.* 2002;4(6):521-527. doi:10.1039/b206169b
  83. Curzons AD, Constable DJC, Mortimer DN, Cunningham VL. So you think your process is green, how do you know? - Using principles of sustainability to determine what is green - A corporate perspective. *Green Chem.* 2001;3(1):1-6. doi:10.1039/b007871i
  84. Hudlicky T, Frey DA, Koroniak L, Claeboe CD, Larry E. Toward a ‘ reagent-free ’ synthesis. 1999;(April):57-59.
  85. Wilson K. R. A. Sheldon, I. Arends and U. Hanefeld. Green chemistry and catalysis. Wiley-VCH, 2007, 448 pp; ISBN 978-3-527-30715-9 (Hardcover). *Appl Organomet Chem.* 2007;21(11):1002-1002. doi:10.1002/aoc.1306
  86. Tickner JA, Becker M. Mainstreaming green chemistry: The need for metrics. *Curr Opin Green Sustain Chem.* 2016;1:1-4. doi:10.1016/j.cogsc.2016.07.002
  87. Roussaki M, Kontogiorgis CA, Hadjipavlou-Litina D, Hamilakis S, Detsi A. A novel synthesis of 3-aryl coumarins and evaluation of their antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2010;20(13):3889-3892. doi:10.1016/j.bmcl.2010.05.022
  88. Tzani A, Douka A, Papadopoulos A, Pavlatou EA, Voutsas E, Detsi A. Synthesis of biscoumarins using recyclable and biodegradable task-specific ionic liquids. *ACS Sustain Chem Eng.* 2013;1(9):1180-1185. doi:10.1021/sc4001093
  89. Srivastava S. Knoevenagel Condensation and Michael Addition in Bio-Renewable Deep Eutectic Solvent: Facile Synthesis of a Library of Bis-enol Derivatives. *ChemistrySelect.* 2020;5(2):799-803. doi:10.1002/slct.201904806
  90. Hemminga MA. Introduction to NMR. 1992;3(September):179-186.
  91. Kaliva M, Vamvakaki M. *Chapter 17 - Nanomaterials Characterization.* Elsevier Inc.; 2020. doi:10.1016/B978-0-12-816806-6.00017-0
  92. Παππά Α. “Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης, Χρωματογραφικές, Θερμικές,

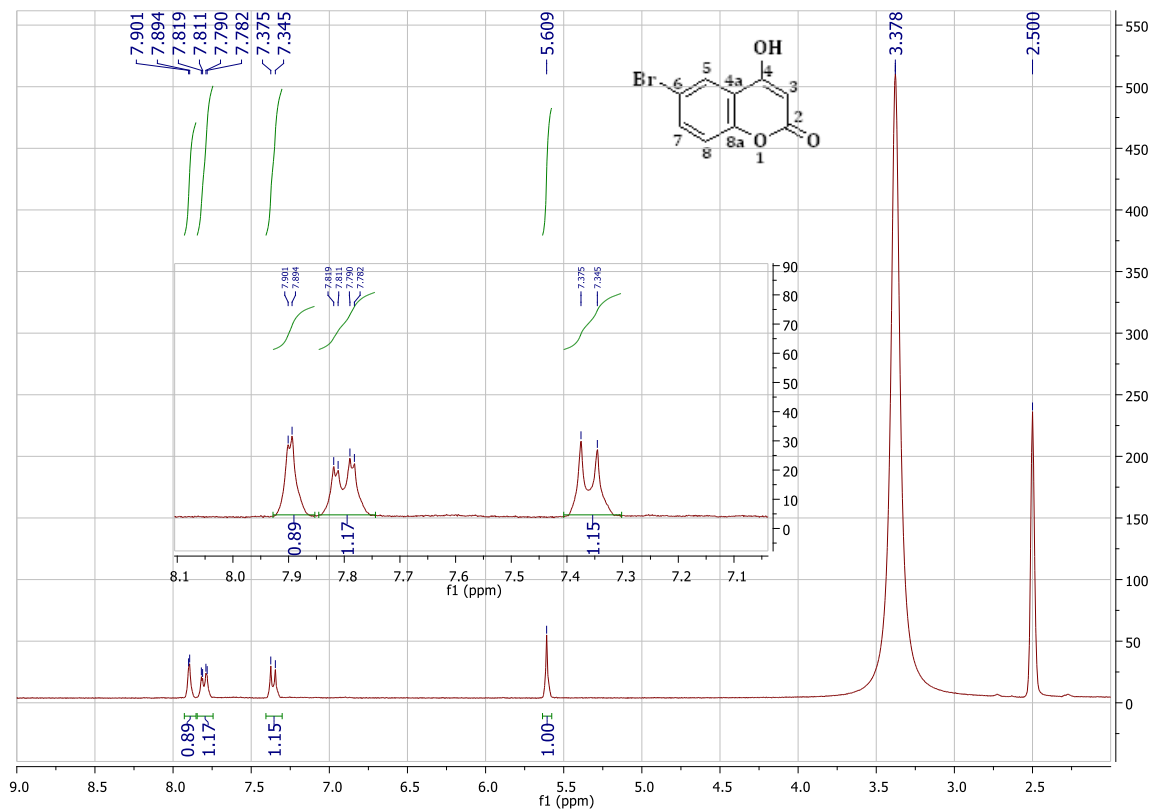
Ηλεκτρομετρικές, Φασματομετρίας Μάζας.” Εκδόσεις ΕΜΠ; 2004.

93. Tognarelli JM, Dawood M, Shariff MIF, et al. Magnetic Resonance Spectroscopy: Principles and Techniques: Lessons for Clinicians. *J Clin Exp Hepatol*. 2015;5(4):320-328. doi:10.1016/j.jceh.2015.10.006
94. Χατζηγιάννου Θ.Π. ΚΜΑ. *Ενόργανη Ανάλυση*. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών; 2003.
95. Santiago M, Strobel S. *Thin Layer Chromatography*. Vol 533. 1st ed. Elsevier Inc.; 2013. doi:10.1016/B978-0-12-420067-8.00024-6
96. Mura P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;101:238-250. doi:10.1016/j.jpba.2014.02.022

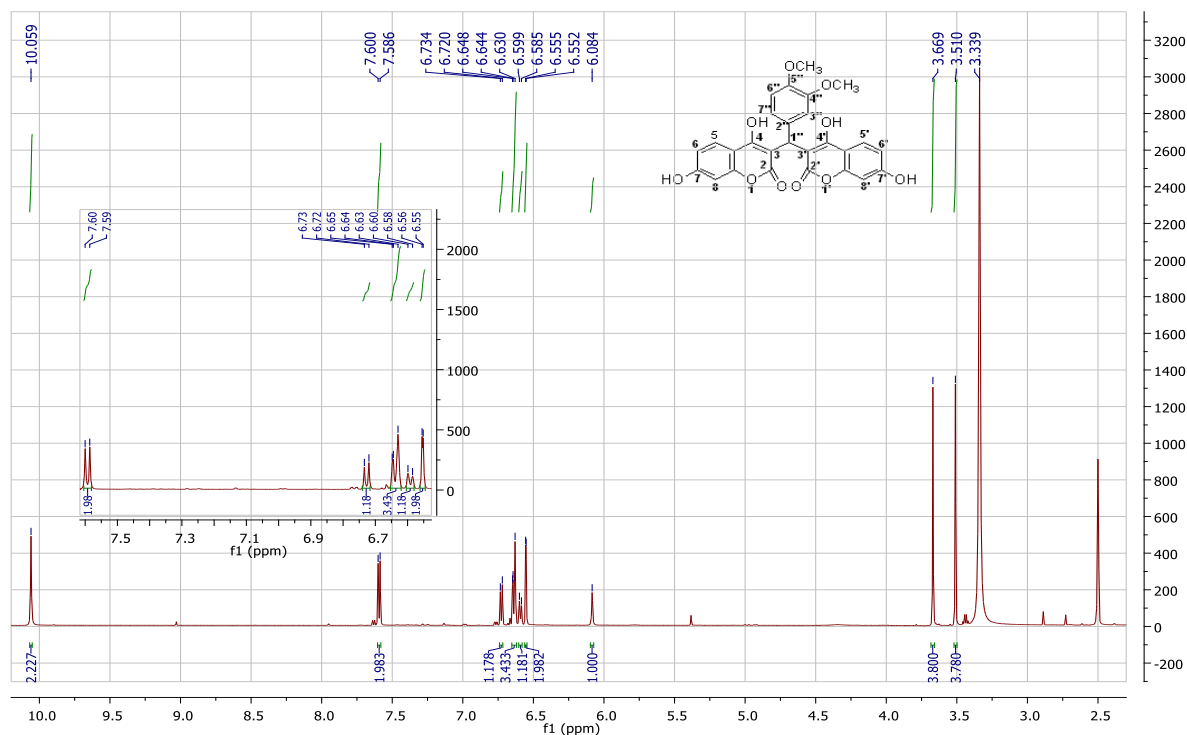
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΑΣΜΑΤΩΝ



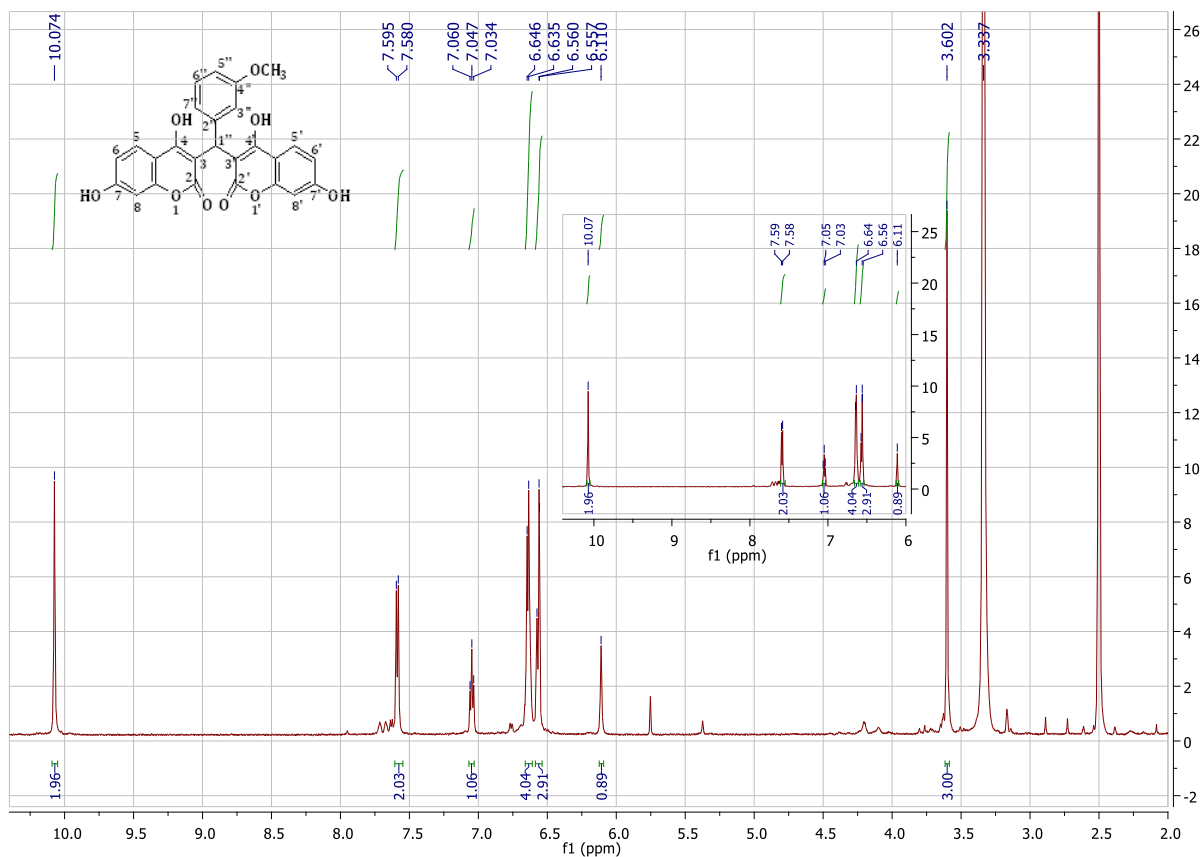
Εικόνα 69. <sup>1</sup>H NMR της 4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνης (1a)



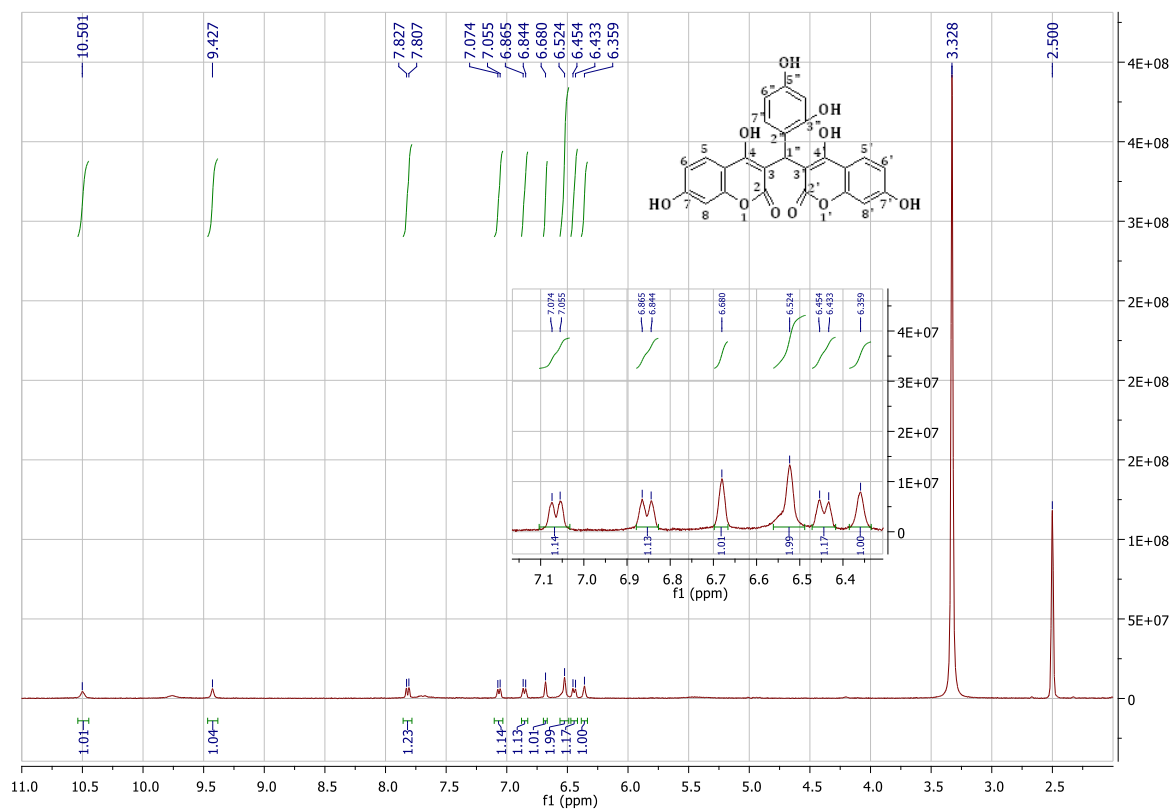
Εικόνα 70. <sup>1</sup>H NMR φάσμα της 6-βρωμο-4-υδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνης (2a)



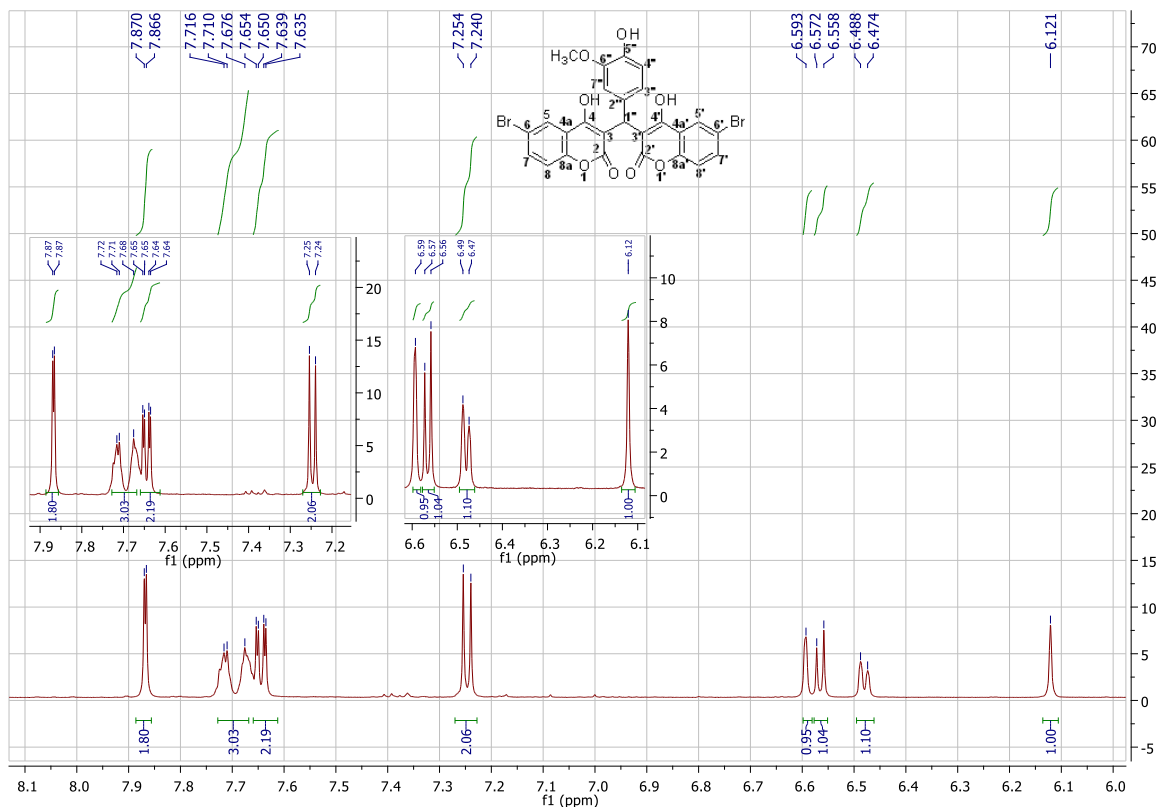
Εικόνα 71. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της 3,3'-(3,4-διμεθοξυ-φαιτυλομεθυλενο)-δι-(4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (3a)



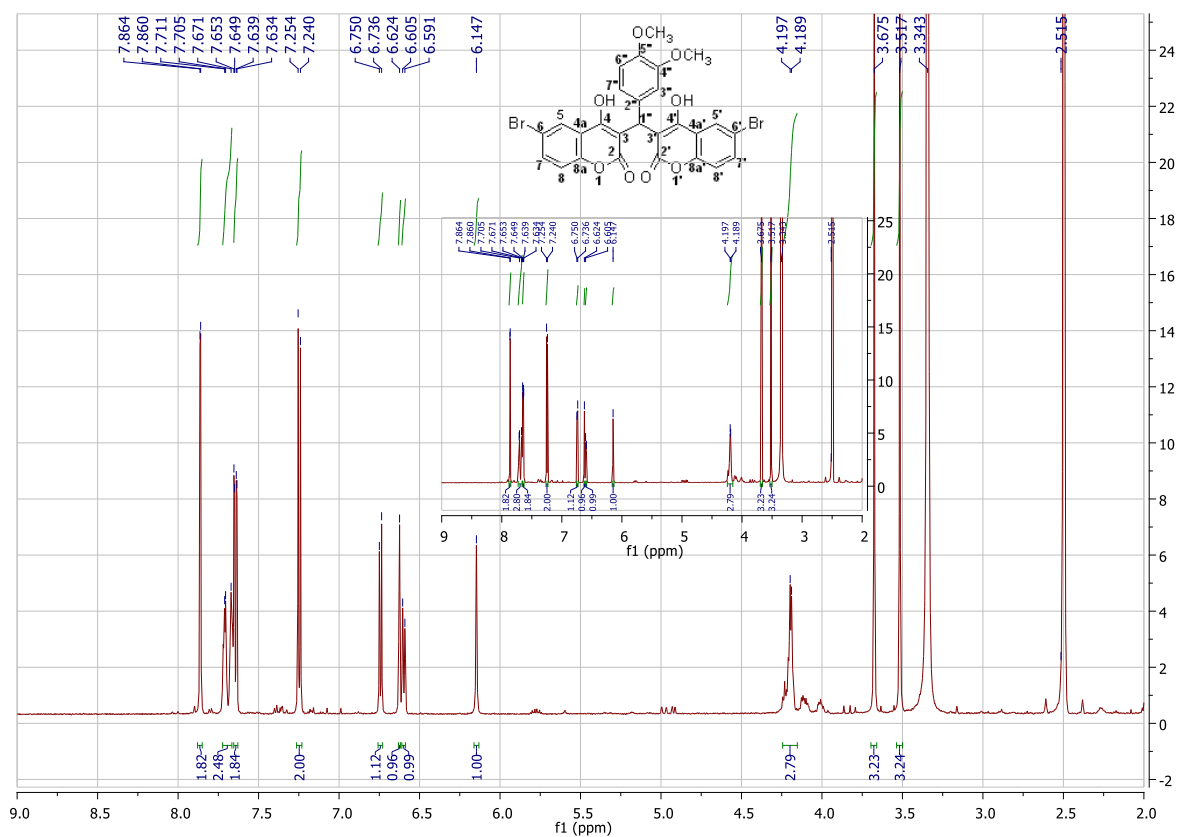
Εικόνα 72. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της 3,3'-(3-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (3c)



Εικόνα 73. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της 3,3'-(2,4-διυδροξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (3d)

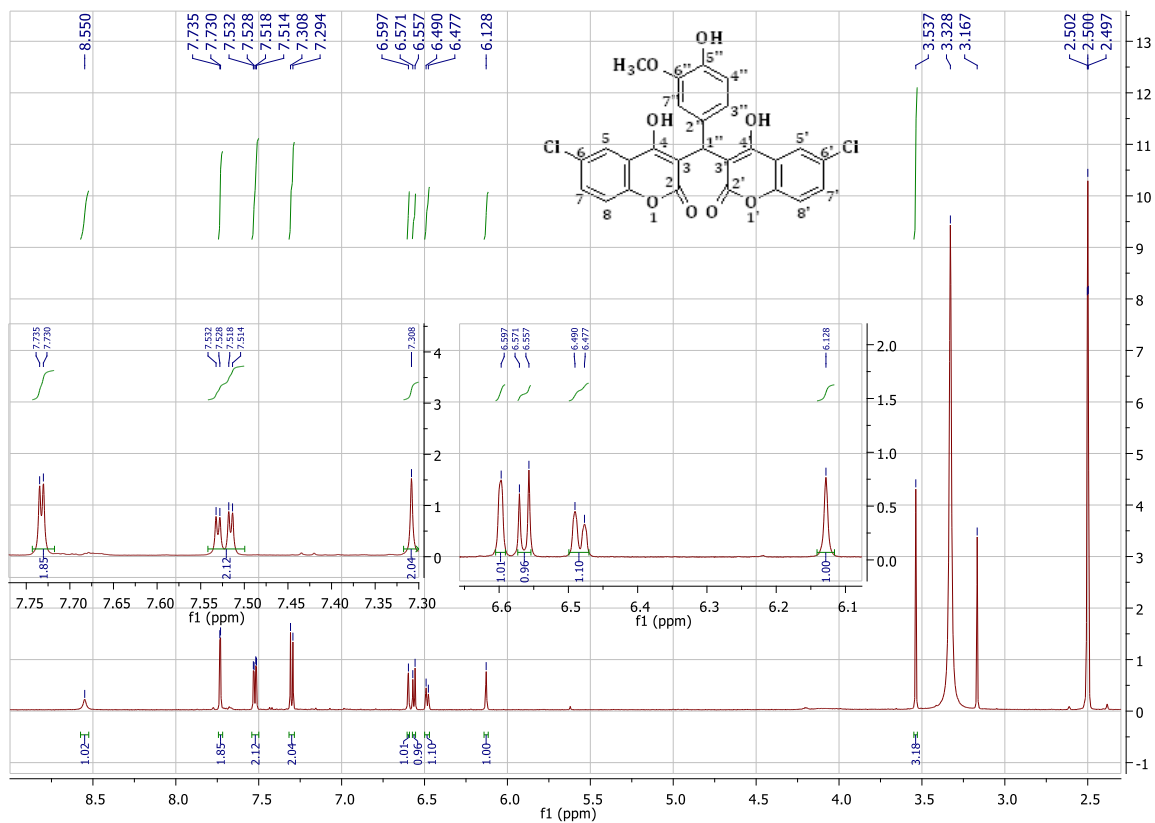


Εικόνα 74. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της 3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυ-φαιτυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-βρωμο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (3g)

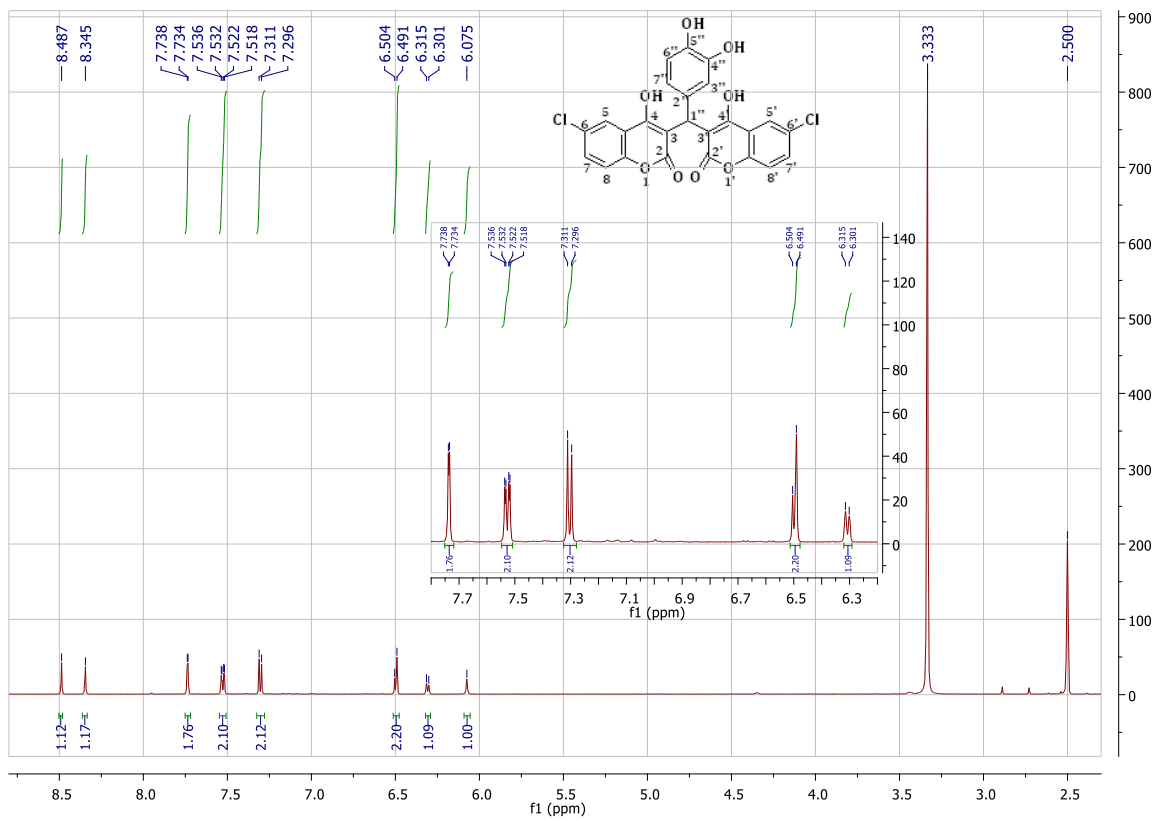


Εικόνα 75. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR της 3,3'-(3,4-διμεθοξυ-φαιτυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-βρωμο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (3h)

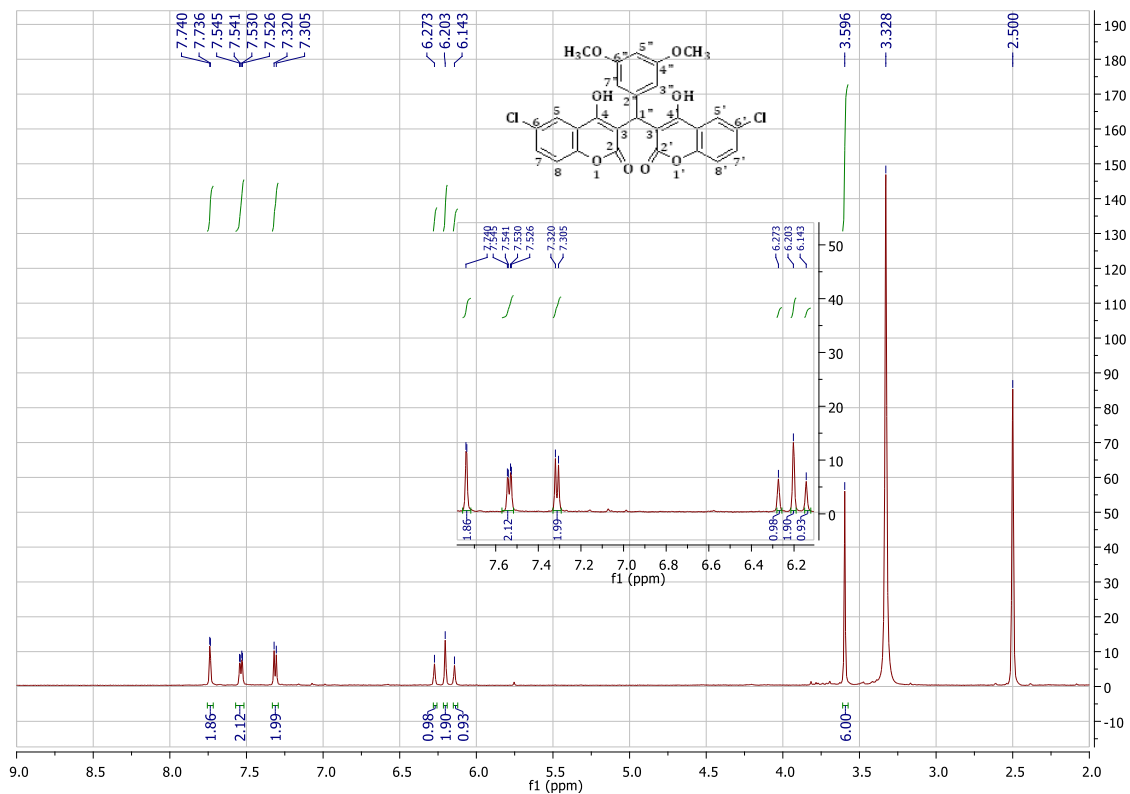




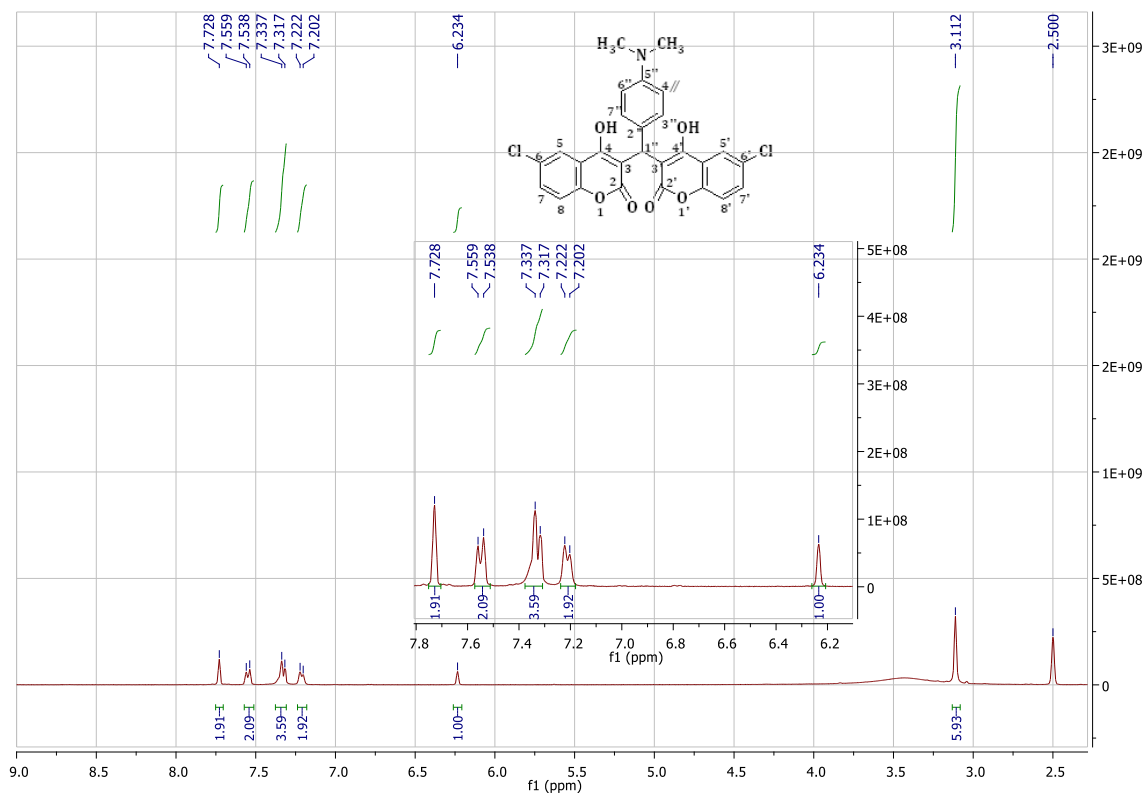
Εικόνα 76. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της 3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (3k)



Εικόνα 77. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της 3,3'-(3,4-διυδροξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (3l)



Εικόνα 78. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της 3,3'-(3,5-διμεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (3m)



Εικόνα 79. Φάσμα <sup>1</sup>H NMR της 3,3'-(παρα-διμεθυλ-αμινο-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (3n)

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 . Χημική δομή δικουμαρινικών αναλόγων 3g και 3l με συνδυασμένη βιολογική δράση.....	5
Εικόνα 2. α)Κανέλα, β)Tonka φασόλια, γ)λεβάντα, δ)φράουλα, ε) Φύλλα murraya paniculata, στ)Φρούτο Bael.....	12
Εικόνα 3. Χημική δομή απλής κουμαρίνης.....	12
Εικόνα 4. Κουμαρίνη και οι λειτουργικές ομάδες της.....	13
Εικόνα 5. Κουμαρίνες που συναντώνται στη φύση <sup>6</sup> .....	13
Εικόνα 6.Βασικές κατηγορίες κουμαρινών και η χημική δομή τους.....	14
Εικόνα 7. 4-υδροξυ-κουμαρίνη.....	15
Εικόνα 8. Κυριότερα χαρακτηριστικά απλών κουμαρινών.....	16
Εικόνα 9. Οσθόλη (osthole).....	17
Εικόνα 10. α) Εσκουλετίνη και β) Φραξίνη.....	17
Εικόνα 11. Κουμαρίνες feroniellamin <sup>15</sup> .....	18
Εικόνα 12. Δικουμαρινικά ανάλογα με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση.....	18
Εικόνα 13. Χημική δομή της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH.....	20
Εικόνα 14. Χημική δομή του εκκινητή ελευθέρων ριζών 2,2'-αζοδισ-(2-αμιδινοπροπανο)διϋδροχλώριο (AAPH).....	20
Εικόνα 15. α)Νοβοβιοκίνη, β)χλωροβιοκίνη.....	21
Εικόνα 16. Δικουμαρίνες με αντιμικροβιακή και αντιβακτηριδιακή δράση.....	22
Εικόνα 17. Βαρφαρίνη, το πιο ισχυρό αντιπηκτικό.....	23
Εικόνα 18. Ακενοκουμαρόλη, φαινοπρομόνη και δικουμαρόλη.....	23
Εικόνα 19. Κύκλος μετατροπής της βιταμίνης K.....	24
Εικόνα 20. Φυσική τετραμερής κουμαρίνη.....	25
Εικόνα 21. Κουμαρίνες calanolides-A και calanolides-B.....	25
Εικόνα 22. Δικουμαρίνη με ισχυρή αντι-HIV δράση.....	25
Εικόνα 23. α)gεiparvarin, β)ιμπερατορίνη, γ)οσθόλη, δ)7-υδροξυ-κουμαρίνη.....	27
Εικόνα 24. 6,7-διμεθυλο-κουμαρίνη.....	27
Εικόνα 25. α)3-(2-βρωμοφαινυλ)-4-μεθυλ-2-οξο-κουμαρίνη, β) 3-(4-βρωμοφαινυλο)-4-μεθυλο-2-οξο-κουμαρίνη.....	27
Εικόνα 26. Στυρενιο-υποκατεστημένη δικουμαρίνη.....	29
Εικόνα 27.Δικουμαρίνες με ισχυρή αντικαρκινική δράση.....	29
Εικόνα 28. Αναστολείς ακετυλοχολινεστεράσης ενσωματωμένοι σε φάρμακα κατά του Alzheimer.....	30
Εικόνα 29. Κουμαρινικά ανάλογα με αξιόλογη αναστολή AChE.....	31
Εικόνα 30. Κουμαρινικά ανάλογα με ανασταλτική δράση κατά της Ακετυλοχολινεστεράσης (AChE).....	31
Εικόνα 31. Δικουμαρίνες με ισχυρή ανασταλτική δράση ουρεάσης.....	32
Εικόνα 32. Δικουμαρόλη.....	32
Εικόνα 33. Φάρμακα με βάση σύνθεσης δικουμαρίνες <sup>6</sup> .....	33
Εικόνα 34.Προτεινόμενος μηχανισμός σύνθεσης κουμαρίνης μέσω αντίδρασης Pechman.....	36
Εικόνα 35. Μηχανισμός σύνθεσης δικουμαρίνης με χρήση Ιοντικών υγρών- ILs.....	39
Εικόνα 36. Χημική δομή αλάτων αλογονιδίου και δοτών δεσμού υδρογόνου για το σχηματισμό DES <sup>64</sup> .....	41
Εικόνα 37. Συντιθέμενα δικουμαρινικά ανάλογα με χρήση DES.....	44
Εικόνα 38. Μόρια οδηγία.....	48

Εικόνα 39. 3,3'-(3,4-διμεθοξυ-φαινυλομεθυλο)-δι-(4-υδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνη) ...	49
Εικόνα 40. Εναλλακτική πορεία σύνθεσης έναντι της χρήσης Ιοντικών Υγρών .....	49
Εικόνα 41. Ικανότητα ανακυκλωσιμότητας και επαναχρησιμοποίησης DES .....	50
Εικόνα 42. Μηχανισμός σύνθεσης δικουμαρινών με χρήση Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών (DES) .....	53
Εικόνα 43. Διάταξη Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού <sup>1</sup> H NMR....	54
Εικόνα 44. Δημιουργία μαγνητικής ροπής μ λόγω της περιστρεφόμενης κίνησης των ηλεκτρονίων <sup>90</sup> .....	55
Εικόνα 45. Διάταξη πρωτονίων σε σχέση με το μαγνητικό πεδίο B <sub>0</sub> και Ενεργειακή Διαφορά ΔΕ μεταξύ πυρήνων με παράλληλο και αντιπαράλληλο spin σε σχέση με το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο (B <sub>0</sub> ) .....	55
Εικόνα 46. Φαινόμενο spin spin συζεύξεως στο NMR.....	56
Εικόνα 47. Χημικές μετατοπίσεις των κυριότερων χαρακτηριστικών ομάδων στο φάσμα <sup>1</sup> H NMR.....	57
Εικόνα 48. Πορεία καθαρισμού του προϊόντος με χρωματογραφία στήλης .....	61
Εικόνα 49. Πορεία καθαρισμού προϊόντος .....	66
Εικόνα 50. Πορεία διαχωρισμού προϊόντος από ακαθαρσίες .....	69
Εικόνα 51. Πλακίδιο 96 θέσεων (96 well plate).....	73
Εικόνα 52. <sup>1</sup> H NMR της 4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνης (1a) .....	77
Εικόνα 53. <sup>1</sup> H NMR φάσμα της 6-βρωμο-4-υδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνης (2a) .....	78
Εικόνα 54. Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της 3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (DMSO) (3k).....	79
Εικόνα 55. Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της 3,3'-(3,4-διυδροξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (3l) .....	80
Εικόνα 56. Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της 3,3'-(παρα-διμεθυλ-αμινο-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (3n).....	81
Εικόνα 57. Χημική δομή της 3l.....	90
Εικόνα 58. Χημική δομή δικουμαρινικών αναλόγων 3b, 3g και 3k.....	90
Εικόνα 59. Χημική δομή ένωσης 1a .....	93
Εικόνα 60. Χημική δομή της 3n .....	94
Εικόνα 61. Χημική δομή δικουμαρινικών αναλόγων 3k, 3l και 3n.....	95
Εικόνα 62. Χημική δομή δικουμαρινικών αναλόγων 3a, 3b, 3d και 3f.....	95
Εικόνα 63. Χημική δομή δικουμαρινικών μορίων 3g και 3h.....	96
Εικόνα 64. Χημική δομή του δικουμαρινικού αναλόγου 3g.....	104
Εικόνα 65. Χημική δομή δικουμαρινικών αναλόγων 3l και 3n.....	105
Εικόνα 66. Σχηματικές πορείες σύνθεσης κουμαρινικών (1 & 2) και δικουμαρινικών αναλόγων (3).....	106
Εικόνα 67. Βιολογική δράση δικουμαρινικών αναλόγων 3b, 3k και 3n .....	107
Εικόνα 68. Βιολογική δράση δικουμαρινικών αναλόγων 3g και 3l .....	108
Εικόνα 69. <sup>1</sup> H NMR της 4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνης (1a) .....	116
Εικόνα 70. <sup>1</sup> H NMR φάσμα της 6-βρωμο-4-υδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνης (2a) .....	117
Εικόνα 71. Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της 3,3'-(3,4-διμεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4,7-διυδροξυ -2H-βενζοπυραν-2-όνης) (3a) .....	117
Εικόνα 72. Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της 3,3'-(3-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4,7-διυδροξυ -2H-βενζοπυραν-2-όνης) (3c) .....	118
Εικόνα 73. Φάσμα <sup>1</sup> H NMR της 3,3'-(2,4-διυδροξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4,7-διυδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (3d).....	118

Εικόνα 74. Φάσμα $^1\text{H}$ NMR της 3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-βρωμο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (3g).....	119
Εικόνα 75.Φάσμα $^1\text{H}$ NMR της 3,3'-(3,4-διμεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-βρωμο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (3h).....	119
Εικόνα 76.Φάσμα $^1\text{H}$ NMR της 3,3'-(4-υδροξυ-5-μεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (3k).....	120
Εικόνα 77.Φάσμα $^1\text{H}$ NMR της 3,3'-(3,4-διυδροξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (3l).....	120
Εικόνα 78.Φάσμα $^1\text{H}$ NMR της 3,3'-(3,5-διμεθοξυ-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (3m).....	121
Εικόνα 79.Φάσμα $^1\text{H}$ NMR της 3,3'-(παρα-διμεθυλ-αμινο-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-6-χλωρο-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (3n).....	121
Εικόνα 80.Φάσμα $^1\text{H}$ NMR της 3,3'-(2-αμινο-φαινυλομεθυλενο)-δι-(4-υδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνης) (3o).....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 2. Ταξινόμηση κουμαρινών και μερικά παραδείγματα <sup>2</sup> .....	15
Σχήμα 4. Αντίδραση Knoevenagel για τη σύνθεση κουμαρινών- Τροποποίηση Doebner <sup>31</sup> .....	34
Σχήμα 5.Τυπική αντίδραση σύνθεσης κουμαρινών Knoevenagel.....	34
Σχήμα 6. Αντίδραση Knoevenagel απουσία διαλύτη .....	34
Σχήμα 7. Αντίδραση Knoevenagel παρουσία 10 mol % στυπτηρίας (alum) .....	35
Σχήμα 8.Παράδειγμα αντίδρασης Perkin .....	35
Σχήμα 9. Σχηματική απεικόνιση αντίδρασης Witting <sup>24</sup> .....	37
Σχήμα 10.Γενική μορφή για την ταξινόμηση των DES .....	41
Σχήμα 11. Εφαρμογές και χρήσεις DES <sup>64,75-77</sup> .....	43
Σχήμα 12. Συνθετικές πορείες 4,7-διυδροξυ-κουμαρινών.....	51
Σχήμα 13. Συνθετική πορεία νέων 4-υδροξυ-κουμαρινών.....	51
Σχήμα 14. Συνθετική πορεία νέων 3,3-δι-(4-υδροξυ)κουμαρινών .....	52
Σχήμα 15. Συνθετική πορεία της 3,3'-(3,4-διμεθοξυ-φαινυλομεθυλο)-δι-(4-υδροξυ-2H-βενζοπυραν-2-όνης) .....	71

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Κουμαρίνες και η αντιμικροβιακή τους δράση <sup>12</sup> .....	21
Πίνακας 2.Κουμαρίνες και η αντικαρκινική τους δράση .....	28
Πίνακας 3. Μονοαλκυλίωση ανιλίνης με εξυλοβρωμίδιο <sup>64</sup> .....	43
Πίνακας 4. Κατάταξη χημικών αντιδράσεων με βάση την απόδοση τους.....	44
Πίνακας 5. Μελέτη συνθηκών αντίδρασης σύνθεσης της 4,7-διυδροξυ-κουμαρίνης .....	50
Πίνακας 6. Επαναληψιμότητα συνθετικής πορείας για έλεγχο της απόδοσης της και της ανάκτησης του DES.....	71
Πίνακας 7. Υλικά και όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της σταθερής ρίζας DPPH.....	72
Πίνακας 8. Υπολογισμός Πράσινων δεικτών των συντιθέμενων μορίων .....	83
Πίνακας 9. Υπολογισμός % Αποτελεσματικής Απόδοσης Μάζας.....	86
Πίνακας 10. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης (DPPH, AAPH) των νέων 4-υδροξυ-κουμαρινικών αναλόγων.....	86
Πίνακας 11. Αποτελέσματα πλατφόρμας "PharmMapper" ως προς το ένζυμο της ακετυλοχολινεστεράσης.....	97
Πίνακας 12. Ικανότητα αναστολής του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση (% 100μM) και υπολογισμός IC <sub>50</sub> (μM).....	100